



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας  
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών  
ΜΠΣ Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΠΟΥ ΠΑΡΕΧΕΙ  
ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΗΝ ΚΟΛΙΣΤΙΝΗ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΠΟ ΧΟΙΡΟΥΣ

POST GRADUATE THESIS  
MOLECULAR DETECTION OF THE PLASMIDIC GENE THAT PROVIDES COLISTINE RE-  
SISTANCE IN PIG SAMPLES



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ(ΤΩΝ)/NAME OF STUDENTS

**Ερμιόνη Αυγέρη**  
Ermioni Avgeri

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

**Παναγιώτα Γιακκούπη**  
Panagiota Giakkoupi

ΑΙΓΑΛΕΩ/ΑΙΓΑΛΕΟ 2022





Faculty of Health and Caring Professions  
Department of Biomedical Sciences  
Postgraduate program:  
Biomedical methods and technology in diagnosis



POST GRADUATE THESIS  
**MOLECULAR DETECTION OF THE PLASMIDIC GENE THAT PROVIDES COL-  
ISTINE RESISTANCE IN PIG SAMPLES**

Ermioni Avgeri  
dm120003  
ermioneaugere@gmail.com

FIRST SUPERVISOR  
Panagiota Giakkoupi

SECOND SUPERVISOR  
Apostolos Beloukas

AIGALEO 2022



## **Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας**

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Ερμιόνη Αυγέρη του Ηλία, με αριθμό μητρώου dml20003 φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Βιοϊατρικές Μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα 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, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα

Ερμιόνη Αυγέρη



## Περίληψη

Η μικροβιακή αντοχή αποτελεί μία από τις μεγαλύτερες απειλές για τον άνθρωπο τον 21ο αιώνα. Τα αυξημένα επίπεδα χορήγησης αντιβιοτικών στους ανθρώπους και στα ζώα για την προαγωγή της δημόσιας υγείας έχει βοηθήσει στην επικράτηση πολυανθεκτικών βακτηρίων. Η ανάπτυξη της αντοχής παρουσιάζεται ιδιαίτερα στα gram αρνητικά βακτήρια καθώς διαφοροποιείται και εξαπλώνεται με γρήγορους ρυθμούς με αποτέλεσμα ακόμα και αντιβιοτικά της τελευταίας γραμμής να μην είναι αποτελεσματικά και όχι μόνο σε ανοσοκατεσταλμένους αλλά και σε ασθενείς χωρίς υποκείμενα νοσήματα. Ωστόσο, το 2015 αναφέρθηκε για πρώτη φορά στην Κίνα το γονίδιο αντοχής *mcr-1* (mobilized colistin resistance) το οποίο εδράζεται πάνω σε πλασμίδιο που έχει σαν αποτέλεσμα να μεταφέρεται και να διασπείρει εύκολα τη μικροβιακή αντοχή. Επιπλέον, η επικράτηση μικροβίων που παράγουν ευρέος φάσματος β-λακταμάσες (Extended-Spectrum β-lactamases) έχουν ανησυχήσει την επιστημονική κοινότητα διότι εμφανίζονται κυρίως σε νοσοκομειακούς ασθενείς, αλλά και στην κοινότητα και την κτηνοτροφία. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η απομόνωση του μικροβίου *Escherichia coli* σε διαρροϊκά δείγματα από χοίρους, τα οποία προήλθαν από 5 διαφορετικές εκτροφές στην Ελλάδα και η ανίχνευση του γονιδίου αντοχής *mcr*. Ακολουθεί, φαινοτυπική και μοριακή ανίχνευση ESBLs, έλεγχος της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης στην κολιστίνη καθώς και μοριακή τυποποίηση των στελεχών *Escherichia coli* και σύγκριση των μοριακών αποτυπωμάτων. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σύζευξης με υγρές καλλιέργειες για να ελεγχθεί η δυνατότητα αυτό-μετακίνησης των πλασμιδίων στα οποία εδράζονται τα γονίδια αντοχής *mcr* & ESBL. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι σε 4 από τις 5 εκτροφές ανιχνεύθηκε το γονίδιο αντοχής *mcr-1* και καμία άλλη παραλλαγή του. Οι ESBLs ανήκουν στις ομάδες CTX-M-3 και SHV-12 που είναι ευρέως διαδεδομένες. Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση κολιστίνης κυμαινόταν από 0,5 mg/L έως >64 mg/L με MIC<sub>50</sub> τα 8 mg/L. Η μοριακή τυποποίηση έδειξε πολύ μεγάλη ποικιλομορφία, γεγονός που αποδεικνύει καλές συνθήκες υγιεινής στις εκτροφές. Στη συνέχεια, επιλέχθηκαν πέντε στελέχη από ομάδες που περιλάμβαναν 5 στελέχη και πάνω και τυποποιήθηκαν με MLST. Τουλάχιστον 25% των στελεχών ανήκαν στο διεθνή υψηλού κινδύνου κλώνο ST88, που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία προκαλεί λοιμώξεις σε ανθρώπους και ζώα. Η παρουσία του ST88, αναδεικνύει την αντοχή στην κολιστίνη που σημαίνει ότι πρέπει να αντιμετωπιστεί ολιστικά. Τέλος, όλα τα πλασμίδια ήταν συζευκτικά, με υψηλές συχνότητες μεταβίβασης.

