



Σχολή Επιστημών Τροφίμων
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Πτυχιακή εργασία

Ανίχνευση-Ταυτοποίηση γονιδίων αντοχής *Klebsiella pneumoniae* σε τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης με μεθόδους μοριακής βιολογίας

Συγγραφείς: Θεοχαρίδη Νικολέττα-Αργυρώ 17198

Μπαλτά Ηλιάννα 17214

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Χούχουλα Δήμητρα

ΘΕΜΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ

«Ανίχνευση-Ταυτοποίηση γονιδίων αντοχής *Klebsiella pneumoniae* σε τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης με μεθόδους μοριακής βιολογίας»

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

01	ΧΟΥΧΟΥΛΑ ΔΗΜΗΤΡΑ	
02	ΜΠΑΤΡΙΝΟΥ ΑΝΘΙΜΙΑ	
03	ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΣ ΔΙΟΝΥΣΙΟΣ	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΩΝ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Θεοχαρίδη Νικολέττα-Αργυρώ του Θεοχάρη, με αριθμό μητρώου 17198 και η κάτωθι υπογεγραμμένη Μπαλτά Ηλιάννα του Δημητρίου, με αριθμό μητρώου 17214, φοιτήτριες του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνουμε υπεύθυνα ότι:

«Είμαστε συγγραφείς αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχαμε για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες κάναμε χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνουμε ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από εμάς αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μας, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μας ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μας».

Η Δηλούσα

Θεοχαρίδη Νικολέττα-Αργυρώ



Η Δηλούσα

Ηλιάννα Μπαλτά



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής ως πτυχιακή εργασία για στο Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων κατά την διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2021-2022.

Για την επιτυχή ολοκλήρωση της θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε την Δρ. ΧΟΥΧΟΥΛΑ ΔΗΜΗΤΡΑ για την συνεργασία της, τις υποδείξεις και την πολύτιμη καθοδήγηση και βοήθεια που μας πρόσφερε καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης αυτής της εργασίας.

Επίσης θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τους καθηγητές που συμμετέχουν στην τριμελή επιτροπή, την καθηγήτρια Δρ. ΜΠΑΤΡΙΝΟΥ ΑΝΘΙΜΙΑ και τον Δρ. ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟ ΔΙΟΝΥΣΗ για τον χρόνο που αφιέρωσαν στην ανάγνωση και παρουσίαση της διπλωματικής μας εργασίας.

Περίληψη

Η εμφάνιση ανθεκτικών στα αντιμικροβιακά στελεχών, όπως το *Klebsiella pneumoniae* στην στον κλάδο των τροφίμων είναι ανησυχητική. Ο στόχος αυτής της μελέτης ήταν να προσδιοριστεί η συχνότητα εμφάνισης του *Klebsiella pneumoniae* σε δείγματα τροφίμων. Το ποσοστό μόλυνσης στα τρόφιμα και τα χαρακτηριστικά των απομονώσεων *Klebsiella pneumoniae* ήταν το επίκεντρο της έρευνάς μας. Βρήκαμε και αξιολογήσαμε τα γονίδια αντοχής τους, που προσφέρουν ανθεκτικότητα. Το ZIBIO Nucleic Acids Isolation Kit (Μέθοδος Magnetic Beads) και ένας αυτόματος εξτράκτορας Zymbio EXM 3000, χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων από απομονωμένες αποικίες. Τα δείγματα DNA χωρίστηκαν σε πέντε τμήματα για την ταυτοποίηση των γονιδίων *E. coli*, των γονιδίων *mrkA*, *escA* και *fimH* και των γονιδίων αντίστασης σε δείγματα κρέατος *Klebsiella pneumoniae* (χοιρινό, βοοειδή και κοτόπουλο). Τα δείγματα περιλάμβαναν 20 (50%) δείγματα βοείου κρέατος, 10 (25%) δείγματα κρέατος από χοιρινό και 10 (25%) δείγματα από κοτόπουλο. Τα ευρήματά μας παρουσίασαν υψηλή συχνότητα εμφάνισης *Klebsiella pneumoniae* (82,5%), ενώ τα στελέχη *E.coli* βρέθηκαν σε χαμηλότερο ποσοστό (17,5%). Επιπλέον, τα γονίδια *fimH-1* και *mrkA*, τα οποία κωδικοποιούν προσκολλητίνες fimbrial τύπου 1 και τύπου 3, βρέθηκαν σε 6 (18,2%) και 24 (72,8%) από τις απομονώσεις, αντίστοιχα. Στην περίπτωση της τροφιμογενούς *Klebsiella pneumoniae*, ανακαλύφθηκε τουλάχιστον ένα γονίδιο αντίστασης σε ποσοστό 62,5% των απομονώσεων. Το γονίδιο *blaNDM*, το οποίο είχε γονοτυπική συχνότητα 51,5% (17/33), ακολουθούμενο από το *blaOXA-48*, το οποίο είχε γονοτυπική συχνότητα 27,3 % (9/33), το *blaIMP*, το οποίο είχε γονοτυπική συχνότητα 6,1 % (2/33), το *blaVIM*, που είχε γονοτυπική συχνότητα 6,1 % (2/33) και το *blaKPC*, που είχε την ίδια γονοτυπική συχνότητα.

ABSTRACT

The emergence of antimicrobial resistant strains, such as *Klebsiella pneumoniae* in the food industry is worrying. The aim of this study was to determine the incidence of *Klebsiella pneumoniae* in food samples. The rate of food contamination and the characteristics of *Klebsiella pneumoniae* isolates were the focus of our research. We found and evaluated their resistance genes which offer durable properties. The ZIBIO Nucleic Acids Isolation Kit (Magnetic Beads Method) and a Zymbio EXM 3000 automatic extractor were used to extract nucleic acids from isolated colonies. DNA samples were divided into five sections to identify *E. coli* genes, *mrkA*, *ecpA* and *fimH* genes and the resistance genes in meat samples *Klebsiella pneumoniae* (pork, bovine and chicken). Samples included 20 (50%) samples of beef, 10 (25%) samples of pork and 10 (25%) samples of chicken. Our findings showed a high incidence of *Klebsiella pneumoniae* (82.5%), while *E.coli* strains were found at a lower rate (17.5%). In addition, the *fimH*-1 and *mrkA* genes, which encode type 1 and type 3 fimbrial adhesions, were found in 6 (18,2%) and 24 (72,8%) of the isolates, respectively. In the case of food-borne *Klebsiella pneumoniae*, at least one resistance gene was detected in 62.5% of the isolates. The NDM gene had a genotypic frequency of 51,5% (17/33), followed by *blaOXA-48*, which had a genotypic frequency of 27,3% (9/33), and *blaIMP*, which had a genotypic frequency of 6,1% (2/33), *blaVIM*, which had a genotype frequency of 6,1% (2/33) and *blaKPC*, which had the same genotype frequency.

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
Περίληψη.....	4
ABSTRACT	5
Περιεχόμενα εικόνων	7
Περιεχόμενα πινάκων.....	8
Περιεχόμενα διαγραμμάτων	8
1. Εισαγωγή.....	9
2. Σκοπός.....	10
3. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	11
3.1 Γενικά.....	11
3.2 Γονίδια αντοχής.....	13
ΓΟΝΙΔΙΟ KPC	14
ΓΟΝΙΔΙΟ VIM	15
ΓΟΝΙΔΙΟ NDM.....	16
ΓΟΝΙΔΙΟ IMP.....	17
ΓΟΝΙΔΙΟ OXA-48.....	18
ΓΟΝΙΔΙΟ EcpA.....	19
ΓΟΝΙΔΙΟ MrkA	19
ΓΟΝΙΔΙΟ FimH	19
3.3 Έρευνες ανίχνευσης γονιδίων	20
4. Υλικά και μέθοδοι	24
4.1 Συσκευές.....	24
4.2 Υλικά.....	24
4.3 Διαλύματα	25
4.4 Συλλογή δειγμάτων	27
4.5 Αναλυτικά η διαδικασία του πειράματος	28
4.6 Απομόνωση DNA.....	31
4.6.1 Αναλυτικά η διαδικασία της απομόνωσης με Monarch Nucleic Acid Purification Kit.....	31
4.6.2 Αναλυτικά η διαδικασία της απομόνωσης με τη μέθοδο Magnetic beads (Μαγνητικών σφαιριδίων).....	33
4.7 Μέθοδος PCR.....	35

4.7.1 Προετοιμασία δειγμάτων PCR:	36
4.7.2 Στάδια κάθε κύκλου:	37
4.8 Ταυτοποίηση στελεχών με PCR.....	39
4.8.1 Επιβεβαίωση E. coli με PCR.....	39
4.8.2 Επιβεβαίωση K. pneumoniae με PCR.....	39
4.8.3 Ανίχνευση των γονιδίων ecpA, fimH και mrkA με Multiplex PCR	40
4.8.4 Ανίχνευση των γονιδίων αντοχής blaKPC, blaNDM, blaVIM, bla IMP και blaOXA-48 από διαφορετικές αναλύσεις Multiplex PCR.....	40
4.9 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης	41
4.9.1 Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης.....	41
4.9.2 Ηλεκτροφόρηση	42
4.10 Επαλήθευση αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης με τρυβλία CHROMagar KPC.	45
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	46
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	47
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	48
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	49

Περιεχόμενα εικόνων

Εικόνα 1 Φυγόκεντρος(Thermo Scientific TM).....	25
Εικόνα 2 Vortex(Biosan).....	26
Εικόνα 3 Αναλυτικός ζυγός(Precisa).....	26
Εικόνα 4 Θερμομπλόκ(Artiglass).....	26
Εικόνα 5 Τρυβλίο C.E.C.C το δείγμα 15 είναι θετικό σε Klebsiella ενώ το δείγμα 16 είναι θετικό σε E.Coli.....	27
Εικόνα 6 Ροζ αποικίες σε τρυβλίο C.E.C.C Θετικό σε Klebsiella	30
Εικόνα 7 Μπλε αποικίες σε τρυβλίο orient θετικό σε Klebsiella	30
Εικόνα 8 Μπλε αποικίες σε τρυβλίο C.E.C.C θετικό σε E.Coli.....	30
Εικόνα 9 Ροζ αποικίες σε τρυβλίο Orient θετικό σε E.Coli.....	30
Εικόνα 10 Μηχάνημα απομόνωσης ZIBIO EXM 3000.....	34
Εικόνα 11 Θερμικός κυκλοποιητής (Applied Biosystems)	37
Εικόνα 12 Ηλεκτροφόρηση με γονίδια OXA-IMP(281-139bp) σε πηκτή αγαρόζης 2,2%	43
Εικόνα 13 Συσκευή ηλεκτροφόρησης(Cleaver Scientific).....	44
Εικόνα 14 Τροφοδοτικό ηλεκτροφόρησης(Major Science)	44
Εικόνα 15 Συσκευή με λάμπα UV(Bio Imaging Systems).....	44
Εικόνα 16 Ο ροζ χρωματισμός που παρατηρείται στην αριστερή πλευρά του τρυβλίου οφείλεται σε χρωστική.	45

Περιεχόμενα πινάκων

Πίνακας 1 Μέθοδος PCR	35
Πίνακας 2.Αλληλουχίες εκκινητών	38
Πίνακας 3 Παρασκευή πηκτής αγαρόζης 2.2 και 3.3%	42

Περιεχόμενα διαγραμμάτων

Διάγραμμα ροής 1	29
------------------------	----

1. Εισαγωγή

Στην παρούσα μελέτη, μας απασχόλησε η διερεύνηση των γονιδίων αντοχής του *Klebsiella pneumoniae* σε ωμά τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Η μικροβιακή αντοχή (AMR) είναι ένα παγκόσμιο πρόβλημα δημόσιας υγείας, που εμποδίζει την θεραπεία και εξάλειψη ενός αυξανόμενου αριθμού βακτηριακών, μυκητιακών και ιογενών λοιμώξεων. Υπάρχουν πολλά βακτηριακά είδη που μολύνουν τα προϊόντα κρέατος, όμως τα πιο διαδεδομένα τροφιμογενή βακτηριακά παθογόνα είναι η *Klebsiella pneumoniae*, η *Listeria monocytogenes*, η *Salmonella enterica*, τα είδη *Campylobacter* και η *Escherichia coli*. Σήμερα, η *E. coli*, τα είδη *Enterococcus* και το *Clostridium* μπορούν επίσης να μεταδοθούν από τα ζώα διατροφής στον άνθρωπο μέσω του κρέατος λιανικής. Επιπλέον, η αντοχή στα αντιβιοτικά έχει αυξηθεί μεταξύ των Εντεροβακτηριδίων που μολύνουν τα κρέατα λιανικής, ιδιαίτερα τα προϊόντα πουλερικών. (Gregg S. Davis et al.)

Το ποσοστό θνησιμότητας των ασθενών από σηψαιμία που προκαλείται από ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια είναι πολύ υψηλό. Η ταχεία ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών ευνοείται από τη μαζική και την κακή χρήση αντιβιοτικών ευρέως φάσματος. Τα γονίδια ανθεκτικότητας μπορούν επίσης να εξαπλωθούν μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών βακτηρίων μέσω οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς (HGT) κινητών γενετικών στοιχείων (MGE), διευκολύνοντας την εξέγερση ανθεκτικών σε πολλά φάρμακα στελεχών. Σύμφωνα με το παγκόσμιο σχέδιο δράσης κατά της μικροβιακής αντοχής του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ), τα τρόφιμα αποτελούν πιθανό φορέα μετάδοσης ανθεκτικών στα αντιμικροβιακά βακτηρίων στον άνθρωπο και η κατανάλωση τέτοιων τροφίμων από τον άνθρωπο έχει ως αποτέλεσμα η απόκτηση ανθεκτικών στα αντιβιοτικά λοιμώξεων. Κατά την ταξινόμηση των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες και στις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς εντεροβακτηριδίων, στα οποία συγκαταλέγεται και το *K. Pneumoniae*, ο ΠΟΥ θέτει τους μικροοργανισμούς αυτούς ως κρίσιμης προτεραιότητας παθογόνα στη λίστα των μη ευαίσθητων στα αντιβιοτικά βακτηρίων που χρειάζονται νέες θεραπείες. (Sri Harminda Pahm Hartantyo et al.)

Στη Σιγκαπούρη, παρόλο που περισσότερο από το 90% των τροφίμων είναι εισαγόμενα, τα δεδομένα σχετικά με τα ποσοστά επικράτησης *Klebsiella pneumoniae* και άλλων βακτηρίων που είναι γνωστό ότι έχουν αντοχή στα αντιβιοτικά στα τρόφιμα λιανικής, καθώς και τα προφίλ αυτών και τα χαρακτηριστικά λοιμογόνου δράσης τους είναι σπάνια, γεγονός που καθιστά δύσκολο τον προσδιορισμό των κινδύνων της τροφιμογενούς *Klebsiella pneumoniae* για τη δημόσια υγεία. Στην Ελλάδα, δεν υπάρχουν επίσης διαθέσιμα στοιχεία επίπτωσης της νόσου που σχετίζεται με την *Klebsiella pneumoniae*. Έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες στα

ελληνικά νοσοκομεία για το προφίλ και τα χαρακτηριστικά των μη ευαίσθητων κλινικών στελεχών, το ίδιο όμως δεν ισχύει για την τροφιμογενή *Klebsiella pneumoniae*. Η έρευνα μας έδειξε σημαντική παρουσία *Klebsiella pneumoniae* κυρίως στο βοδινό κρέας.

Μια μελέτη σχετικά με πιθανά συμβάντα μετάδοσης *Klebsiella pneumoniae* στην Αυστραλία διαπίστωσε ότι το 48 % (13 από 27) των ασθενών στη μονάδα εντατικής θεραπείας εμφάνισαν αποικισμό του εντέρου πριν από τη μόλυνση. Σύμφωνα με αρκετές έρευνες, τα γεωγραφικά πρότυπα κατανομής των λοιμωδών υποομάδων *Klebsiella pneumoniae* μπορεί να παίζουν ρόλο στην εξέλιξη της αντοχής της, ωστόσο οι πηγές και οι μηχανισμοί μετάδοσης του *Klebsiella pneumoniae* είναι άγνωστες. Το φαγητό μπορεί να θεωρηθεί ως πιθανός παράγοντας μέσω του οποίου η λοιμώδης *Klebsiella pneumoniae* θα μπορούσε να φτάσει στο γαστρεντερικό σωλήνα, επειδή οι λοιμώξεις από *Klebsiella pneumoniae* προηγούνται από αποικισμό του γαστρεντερικού σωλήνα και η μικροχλωρίδα των τροφίμων συμβάλλει στο μικροβίωμα του εντέρου. Ο πολλαπλασιασμός μεταδοτικών πλασμιδίων που φέρουν επίσης μολυσματικά γονίδια υποστηρίζεται ότι συνδέεται με την ανθεκτικότητα στα φάρμακα και η απόκτηση ανθεκτικών παραγόντων μπορεί να βοηθήσει τα λοιμογόνα μικρόβια να επιμείνουν. Το *Klebsiella pneumoniae*, ειδικά όταν ανακτάται από μαγειρεμένο φαγητό, μπορεί να είναι ενδεικτικό ανθυγιεινών πρακτικών χειρισμού τροφίμων, ακατάλληλου μαγειρέματος ή μόλυνσης μετά το μαγείρεμα. Το *Klebsiella pneumoniae* βρίσκεται επίσης στο έδαφος και στη γεωργία. Επειδή έχει αποδειχθεί ότι ενισχύει την απόδοση των καλλιεργειών σε γεωργικές καταστάσεις, το *Klebsiella pneumoniae* παρουσιάζει γεωργικό ενδιαφέρον.