Λέξεις κλειδιά: κολιστίνη, *Escherichia coli*, *mcr-1*, μικροβιακή αντοχή

## Abstract

Antimicrobial resistance is one of the biggest threats to humans in the 21st century. Increased levels of antibiotics in humans and animals to promote public health have helped the prevalence of multidrug-resistant bacteria. The development of resistance is particularly pronounced in gram-negative bacteria as it differentiates and spreads rapidly with the result that even last-line antibiotics are not effective not only in immunosuppressed but also in patients without underlying diseases. However, in 2015, the *mcr-1* resistance gene (mobilized colistin resistance) was reported for the first time in China, which is based on a plasmid that has the effect of easily transporting and dispersing microbial resistance. In addition, the retention of microbes that produce broad-spectrum  $\beta$ -lactamases (Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases) has worried the scientific community because they occur mainly in hospital patients, but also in the community and livestock. The aim of this dissertation is the isolation of the *Escherichia coli* bacterium in diarrheal samples from pigs, which came from 5 different farms in Greece and the detection of the *mcr* resistance gene. This is followed by phenotypic and molecular detection of ESBLs, control of the minimum inhibitory concentration in colistin as well as molecular standardization of *e.coli* strains and comparison of molecular fingerprints. Finally, liquid culture coupling experiments were performed to test the self-mobility of plasmids on which the *mcr* & ESBL resistance genes are located. The results show that in 4 of the 5 breeds the *mcr-1* resistance gene was detected and no other variant of it. ESBLs belong to the widespread CTX-M-3 and SHV-12 groups. The minimum inhibitory concentration of colistin ranged from 0.5mg / L to > 64mg / L with a MIC<sub>50</sub> of 8mg / L. Molecular standardization showed great diversity, which proves good hygiene conditions in farms. Then, five strains were selected from groups of 5 strains and above and standardized with MLST. At least 25% of the strains belonged to the international high-risk clone ST88, which according to the literature causes infections in humans and animals. The presence of ST88 highlights the resistance to colistin which means that it must be treated holistically. Finally, all plasmids were conjugated, with high transfer frequencies.

Key words: colistin, *Escherichia coli*, *mcr-1*, antimicrobial resistance



## Περιεχόμενα

<b>Περίληψη</b> .....	iii
<b>Abstract</b> .....	2
Κατάλογος πινάκων.....	5
Κατάλογος εικόνων .....	6
Συντομογραφίες.....	7
Πρόλογος.....	8
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1</b> .....	10
1.1 GRAM ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΗΔΙΑ .....	10
1.2 ESCHERICHIA COLI .....	11
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2</b> .....	12
2.1 ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΣ β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΕΣ (ESBL) .....	12
2.2 ΕΠΙΚΡΑΤΗΣΗ ESBL .....	13
2.3 ΤΥΠΟΙ ESBL .....	14
2.4 CTX-M ESBLs.....	15
2.5 SHV ESBLs.....	18
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3</b> .....	20
3.1 ANTIBIOTIKA .....	20
3.2 ΚΟΛΙΣΤΙΝΗ .....	20
3.3 ΚΟΛΙΣΤΙΝΗ ΚΑΙ ΖΩΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ .....	21
3.4 MCR-1 .....	22
3.5 ΕΠΙΚΡΑΤΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΑΝΤΟΧΗΣ ΠΑΓΚΟΣΜΙΩΣ.....	23
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4</b> .....	24
4.1 Σκοπός της διπλωματικής εργασίας .....	24
4.2 Υλικά και μέθοδοι .....	25
4.2.1 Απομόνωση DNA με βρασμό.....	25
4.2.2 Έλεγχος παρουσίας γονιδίων που προσδίδουν αντοχή στην κολιστίνη με τη μέθοδο της multiplex (πολυπλεκτικής) PCR.....	25
4.2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	26
4.2.4 Φαινοτυπική και γονοτυπική ανίχνευση ESBLs .....	26
4.2.5 Προσδιορισμός ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) στην κολιστίνη. ....	28
4.2.6 Μοριακή τυποποίηση με τη μέθοδο PFGE .....	29

4.2.7 Σύγκριση μοριακών αποτυπωμάτων με δενδρόγραμμα .....	31
4.2.8 MLST και sequencing .....	31
4.2.9 Πειράματα σύζευξης (conjugation) .....	32
4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	32
ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	35
Αναφορές.....	1

## Κατάλογος πινάκων

**Πίνακας 1.** Χώρα και ημερομηνία απομόνωσης β λακταμασών.

**Πίνακας 2.** Κατηγορίες SHV με τη χώρα και το έτος της πρώτης απομόνωσης τους.

**Πίνακας 3.** Υλικά για την multiplex PCR.

**Πίνακας 4.** Συνθήκες multiplex PCR.

**Πίνακας 5.** Primers που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση του mecR γονιδίου.

**Πίνακας 6.** Συνθήκες multiplex PCR για ανίχνευση CTX-M ESBLs.

**Πίνακας 7.** Συνθήκες multiplex PCR για ανίχνευση SHV ESBLs.

**Πίνακας 8.** Συνθήκες multiplex PCR για ανίχνευση AmpC ESBLs.

**Πίνακας 9.** Eucast Breakpoints (v 12.0) για τον χαρακτηρισμό των στελεχών για τα Εντεροβακτηριακά ενάντια στην κολιστίνη σε ευαίσθητα (S) και ανθεκτικά (R).

**Πίνακας 10.** Όρια ευαισθησίας/αντοχής σύμφωνα με το Eucast breakpoints.

**Πίνακας 11.** Ομάδες τυποποίησης.

**Πίνακας 12.** Αποτελέσματα sequencing σύμφωνα με τη βάση δεδομένων του Ινστιτούτου Pasteur.

## Κατάλογος εικόνων

**Εικόνα 1.** Δομή gram αρνητικών βακτηρίων.

**Εικόνα 2.** Ανάπτυξη αποικιών *Escherichia coli* σε θρεπτικό υλικό MacConkey.

**Εικόνα 3.** Εκτίμηση ποσοστών ESBL σε όλο τον κόσμο.

**Εικόνα 4.** Ποσοστά επικράτησης CTX-M και ESBL των μικροβίων *Escherichia coli* και *Klebsiella pneumoniae* στην Ευρώπη, Λατινική Αμερική, Ηνωμένες Πολιτείες και Ασία.

**Εικόνα 5.** Επιδημιολογία SHV. Χώρα και είδος εμφάνισης.

**Εικόνα 6.** Αύξηση χρήσης κολιστίνης και αντοχής ESBL από το 2008 έως το 2014.

**Εικόνα 7.** Εμφάνιση του γονιδίου αντοχής *mcr-1* στους ανθρώπους, στα ζώα και στο περιβάλλον παγκοσμίως.

**Εικόνα 8.** Αποτελέσματα multiplex PCR μετά από ηλεκτροφόρηση σε τζελ αγαρόζης για την ανίχνευση γονιδίου αντοχής *mcr*. Το γονίδιο *mcr-1* αντιστοιχεί στις 320 bp.

**Εικόνα 9.** Multiplex PCR για την ανίχνευση CTX-M.

**Εικόνα 10.** Multiplex PCR για την ανίχνευση SHV.

**Εικόνα 11.** 1<sup>η</sup> Μοριακή τυποποίηση 24 δειγμάτων με τη μέθοδο PFGE.

**Εικόνα 12.** 2<sup>η</sup> Μοριακή τυποποίηση 24 δειγμάτων με τη μέθοδο PFGE.

**Εικόνα 13.** Δενδρόγραμμα σύγκριση ομοιότητας 48 μοριακών αποτυπωμάτων.

**Εικόνα 14.** Ενίσχυση 8 housekeeping γονιδίων με multiplex PCR.

**Εικόνα 15.** Φαινοτυπική ανίχνευση ESBLs.

## Συντομογραφίες

CTX-M: Cefotaxime- hydrolyzing  $\beta$ -lactamase isolated in Munich

Esbl: Extended-Spectrum Beta-Lactamase

ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control (Ευρωπαϊκό Κέντρο Πρόληψης και Ελέγχου Νόσων)

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

Mcr: Mobilized colistin resistance

MIC: Minimum Inhibitory Concentration

MLST: Multi Locus Sequence Typing

PBPs: Penicillin Binding Proteins

PCR: Polymerase chain reaction

PER: Pseudomonas extended resistance

PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis

R: Resistance

S: Sensitivity

SHV: Sulfhydryl reagent variable

ST: Sequence type

TEM: Temoneira

VEB: Vietnam entended-spectrum  $\beta$ -lactamase

## Πρόλογος

Οι μικροβιακές λοιμώξεις απειλούν τη δημόσια υγεία και είναι μία από τις πιο σημαντικές κρίσεις που αντιμετωπίζει η ανθρωπότητα σήμερα ( Morrison & Zembower, 2020). Παρόλο που είναι ευρέως διαδεδομένη τόσο σε διεθνές όσο και σε εθνικό επίπεδο και ταυτόχρονα η ευαισθητοποίηση στην επιστημονική κοινότητα είναι μεγάλη, η μικροβιακή αντοχή συνεχίζει να διαφοροποιείται και να εξαπλώνεται πολύ γρήγορα. Οι χρωμοσωματικές μεταλλαγές και τα πλασμίδια μεταφοράς είναι 2 από τους κύριους μηχανισμούς που επιτρέπει την επιβίωση των μικροβίων σε νοσοκομειακές μονάδες, το περιβάλλον, στους ανθρώπους και τα ζώα. Περισσότεροι από 1,2 εκατομμύρια θάνατοι καταγράφονται το 2019 από ανθεκτικά βακτήρια παγκοσμίως. Το 2013 το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων είχε δημοσιεύσει ότι οι περισσότεροι θάνατοι από πολυανθεκτικά βακτήρια εμφανίζονται στα νοσοκομεία σε σχέση με την κοινότητα αναφέροντας ότι υπάρχουν πάνω από 140.000 λοιμώξεις που σχετίζονται με τα εντεροβακτηριακά. Επίσης, σημαντικό είναι το γεγονός ότι η Ευρώπη αναφέρει το 2016 σημαντική αύξηση αντοχής στις 3ης γενιάς κεφαλοσπορίνες από βακτήρια που παράγουν ευρέως φάσματος β- λακταμάσες στο διάστημα 2012 και 2015 (Exner, et al., 2017).

Επιπλέον, μεγάλος αριθμός μολύνσεων στους ανθρώπους προέρχονται από τα ζώα. Η παραμονή των ζώων σε περιορισμένο χώρο για μεγάλο χρονικό διάστημα και η μειωμένη κινητικότητα τους, επιτρέπει την εύκολη διασπορά μικροβίων και επιβάλλει τη χορήγηση αντιβιοτικών. Συνήθως, τα μικρόβια που εμφανίζονται ανάμεσα στα ζώα είναι *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus spp*, *Streptococcus spp*, *Escherichia coli*, *Proteus spp*, *Klebsiella pneumoniae* στα οποία οφείλονται μεγάλος αριθμός μολύνσεων (Κρίνονογona, et al., 2020). Συγκεκριμένα, τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί αύξηση της ανθεκτικότητας στα εντεροβακτηριακά και σε αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία των ζώων όπου κάποια από αυτά ανήκουν στην ίδια οικογένεια αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται και στους ανθρώπους (Karczmarczyk, et al., 2011). Παρόλο που η χρήση των αντιβιοτικών στους ανθρώπους και τα ζώα είναι μεγάλη, τα αντιβιοτικά είναι διαδεδομένα και στη γεωργία, στις ζωοτροφές και στις υδατοκαλλιέργειες ( Rolain, 2013).