2. Σκοπός

Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν αρχικά η αξιολόγηση της συχνότητας του *Klebsiella pneumoniae* σε ελληνικά δείγματα κρέατος από διαφορετικές τοπικές αγορές καθώς και ο περαιτέρω χαρακτηρισμός των γονιδίων της μικροβιακής αντοχής τους, ως πρώτη προσπάθεια εξάπλωσης του *Klebsiella pneumoniae*.

Τέλος, έπειτα από την κατάλληλη βιβλιογραφική έρευνα, εκτελέστηκε σύγκριση μεταξύ των αποτελεσμάτων των πειραμάτων μας σε σχέση με πειράματα που έχουν πραγματοποιήσει επιστήμονες του εξωτερικού.

3. *Klebsiella pneumoniae*

3.1 Γενικά

Το γένος *Klebsiella* ανήκει στην οικογένεια των *Enterobacteriaceae*. Το *K. pneumoniae*, είναι ένα παθογόνο βακτήριο των ανθρώπων και των κατοικίδιων ζώων και μια κοινή μόλυνση του κρέατος λιανικής. Βρίσκεται στο γαστρεντερικό σωλήνα, στο νερό και το φαγητό. Έχει επίσης αναφερθεί ότι είναι ένας πιθανός φορέας μετάδοσης, αν και γενικά δεν αναγνωρίζεται ως τροφιμογενής παθογόνος παράγοντας, σε διάφορες μικροβιολογικές κόγχες όπως το έδαφος, το δέρμα, τα έντερα και περιττώματα θηλαστικών και το φαγητό. Μια πρόσφατη αναφορά έδειξε ότι ο τροφιμογενής *Klebsiella pneumoniae* θα μπορούσε να προκαλέσει νοσοκομειακή εστία μόλυνσης. Από όσο γνωρίζουμε, υπάρχουν σπάνιες πληροφορίες σχετικά με την παρουσία των υψηλής αντοχής στελεχών όπως ο *Klebsiella pneumoniae* σε δείγματα κρέατος που προορίζονται για κατανάλωση μέσω αλυσίδων αγοράς στην Ελλάδα.

Στους ανθρώπους, ο *K. pneumoniae* αποικίζει συχνότερα το έντερο ενώ μπορεί να εντοπιστούν και σποραδικά εξωεντερικές λοιμώξεις. Αν και είναι ευρέως γνωστό για την ικανότητά του να προκαλεί πνευμονία, μπορεί επίσης να προκαλέσει λοίμωξη του ουροποιητικού συστήματος, κυστίτιδα, πυελονεφρίτιδα, οστεομυελίτιδα, μηνιγγίτιδα, βακτηριαμία, λοιμώξεις τραυμάτων έως και σηψαιμία. Η γαστρεντερική μεταφορά του *Klebsiella pneumoniae* έχει αναφερθεί ότι είναι ένας παράγοντας για ηπατικό απόστημα. (Gregg S. Davis et al.)

Αυτό το βακτήριο συνδέεται συχνά με νοσοκομειακές λοιμώξεις στα νοσοκομεία, αντιπροσωπεύοντας το 14% των λοιμώξεων στις μονάδες εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ) με υψηλά ποσοστά νοσηρότητας και θνησιμότητας (50%). (Vanessa PP Alonso et al.) Επιπλέον, η αυξανόμενη αντοχή σε πολλά φάρμακα δημιουργεί προβλήματα στην κλινική διαχείριση αυτών των λοιμώξεων. Η *K. pneumoniae* ως πολυανθεκτικό παθογόνο είναι ανθεκτική στην καρβαπενέμη. (Gregg S. Davis et al.)

Για τη θεραπεία σοβαρών Gram-αρνητικών λοιμώξεων, στην οποία ανήκει και η *K. pneumoniae*, έχουν χρησιμοποιηθεί αντιβιοτικά β-λακτάμης. Ωστόσο, έχει προκύψει αντοχή των βακτηρίων *Klebsiella* έναντι των β-λακταμών λόγω της ικανότητάς τους να παράγουν β-λακταμάσες που είναι ικανά να υδρολύουν αντιβιοτικά β-λακτάμης. (Fereshteh Eftekhari and Parvaneh Nouri)

Επιπλέον, αρκετά γονίδια αντίστασης στο *Klebsiella pneumoniae* βρίσκονται σε μεταφερόμενα γενετικά στοιχεία που μπορεί να μεταφερθούν σε άλλα βακτήρια. Έτσι, η πιθανή συμβολή του *Klebsiella pneumoniae* στην αντίσταση άλλων κλινικά σχετικών βακτηρίων προκαλεί ανησυχία.

Το *Klebsiella pneumoniae* έχει εξελιχθεί σε δύο ανεξάρτητες εξελικτικές κατευθύνσεις: την υπερμολυσματικότητα και την αντίσταση στην καρβαπενέμη τα οποία συνιστούν σημαντικό κλινικό κίνδυνο. Η υπερμολυσματικότητα προκαλείται από συνδυασμό λοιμογόνων παραγόντων και οι μηχανισμοί αντίστασης στην καρβαπενέμη είναι πολύπλοκοι. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, έχουν ανακαλυφθεί όλο και περισσότερα στελέχη *K. pneumoniae* που συνδυάζουν και τα δύο χαρακτηριστικά, με αποτέλεσμα καταστροφικά κλινικά αποτελέσματα. Το ανθεκτικό στις καρβαπενέμες *K. pneumoniae* (CR-hvKP) εμφανίστηκε για πρώτη φορά στις αρχές της δεκαετίας του 2010 και έκτοτε έχει γίνει πιο κοινό. Έχει εντοπιστεί σε όλο τον κόσμο ωστόσο είναι πιο διαδεδομένο στην Ασία, ιδιαίτερα στην Κίνα. (Peng Lan et al.)

Τρία μοτίβα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να εξηγήσουν την εμφάνιση του CR-hvKP:

- A. Ανθεκτικό στην καρβαπενέμη *K. pneumoniae* (CRKP) που αποκτά έναν υπερμολυσματικό φαινότυπο
- B. Υπερμολυσματικό *K. pneumoniae* (hvKP) που αποκτά έναν φαινότυπο ανθεκτικό στην καρβαπενέμη
- C. *K. pneumoniae* που αποκτά υβριδικό πλασμίδιο αντίστασης στην καρβαπενέμη και υπερμολυσματικότητας.

Με την ευρεία διανομή τους σε παγκόσμιο επίπεδο, είναι πιο σημαντικό από ποτέ να παρακολουθούμε συνεχώς την εμφάνιση και την πορεία του CR-hvKP. Δυστυχώς, συνήθως ασθενείς με λοιμώξεις από αυτό το στέλεχος έχουν κακή έκβαση λόγω της ταχείας εξέλιξης της λοίμωξης. Το 1986, υπερμολυσματικά στελέχη αναφέρθηκαν για πρώτη φορά στην Ταϊβάν. Υπήρξαν επτά αναφορές ηπατικών αποστημάτων *K. pneumoniae* που συνδέονται με σηπτική ενδοφθαλμίτιδα και μεταστατικές λοιμώξεις. Παρά την έγκαιρη θεραπεία με αντιβιοτικά, έξι άτομα έχασαν τελικά την όρασή τους και ένα είχε περιορισμένη όραση. Η υψηλή διεισδυτικότητα της hvKP, που είναι το θεμελιώδες χαρακτηριστικό της, αποκαλύπτεται από την ταχεία εξέλιξη αυτών των λοιμώξεων. Έκτοτε, ο παθογόνος μηχανισμός του hvKP έχει αποτελέσει αντικείμενο ποικίλων μελετών. (Peng Lan et al.)

Η αντίσταση στην καρβαπενέμη στο *K. pneumoniae* προκαλείται από έναν αριθμό διεργασιών, συμπεριλαμβανομένης της σύνθεσης καρβαπενεμάσης, της μειωμένης έκφρασης ή απώλειας πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης (OMPs) και της ενεργοποίησης αντλιών εκροής. Ο πιο ουσιαστικός μηχανισμός είναι η σύνθεση της καρβαπενεμάσης.

Ανάλογα με τη γεωγραφική θέση, ο επίκτητος ανθεκτικός στην καρβαπενέμη φαινότυπος συνδέεται με μηχανισμούς αντοχής στην επιδημία. Στην Ινδία, για παράδειγμα, το blaNDM και το blaOXA είναι συχνώς εμφανιζόμενα, επομένως τα στελέχη hvKP που παράγουν τα

γονίδια αυτά εμφανίζονται σε αυτήν την περιοχή τα τελευταία χρόνια. Συνήθως, αυτά τα στελέχη έχουν εκ γενετής ένα πλασμίδιο λοιμογόνου δράσης και αργότερα αποκτούν ένα πλασμίδιο που περιέχει ένα γονίδιο καρβαπενεμάσης. Η αντοχή στην καρβαπενέμη στην *hνKP* μπορεί να αποκτηθεί μέσω χρωμοσωμικής μετάλλαξης, αν και αυτό είναι ασυνήθιστο. (Peng Lan et al.)

3.2 Γονίδια αντοχής

Οι καρβαπενεμάσες της κατηγορίας Ambler KPC ή της κατηγορίας B τύπου Ambler, συμπεριλαμβανομένων των ενζύμων που μοιάζουν με IMP, VIM και NDM, θεωρούνται οι πιο σημαντικές καρβαπενεμάσες στα *Enterobacteriaceae* από τις αρχές της δεκαετίας του 2000, επειδή η υδρολυτική τους δράση δεν περιλάμβανε μόνο καρβαπενέμες αλλά και κεφαλοσπορίνες ευρέως φάσματος. Οι δραστηριότητές τους σε καρβαπενεμάση ήταν σημαντικές και το OXA-48, από την άλλη πλευρά, δεν θεωρήθηκε σημαντική απειλή επειδή το υδρολυτικό του φάσμα δεν περιλαμβάνει κεφαλοσπορίνες ευρέως φάσματος. (Gregg S. Davis et al.)

Τα ένζυμα μπορεί να ανήκουν στην κατηγορία A όπως το KPC, στην κατηγορία B (μεταλλο-β-λακταμάσες) ή στην κατηγορίας D όπως το OXA-48.

Στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, ο πιο κοινός και σημαντικός μηχανισμός αντίστασης στην καρβαπενέμη είναι τα στελέχη *K.pneumoniae* που κωδικοποιούν το γονίδιο KPC, ενώ γονίδια όπως το VIM, το IMP και το NDM είναι πιο κοινά στην Ασία.

Η κατηγορία B περιλαμβάνει το VIM (Verona Integron-encoded Metallo-β-lactamase) και το IMP (Imipenemase) και πιο πρόσφατα (New Delhi Metallo-β-lactamase-1) NDM-1. Αυτά τα ένζυμα υδρολύουν πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, μονοβακτάμες και καρβαπενέμες εκτός από την αζτρεονάμη. (Rohollah Khodadadian et al.) Παρόλο που τα στελέχη που κωδικοποιούν το IMP βρίσκονται κυρίως στην Κίνα, την Ιαπωνία και την Αυστραλία, τα απομονωμένα στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν VIM παρατηρούνται κυρίως στην Ιταλία και την Ελλάδα. (Johann D. D. Pitout et al.)

ΓΟΝΙΔΙΟ KPC

Οι KPC ήταν οι πιο συχνά παρατηρούμενες καρβαπενεμάσες κατηγορίας A. Έχουν αναφερθεί σε αρκετά εντεροβακτηριακά είδη και ιδιαίτερα στο *K. pneumoniae*. Το KPC εντοπίστηκε σε απομόνωση *K. pneumoniae* στη Βόρεια Καρολίνα στα τέλη της δεκαετίας του 1990. Έως τις μέρες μας, έχουν βρεθεί περισσότερες από 20 διαφορετικές παραλλαγές KPC, με τις KPC-2 και -3 να είναι οι πιο αναγνωρισμένες. Αυτά τα ένζυμα προδίδουν αντοχή κατά των πενικιλινών, καρβαπενεμών, κεφαλοσπορινών, κεφαλομυκινών και των μονοβακταμίων. Η αναστολή τους παρατηρείται κατά τη δράση αναστολέων β-λακταμάσης όπως το βορικό οξύ και η αβιβακτάμη και ασθενώς από κλαβουλανικό οξύ και ταζομπακτάμη.

Πολλά νοσοκομειακά κρούσματα KPC *Klebsiella pneumoniae* έχουν αναφερθεί στη Βόρεια Αμερική (ιδιαίτερα τις Ηνωμένες Πολιτείες), τη Νότια Αμερική (Κολομβία, Αργεντινή), την Ευρώπη (Ελλάδα, Ιταλία, Πολωνία), Ασία (Κίνα) και τη Μέση Ανατολή (Ισραήλ). Τα βακτήρια αυτά θεωρούνται ενδημικά σε ορισμένα μέρη του κόσμου, όπως οι βορειοανατολικές ΗΠΑ, η Κολομβία, το Πουέρτο Ρίκο, η Ελλάδα, η Ιταλία, το Ισραήλ και η Κίνα. Το γονίδιο KPC είναι ένας από τους βασικότερους λόγους που το βακτήριο αυτό κατατάσσεται υψηλά στην παγκόσμια κατανομή ανθεκτικών στα αντιβιοτικά μικροοργανισμών. (Johann D. D. Pitout et al.).

Τα βακτήρια που παράγουν KPC είναι ευαίσθητα σε λίγα αντιβιοτικά όπως την κολιστίνη, τις αμινογλυκοσίδες και τη τιγκεκυκλίνη. Για αυτό το λόγο οι λοιμώξεις του αίματος από τέτοια βακτήρια έχουν πολύ υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. (Munoz-Price et al., 2013). Οι κλινικές λοιμώξεις που προκαλούνται από *K. pneumoniae* που παράγει KPC σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο θανάτου ενώ φαίνεται να επηρεάζουν περισσότερο ασθενείς με σοβαρή ασθένεια.

Σύμφωνα με τους Cannatelli et al η κολιστίνη (πολυμυξίνη E), αποτελεί ένα κύριο συστατικό του συνδυασμού αντιμικροβιακών σχημάτων για τη θεραπεία σοβαρών λοιμώξεων από *K. pneumoniae* που παράγουν KPC και ανακαλύφθηκε πριν από περισσότερο από 60 χρόνια. Από την παγκόσμια εξάπλωση του *K. pneumoniae* που παράγει KPC κάνει την εμφάνιση της και η αντοχή στην κολιστίνη. Μια έρευνα στην Ιταλία έδειξε ότι το ποσοστό αντοχής στην κολιστίνη μεταξύ απομονωμένων από αίμα στελεχών αυξήθηκε περισσότερο από τρεις φορές κατά τα 4,5 έτη που διεξήχθη η έρευνα και μαζί με αυτή και η θνησιμότητα σε διάστημα 30 ημερών λόγω της ανθεκτικής στην κολιστίνη KPC.

Η χορήγηση ακατάλληλης αντιμικροβιακής αγωγής αποτελεί τον παράγοντα θνησιμότητας. Η αντιβιοτική θεραπεία περιορίζεται σε λίγες επιλογές, συνήθως κολιστίνη, τιγκεκυκλίνη και αμινογλυκοσίδες. Πρόσφατα ευρήματα δείχνουν ότι η καρβαπενέμη μπορεί να βελτιώσει την επιβίωση μεταξύ των ασθενών με βακτηριαιμία από KPC *K. pneumoniae*. (George L. Daikos et al.) Ενώ η κολιστίνη έχει χρησιμοποιηθεί συχνά ως εναλλακτική θεραπεία λοιμώξεων από CR *K. pneumoniae*, η αλόγιστη χρήση της προκαλεί ταχεία εξάπλωση της αντοχής στην ουσία στις *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάσες και ιδιαίτερα τύπου KPC. (Chang-Ro Lee et al.)