Στο πρώτο κεφάλαιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας γίνεται αναφορά στη δομή των gram αρνητικών βακτηριδίων όπου είναι και ο κύριος λόγος επικράτησης τους ανάμεσα στα είδη. Επίσης, περιγράφονται οι κατηγορίες του μικροβίου *Escherichia coli* καθώς και οι παράγοντες που ευνοούν την επιβίωση τους.

Στο δεύτερο κεφάλαιο δίνεται ο ορισμός για τις β λακταμάσες και αναφέρεται ότι η αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών έχει βοηθήσει όχι μόνο στην εξάπλωση τους σε πολλές χώρες του κόσμου αλλά και στην επικράτηση τους. Στη συνέχεια, σε πίνακα βλέπουμε την ονοματολογία των β λακταμασών καθώς την ημερομηνία και τη χώρα που απομονώθηκαν για πρώτη φορά. Επιπλέον, δίνονται μερικά ποσοστά επικράτησης της κατηγορίας CTX-M και SHV όπου είναι από τις πιο διαδεδομένες κατηγορίες β λακταμασών παγκοσμίως τόσο στους ανθρώπους όσο και στα ζώα.

Στο τρίτο κεφάλαιο, περιγράφεται ότι η κολιστίνη χρησιμοποιείται συχνά για λόγους δημόσιας υγείας στην κτηνοτροφία αλλά και στους ανθρώπους για την αντιμετώπιση των μικροβιακών λοιμώξεων. Επίσης, τονίζεται πόσο στενά συνδέεται η υγεία των ζώων με την υγεία των ανθρώπων. Σημαντικό είναι ότι το πλασμιδιακό γονίδιο *mcr-1* που παρουσιάζει αντοχή στην κολιστίνη, είναι ευρέως διαδεδομένο γεγονός που έχει ανησυχήσει την επιστημονική κοινότητα.

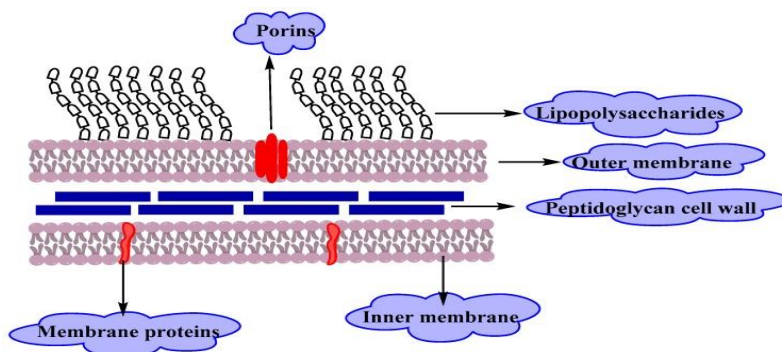
Τέλος, στο τέταρτο κεφάλαιο, αναφέρονται τα αποτελέσματα από Α) μοριακή ανίχνευση του πλασμιδιακού γονιδίου *mcr* σε δείγματα από χοίρους που παρουσίαζαν διάρροια, Β) μοριακή και φαινοτυπική ανίχνευση ESBL Γ) εύρεση της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης στην κολιστίνη σε στελέχη που παράγουν και στελέχη που δεν παράγουν *mcr-1* Δ) μοριακή τυποποίηση των στελεχών *Escherichia coli* με PFGE & MLST καθώς και σύγκριση των μοριακών αποτυπωμάτων τους για την εύρεση επικράτησης ενός υποτύπου και Ε) πειράματα σύζευξης.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## 1.1 GRAM ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

Σε συνδυασμό με τα πολυανθεκτικά βακτήρια αποτελούν μία από τις κυριότερες απειλές στη δημόσια υγεία ( Mukerji, et al., 2017). Χαρακτηρίζονται για τον μεγάλο αριθμό εισαγωγής των ανθρώπων στα νοσοκομεία καθώς και την υψηλή θνητότητα και θνησιμότητα (Oliveira & Reygaert, 2019). Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας το 2017 έχει δημοσιεύσει μία λίστα με τα πιο απειλητικά βακτήρια που παρουσιάζουν μικροβιακή αντοχή βάζοντας σε προτεραιότητα την ανακάλυψη νέων αντιβιοτικών για την αντιμετώπιση τους. Σε αυτή τη λίστα περιλαμβάνονται και τα gram αρνητικά βακτήρια. Παγκοσμίως, τα gram αρνητικά βακτήρια εξαιτίας της δομής τους παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντοχή από ότι τα gram θετικά. Ένα από τα πλεονεκτήματά τους είναι οι αποτελεσματικοί μηχανισμοί που τους επιτρέπει να διασπείρονται μεταξύ των βακτηρίων του ίδιου ή διαφορετικού είδους. Αυτό τους δίνει τη δυνατότητα να εξελίσσονται και να επιδεικνύουν την αντοχή σε μεγάλες κατηγορίες αντιβιοτικών ενώ ταυτόχρονα αυξάνεται το κόστος για την αντιμετώπισή τους και διευρύνεται το εύρος της θνησιμότητας μεταξύ ανθρώπων και ζώων ( Breijyeh, et al., 2020).

Τα gram αρνητικά βακτήρια αποτελούνται από 3 διαφορετικά στρώματα. Η εξωτερική μεμβράνη που χαρακτηρίζεται από φωσφολιπίδια και λιποπολυσακχαρίτη και είναι το στρώμα που τα διακρίνει από τους gram θετικούς κόκκους. Ένα ακόμα στοιχείο της εξωτερικής μεμβράνης είναι οι πορίνες, δηλαδή πρωτεΐνες που επιτρέπουν τη διάχυση μόνο υδρόφιλων μορίων στην εσωτερική στοιβάδα του κυττάρου. Τη δεύτερη στιβάδα αποτελεί ένα λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης που δίνει το σχήμα στο κύτταρο αλλά και αποθηκεύει ένζυμα για το μεταβολισμό του. Τέλος, εσωτερικά υπάρχει η διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων η οποία χρησιμοποιείται για την δομή και τις βιοσυνθετικές λειτουργίες του κυττάρου.



Εικόνα 1. Δομή gram αρνητικών βακτηρίων ( Breijyeh, et al., 2020).



## 1.2 *Escherichia coli*

Η *Escherichia coli* είναι ένα gram αρνητικό βακτήριο με ραβδοειδές σχήμα καθώς ανήκει στην οικογένεια των *Enterobacteriaceae*. Τα εντεροβακτηριακά ανήκουν στη φυσιολογική χλωρίδα του ανθρώπου, ωστόσο ενοχοποιούνται για το μεγαλύτερο αριθμό μολύνσεων στα νοσοκομεία και στην κοινότητα ( Dandachi, et al., 2018). Αποτελεί την πιο συχνή αιτία εμφάνισης ουρολοίμωξης, σηψαιμίας και άλλων κλινικών λοιμώξεων όπως μηνιγγίτιδα, βακτηριακία και πνευμονία. Χαρακτηριστικό του μικροβίου είναι ότι προκαλεί διάρροια και ο μεγάλος αριθμός θανάτων σε βρέφη και μικρά παιδιά. Επίσης, η εμφάνισή του είναι συχνή σε χώρες με χαμηλό βιοτικό επίπεδο, άσχημες συνθήκες διαβίωσης και κακή ποιότητα νερού όπως η Αφρική, η Ασία και η Λατινική Αμερική ( Gomes, et al., 2016). Μεταδίδεται μέσω της κοπρανοστοματικής οδού, με την κατάποση μολυσμένων τροφών ή νερού (Allocati, et al., 2013). Είναι ένας από τους πιο συχνούς παράγοντες ενδοноσοκομειακών λοιμώξεων ενώ ανευρίσκεται στα λαχανικά, στο νερό, στο έδαφος και στο κακοποιημένο κρέας. Τα παθογόνα στελέχη του *Escherichia coli* συγκαταλέγονται στις εξής κατηγορίες:

- Εντεροτοξινογόνα στελέχη (ETEC) που ανιχνεύονται στα τρόφιμα και στο νερό και αποτελεί την πιο συχνή αιτία διάρροιας στους ταξιδιώτες. Συχνά εμφανίζεται σε περιοχές με κακές συνθήκες διαβίωσης.
- Εντεροπαθογόνα στελέχη (EPEC) που ήταν το πρώτο παθογόνο στέλεχος που ενοχοποιήθηκε για τη διάρροια στα παιδιά.
- Εντεροσυσσωρευόμενα στελέχη (EAEC) που προκαλούν διάρροια.
- Εντεροαιμορραγικά στελέχη (EHEC/STEC) που περιλαμβάνουν την τοξίνη Shiga και είναι υπεύθυνα για τη διάρροια. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας το 2014 είχαν καταγραφεί 2,8 εκατομμύρια περιστατικά παγκοσμίως.
- Εντεροδιεισδυτικά στελέχη (EIEC) που προκαλούν διάρροια και σχετίζεται στενά με την *Shigella* (Mueller & Tainter., 2021).
- Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια έχει αναφερθεί ένας ακόμη τύπος εντεροβακτηριακών (DAEC). Δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής αρκετές πληροφορίες αλλά φαίνεται ότι προσκολλάται στα επιθηλιακά κύτταρα και προκαλεί διάρροια ( Gomes, et al., 2016).

Μέχρι το 2003 γνωρίζαμε ότι το κολοβακτηρίδιο δεν μπορεί να επιβιώσει για μεγάλο χρονικό διάστημα μακριά από τον ξενιστή. Ωστόσο, νέες μελέτες αποδεικνύουν ότι έχει την ικανότητα να επιβιώσει για αρκετό καιρό στον εντερικό σωλήνα και να α-

ναπτυχθεί στο έδαφος. Επίσης, οι παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση του διακρίνονται i) στους βιοτικούς, δηλαδή η ύπαρξη άλλων μικροοργανισμών και θρεπτικών συστατικών και ii) τους αβιοτικούς παράγοντες που περιλαμβάνουν τη θερμοκρασία, το pH, την ύπαρξη θρεπτικών συστατικών και την ηλιακή ακτινοβολία ( Jang, et al., 2017).