Τα ένζυμα KPC επίσης βρίσκονται σε πλασμίδια και παρουσιάζουν σημαντική υδρολυτική ικανότητα έναντι των καρβαπενεμών, η οποία αναστέλλεται μόνο από το κλαβουλανικό οξύ και την ταζομπακτάμη. (AbrahamBorerMD et al.)

ΓΟΝΙΔΙΟ VIM

Οι πιο κοινές οικογένειες MBLs περιλαμβάνουν τα VIM, IMP, GIM, και SIM τα οποία εντοπίζονται σε ιντεγκρόνια όπου ενσωματώνονται ως γονίδια. Η VIM οικογένεια συνίσταται από 14 μέλη που κατηγοριοποιούνται σε τρεις ομάδες κάθε μία από τις οποίες αντιπροσωπεύεται από τα ένζυμα VIM-1, VIM-2 και VIM-7 αντίστοιχα. (Laurent Poirel et al.)

Το VIM-1, το πρώτο μέλος της οικογένειας VIM, ανακαλύφθηκε στη Βερόνα της Ιταλίας από ένα κλινικό στέλεχος *Pseudomonas aeruginosa*. Οι λακταμάσες τύπου VIM έχουν βρεθεί σε μια ποικιλία εντεροβακτηριακών ειδών και έχουν χαρακτηριστεί σε διάφορες γεωγραφικές τοποθεσίες. Επιδημίες VIM έχουν καταγραφεί κυρίως στην *P. aeruginosa*, αλλά και στην *Klebsiella pneumoniae* στην Ελλάδα και μάλιστα πρόσφατα. Πρώτη εστία αποικισμών και λοιμώξεων λόγω στελέχους *K. pneumoniae* που φέρει γονίδιο VIM-1 αποτελεί το Γαλλικό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο, μετά από μεταφορά ασθενούς από την Ελλάδα. (Najiby Kassis-Chikhani et al.)

Τα Enterobacteriaceae που παράγουν VIM-1 έχουν συνδεθεί με μεμονωμένα κρούσματα, μικρές επιδημίες και εξάπλωση που επηρεάζουν πολλά βακτηριακά είδη στην Ισπανία. (Isabel Sánchez-Romero)

Το ένζυμο που εκφράζεται χαρακτηρίζεται από την ικανότητα υδρόλυσης καρβαπενεμών και όλων των β-λακταμών με εξαίρεση την αζτρεονάμη.

Τα γονίδια bla VIM βρίσκονται σε ιντεγκρόνια κατηγορίας 1 ενώ έχουν ανιχνευθεί σε πλασμίδια με διάφορους τύπους αντιγράφων, ενισχύοντας τη δυνατότητα εξάπλωσης και συσχέτισης με άλλα γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά.

Ως αποτέλεσμα, διάφορα γονίδια επίκτητης αντοχής βρίσκονται συχνά σε απομονωμένα στελέχη VIM *K. pneumoniae*, όπως γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα τροποποίησης αμινογλυκοσιδίων, γονίδια αντοχής στην κινολόνη που προκαλείται από πλασμίδιο, ανθεκτικότητα στην τριμεθοπρίμη και άλλες βλακταμάσες. (Samuelson et al.)

Το VIM-2 είναι το δεύτερο μεταλλοένζυμο υδρόλυσης καρβαπενέμης που ανακαλύφθηκε σε ένα προϊόν απομόνωσης *P. aeruginosa*. Η καθαρισμένη VIM-2-λακταμάση έχει pI 5,6, σχετική μοριακή μάζα 29,7 kDa και ένα ευρύ φάσμα υδρόλυσης υποστρώματος που περιλαμβάνει πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, κεφαλομυκίνες, οξακεφαμυκίνες και καρβαπενέμες, αλλά όχι μονοβακτάμες. Η δραστηριότητά του ως μεταλλο-β-λακταμάση ήταν εξαρτώμενη από τον ψευδάργυρο και αναστέλλεται από EDTA (50 τοις εκατό ανασταλτική συγκέντρωση, 50 M). Εκτός από την ευαισθησία σε ουρεΐδοπενικιλίνες, καρβαπενέμες και κεφεπίμη, το VIM-2 παρείχε αντοχή στις λακτάμες στο *E. Coli*, που ταίριαζε με τα in vitro υδρολυτικά χαρακτηριστικά του. Το blaVIM-2 βρέθηκε σε ένα πλασμίδιο 45 kb που προσέδωσε επίσης αντίσταση στα σουλφαμίδια και δεν ήταν αυτομεταδιδόμενο από το *P. aeruginosa* στο *E. coli* ή από το *E. coli* στο *P. aeruginosa*.

Το VIM-1 ανακαλύφθηκε πρόσφατα σε πολλές απομονώσεις *P. aeruginosa* και έχει 28% ταυτότητα αμινοξέων με το IMP-1. Το blaIMP-1 βασίζεται σε πλασμίδιο ή χρωμόσωμα, ενώ το blaVIM-1 βασίζεται αποκλειστικά σε χρωμόσωμα. (Laurent Poirel et al.)

Ένα προϊόν απομόνωσης *Klebsiella pneumoniae* και ένα προϊόν απομόνωσης *E. coli* είχαν ένα ξεχωριστό γονίδιο blaVIM. Αυτό το γονίδιο θα μπορούσε να θεωρηθεί υβρίδιο blaVIM-1/blaVIM-2, καθώς είναι πανομοιότυπο με το blaVIM-1 από το νουκλεοτίδιο 663 στο νουκλεοτίδιο 614 και με το blaVIM-2 από το νουκλεοτίδιο 614 στο νουκλεοτίδιο 663.

Η κατανόηση της δυναμικής του αυξανόμενου αριθμού στελεχών που παράγουν VIM απαιτεί μια κατανόηση της επιδημιολογίας των πλασμιδίων που φέρουν blaVIM. Αν και έχει παρατηρηθεί η διάδοση πλασμιδίων με πανομοιότυπα μοτίβα σε απομονώσεις του ίδιου είδους ή ακόμη και μεταξύ απομονώσεων διαφορετικών ειδών, αυτά τα πλασμίδια συχνά βρέθηκαν να έχουν διαφορετικά πρότυπα περιορισμού. (A Vatoroulos)

ΓΟΝΙΔΙΟ NDM

Στο Νέο Δελχί απομονώθηκε σε στέλεχος *K. pneumoniae* για πρώτη φορά ένα ένζυμο μεταλλο-β-λακταμάσης, που υδρολύει εύκολα τις πενικιλίνες, τις κεφαλοσπορίνες και τις καρβαπενέμες. Το γονίδιο που κωδικοποιούσε αυτή τη νέα β-λακταμάση βρέθηκε σε ένα μεγάλο 180-kb πλασμίδιο, που μπορεί εύκολα να μεταφερθεί σε άλλα εντεροβακτηριακά και περιείχε μια ποικιλία από άλλους καθοριστικούς παράγοντες αντίστασης, συμπεριλαμβανομένου ενός γονιδίου που κωδικοποιούσε την ευρέως φάσματος β-λακταμάσης και γονιδίων αδρανισμού της ερυθρομυκίνης, σιπροφλοξασίνης, ριφαμπικίνης, και χλωραμφενικόλης. Αυτό το νέο ένζυμο ονομάστηκε μεταλλο-β-λακταμάση-1 του Νέου Δελχί (NDM-1). (Robert C. Moellering, Jr.)

Εκτός από την κολιστίνη, το αρχικό βακτήριο βρέθηκε να είναι ανθεκτικό σε όλους τους αντιμικροβιακούς παράγοντες που εξετάστηκαν. Η μοριακή δοκιμή έδειξε ότι το προϊόν απομόνωσης περιελάμβανε μια νέα μεταλλο-βήτα-λακταμάση που αποικοδομούσε εύκολα τις πενικιλίνες, τις κεφαλοσπορίνες και τις καρβαπενέμες (με εξαίρεση την αζτρεονάμη). (Robert C. Moellering et al.)

Η NDM (μεταλλο-β-λακταμάση του Νέου Δελχί) είναι μια από τις πιο βασικές κλινικά καρβαπενεμάσες. Πρώτη φορά το 2008 σε *K. pneumoniae* και *E. coli* σε ασθενή που επέστρεφε από την Ινδία στη Σουηδία και έπειτα εξαπλώθηκε σε όλο τον κόσμο. Προς το παρόν, εκτιμάται ότι υπάρχουν 15 παραλλαγές NDM. Η παγκόσμια διασπορά του στελέχους *K. pneumoniae* που παράγει NDM, ειδικά σε χώρες χαμηλού εισοδήματος, αποτελεί μείζον θέμα στο τομέα της υγείας λόγω νεογνικής θνησιμότητας, γιατί το ποσοστό της νεογνικής σήψης είναι υψηλό. Πολλά τέτοια στελέχη εμφανίζουν ευαισθησία μόνο στην κολιστίνη, τη φωσφομυκίνη και την τιγκεκυκλίνη. Η εξάπλωση του γονιδίου blaNDM διευκολύνεται από την οριζόντια μεταφορά γονιδίου μεταξύ βακτηρίων διότι εντοπίζονται σε πολλά πλασμίδια ευρείας περιοχής ξενιστή. Συνολικά παρατηρείται ανθεκτικότητα στα περισσότερα αντιβιοτικά β-λακτάμης, αλλά εμφανίζει ευαισθησία στην αζτρεονάμη. Τα μικρόβια που εκφράζουν το blaNDM-1 δεν είναι μόνο ανθεκτικά στην καρβαπενέμη, αλλά και σε ένα ευρύ φάσμα αντιβιοτικών, τονίζοντας την ανάγκη έγκαιρης ανίχνευσης και αυστηρών μέτρων

ελέγχου των λοιμώξεων για την αποφυγή της εξάπλωσης αυτών των βακτηρίων.(Chih-ChengLai et al.)

Δοκιμάζεται συνδυαστική θεραπεία όπως και στην περίπτωση του *K. pneumoniae* που παράγει KPC. (Chang-Ro Lee et al.)

Το NDM-1 έχει υδρολυτικό χαρακτήρα προς τις καρβαπενέμες και δεν επηρεάζεται από αναστολείς β-λακταμάσης, προδίδοντας έτσι άμυνα προς δύο κύριες επιλογές θεραπείας στα βακτηρια που το εκφράζουν. Σε ορισμένες περιπτώσεις, έχουν παρατηρηθεί διαδοχικές επανάληψεις στην περιοχή του γονιδίου αυξάνοντας έτσι τον αριθμό των αντιγράφων. Ο ψευδάργυρος απαιτείται στη δραστική θέση των μεταλλο-β-λακταμάσων Κατηγορίας B. Όσον αφορά την Ευρώπη, το 11,5% (79/684) του CR-hvKP είναι θετικό σε NDM, ενώ στην Κίνα είναι 17,2% (121/703). (PengLan et al.)

ΓΟΝΙΔΙΟ IMP

Το ένζυμο IMP-1 πρόκειται για την πρώτη αναγνωρισμένη μεταλλο-β-λακταμάση. Εντοπίστηκε για πρώτη φορά το 1988 στην Ιαπωνία, σε ένα στέλεχος *Pseudomonas aeruginosa*. Προσδίδει αντοχή στην καρβαπενέμη. Οι καρβαπενεμάσες αυτού του υδρολύουν σχεδόν όλες τις β-λακτάμες. Βρίσκονται σε βάκιλλους αρνητικούς κατά Gram που δεν ζυμώνονται (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. και μερικών *Enterobacteriaceae*). Τα γονίδια συναντώνται σε μεγάλα πλασμίδια με διαφορετικούς τύπους αντιγραφής ή τύπους ασυμβατότητας.

Η IMP *Klebsiella pneumoniae*(IMP_{Kpn}) είναι ένα σημαντικό παθογόνο που προκαλεί διαφόρων ειδών λοιμώξεις. Τέτοια στελέχη *pneumoniae* έχουν εντοπιστεί παγκοσμίως. Προς το παρόν έχουν μόνο μικρής κλίμακας εστίες.(Kaisheng Lai et al.)

Κλινικά εργαστήρια βρήκαν ότι το 15 % από τα 62 θετικά στο KPC απομονώσεις είναι ανθεκτικά στην ιμιπενέμη. Το 12 % από τα 42 απομονωμένα στελέχη που δοκιμάστηκαν για ευαισθησία στη μεροπενέμη βρέθηκαν να είναι ευαίσθητα σε αυτό το αντιβιοτικό. Σε όλες ανακαλύφθηκε αντοχή στην κεφταζιδίμη. Στο ερευνητικό εργαστήριο, διερευνήθηκαν διάφορες μέθοδοι δοκιμής ευαισθησίας στην καρβαπενέμη.Μόνο το 19 % των βακτηρίων θεωρήθηκαν ανθεκτικά. Αν και μόνο το 5% αυτών που έλαβαν εμβόλια ήταν ευάλωτα στη μεροπενέμη, το υπόλοιπο 77 % ταξινομήθηκε ως ενδιάμεσο.Ουσιαστικά όλα τα προϊόντα απομόνωσης αποδείχθηκαν ανθεκτικά στις τρεις καρβαπενέμες.(Simona Bratu et al.)

ΓΟΝΙΔΙΟ OXA-48

Οι οξακιλλινάσες (OXAs) ανήκουν στις β-λακταμάσες της κατηγορίας D καθώς υδρολύουν τις ισοξαζολυλοπενικιλίνες (οξακιλλίνη, κλοξακιλλίνη και δικλοξακιλλίνη) πολύ ταχύτερα από τη βενζυλοπενικιλίνη. Στην κατηγορία D συγκαταλέγονται περισσότερες από 400 β-λακταμάσες αλλά λίγες έχουν δράση καρβαπενεμάσης. Οι καρβαπενεμάσες αυτές ταξινομούνται με βάση την αλληλουχία αμινοξέων τους σε 12 υποομάδες: OXA-23, OXA-24/40, OXA-48, OXA-51, OXA-58, OXA-134a, OXA-143, OXA-211, OXA-213, OXA-214, OXA-229 και OXA-235. Στο *K. Pneumoniae* αναφέρονται μόνο οι OXA-23, OXA-48, OXA-51 και OXA-58. Το γονίδιο αυτό αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά σε *K. pneumoniae* στην Τουρκία το 2003 και έως σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 10 διαφορετικοί τύποι του γονιδίου bla OXA-48. Το OXA-48 έχει την ικανότητα αποτελεσματικής υδρόλυσης των β-λακταμών στενού φάσματος όπως της πενικιλίνης, ενώ υδρολύει ασθενέστερα τις καρβαπενέμες. Έχει βρεθεί κυρίως σε απομονώσεις του *K. Pneumoniae* αλλά γενικά έχει αναφερθεί σε όλα τα μέλη της οικογένειας *Enterobacteriaceae*. (Johann D. D. Pitout et al)

Ο συνδυασμός σουλβακτάμης, μεροπενέμης και κολιστίνης έδειξε καλύτερα αποτελέσματα σε απομονώσεις που παράγουν καρβαπενεμάση NDM από ότι OXA-48. Αυτό αντανάκλα την σημαντικότητα της αναγνώριση του τύπου καρβαπενεμάσης ώστε να προσδιοριστεί ο κατάλληλος συνδυασμός που θα είναι περισσότερο ικανός να εξαλείψει τη μόλυνση. Συνδυαστικά η φωσφομυκίνη με μιπενέμη, μεροπενέμη και τιγκεκυκλίνη ήταν αποτελεσματική θεραπεία έναντι των θετικών στο OXA-48 στελεχών *K. Pneumoniae*. Η μελέτη έγινε in vitro με αναλογίες 42%, 33% και 33%, αντίστοιχα (Evren et al., 2013).

Τα περισσότερα αντιβιοτικά που κυκλοφορούν σήμερα στην αγορά μπορεί να μην είναι αρκετά για τη θεραπεία όλων των τύπων παραγωγών καρβαπενεμάσης από μόνα τους. Για αυτό, κατά κύριο λόγο, προτιμάται η συνδυαστική θεραπεία με κολιστίνη, ριφαμπικίνη, πολυμυξίνη Β, φωσφομυκίνη ή τιγκεκυκλίνη. Ωστόσο, η σπανιότητα πρόσφατων κλινικών στοιχείων για κατευθυντήριες γραμμές θεραπείας καθιστά την διεξαγωγή περισσότερων και στοχευμένων in vivo μελετών, πάντα με μέτρο και μεγάλη προσοχή κατά την εφαρμογή. (Chang-Ro Lee et al.)

Εκτός από μερικές περιπτώσεις, το κλαβουλανικό οξύ, η ταζομπακτάμη και η σουλβακτάμη δεν αναστέλλουν τις λακταμάσες της κατηγορίας D, ωστόσο το NaCl μπορεί να μειώσει τη δραστηριότητά τους in vitro.

ΓΟΝΙΔΙΟ EcpA

Είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί το *E. coli* common pilus (ECP) βρέθηκε πρώτη φορά σε στελέχη *E. Coli*, από όπου πήρε και την ονομασία. Πρόκειται για μια κολλητική ίνα που παράγεται από όλα τα *E. coli* και κωδικοποιείται από το οπερόνιο ecpRABCDE, ενώ ένα ομόλογο του οπερονίου υπάρχει στο γονιδίωμα του *K. pneumoniae*. (María D. Alcántar-Curiel)

Η πλειονότητα της ECP αποτελείται από μια μοναδική πρωτεΐνη ~18 kDa που ονομάζεται EcpA. Αυτή περιέχει μια αλληλουχία χωρίς οποιαδήποτε ομοιότητα με άλλη πιλίνη ή κροσσική υπομονάδα με γνωστή δομή. (James A. Garnett et al.)

ΓΟΝΙΔΙΟ MrkA

Για τη διευκόλυνσή του να αποικίσει σε βιοτικές και μη επιφάνειες, ο *Klebsiella pneumoniae* σχηματίζει βιομεμβράνες. Για αυτό απαιτείται η έκφραση κροσσών τύπου 3. Πρόκειται για πρωτεϊνικά νήματα με επίμηκες σχήμα που ωθούνται στην εξωτερική μεμβράνη του βακτηρίου μέσω ενός συνοδευτικού συστήματος χορήγησης. Το κύριο δομικό συστατικό των κροσσών τύπου είναι η πρωτεΐνη MrkA η οποία συνδέεται με μόρια κολλαγόνου με τη βοήθεια της προσκολλητίνης MrkD. (Ji Yang et al.)

Συνολικά τα γονίδια που εμπλέκονται στην έκφραση κροσσών τύπου 3 είναι έξι. Στην κατασκευή και στη ρύθμιση της κροσσικής έκφρασης τύπου 3 εμπλέκονται επίσης τα γονίδια mrkB, mrkC και mrkE ενώ το mrkF παίζει ρόλο στη διατήρηση της σταθερότητας του στην κυτταρική επιφάνεια. (B. L. Allen)

Τα στελέχη που φέρουν το bla_{mrkA} είναι ανθεκτικά στη μαννόζη. (A.Ghasemian et al.)

Οι κροσσοί τύπου 1, που μελετιούνται παρακάτω, για την προώθηση του αποικισμού του *K. pneumoniae* και τον σχηματισμό βιοφίλμ ενώ οι κροσσοί τύπου 3 έχει αποδειχθεί ότι είναι υπαίτιοι για την έναρξη του σχηματισμού του βιοφίλμ και την ανάπτυξη ώριμης βιομεμβράνης. (Ji Yang et al.)

ΓΟΝΙΔΙΟ FimH

Η νουκλεοτιδική και δομική ποικιλομορφία των γονιδίων FimH είναι μάλλον μέτρια, ωστόσο σε τακτική βάση παρατηρείται οριζόντια μεταφορά μεταξύ των διαφορετικών βακτηριακών κλώνων. Αποτελεί συγκολλητική υπομονάδα των κροσσών τύπου 1 και εντοπίζεται σε πολλά εντεροβακτήρια. Σε διαφορετικά είδη, τα δομικά χαρακτηριστικά υποδοχέα της προσκολλητίνης FimH μπορεί να διαφέρουν, με αποτέλεσμα να επηρεάζουν την επίδραση του βακτηρίου και εν συνεχεία τον ρόλο των συγκεκριμένων κροσσών στην παθογένεια. Η δομική μονάδα FimA κυριαρχεί στους κροσσούς τύπου 1, με μέτριες ποσότητες τριών

βοηθητικών μονάδων, FimF, FimG και της ειδικής πρόσφυσης για τη μαννόζη FimH. Η προσκολλητίνη FimH είναι μια πρωτεΐνη που λαμβάνει ενεργό ρόλο στον μηχανισμό πρόσφυσης του δεσμού σύλληψης.

Οι κροσσοί του *K. pneumoniae* τύπου 1 έχουν βαρύνουσα σημασία στη λοίμωξη του ουροποιητικού συστήματος από το βακτήριο και τόσο δομικά όσο και λειτουργικά παρομοιάζονται κατά 85% με αυτούς του *E. Coli*. Σύμφωνα με την έρευνα των Steen G. Stahlhut et al., το FimH 54 απομονώσεων του *K. pneumoniae* (από ούρα, αίμα, ήπαρ και το περιβάλλον) μπορεί να συναντηθεί ως μία από τις συνολικά επτά παραλλαγές πρωτεΐνης λόγω αντικαταστάσεων αμινοξέων σε διάφορα σημεία. (Steen G. Stahlhut et al.)

3.3 Έρευνες ανίχνευσης γονιδίων

Στελέχη με αντοχή στην καρβαπενέμη εντοπίστηκαν στην Ελλάδα το 2002, ως αποτέλεσμα καρβαπενεμάσης VIM και αργότερα καρβαπενεμάσης KPC. Το 2011, το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων (Ηπειρος, Στερεά Ελλάδα) ανέφερε την εμφάνιση στελεχών που παράγουν NDM. Το πρώτο ξέσπασμα καρβαπενεμάσης τύπου OXA-48 ανακαλύφθηκε το 2012.

Μεταξύ 1ης Νοεμβρίου 2014 και 30 Απριλίου 2016, 15 νοσοκομεία σε έξι ελληνικές πόλεις παρείχαν κατά μέσο όρο 20 απομονώσεις το καθένα στη μελέτη. Κατά τη διάρκεια της έρευνας, ελήφθησαν 394 απομονώσεις του *K. pneumoniae*. Προήλθαν από ούρα (n = 168), αίμα (n = 86), εκκρίσεις κατώτερης αναπνευστικής οδού (n = 60), πύον (n = 55), εγκεφαλονωτιαίο υγρό (n = 3) και άγνωστα κλινικά δείγματα (n = 22). Θετικά για παραγωγή καρβαπενεμάσης βγήκαν τα 389 απομονωμένα στελέχη (98,7%), συμπεριλαμβανομένων 262 (66,5%), 54 (13,7%), 34 (8,6%) και 14 (3,6%) περιπτώσεων blaKPC, blaNDM, blaVIM και γονίδια που μοιάζουν με blaOXA-48, αντίστοιχα. Επιπλέον, 25 (6,3%) από τα στελέχη είχαν δύο γονίδια καρβαπενεμάσης, 22 (5,6) είχαν και blaKPC και blaVIM, 2 (0,5%) είχαν blaNDM και blaOXA-48 και 1 (0,3%) είχε blaKPC και blaOXA-48.

Σε όλα τα νοσοκομεία εκτός από δύο, τα ένζυμα KPC βρέθηκαν στο 66,5 % των απομονώσεων, με ποσοστά που κυμαίνονται από 14,3 % έως 90,0 %. Η καρβαπενεμάση NDM ήταν το δεύτερο πιο κοινό ένζυμο συνολικά (13,7%), αλλά αποκλειστικά σε ένα νοσοκομείο στη δυτική Ελλάδα (81,0%). (Γενικό Νοσοκομείο Κέρκυρας). Οι παραγωγοί NDM απομονώθηκαν σε ποσοστό 20 % σε 4 νοσοκομεία (3 στην περιοχή της Αθήνας και 1 στη Θεσσαλονίκη), ενώ κανένα δεν απομονώθηκε σε 3 νοσοκομεία (2 στην περιοχή της Αθήνας και 1 στην κεντρική Ελλάδα). Τα ένζυμα VIM βρέθηκαν στο 8,6% των απομονώσεων του *K. pneumoniae*, καθιστώντας τα την πιο κοινή κατηγορία σε ένα νοσοκομείο της Αθήνας. Σε 14 απομονώσεις (3,6%) από 5 νοσοκομεία, βρέθηκαν ένζυμα τύπου OXA-48. Τα ένζυμα VIM βρέθηκαν στο 8,6% των απομονώσεων του *K. pneumoniae* και ήταν η πιο διαδεδομένη κατηγορία σε ένα νοσοκομείο της Αθήνας. Ένζυμα τύπου OXA-48 βρέθηκαν σε 14 απομονώσεις (3,6%) από πέντε νοσοκομεία, τέσσερα από τα οποία ήταν στην περιοχή της Αθήνας και ένα στη Θεσσαλονίκη. Αυτά τα ευρήματα συνάδουν με αυτά της έρευνας European Survey on Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE), η οποία διεξήχθη μεταξύ Νοεμβρίου 2013 και Απριλίου 2014 και διαπίστωσε ότι η NDM ήταν η δεύτερη στην κατάταξη καρβαπενεμάση στην Ελλάδα για πρώτη φορά. Σε μια προηγούμενη πανελλαδική μελέτη που διεξήχθη σε 119 ελληνικά νοσοκομεία από τον Ιανουάριο του 2011 έως τον Ιούνιο του 2012, ο πιο κοινός μηχανισμός αντοχής στην

καρβαπενέμη στα απομονωμένα στελέχη *K. pneumoniae* ήταν η KPC (82,6%), ακολουθούμενη από το VIM (9,7%) και η ταυτόχρονη παραγωγή KPC και VIM παρατηρήθηκε στο 7,7% των απομονώσεων. (Irene Galani et al.)

Πέρα από την Ελλάδα παρόμοιες έρευνες έχουν διεξαχθεί και στην Αριζόνα από τον Νοέμβριο του 2011 έως τον Οκτώβριο του 2012. Τα κλινικά απομονωμένα στελέχη *Klebsiella pneumoniae* συλλέχθηκαν από όλα τα κλινικά δείγματα ούρων ή αίματος που υποβλήθηκαν τακτικά που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία από το Ιατρικό Κέντρο Flagstaff στο Flagstaff της Αριζόνα, ανεξάρτητα από τα χαρακτηριστικά του ασθενούς ή το κλινικό πλαίσιο. Εκτός από επιλεγμένες κλινικές εξωτερικών ασθενών που χρησιμοποιούν διαγνωστικά εργαστήρια τρίτων, το Ιατρικό Κέντρο Flagstaff είναι το μόνο νοσοκομείο στο Φλάγκσταφ και το κλινικό εργαστήριό του εξυπηρετεί κέντρα υγειονομικής περίθαλψης σε όλη τη βόρεια Αριζόνα. Αυτή η μελέτη εγκρίθηκε από το Συμβούλιο Αναθεώρησης Ιδρυμάτων Υγείας της Βόρειας Αριζόνα.

Το *K. pneumoniae* βρέθηκε σε 174 από τα 1728 (10%) ανθρώπινα κλινικά στελέχη που ελήφθησαν από το Ιατρικό Κέντρο Flagstaff καθ' όλη την περίοδο συλλογής. Ομοίως, το *K. pneumoniae* βρέθηκε σε 241 (47%) από τα 508 είδη κρέατος που αγοράζονται τοπικά. Η μόλυνση από προϊόντα κρέατος διέφερε σημαντικά ανάλογα με τον τύπο κρέατος, με 58 % (65/112) για το χοιρινό, 47 % (128/272) για το κοτόπουλο και 38 % (48/128) για τη γαλοπούλα.

Ανθεκτικότητα σε πολλά φάρμακα εντοπίστηκε σε περίπου 22% όλων των απομονώσεων, συμπεριλαμβανομένου του 32% των προϊόντων απομόνωσης από κρέας αλλά μόνο στο 8% των κλινικών απομονώσεων.

Ομοίως, από τον Ιανουάριο έως τον Οκτώβριο του 2012, αγοράστηκαν προϊόντα λιανικής γαλοπούλας, κοτόπουλου και χοιρινού από καθμία από τις εννέα μεγάλες αλυσίδες παντοπωλείων στην Αριζόνα (ένα κατάστημα ανά αλυσίδα). Δεν έγιναν δειγματοληψίες από παντοπωλεία.

Το αργότερο 1 ημέρα μετά την ημερομηνία πώλησης, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία. 1 πλήρες κομμάτι κρέατος (ή 325 g 10% αλεσμένο προϊόν) αφαιρέθηκε από κάθε συσκευασία και μεταφέρθηκε υπό άσηπτο τρόπο σε μια σακούλα Stomacher (VWR, Radnor, Pennsylvania) που περιείχε 250 mL ζωμό MacConkey (Alpha Biosciences, Baltimore, Maryland). (Κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας χρησιμοποιήθηκαν 30 g ή 10% από κάθε αλεσμένο δείγμα για τις πέντε πρώτες συλλογές.) Ένα ιώδες κόκκινο χολικό άγαρ συν 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide (VRBA + MUG) πλάκα (Teknova, Hollister, California) εμβολιάστηκε με 10 L ζωμού και επώαστηκε στους 37°C για 2 ώρες και στη συνέχεια στους 44°C για 22 ώρες μετά από έναν ολονύκτιο εμπλουτισμό στους 44°C. Ένα ιώδες κόκκινο χολικό άγαρ συν 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide (VRBA + MUG) πλάκα (Teknova, Hollister, California) εμβολιάστηκε με 10 L ζωμού και επώαστηκε στους 37°C για 2 ώρες και στη συνέχεια στους 44°C για 22 ώρες μετά από ολονύκτιο εμπλουτισμό στους 44°C. Τέσσερις υποτιθέμενες αποικίες *K. pneumoniae* τοποθετήθηκαν σε ραβδώσεις σε CHROMagar (Hardy Diagnostics, Santa Maria, Καλιφόρνια) και καλλιεργήθηκαν για 20-24 ώρες στους 37°C από κάθε πλάκα VRBA + MUG. Τέλος, 1 αποικία *K. pneumoniae* που εμφανιζόταν μπλε στο CHROMagar επιστρώθηκε σε μια δεύτερη πλάκα CHROMagar για απομόνωση και καλλιεργήθηκε για 20-24 ώρες στους 37°C. Η ανάλυση αλληλουχίας DNA

επαλήθευσε ότι τα προϊόντα απομόνωσης ήταν *K. pneumoniae* και διατηρήθηκαν στους 80°C σε ζωμό Brucella με 20% γλυκερίνη.

Το *K. pneumoniae* βρέθηκε σε 174 από τα 1728 (10%) ανθρώπινα κλινικά στελέχη που ελήφθησαν από το Ιατρικό Κέντρο Flagstaff καθ' όλη την περίοδο συλλογής. Ομοίως, το *K. pneumoniae* βρέθηκε σε 241 (47%) από τα 508 είδη κρέατος που αγοράζονται τοπικά. Η μόλυνση από προϊόντα κρέατος διέφερε σημαντικά ανάλογα με τον τύπο κρέατος, με 58 % (65/112) για το χοιρινό, 47 % (128/272) για το κοτόπουλο και 38 % (48/128) για τη γαλοπούλα (P =,003 για τη γαλοπούλα έναντι χοιρινού· P =,02 για γαλοπούλα έναντι κοτόπουλου).

Η αντοχή στα αντιβιοτικά στα απομονωμένα από προϊόντα κρέατος στελέχη ήταν πιο συχνή από ότι των κλινικών στελεχών, γεγονός που θα μπορούσε να υποδεικνύει τη χρήση αντιβιοτικών στη ζωική παραγωγή τροφίμων. Τα ευρήματά μας δείχνουν ότι το κρέας λιανικής θα μπορούσε να είναι μια οδός εξάπλωσης του λοιμογόνου, ανθεκτικού στα αντιβιοτικά *K. pneumoniae* από τα ζώα διατροφής στον άνθρωπο. (Gregg S. Davis et al.)

Μεταξύ 2016 και 2018, 794 δείγματα φρέσκου κρέατος λιανικής συγκεντρώνονταν από αγορές αγροτών και σούπερ μάρκετ στο Guangzhou της Κίνας (512 δείγματα χοιρινού, 222 κοτόπουλου και 60 βοειδίου). Το άγαρ MacConkey που περιείχε 1 g/ml ιμιπενέμη χρησιμοποιήθηκε για την αναγνώριση ανθεκτικών στην καρβαπενέμη απομονώσεων *Enterobacteriaceae*. Συνολικά, 110 προϊόντα απομόνωσης *Enterobacteriaceae* που παράγουν καρβαπενεμάση ανακτήθηκαν από 105 (13,2%) δείγματα (64 δείγματα χοιρινού, 38 κοτόπουλου και 3 βοείου κρέατος), με αποτελέσματα που δείχνουν ότι 110 απομονώσεις περιείχαν 98 *bla*_{NDM}, *bla*_{NDM-1}, και 1 *bla*_{NDM-7} γονίδιο, το οποίο ήταν σύμφωνο με τα ευρήματα από μελέτες σε ζώα φάρμας στην Κίνα.