Εικόνα 2. Ανάπτυξη αποικιών *Escherichia coli* σε θρεπτικό υλικό *MacConkey* ( Acharya, 2022).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

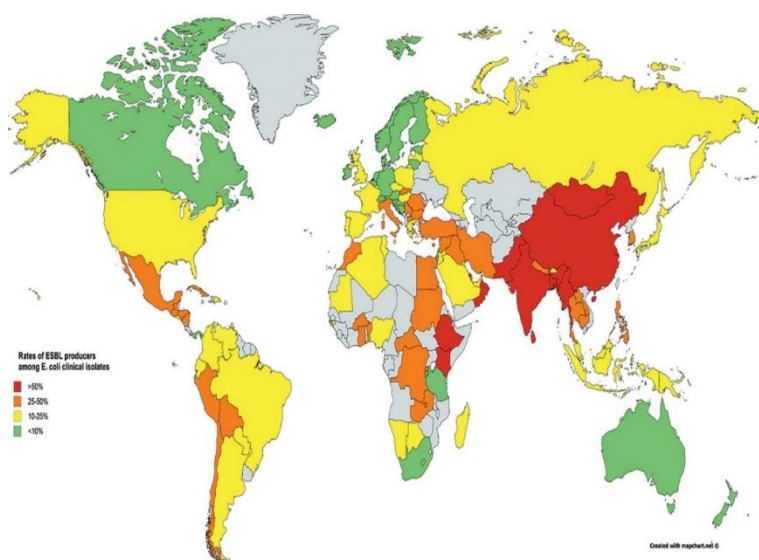
### 2.1 ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΣ β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΕΣ (ESBL)

Η επικράτησή των μικροοργανισμών και η μικροβιακή αντοχή έχει βοηθήσει στην ανάπτυξη μιας σημαντικής κατηγορίας ενζύμων που ονομάζεται ευρέος φάσματος β λακταμάσες (ESBL) όπου παρουσιάζουν αντοχή στις κεφαλοσπορίνες 1-3<sup>ης</sup> γενιάς και στις μονοβακτάμες καθώς αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ. Η εξάπλωσή τους είναι ευρέως διαδεδομένη, μολύνοντας πάνω από 1,5 εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως καθώς η επικράτησή τους αναφέρεται στις ανεπτυγμένες χώρες ( Doi, et al., 2017).

Οι β-λακταμάσες είναι πρωτεϊνικής φύσης ένζυμα που υδρολύουν β-λακταμικά αντιβιοτικά και είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη της μικροβιακής αντοχής και της μη αποτελεσματικής αντιμικροβιακής θεραπείας. Δρουν είτε στο περιβάλλον των gram + βακτηρίων είτε στον περιπλασμικό χώρο των gram - βακτηρίων, αδρανοποιώντας της β λακτάμες μέσω υδρόλυσης του β λακταμικού δακτυλίου. Πιο συγκεκριμένα, αναστέλλουν πρωτεΐνες οι οποίες είναι απαραίτητες στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος όλων των βακτηρίων και ονομάζονται PBPs (Penicillin Binding Proteins) (Bonomo, 2017).

Το πρώτο ένζυμο ανακαλύφθηκε από τους Abraham και Chain το 1940 πριν από της εξάπλωση της πενικιλίνης για την αντιμετώπιση των μικροβιακών λοιμώξεων. Έκτοτε, έχουν εξαπλωθεί παγκοσμίως και ανακαλύφθηκαν πολλά ένζυμα που βοηθούν στην εξάπλωση της μικροβιακής αντοχής είτε στα νοσοκομεία είτε στο περιβάλλον (Bush, 1989). Η επικράτηση των ESBL οφείλεται είτε στην ανεξέλεγκτη χορήγηση αντιβιοτικών σε ανθρώπους και ζώα είτε στην μετακίνηση των ανθρώπων είτε στη μετάδοση από νοσοκομειακούς χώρους προς την κοινότητα (Coque & R Canton, 2008).

Η ταξινόμηση των β λακταμασών έγινε με βάση τα βιοχημικά τους χαρακτηριστικά. Παλαιότερα, οι TEM και οι SHV ήταν οι επικρατέστερες κατηγορίες των ESBL. Ωστόσο, σήμερα οι CTX -M ανευρίσκονται πιο συχνά και η εξάπλωση τους αποτελεί συναγερμό για τη δημόσια υγεία. Οι ευρέως φάσματος β-λακταμάσες έκαναν την εισαγωγή τους μετά την ανακάλυψη των κεφαλοσπορινών 1<sup>ης</sup> και 2<sup>ης</sup> γενιάς. Στη συνέχεια, η κεφταζιδίμη και η κεφοταξίμη χρησιμοποιούνταν ευρέως το οποίο αποτέλεσε αφορμή για την ανακάλυψη νέων αντιβιοτικών ( Castanheira, et al., 2021).



Εικόνα 3. Εκτίμηση ποσοστών ESBL σε όλο τον κόσμο (Yohei Doi, et al., 2017).

## 2.2 ΕΠΙΚΡΑΤΗΣΗ ESBL

Στις ανεπτυγμένες χώρες η επικράτηση των ESBL έχει προέλθει στο μεγαλύτερο ποσοστό από τα μικρόβια *Escherichia coli* και *Klebsiella pneumoniae*. Στα νοσοκομεία των Ηνωμένων Πολιτειών το ποσοστό εμφάνισης τους αυξήθηκε από 7,8% το 2010 σε 18,3% το 2014.