Τα δείγματα κοτόπουλου (17,1 % [38/222]) είχαν μεγαλύτερα ποσοστά μεταφοράς CRE από τα δείγματα χοιρινού (12,5 % [64/512]) και βοείου κρέατος (5,0 % [3/60]). Ανακαλύψαμε ότι ο πολλαπλασιασμός του CRE μεταξύ των δειγμάτων κοτόπουλου και χοιρινού κρέατος αυξήθηκε σημαντικά από το 2016 έως το 2018 (9,4 % [34/360] το 2016, 11,1 % [15/135] το 2017 και 22,2% [53/23] το 2018) με βάση την ετήσια απομόνωση δειγμάτων χοιρινού και κοτόπουλου. Εκφράστηκαν ανησυχίες σχετικά με την υψηλή συχνότητα εμφάνισης CRE στο κρέας λιανικής (13,2 % [105/794]) και την αυξανόμενη επικράτηση του CRE στο χοιρινό και το κοτόπουλο.

Το CRE βρέθηκε σε χοίρους, πουλερικά και αγελάδες στην Κίνα μεταξύ 2013 και 2017, με ποσοστά ανίχνευσης που κυμαίνονται από 6,5 % έως 61,0 % . Το CRE βρέθηκε επίσης σε πτηνά και χοίρους που σφάζονται σε σφαγεία. Σύμφωνα με στοιχεία από το Δίκτυο Αντιμικροβιακής Παρακολούθησης της Κίνας (CHINET), η αντοχή στην καρβαπενέμη στο *K. pneumoniae* αυξήθηκε από 9,3% το 2011 σε 20,9 % το 2017, ενώ το ποσοστό στην *Escherichia coli* παρέμεινε σταθερό στο 1,0 % έως 1,9 % κατά την ίδια χρονική περίοδο. Έτσι, το CRE που βρέθηκε σε δείγματα κρέατος λιανικής φάνηκε να οφείλεται κυρίως σε μόλυνση από βοοειδή μετά τη σφαγή, παρά σε ανθρώπινες δραστηριότητες ή νοσοκομειακά απόβλητα.

Στην Κίνα στο Guangzhou όπου τα εντεροβακτηρίδια που παράγουν καρβαπενεμάση (CPE) βρέθηκαν σε προϊόντα κρέατος και μελετήθηκε η παρουσία και τα μοριακά τους χαρακτηριστικά. Βρέθηκαν μόνο γονίδια *bla*_{NDM}, με τα πλασμίδια *IncX3* να φέρουν το

79,1% των γονιδίων blaNDM. Η παρουσία των *Enterobacteriaceae* που παράγουν καρβαπενεμάση στην παροχή ζωοτροφών θα πρέπει να παρακολουθείται σε τακτική βάση.

Πολλαπλές μελέτες στην Κίνα έχουν βρει μια αύξηση στον πολλαπλασιασμό της CRE, ιδιαίτερα των εντεροβακτηριδίων που παράγουν NDM, σε βοοειδή, κατοικίδια και στο περιβάλλον. Ωστόσο, τίποτα δεν είναι γνωστό για την αφθονία τους σε προϊόντα κρέατος ή τα μοριακά τους χαρακτηριστικά. Η συχνότητα και τα μοριακά επιδημιολογικά χαρακτηριστικά του CRE στο λιανικό βόειο κρέας από τις αγορές τροφίμων της Guangzhou διερευνήθηκαν σε αυτή τη μελέτη. (Qianhui Zhang et al.)

Μια άλλη έρευνα (Φεβρουάριος-Ιούλιος 2017), εξέτασε δείγματα κρέατος κοτόπουλου από τρεις πτηνοτροφικές μονάδες στη Δυτική Αλγερία για την παρουσία CPE(ανθεκτικών στην καρβαπενέμη Εντεροβακτηριδίων). Από τα 181 δείγματα, ανιχνεύθηκαν 29(16,0%) στελέχη *Klebsiella pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάση. Με μεθόδους μοριακής ανάλυσης, επιβεβαιώθηκε ότι μόνο στελέχη *K. pneumoniae* κωδικοποιούσαν γονίδια καρβαπενεμάσης: 23 (79,3% των απομονώσεων *K. pneumoniae* [CPKP] που παράγουν καρβαπενεμάση) έφεραν γονίδιο bla OXA-48 και 6 (20,7%) bla NDM-1. (Nadia Chaalal et al.)

4. Υλικά και μέθοδοι

4.1 Συσκευές

- Stomacher (Laboratory Blender Stomacher 400, Seward Medical, Αγγλία)
- ZIBIO EXM 3000 (Μέθοδος Magnetic Beads)
- Θερμικός κυκλοποιητής (Applied Biosystems)
- Αναλυτικός ζυγός
- Θερμομπλόκ
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Τροφοδοτικό ηλεκτροφόρησης
- Φυγόκεντρος
- Ρυθμιζόμενες μικροπιπέτες-PIPETMAN GILSON Classic (20μL,200μL,1000μL)
- Συσκευή Vortex
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Συσκευή με λάμπα UV
- Επωαστικός θάλαμος

4.2 Υλικά

- Πρότυπα στελέχη *Klebsiella Pneumoniae* (Αττικό Νοσοκομείο Αθηνών)
- Δείγματα κρεάτων
- Απιονισμένο νερό
- GoTaq Hot Start Master Mix (Promega GmbH, Mannheim, 68199, Γερμανία)
- Ultra Mix Red (PCR BIO, London, UK)
- Τρυβλία CHROMagar ORIENTATION
- Τρυβλία CHROMagar E.C.C
- Τρυβλία CHROMagar KPC
- Κρίκοι επίστρωσης
- Buffered Peptone Water (BPW)
- Κωνική φιάλη των 250mL
- Ογκομετρική φιάλη 100mL

- Πλαστικά erpendorf των 1.5 mL
- PCR tubes
- Πλαστικά tips
- PCR tubes
- PCR plates
- Γάντια
- Αγαρόζη
- Κιτ απομόνωσης Monarch Nucleic Acid Purification Kit (BioLabs, New England)
- Κιτ απομόνωσης ZYBIO
- Δείγματα DNA
- Stock Solution
- Εκκινητές
- Μάρτυρας μοριακών μεγεθών (ladder DNA 100 bp)
- Loading buffer (10x)

4.3 Διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 10x
- Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) 10 mg/mL
- Υγρό ηλεκτροφόρησης (για την παρασκευή 100ml διαλύματος προσθέτουμε 10mL TBE και 90 mL απεσταγμένο νερό)



Laboratory-Equipment.com

Εικόνα 1 Φυγόκεντρος(Thermo Scientific™)



Εικόνα 2 Vortex(Biosan)



Εικόνα 3 Αναλυτικός ζυγός(Precisa)

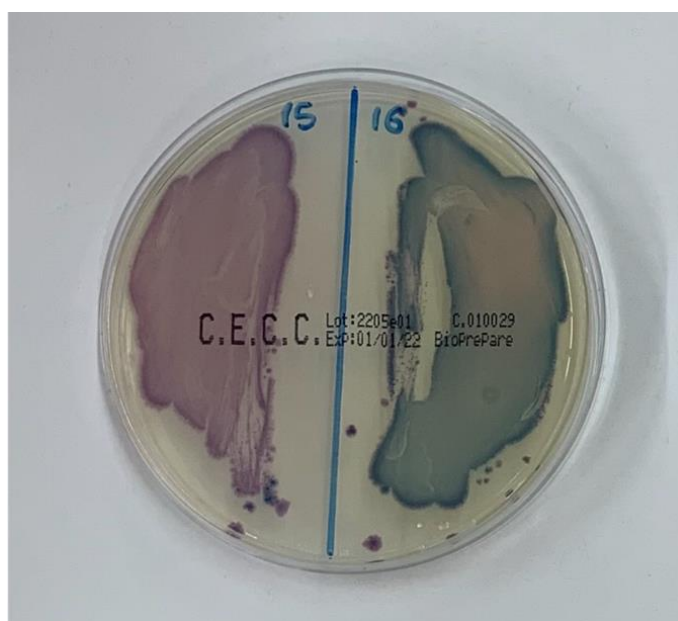


Εικόνα 4 Θερμομπλόκ(Artiglass)

4.4 Συλλογή δειγμάτων

Συνολικά συλλέχθηκαν 40 δείγματα κρέατος από διάφορες τοπικές αγορές που διανεμήθηκαν σε όλη την πόλη της Αθήνας. Αυτά τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση στελεχών *K. pneumoniae*. Τα δείγματα περιλάμβαναν 20 (50%) από βοοειδή, 10 (25%) δείγματα κρέατος από χοιρινό και 10 (25%) από κοτόπουλο.

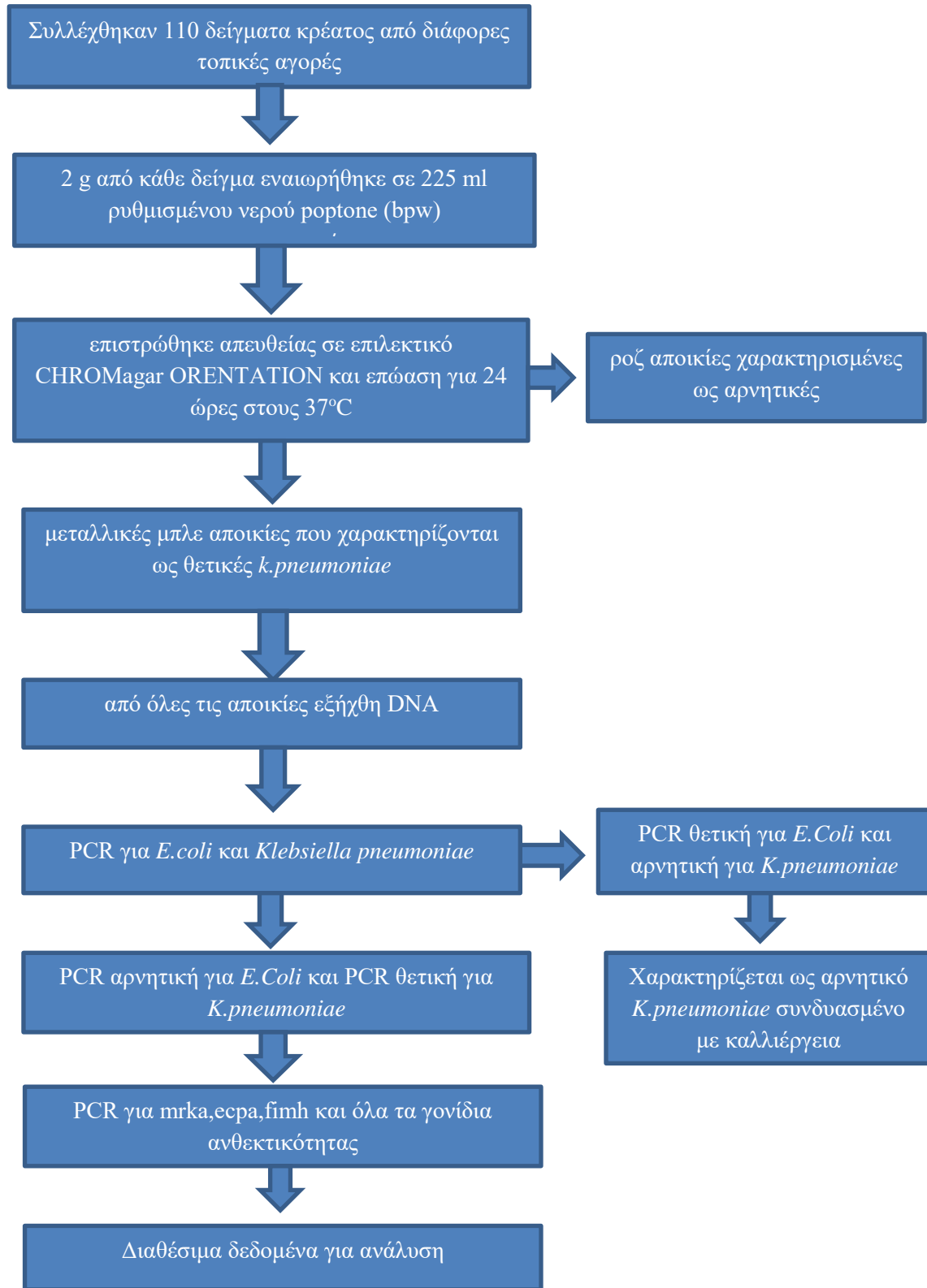
Χρησιμοποιήθηκε επίσης ως θετικός μάρτυρας το γονιδιωματικό DNA ενός κλινικού στελέχους *Klebsiella pneumoniae* (ευαίσθητο), ενώ το κλινικά αναγνωρισμένο στέλεχος εντερίτιδας από *E.coli* ορίστηκε ως αρνητικός έλεγχος. Επίσης, κλινικά στελέχη που χαρακτηρίζονται ως *Klebsiella pneumoniae* blaKPC, blaVIM-1 και blaNDM-1 χαρακτηρίστηκαν ως θετικοί μάρτυρες για την ταυτοποίηση των γονιδίων αντίστασης.



Εικόνα 5 Τρυβλίο C.E.C.C το δείγμα 15 είναι θετικό σε *Klebsiella* ενώ το δείγμα 16 είναι θετικό σε *E.Coli*

4.5 Αναλυτικά η διαδικασία του πειράματος

1. Τα κατεψυγμένα δείγματα κρέατος αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου μέχρις ότου να αποψυχθούν πλήρως.
2. Έπειτα από τον τεμαχισμό τους, ζυγίστηκαν και συλλέχθηκαν 2 γραμμάρια από το κάθε δείγμα, τα οποία μεταφέρθηκαν σε ζωμό ρυθμισμένου νερού πεπτόνης (BPW).
3. Τοποθετήθηκαν στον επωαστικό θάλαμο για 24 ώρες στους 37°C.
4. Ποσότητα 100μL καλλιέργειας προεμπλουτισμού επιστρώθηκε απευθείας σε επιλεκτικό CHROMagar ORIENTATION (Biorprepare Microbiology, Αθήνα, Ελλάδα) και CHROMagar E.C.C. , τα οποία με τη σειρά τους τοποθετήθηκαν στον επωαστικό θάλαμο για 24 ώρες στους 37°C.
5. Επιλέχθηκαν και συλλέχθηκαν με τον κρίκο οι αποικίες με μοβ χρώμα από το CHROMagar E.C.C. και οι αποικίες με μπλε μεταλλικό χρώμα από το CHROMagar ORIENTATION καθώς σύμφωνα με τους κατασκευαστές τα χρώματα αυτά ταυτοποιούσαν την ύπαρξη *Klebsiella*.
6. Απομονώθηκε το DNA από όλες τις αποικίες.
7. Πραγματοποίηση PCR για *E coli* και *Klebsiella pneumoniae*
 - ✓ Η PCR που βγήκε θετική για *E coli* και αρνητική σε *K. Pneumoniae*: χαρακτηρίστηκε ως αρνητική σε συνδυασμό με την καλλιέργεια.
 - ✓ Η PCR που βγήκε αρνητική για *E coli* και θετική για *Klebsiella pneumoniae*: πραγματοποιήθηκε PCR για τα γονίδια *mrkA*, *ecpA*, *fimH* και για όλα τα γονίδια αντοχής.
8. Ηλεκτροφόρηση.
9. Δεδομένα διαθέσιμα για ανάλυση.
10. Επαλήθευση αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης με τρυβλία CHROMagar KPC.



Διάγραμμα ροής 1



Εικόνα 6 Ροζ αποικίες σε τρυβλίο C.E.C.C Θετικό σε *Klebsiella*



Εικόνα 7 Μπλε αποικίες σε τρυβλίο orient θετικό σε *Klebsiella*



Εικόνα 8 Μπλε αποικίες σε τρυβλίο C.E.C.C θετικό σε *E.Coli*



Εικόνα 9 Ροζ αποικίες σε τρυβλίο Orient θετικό σε *E.Coli*

4.6 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων από τις απομονωμένες αποικίες έγινε με δύο τρόπους, χειροκίνητα και αυτόματα. Ο πρώτος πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εμπορικού κιτ απομόνωσης Monarch Nucleic Acid Purification Kit (BioLabs, New England) ενώ ο δεύτερος με αυτόματο εξολκέα ZYBIO EXM 3000 και το κιτ απομόνωσης ZYBIO με τη μέθοδος Magnetic Beads, σύμφωνα με τις οδηγίες κατασκευής.

4.6.1 Αναλυτικά η διαδικασία της απομόνωσης με Monarch Nucleic Acid Purification Kit

ΜΕΡΟΣ 1^ο: Λύση κυττάρου

- A. Τοποθέτηση 600μL δείγματος σε eppendorf και φυγοκέντριση στις 1000 στροφές για 1 λεπτό.
- B. Προσθήκη 1μL πρωτεΐνάση K και 3μL RNαση A για διάλυση κυτταρικής μεμβράνης και RNA και ανάμειξη με vortex για να διασφαλιστεί ότι τα ένζυμα διασπείρονται αποτελεσματικά.
- C. Προσθήκη 100μL Cell Lysis Buffer και απευθείας ανάμειξη με vortex.
- D. Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 56°C.

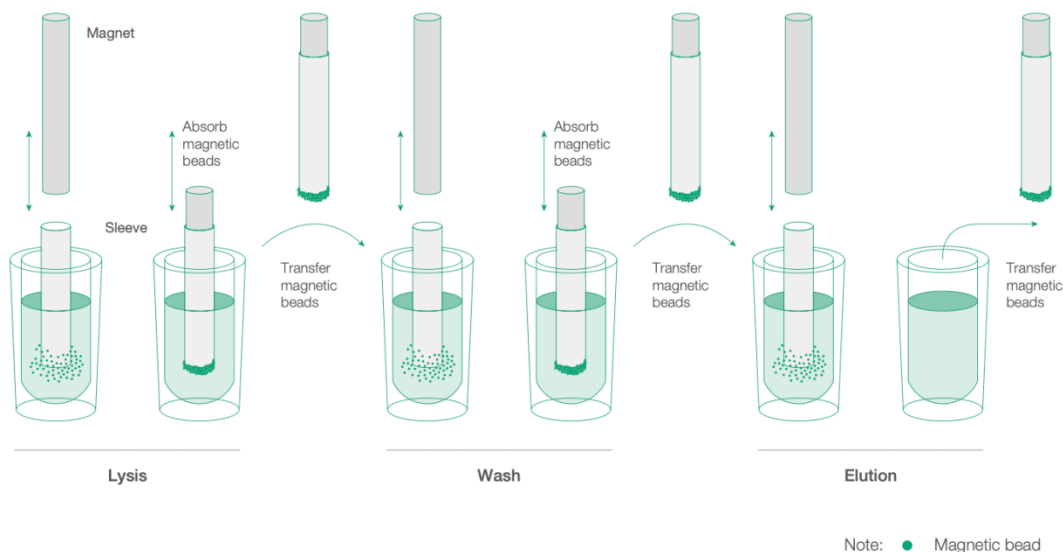
ΜΕΡΟΣ 2^ο: Δέσμευση και εκχύλιση γονιδιωματικού DNA (gDNA)

- A. Προσθήκη 400μL gDNA Binding Buffer στο δείγμα και ανάμειξη με vortex για 5-10 δευτερόλεπτα.
- B. Μεταφορά 600μL του προϊόντος λύσης/δέσμευσης σε μία στήλη καθαρισμού gDNA (gDNA Purification Column), η οποία έχει προεισαχθεί σε σωλήνα συλλογής, χωρίς να ακουμπήσουμε την πάνω περιοχή της στήλης.
Οδηγούμαστε κατευθείαν στο βήμα C. Αποφεύγουμε τη μεταφορά αφρού που μπορεί να έχει δημιουργηθεί κατά την λύση.
- C. Φυγοκέντριση πρώτα για 3 λεπτά στις 1000 στροφές για δέσμευση του gDNA και έπειτα για 1 λεπτό στη μέγιστη ταχύτητα (περίπου >12000 στροφών) για να καθαριστεί η μεμβράνη. Απόχυση και απόρριψη του σωλήνα συλλογής.
- D. Μεταφορά της στήλης σε νέο σωλήνα συλλογής και προσθήκη 500μL gDNA Wash Buffer. Κλείσιμο και αναστροφή μερικές φορές με σκοπό το Wash Buffer να φτάσει μέχρι και το καπάκι (δεν χρησιμοποιούμε vortex). Απευθείας φυγοκέντριση για 1 λεπτό στη μέγιστη ταχύτητα και απόχυση ανεπιθύτου υγρού.
- E. Αντικατάσταση της στήλης στο σωλήνα συλλογής. Προσθήκη 500μL gDNA Wash Buffer και φυγοκέντριση για 1 λεπτό στη μέγιστη ταχύτητα. Απόχυση ανεπιθύμητου υγρού.
- F. Τοποθέτηση του gDNA Purification Column σε eppendorf. Προσθήκη 35-100μL gDNA Elution Buffer προθερμανσμένο στους 60°C. Επώαση για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- G. Φυγοκέντριση για 1 λεπτό στη μέγιστη ταχύτητα για την εκχύλιση του γονιδιωματικού DNA.

4.6.2 Αναλυτικά η διαδικασία της απομόνωσης με τη μέθοδο Magnetic beads (Μαγνητικών σφαιριδίων)

Μετά τη λύση του κυττάρου και της πυρινικής μεμβράνης (πρωτεΐνάση), το DNA έλκεται από τα μαγνητικά σφαιρίδια. Ο μαγνήτης που βρίσκεται ενσωματωμένος στον εξολκέα έλκει τα σφαιρίδια στο εξωτερικό άκρο του, το οποίο καλύπτεται από προστατευτικά, και τα ακινητοποιεί. Με αυτόν τον τρόπο το DNA παραμένει ακινητοποιημένο κατά τη διάρκεια των σταδίων της έκπλυσης και εκχύλισης.

- I. Το κιτ απομόνωσης μένει για 3-5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα αφαιρούμε το φιλμ αλουμινίου από την πλακέτα με τις κυψέλες.
- II. Προσθέτουμε 15μL πρωτεϊνάση K στις κυψέλες της σειράς 1 και 7 (A1-H1 και A7-H7) και στη συνέχεια 200μL δείγματος αντίστοιχα στην κάθε θέση.
- III. Ενεργοποιούμε τον εξολκέα ZYBIO EXM 3000 και τοποθετούμε προσεκτικά την πλακέτα και τα προστατευτικά των μαγνητών.
- IV. Επιλέγουμε το κατάλληλο πρόγραμμα απομόνωσης.
- V. Μετά την λήξη του προγράμματος αφαιρούμε την πλακέτα και τα προστατευτικά και πραγματοποιούμε αποστείρωση με λάμπα UV.
- VI. Το εκχυλισμένο DNA βρίσκεται στις θέσεις A6-H6 και A12-H12 από που παραλαμβάνεται έτοιμο για χρήση ή αποθήκευση.



<https://dlongwood.com/en/products/nucleic-acid-isolation-system-exm3000/>



Εικόνα 10 Μηχάνημα απομόνωσης ZIBIO EXM 3000

4.7 Μέθοδος PCR.

Η τεχνική PCR (Polymerase Chain Reaction) ή αλλιώς τεχνική αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης συμβάλει στην ενίσχυση τμήματος DNA. Αποτελείται από επαναλαμβανόμενους κύκλους οι οποίοι ενισχύουν επιλεγμένες αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων. Η διαδικασία ολοκληρώνεται σε 35 κύκλους και πραγματοποιείται σε προγραμματισμένο θερμικό κυκλοποιητή. Αρχική αποδιάταξη στους 95 °C για 5 λεπτά, στη συνέχεια 35 κύκλοι για αποδιάταξη στους 95 °C για 30 δευτερόλεπτα, υβριδοποίηση στους 50 °C για 30 δευτερόλεπτα, επιμήκυνση στους 72 °C για 1 λεπτό και μια τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 30 λεπτά.

Για την πραγματοποίησή της απαιτούνται:

Πίνακας 1 Μέθοδος PCR

Υλικό	Σκοπός
PCR mix	Περιέχει απαραίτητα ένζυμα και πρόδρομες ουσίες (Taq πολυμεράση, MgCl ₂ , dNTPs)
Πρότυπο DNA	Η αλληλουχία που θέλουμε να ενισχύσουμε
Ζεύγος εκκινητών (primers)	Πρωταρχικά τμήματα για το σχηματισμό συμπληρωματικών DNA
Απιονισμένο νερό	Παρέχει το υγρό περιβάλλον για να λάβει χώρα η αντίδραση

Αποτέλεσμα είναι η εκθετική αύξηση των αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου καθώς στον κάθε κύκλο, η ποσότητα των προϊόντων της PCR διπλασιάζεται.

Πριν την χρήση τους, προτίθεται απιονισμένο νερό στους εκκινητές σε ποσότητα σύμφωνη με τις οδηγίες του κατασκευαστή. 10μL από τον καθένα αραιώνονται (1:10) σε ξεχωριστό erpendorf το οποίο αποθηκεύεται στους -20°C.

4.7.1 Προετοιμασία δειγμάτων PCR:

Κάθε μίγμα PCR είχε συνολικό όγκο 50μL αποτελούμενο από:

- 25μL mix (GoTaq Hot Start Master Mix ή Ultra Mix Red)
- 10μL DNA
- 1μL από κάθε εκκινητή
- ddH₂O μέχρι τη συμπλήρωση τελικού όγκου

Βήμα 1^ο: Βγάζουμε το mix της PCR και τους εκκινητές από την κατάψυξη και τους αφήνουμε 5 λεπτά ώστε να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου. Είναι σημαντικό να ξεπαγώσει όλο το μίγμα.

Βήμα 2^ο: Προσθέτουμε σε ένα eppendorf 25 μL PCR mix που περιέχει τα απαραίτητα, για την πραγματοποίηση της αντίδρασης, ένζυμα και πρόδρομες ουσίες όπως Taq DNA πολυμεράση, reaction buffer, MgCl₂, dNTP και νερό χωρίς νουκλεάση.

Βήμα 3^ο: Προσθέτουμε 1μL από κάθε εκκινητή. Αναδεύουμε με την πιπέτα.

Βήμα 4^ο: Υπολογίζουμε πόσο ddH₂O θα χρειαστεί ώστε να φτάσουμε τον όγκο των 40μL καθώς το DNA που θα προστεθεί έπειτα είναι 10μL άρα θα φτάσουμε τον τελικό όγκο των 50μL.

Βήμα 5^ο: Μοιράζουμε 40μL από το μίγμα σε PCR tubes. Τα πωματίζουμε και τα αριθμούμε.

Βήμα 6^ο: Προσθέτουμε 10μL DNA σε κάθε tube με τη σειρά και αναδεύουμε με την πιπέτα. Στο πρώτο τοποθετούμε συνήθως το δείγμα που περιέχει νερό, στο δεύτερο τον αρνητικό μάρτυρα, στο τρίτο τον θετικό και συνεχίζουμε με τα άγνωστα δείγματα.

Βήμα 7^ο: Τα PCR tubes μπαίνουν σε ειδική πλακέτα και αυτή τοποθετείται στον θερμικό κυκλοποιητή. Προγραμματίζουμε το σύστημα ανάλογα με τη θερμοκρασία και τους κύκλους που θέλουμε να ακολουθήσουν.

4.7.2 Στάδια κάθε κύκλου:

Θέρμανση στους 95 °C για 5 λεπτά για μια αρχική μετουσίωση

- Αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA-στόχων.

35 κύκλοι ενίσχυσης

- στους 95 °C για 30 δευτερόλεπτα
- στους 50 °C για 30 δευτερόλεπτα
- στους 72 °C για 1 λεπτό

τελική επέκταση στους 72 °C για 30 λεπτά

https://aricjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13756-021-00923-w?fbclid=IwAR1HI7XkjF9TvlJstpM2SAUj3LaLsfF8xu38kVZktTupqZzAk4g_U6Z11gU#Sc2



Εικόνα 11 Θερμικός κυκλοποιητής (Applied Biosystems)

Πίνακας 2. Αλληλουχίες εκκινήτων

Target genes	Primer sequence	Ampillicon size(bp)
BlaIMP-1	F: 5'-TGA GCA AGT TAT CTG TAT TC-3' R: 5'-TTA GTT GCT TGG TTT TGA TG-3'	139
BlaOXA-48	F: 5'-TTG GTG GCA TCG ATT ATC GG-3' R: 5'-GAG CAC TTC TTT TGT GAT GGC-3'	281
fimH	F: 5'-CGC CTG GTC CTT TGC CTG CA-3' R: 5'-CTG CAC GTT GCC GGC GGT AA-3'	817
ecpA	F: 5'-AAT GGT TCA CCG GGA CAT CAT GTC C-3' R: 5'-AAG GAT GAA ATA TCG CCG ACA TCC-3'	759
mrkA	F: 5'-GTT AAC GGC GGC CAG GGC AGC GA-3' R: 5'- AGG TGA AAC GCG CGC CAT CA-3'	382
BlaVIM	F: 5'- GAT GGT GTT TGG TCG CAT A-3' R: 5'-CGA ATG CGC AGC ACC AG-3'	390
BlaNDM	F: 5'-GGT TTG GCG ATC TGG TTT TC-3' R: 5'- CGG AAT GGC TCA TCA CGA TC-3'	521
BlaKPC	F: 5'-ATG TCA CTG TAT CGC CGT CT-3' R: 5'-TTT TCA GAG CCT TAC TGC CC-3'	538
E.coli	F: 5'-TGA TTG AAG CAG AAG CCT GC-3' R: 5'-CGC CAA TCC ACA TCT GTG AA-3'	1350
Klebsiella pneumoniae	F: 5'- ATT TGA AGA GGT TGC AAA CGA T-3' R: 5'- TTC ACT CTG AAG TTT TCT TGT GTT C-3'	130

4.8 Ταυτοποίηση στελεχών με PCR

Το χρώμα των αποικιών στα τρυβλία ήταν η πρώτη ένδειξη για το είδος του στελέχους που αναπτυσσόταν. Για την επιβεβαίωση ότι η επιλεγμένη αποικία ήταν *Klebsiella pneumoniae*, στην οποία θέλαμε να καταγράψουμε τα γονίδια αντοχής, και όχι άλλος μικροοργανισμός πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες PCR.

4.8.1 Επιβεβαίωση *E. coli* με PCR

Η δοκιμασία PCR πραγματοποιήθηκε κατά τον ίδιο τρόπο για την ταυτοποίηση στελεχών *E. coli*. Το γονιδιωματικό DNA ενός ευαίσθητου κλινικού στελέχους *Klebsiella pneumoniae* και εντερίτιδας από σαλμονέλα χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες. Τα προϊόντα PCR διαμοιράστηκαν σε πήκτωμα αгарόζης 2,2%, χρωματισμένο με βρωμιούχο αιθίδιο. Τα δείγματα που βρέθηκαν θετικά σε *E.coli* απορρίφθηκαν από τη μετέπειτα εξέταση γονιδίων αντοχής.

4.8.2 Επιβεβαίωση *K. pneumoniae* με PCR

Η δοκιμασία PCR πραγματοποιήθηκε κατά τον ίδιο τρόπο για την ταυτοποίηση στελεχών *K. pneumoniae*. Το γονιδιωματικό DNA των στελεχών *E. coli* και *Salmonella enteritis* χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες. Τα προϊόντα PCR διαμοιράστηκαν σε πήκτωμα αгарόζης 2%, χρωματισμένο με βρωμιούχο αιθίδιο. Τα δείγματα που βρέθηκαν αρνητικά σε *K. pneumoniae* απορρίφθηκαν ενώ τα θετικά επιλέχθηκαν για τη μετέπειτα εξέταση παρουσίας γονιδίων αντοχής.

4.8.3 Ανίχνευση των γονιδίων *espA*, *fimH* και *mrkA* με Multiplex PCR

Τα γονίδια *espA*, *fimH* και *mrkA* ανιχνεύθηκαν με βάση το δημοσιευμένο γονιδίωμα του στελέχους *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044.). Οι αντιδράσεις PCR διεξήχθησαν σε θερμικό κυκλοποιητή (Applied Biosystems). Οι συνθήκες ενίσχυσης αποτελούνταν από ένα αρχικό στάδιο μετουσίωσης 5 λεπτών στους 95°C, ακολουθούμενο από 35 κύκλους μετουσίωσης 35 δευτερολέπτων στους 94°C, 60 δευτερόλεπτα αναδιάταξη στους 58°C και επέκταση 60 δευτερολέπτων στους 72°C και ένα τελικό βήμα επέκτασης στους 72°C για 30 λεπτά. Τα προϊόντα PCR διαμοιράστηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 3,3%, χρωματισμένο με βρωμιούχο αιθίδιο. Το γονιδιωματικό DNA των ανθεκτικών κλινικών στελεχών *Klebsiella pneumoniae* χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες.

4.8.4 Ανίχνευση των γονιδίων αντοχής *blaKPC*, *blaNDM*, *blaVIM*, *blaIMP* και *blaOXA-48* από διαφορετικές αναλύσεις Multiplex PCR

Πραγματοποίηση τριών multiplex αναλύσεων για ανίχνευση τριών συνδυαστικά σετ ανθεκτικών γονιδίων. Το σετ 1 αναφέρεται στα γονίδια *blaVIM*, *blaKPC*, το σετ 2 αναφέρεται στο *blaNDM* και στο Σετ 3 αναφέρεται στα γονίδια *blaIMP* και *blaOXA-48*. Οι αντιδράσεις PCR διεξήχθησαν σε θερμικό κυκλοποιητή (Applied Biosystems). Οι συνθήκες ενίσχυσης αποτελούνταν από ένα αρχικό στάδιο μετουσίωσης 5 λεπτών στους 95°C, ακολουθούμενο από 35 κύκλους μετουσίωσης 35 δευτερολέπτων στους 94°C, 60 δευτερόλεπτα αναδιάταξη στους 58°C και επέκταση 60 δευτερολέπτων στους 72°C και ένα τελικό βήμα επέκτασης στους 72°C για 30 λεπτά. Τα προϊόντα PCR διαμοιράστηκαν σε πηκτώματα αγαρόζης 3,3%, χρωματισμένα με βρωμιούχο αιθίδιο. Το γονιδιωματικό DNA των ανθεκτικών κλινικών στελεχών *Klebsiella pneumoniae* χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες.