Επιπλέον, το μεσοδιάστημα 2011 και 2013, η παραγωγή των ESBL με πλειονότητα εμφάνισης την κατηγορία CTX-M είχε ποσοστό 16,3% και προήλθε από το μικρόβιο *Klebsiella pneumoniae*. Στην Ευρώπη, η συχνότητα εμφάνισης των ESBL παρατηρείται στην νοτιοανατολικές χώρες. Στην Ιαπωνία, το ποσοστό είναι περίπου 30% για τις ESBL που παράγονται από *Escherichia coli* και 10% που προέρχονται από *Klebsiella pneumoniae*. Από την άλλη μεριά, τα ποσοστά για την Αυστραλία και την Νέα Ζηλανδία είναι πολύ μικρότερα. Πιο συγκεκριμένα, η εμφάνιση των ESBL στα εντεροβακτηριακά είναι πιο συχνή στην Νότια Ασία, Αφρική και κεντρική Αμερική και λιγότερο στην Ευρώπη. Βέβαια, υπάρχει και διακύμανση από χώρα σε χώρα. Για παράδειγμα, η επικράτηση ευρέος φάσματος β λακταμάσες είναι μικρή στις μεσογειακές χώρες σε σύγκριση με την Σκανδιναβία και την Ολλανδία που είναι υψηλή. Φαίνεται ότι οι ασθενείς που νόσησαν από *Klebsiella pneumoniae* έχουν μεγαλύτερο ποσοστό μετάδοσης των ESBL σε σχέση με εκείνους που νόσησαν από *Escherichia coli*. Επιπλέον, τα ένζυμα εμφανίστηκαν αρχικά στα νοσοκομεία επηρεάζοντας κυρίως ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς αλλά γρήγορα επεκτάθηκαν στην κοινότητα και στις κτηνιατρικές μονάδες ( Castanheira, et al., 2021).

Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι, οι ευρέος φάσματος β λακταμάσες ανευρίσκονται πολύ συχνά και στην κτηνοτροφία. Ιδιαίτερα, στην Ευρώπη η παραγωγή ESBL από *Escherichia coli* στα πουλικά ανέρχεται το 2010 σε ποσοστό πάνω από 90% σε αντίθεση το 2007 που ήταν 60%. Σύμφωνα με μία μελέτη που έγινε το 2009 στην Ιρλανδία, η εύρεση ESBL ήταν 80% στα πουλικά, με μικρότερο ποσοστό στο χοιρινό και στο βοδινό κρέας.

### 2.3 ΤΥΠΟΙ ESBL

Ανευρίσκονται κυρίως στα gram αρνητικά βακτηρίδια και πιο συγκεκριμένα στην *Escherichia coli* και την *Klebsiella pneumoniae* αλλά και στον *Proteus spp*, *Providencia spp* και σε άλλα εντεροβακτηριακά. Οι πιο συχνοί τύποι β-λακταμασών είναι οι TEM και SHV ( Bradford, 2001) ενώ κάποιες οικογένειες όπως PER, VEB είναι σχετικά σπάνιες και δεν αναφέρονται συχνά ( Doi, et al., 2017). Στον Πίνακα 1 αναφέρονται οι β λακταμάσες με την ημερομηνία και τη χώρα απομόνωσης τους.

Πίνακας 1. Χώρα και ημερομηνία απομόνωσης β λακταμασών (Bush, 2018).

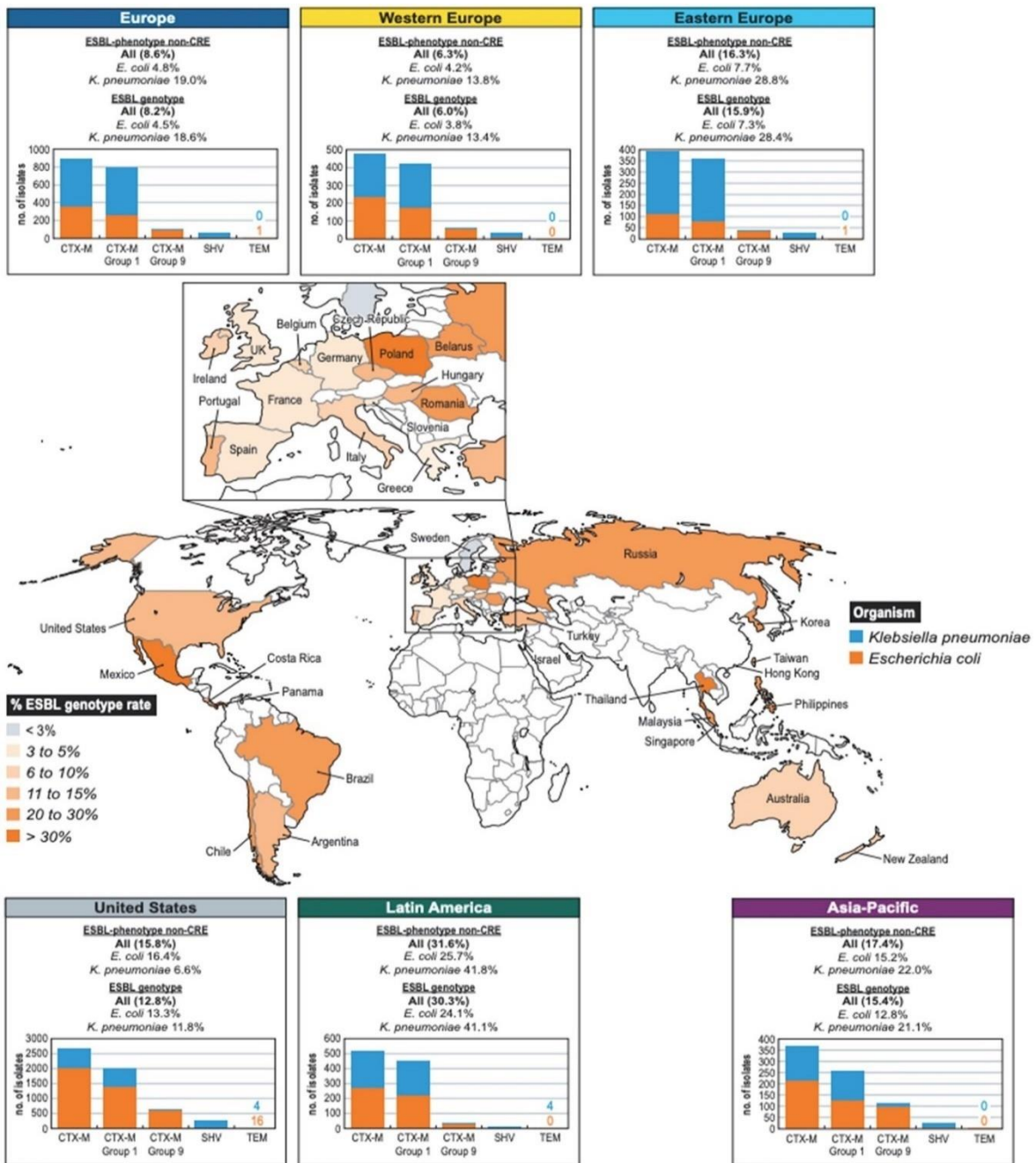
Αρχικό όνομα β-λακταμάσης	Ημερομηνία απομόνωσης	Βακτήριο	Τοποθεσία	Πρώτη περιγραφή στη βιβλιογραφία
<b>AmpC</b>	1940	<i>Bacillus coli (Escherichia coli)</i>	Αγγλία	1940
<b>Πενικιλινάση</b>	1942	<i>Staphylococcus aureus</i>	Αγγλία	1942
<b>OXA</b>	1962	<i>Salmonella enterica serovar Typhimurium, Escherichia coli</i>	Αγγλία	1965
<b>TEM-1</b>	1963	<i>Escherichia coli</i>	Ελλάδα	1965
<b>SHV-1</b>	1972	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Άγνωστο	1972
<b>SHV-2</b>	Πριν το 1983	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Γερμανία	1983
<b>SME-1</b>	1982	<i>Serratia marcescens</i>	Αγγλία Μινεσότα	1990
<b>MIR-1</b>	1988	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής	1990
<b>IMP-1</b>	1988	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ιαπωνία	1991
<b>TEM-30</b>	1991	<i>Escherichia coli</i>	Γαλλία	1994
<b>KPC-2</b>	1996	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Βόρεια Καρολίνα	2000
<b>NDM-1</b>	2006	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ινδία (Νέο Δελχί)	2009