4.9 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη

4.9.1 Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης

- Ζυγίζονται 2,2g αγαρόζης(για μονό δίσκο) ή 3,3g (για διπλό), τοποθετούνται σε κωνική φιάλη των 500ml και προστίθενται 10mL TBE και 90 mL απεσταγμένο νερό ή 15 mL και 135 mL αντίστοιχα.
- Η κωνική φιάλη τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων και αφήνεται μέχρι να λιώσει η αγαρόζη και να δημιουργηθεί ένα διαφανές διάλυμα.
- Αφήνεται το διάλυμα να κρυώσει μέχρι τους 60° C και προσθέτουμε 10μl βρωμιούχο αιθίδιο (Το βρωμιούχο αιθίδιο αποτελεί ισχυρό μεταλλαξογόνο παράγοντα και είναι μέτρια τοξικό. Επομένως απαιτείται η χρήση γαντιών όταν χρησιμοποιούνται διαλύματα που περιέχουν αυτή την χρωστική).
- Το πλαστικό χτενάκι τοποθετείται πάνω από τον πλαστικό δίσκο, ώστε όταν προστεθεί το διάλυμα της αγαρόζης να σχηματιστούν πηγαδάκια. Έπειτα ρίχνουμε προσεκτικά το διάλυμα της αγαρόζης μέσα στο δίσκο ώστε να μην δημιουργούνται φυσαλίδες.
- Ο δίσκος τοποθετείται στο ψυγείο σε επίπεδο ράφι έως ότου πήξει, περίπου 20 λεπτά. Στην συνέχεια αφαιρούμε την χτένα και τοποθετούμε τον δίσκο στη συσκευή της ηλεκτροφόρησης.
- Προσθέτουμε υγρό ηλεκτροφόρησης μέχρι να καλυφθεί το τζελ.
- Τοποθετούμε με μια πιπέτα 15μL δείγματος κατά σειρά σε κάθε εγκοπή της πηκτής αγαρόζης και τέλος 4 μL ladder. Στην πρώτη εγκοπή τοποθετούμε το δείγμα με το νερό και στη δεύτερη το DNA του αρνητικού μαρτύρα(E.coli) και στην τρίτη του θετικού(Kl.pneumoniae).
- Κλείνουμε καπάκι της συσκευής, συνδέουμε τα καλώδια στους κατάλληλους πόλους και επιλέγουμε τη φορά του πεδίου, έτσι ώστε το DNA να μετακινείται προς την άνοδο (+). Η ηλεκτροφόρηση γίνεται υπό σταθερή τάση 100V για 30 min.
- Κλείνουμε τη συσκευή και μεταφέρουμε το τζελ στη συσκευή με τη λάμπα UV προς εξέταση. Καταγράφουμε τα αποτελέσματα και βγάζουμε φωτογραφίες. Οι φωτογραφίες των προϊόντων της ηλεκτροφόρησης λαμβάνονται με την ψηφιακή κάμερα που βρίσκεται συνδεδεμένη με ηλεκτρονικό υπολογιστή.

Υλικό	Δοσολογία (Gel 20 θέσεων)	Δοσολογία (Gel 40 θέσεων)
Αγαρόζη	2,2g	3,3g
TBE	10mL	15mL
Απεσταγμένο νερό	90mL	135mL
Βρωμιούχο αιθίδιο	10μL	10μL

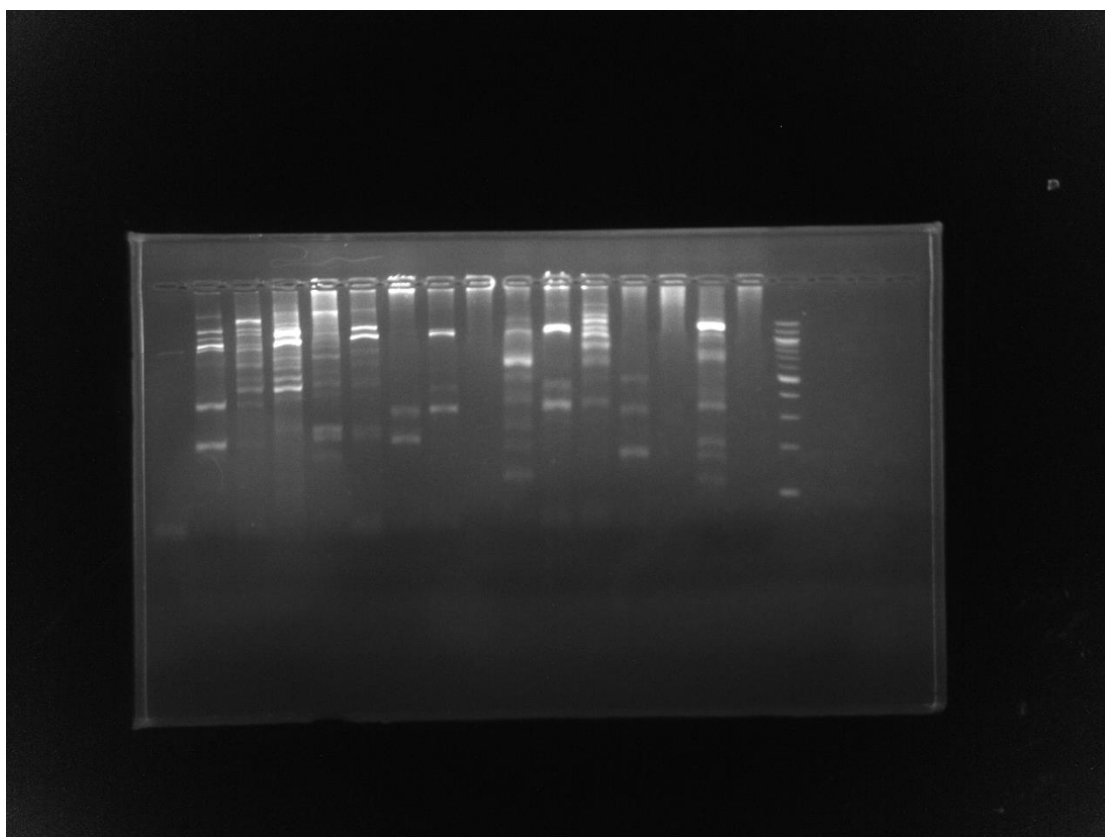
Πίνακας 3 Παρασκευή πηκτής αγαρόζης 2.2 και 3.3%

4.9.2 Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια αναλυτική μέθοδος στην οποία οι διαχωρισμοί βασίζονται στις διαφορετικές κινητικότητες (δηλαδή ταχύτητα συν κατεύθυνση κίνησης) δύο ή περισσότερων φορτισμένων αναλυτών (ιονικών ενώσεων) ή σωματιδίων που συγκρατούνται σε ένα αγωγίμο μέσο υπό την επίδραση εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού συνεχούς ρεύματος πεδίου. Η μετακίνηση των μορίων DNA μέσα στο πήκτωμα αγαρόζης εξαρτάται από το μοριακό μέγεθός τους. Η σχέση ταχύτητας-μεγέθους είναι αντιστρόφως ανάλογη. Στην ηλεκτροφόρηση η κίνηση γίνεται προς το ηλεκτρόδιο με αντίθετο φορτίο από αυτό του σωματιδίου ή του ιόντος που διαχωρίζεται. Τα κατιόντα είναι θετικά φορτισμένα ιόντα και κινούνται προς το αρνητικό ηλεκτρόδιο (την κάθοδο). Τα ανιόντα είναι αρνητικά φορτισμένα ιόντα και μετακινούνται προς το θετικό ηλεκτρόδιο (την άνοδο).

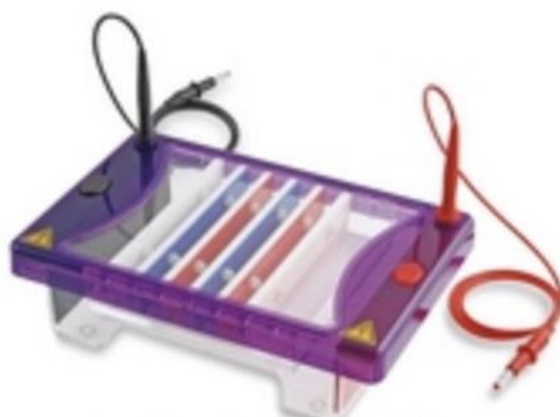
Κατά την κίνηση των νουκλεϊκών οξέων, στο πήκτωμα σχηματίζονται μη ορατές ζώνες. Αυτές καθίστανται ορατές με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) το οποίο δεσμεύεται από τα μόρια DNA και, κατά την έκθεσή του σε υπεριώδη ακτινοβολία, παρατηρείται φθορισμός.

Με σκοπό τον ποσοτικό προσδιορισμό μορίων DNA στα δείγματα, πέρα από τα δείγματα προστίθεται και ο ποσοτικοποιημένος μάρτυρας (ladder) στο πήκτωμα αγαρόζης. Ο μάρτυρας περιέχει νουκλεϊκά οξέα γνωστού μεγέθους και συγκέντρωσης. Επειδή η ποσότητα EtBr που δεσμεύεται είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των νουκλεϊκών οξέων, συγκρίνουμε το φθορισμό των άγνωστων δειγμάτων με το φθορισμό του μάρτυρα ως προς τις θέσεις των ζωνών και της έντασης φθορισμού. (Campbell, N. and Reece, J., 2010)



Εικόνα 12 Ηλεκτροφόρηση με γονίδια OXA-IMP(281-139bp) σε πηκτή αραρόζης 2,2%

Τα όργανα για την πραγματοποίηση ηλεκτροφόρησης είναι ένα μέσο παραγωγής τάσης συνεχούς ρεύματος, μια δεξαμενή προσωρινής αποθήκευσης που διαθέτει επίσης κάποιο μέσο συγκράτησης των μέσων διαχωρισμού μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων. Η τροφοδοσία μπορεί να είναι 100–500 V. Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης το gel τοποθετείται σε ένα υπεριώδες φως (UV) ή κάτω από μια λάμπα UV ώστε να αποκαλύψει τις ζώνες απορρόφησης υπεριώδους ακτινοβολίας και ζώνες φθορισμού UV. (D.Perrett)



Εικόνα 13 Συσκευή ηλεκτροφόρησης(Clever Scientific)



Εικόνα 14 Τροφοδοτικό ηλεκτροφόρησης(Major Science)



Εικόνα 15 Συσκευή με λάμπα UV(Bio Imaging Systems)

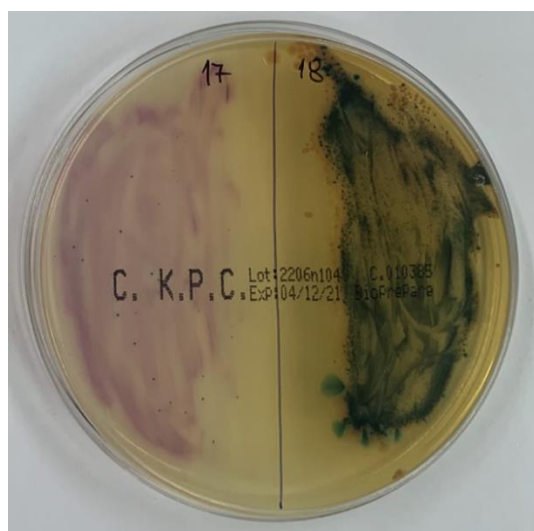
4.10 Επαλήθευση αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης με τρυβλία CHROMagar KPC.

Τα τρυβλία CHROMagar KPC είναι ειδικά υποστρώματα που περιέχουν καρβαπενέμη. Οι μικροοργανισμοί για να αναπτυχθούν σε ένα τέτοιο υπόστρωμα θα πρέπει να έχουν το γονίδιο της καρβαπενεμάσης αλλιώς θανατώνονται. Επομένως ανάλογα με την ανάπτυξη ή μη που θα παρατηρηθεί στο τρυβλίο μετά την επώαση συμπεραίνουμε αντίστοιχα το ανθεκτικό ή μη στέλεχος. Ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- Ποσότητα 100μL καλλιέργειας προεμπλουτισμού επιστρώθηκε απευθείας σε επιλεκτικό CHROMagar KPC τα οποία με τη σειρά τους τοποθετήθηκαν στον επωαστικό θάλαμο για 24 ώρες στους 37°C.
- Μελετήθηκε και καταγράφηκε η ανάπτυξη αποικιών. Η ύπαρξη αποικιών θεωρείται θετικό αποτέλεσμα, δηλαδή ότι υπάρχει στέλεχος με το ανθεκτικό γονίδιο KPC.
- Σύγκριση μεταξύ ένδειξης τρυβλίων και αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης.

Τα αποτελέσματα της σύγκρισης επαλήθευσαν την εκτίμηση της ηλεκτροφόρησης σε ποσοστό 90%.

Στην εικόνα που ακολουθεί φαίνεται δεξιά το θετικό αποτέλεσμα (δείγμα 18) , ανάπτυξη δηλαδή αποικιών και αριστερά το αρνητικό (δείγμα 17). Αντίστοιχα, η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων αυτών έδειξε τα ίδια αποτελέσματα.



Εικόνα 16 Ο ροζ χρωματισμός που παρατηρείται στην αριστερή πλευρά του τρυβλίου οφείλεται σε χρωστική.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Συνολικά, η *Klebsiella pneumoniae* ανιχνεύθηκε στην πλειοψηφία των καλλιεργειών, σε ποσοστό 82,5 % (33 από 40) των δειγμάτων που συλλέχθηκαν, ενώ το *Escherichia coli* ανιχνεύθηκε μόνο σε 7 δείγματα (17,5%).

Η PCR χρησιμοποιήθηκε για να επιβεβαιώσει όλα τα ευρήματα:

Τα ευρήματά μας αποκάλυψαν ότι το 36,4 % (12/33) των στελεχών *K. pneumoniae* έδειξαν στην ηλεκτροφόρηση ζώνη στη θέση 759 bp που αντιστοιχεί στο μοριακό βάρος του γονιδίου *espA*. Επιπλέον, τα γονίδια *fimH-1* και *mrkA*, τα οποία κωδικοποιούν fimbrial adhesins τύπου 1 και τύπου 3, βρέθηκαν σε 6 (18,2%) και 24 (72,8%) από τις απομονώσεις, αντίστοιχα. Είναι ενδιαφέρον ότι το 12,2% (4/33) των στελεχών είχε τον γονότυπο *espA+* /*fimH+* /*mrkA+*, το 0% (0/33) είχε τον γονότυπο *espA+* /*fimH+* / *mrkA-* και το 24,3% (8/33) είχε τον γονότυπο *espA+* / *fimH-* /*mrkA+*. Το *bla*NDM, είχε γονοτυπική συχνότητα 51,5% (17/33), ακολουθούμενο από το *bla*OXA-48, το οποίο είχε γονοτυπική συχνότητα 27,3%(9/33). Έπειτα τα γονίδια τύπου *bla*IMP, *bla*VIM- και *bla*KPC, με συχνότητα 6,1%(2/33).

3 δείγματα είχαν ταυτόχρονα δύο γονίδια αντίστασης (*bla*OXA-48 και *bla*IMP) και 3 είχαν ταυτόχρονα τα γονίδια αντοχής *bla*VIM και *bla*KPC.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Συνολικά, η *Klebsiella pneumoniae* ανιχνεύθηκε στην πλειοψηφία των καλλιεργειών, σε ποσοστό 82,5 % (33 από 40) των δειγμάτων που συλλέχθηκαν, ενώ το *Escherichia coli* ανιχνεύθηκε μόνο σε 7 δείγματα (17,5%). Σε παρόμοιες έρευνες όπως στην Αριζόνα το *K. pneumoniae* βρέθηκε σε 174 από τα 1728 (10%) ανθρώπινα κλινικά στελέχη που ελήφθησαν από το Ιατρικό Κέντρο Flagstaff καθ' όλη την περίοδο συλλογής. Ομοίως, το *K. pneumoniae* βρέθηκε σε 241 (47%) από τα 508 τοπικά είδη κρέατος. Η μόλυνση από προϊόντα κρέατος διέφερε σημαντικά ανάλογα με τον τύπο κρέατος, με 58 % (65/112) για το χοιρινό, 47 % (128/272) για το κοτόπουλο και 38 % (48/128) για τη γαλοπούλα (Gregg S. Davis et al). Ακόμη στην Κίνα ερευνήθηκαν 794 δείγματα φρέσκου κρέατος λιανικής. Συνολικά απομονώσεις *Enterobacteriaceae* (CRE) βρέθηκαν ανθεκτικά στην καρβαπενέμη σε 105 από 794 (13,2%) δείγματα, συμπεριλαμβανομένων 94 απομονώσεων *Escherichia coli* και 10 *Klebsiella pneumoniae*. Από το 2016 (9,4%) έως το 2018, το θετικό ποσοστό αυξήθηκε δραματικά (22,2%). Βρέθηκαν μόνο γονίδια blaNDM, με τα πλασμίδια IncX3 να φέρουν το 79,1% των γονιδίων blaNDM. (Qianhui Zhang et al). Ετσι, σε σύγκριση με τις παραπάνω έρευνες ότι το δικό μας ποσοστό ανίχνευσης σε *klebsiella pneumoniae* κρίνεται υψηλό.

Τα γονίδια με την μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης ήταν κατά φθίνουσα σειρά τα: mtrkA(72,8%),NDM(51,5%),ecpA(36,4%),OXA-48(27,3%),fimH(18,2%),KPC-VIM-IMP(6,1%). Σύμφωνα με την ελληνική έρευνα σε κλινικά απομονωμένα στελέχη, η σειρά των γονιδίων ήταν: KPC(66,5%),NDM(13,7%),VIM(8,6%),OXA-48(3,6%)(Irene Galani et al.). Σε σύγκριση με την δική μας, δεν βρίσκεται ιδιαίτερη ομοιότητα ούτε στη επαναληψιμότητα ούτε στη συγκέντρωση τους ποσοστιαία. Αυτό μπορεί να αποδεικνύει την διαφορετικότητα μεταξύ των κλινικών και τροφιμογενών στελεχεών.

Όσον αφορά την διεκπεραίωση πειραμάτων σε τρόφιμα, δεν βρέθηκαν έρευνες που να ανιχνεύουν το σύνολο όλων των γονιδίων ταυτόχρονα. Επομένως, δεν υπάρχει παρόμοια έρευνα για να συγκριθεί απόλυτα.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μικροβιακή αντοχή (AMR) είναι ένα σύνθετο και επείγον παγκόσμιο ζήτημα που πρέπει να αντιμετωπιστεί από ποικίλες προοπτικές από τους διάφορους ενδιαφερόμενους φορείς, συμπεριλαμβανομένων φαρμακευτικών εταιρειών, ιατρών, φαρμακείων, μεγάλων διακρατικών δικτύων, διαγνωστικών εταιρειών και ερευνητικών ιδρυμάτων .

Δεν εντοπίζεται σαφής λόγος για την υψηλή συχνότητα εμφάνισης του *Klebsiella pneumoniae*, καθώς υπάρχουν πολλά σημεία από τον αγρότη προς το καταναλωτή όπου θα μπορούσαν να έχουν προκύψει επιμολύνσεις. Ως αποτέλεσμα, απαιτείται περισσότερη έρευνα για να εξηγηθεί αυτό εξίσου μεγάλη προσοχή σε όλα τα στάδια. Ωστόσο, η ανίχνευση του παθογόνου, ιδιαίτερα σε δείγματα ακατέργαστων τροφίμων, είναι κρίσιμη, καθώς θα μπορούσε να αποτελέσει σοβαρό «φορέα» για την εξάπλωση και την επιμονή των νοσοκομειακών λοιμώξεων. Μετά τον εντοπισμό της κύριας πηγής μόλυνσης που ευθύνεται για την ασθένεια που παρατηρείται σε δείγματα κρέατος, οι έμμεσες μέθοδοι προστασίας και πρόληψης είναι σημαντικές.

Ένα άλλο συμπέρασμα της μελέτης μας είναι η ύπαρξη τουλάχιστον 5 γονιδίων αντίστασης *Klebsiella pneumoniae*, γεγονός που αποδεικνύει το μέγεθος της παρεμπόδισης κατά την προσπάθεια αντιμετώπισης και εκρίζωσης αυτού του οργανισμού. Τα ευρήματά μας συνάδουν με αναφορές για ανθεκτικό στα αντιβιοτικά *Klebsiella pneumoniae* που βρέθηκε σε ποικιλία πουλερικών και προϊόντων κρέατος , υποδηλώνοντας ότι το *Klebsiella pneumoniae* έχει τη δυνατότητα να χρησιμεύσει ως δεξαμενή για γονίδια αντιβιοτικών στην τροφική αλυσίδα.

Λόγω της έλλειψης δεδομένων όσον αφορά τα γονίδια λοιμογόνου δράσης και ανθεκτικότητας στον εφοδιασμό τροφίμων στην Ελλάδα, αυτή η εργασία είναι καινοτόμος. Με γνώμονα αυτά τα κενά γνώσης, η έναρξη μιας συλλογής δεδομένων για το *Klebsiella pneumoniae* των τροφίμων(τροφιμογενή) και τις νοσοκομειακές λοιμώξεις από αυτήν θα είναι ευεργετική, προκειμένου να χαρακτηριστούν τα γονίδια αντίστασης και η συχνότητα εμφάνισης τους. Οι πληροφορίες που συλλέγονται θα βοηθήσουν στον προσδιορισμό του πιθανού κινδύνου του *Klebsiella pneumoniae* στην ασφάλεια των τροφίμων, την υγιεινή στη λιανική πώληση των τροφίμων και γενικότερα τη δημόσια υγεία στην Ελλάδα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Επιστημονικά άρθρα:

- Abraham Borer MD, Lisa Saidel-Odes MD, Seada Eskira RN, MPH, Ronit Nativ RN, MPH, Klaris Riesenber MD, Ilana Livshitz-Riven RN, PhD, Francisc Schlaeffer MD, Michael Sherf MD, Nejama Peled MA (2012) Risk factors for developing clinical infection with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospital patients initially only colonized with carbapenem-resistant *K pneumoniae*
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196655311008443?via%3Dihub>
- A. Ghasemian, A.M. Mobarez, S.N. Peerayeh, A.T. Bezmin Abadi (2019) The association of surface adhesin genes and the biofilm formation among *Klebsiella oxytoca* clinical isolates. *New Microbes and New Infections*, Volume 27, January 2019, Pages 36-39
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S205229751830057X>
- A. Vatopoulos (2008) High rates of metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece- a review of the current evidence
https://www.eurosurveillance-org.translate.googleusercontent.com/content/10.2807/es.e13.04.08023-en?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=el&_x_tr_hl=el&_x_tr_pto=sc
- B. L. Allen, G F Gerlach, S Clegg (1991). Nucleotide sequence and functions of mrk determinants necessary for expression of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal Of Bacteriology*.
<https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/jb.173.2.916-920.1991>
- Chang-Ro Lee, Jung Hun Lee, Kwang Seung Park, Young Bae Kim, yeong Chul Jeong, Sang Hee Lee (2016), Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Frontiers in Microbiology*
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00895/full#B227>
- Chih-Cheng Lai, Wen-Liang Yu (2021) *Klebsiella pneumoniae* Harboring Carbapenemase Genes in Taiwan: Its Evolution over 20 Years, 1998–2019
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857921000960>
- D. Perrett, (2000) ELECTROPHORESIS
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B012226770200051X#f0045>
- Fereshteh Eftekhari and Parvaneh Nouri (2015), Correlation of RAPD-PCR Profiles with ESBL Production in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Tehran, *Journal Of Clinical & Diagnostic Research*
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4347074/>

- George L. Daikos, Sophia Tsaousi, Leonidas S. Tzouvelekis, Ioannis Anyfantis, Mina Psychogiou, Athina Argyropoulou, Ioanna Stefanou, Vana Sypsa, Vivi Miriagou, Martha Nepka, Sarah Georgiadou, Antonis Markogiannakis, Dimitris Goukos, Athanasios Skoutelisb (2014), Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Infections: Lowering Mortality by Antibiotic Combination Schemes and the Role of Carbapenems. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4023796/>
- Gregg S. Davis, Kara Waits, Lora Nordstrom, Brett Weaver, Maliha Aziz, Lori Gauld, Heidi Grande, Rick Bigler, Joseph Horwinski, Stephen Porter, Marc Stegger, James R. Johnson, Cindy M. Liu, Lance B. Price(2015) Intermingled *Klebsiella pneumoniae* Populations Between Retail Meats and Human Urinary Tract Infections. *Clinical Infectious Diseases*, Volume 61, Issue 6, Pages 892–899
<https://academic.oup.com/cid/article/61/6/892/451463?fbclid=IwAR3jtrab1LH9pNvLglWvmqtb7iFbd7FpwNEwdjyILhkVkiZ3HkaK-7RHU44>
- Irene Galani , Ilias Karaiskos , Irene Karantani, Vassiliki Papoutsaki , Sofia Maraki , Vassiliki Papaioannou, Polyzo Kazila , Helen Tsorlini, Nikoletta Charalampaki, Marina Toutouza, Helen Vagiakou, Konstantinos Pappas, Anna Kyratsa, Konstantina Kontopoulou , Olga Legga, Efthymia Petinaki , Helen Papadogeorgaki, Efrosini Chinou, Maria Souli , Helen Giamarellou, on behalf of the study collaborators (2018)Epidemiology and resistance phenotypes of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece, 2014 to 2016
<https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.30.1700775>
- Isabel Sánchez-Romero, Ángel Asensio, Jesús Oteo, María Muñoz-Algarra, Beatriz Isidoro, Ana Vindel, José Álvarez-Avello, Bárbara Balandín-Moreno, Oscar Cuevas, Sara Fernández-Romero, Luisa Azañedo, David Sáez, José Campos(2012) Nosocomial Outbreak of VIM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates of Multilocus Sequence Type 15: Molecular Basis, Clinical Risk Factors, and Outcome
<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AAC.05036-11>
- James A. Garnett, Verónica I. Martínez-Santos, Zeus Saldaña, Tillmann Pape, William Hawthorne, Jennifer Chan, Peter J. Simpson, Ernesto Cota, José L. Puente, Jorge A. Girón, and Steve Matthews,(2012), Structural insights into the biogenesis and biofilm formation by the *Escherichia coli* common pilus
<https://www.pnas.org/content/109/10/3950>
- Ji Yang, Jonathan J. Wilksch ,Jason W. H. Tan, Dianna M. Hocking, Chaille T. Webb, Trevor Lithgow, Roy M. Robins-Browne, Richard A. Strugnell(2013). Transcriptional Activation of the mrkA Promoter of the *Klebsiella pneumoniae* Type 3 Fimbrial Operon by the c-di-GMP-Dependent MrkH Protein. *PLOS ONE*.
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0079038>

- Johann D. D. Pitout, Patrice Nordmann, Laurent Poirel(2015). Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. ASM Journals-Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 59, No. 10
<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AAC.01019-15>
- Kaisheng Lai, Yanning Ma, Ling Guo, Jingna An, Liyan Ye & Jiyong Yang(2017) Molecular characterization of clinical IMP-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from a Chinese Tertiary Hospital
<https://link.springer.com/article/10.1186/s12941-017-0218-9>
- Laurent Poirel,Thierry Naas,Delphine Nicolas,Louis Collet,Samuel Bellais,Jean-Didier Cavallo, and Patrice Nordmann(2000) Characterization of VIM-2, a Carbapenem-Hydrolyzing Metallo- β -Lactamase and Its Plasmid- and Integron-Borne Gene from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate in France
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC89788/>
- L Silvia Munoz-Price, Laurent Poirel, Robert A Bonomo, Mitchell J Schwaber, George L Daikos, Martin Cormican, Giuseppe Cornaglia, Javier Garau, Marek Gniadkowski, Mary K Hayden, Karthikeyan Kumarasamy, David M Livermore, Juan J Maya, Patrice Nordmann, Jean B Patel, David L Paterson, Johann Pitout, Maria Virginia Villegas, Hui Wang, Neil Woodford, John P Quinn(2013), Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. PubMed.gov
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23969216>
- María D. Alcántar-Curiel,Dana Blackburn,Zeus Saldaña,Catalina Gayosso-Vázquez,Nicole Iovine,Miguel A. De la Cruz& Jorge A. Girón (2013) Multi-functional analysis of *Klebsiella pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation,Department of Molecular Genetics and Microbiology ,InstituteUniversity of Florida,Gainesville,Pages 129-138
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/viru.22974>
- Nadia Chaalal, Abdelaziz Touati, Sofiane Bakour, Mohamed Amine Aissa, Albert Sotto, Jean-Philippe Lavigne, and Alix Pantel(2021)Spread of OXA-48 and NDM Producing *Klebsiella pneumoniae* ST48 and ST101 in Chicken Meat in Western Algeria
<https://www.liebertpub.com/doi/full/10.1089/mdr.2019.0419>
- Najiby Kassis-Chikhani, Dominique Decré, Valérie Gautier, Béatrice Burghoffer, Faouzi Saliba, Daniele Mathieu, Didier Samuel, Denis Castaing, Jean-Claude Petit, Elisabeth Dussaix,Guillaume Arlet(2005) *First outbreak of multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae carrying bla_{VIM-1} and bla_{SHV-5} in a French university hospital* *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 57, Issue 1, January 2006, Pages 142–145
<https://academic.oup.com/jac/article/57/1/142/914991?login=true>

- Peng Lan, Yan Jiang, Jiancang Zhou, Yunsong Yu (2021). A global perspective on the convergence of hypervirulence and carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, Volume 25, Pages 26-34
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213716521000527>
- Qianhui Zhang, Luchao Lv, Xiuyu Huang, Ying Huang, Zilin Zhuang, Jiaxun Lu, Enyu Liu, Miao Wan, Haoliang Xun, Zhiwei Zhang, Jin Huang, Qianhua Song, Chao Zhuo, Jian-Hua Liu(2019) Rapid Increase in Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* in Retail Meat Driven by the Spread of the *bla*_{NDM-5}-Carrying IncX3 Plasmid in China from 2016 to 2018
<https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.00573-19>
- Robert C. Moellering, Jr. (2010), M.D. ,NDM-1 --- A Cause for Worldwide Concern. *The New England Journal of Medicine*.
https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMp1011715?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200www.ncbi.nlm.nih.gov
- Rohollah Khodadadian, Hossein Ali Rahdar, Ali Javadi, Mahmood Safaria, Ahmad Khorshidi(2018). Detection of VIM-1 and IMP-1 genes in *Klebsiella pneumoniae* and relationship with biofilm formation. *Microbial Pathogenesis*, Volume 115, Pages 25-30
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401017314523>
- Samuelsen, M.A. Toleson, V. Hasseltvedt, K. Fursted, T.M. Leegaard, T.R. Walsh, A. Sundsfjord, C.G. Giske, (2011), Molecular characterization of VIM-producing *Klebsiella pneumoniae* from Scandinavia reveals genetic relatedness with international clonal complexes encoding transferable multidrug resistance *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 17, Issue 12, Pages 1811-1816
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14619261>
- Simona Bratu, Mohamad Mooty, Satyen Nichani, David Landman, Carl Gullans, Barbara Pettinato, Usha Karumudi, Pooja Tolaney, John Quale(2005) Emergence of KPC-Possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: Epidemiology and Recommendations for Detection
<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AAC.49.7.3018-3020.2005>
- Sri Harminda Pahm Hartantyo, Man Ling Chau, Tse Hsien Koh, Min Yap, Tseng Yi, Delphine Yan Hong Cao, Ramona Alikiteaga Gutierrez, Lee Ching Ng(2020). Foodborne *Klebsiella pneumoniae*: Virulence Potential, Antibiotic Resistance, and Risks to Food Safety. *Food Prot* 83 (7): 1096–1103
<https://meridian.allenpress.com/jfp/article/83/7/1096/425930/Foodborne-Klebsiella-pneumoniae-Virulence>
- Steen G. Stahlhut, Veronika Tchesnokova, Carsten Struve, Scott J. Weissman, Sujay Chattopadhyay, Olga Yakovenko, Pavel Aprikian, Evgeni V. Sokurenko, Karen Angeliki Krogfelt ,(2009), Comparative Structure-Function Analysis of Mannose-Specific FimH Adhesins from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*

<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/JB.00786-09>

- Vanessa PP Alonso, Murilo M Queiroz, Miriã L Gualberto, Maristela S Nascimento (2019) Klebsiella pneumonia carbapenemase (KPC), methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA), and vancomycin-resistant Enterococcus spp. (VRE) in the food production chain and biofilm formation on abiotic surfaces. Current Opinion in Food Science, Volume 26, Pages 79-86
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214799319300189>
- World Health Organization(2015) Global action plan on antimicrobial resistance: Institutional repository for information sharing, Geneva

Βιβλία:

Campbell, N. and Reece, J.(2010) ΒΙΟΛΟΓΙΑ (τόμος Ι). Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο Κρήτης