#### 2.4 CTX-M ESBLs

Οι πρώτες αναφορές της οικογένειας των ενζύμων CTX-M έγινε το 1980 σε διάφορες περιοχές όπως το Μόναχο καθώς στην Ιαπωνία και στην Γαλλία με παραλλαγές του ονόματος όπως FEC-1, Toho-1 και MEN-1 αντίστοιχα. Έκτοτε έχουν εξαπλωθεί παγκοσμίως στην Ευρώπη, στην Λατινική Αμερική και την Ασία προκαλώντας τη λεγόμενη «πανδημία CTX-M» επικρατώντας στα εντεροβακτηριακά και συγκεκριμένα στην *Escherichia coli*. Μετά από μελέτες που έγιναν στα νοσοκομεία των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής δείχνουν ότι απομονώθηκαν οι CTX-M στο 80% των περιπτώσεων και πιο συγκεκριμένα CTX-M 15

και 14. Στο διάστημα 2012 και 2017, η επικράτηση των CTX-M στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής έχει αυξηθεί κατά 53%. Σημαντικοί παράγοντες που βοηθούν στην επικράτηση των CTX-M είναι η γεωγραφική περιοχή, οι συνθήκες υγιεινής και η χρήση αντιβιοτικών (Castanheira, et al., 2021).

Αναγνωρίζονται 5 διαφορετικά group στην κατηγορία CTX-M 1,2,8,9 και 25 (Doi, et al., 2017). Ωστόσο η πιο συχνή β-λακταμάση από το γκρουπ 1 είναι η CTX-M 15. Στο group CTX-M 9, η CTX-M 9 και CTX-M 14 αναφέρονται συχνά αλλά τελευταίες αναφορές δείχνουν και την CTX-M 25. Από την άλλη μεριά, στα ζώα φαίνεται να επικρατεί η CTX-M 1 και λιγότερο η 2 για την οποία υπάρχουν αναφορές στην Νότια Αμερική και την Ιαπωνία, για την CTX-M 8 στην Νότια Αμερική και για την CTX-M 25 στο Ισραήλ. Επιπλέον, η CTX-M 1 είναι η πιο συχνά εμφανιζόμενη ομάδα τόσο στους ανθρώπους όσο και στα ζώα (Doi, et al., 2017).



Εικόνα 4. Ποσοστά επικράτησης CTX-M και ESBL των μικροβίων *Escherichia coli* και *Klebsiella pneumoniae* στην Ευρώπη, Λατινική Αμερική, Ηνωμένες Πολιτείες και Ασία ( Castanheira, et al., 2021).

## 2.5 SHV ESBLs

Τις τελευταίες δεκαετίες τα ένζυμα της κατηγορίας SHV που παράγονται από τα εντεροβακτηριακά έχουν ανευρεθεί τόσο στους ανθρώπους όσο στα ζώα και στο περιβάλλον καθώς έχουν σημάνει τον κίνδυνο για την αύξηση των μολύνσεων. Εξαιτίας της αντοχής τους στις μονοβακτάμες και στις καρβαπενέμες, έχουν εξαπλωθεί παγκοσμίως τονίζοντας την κλινική τους σημασία καθώς έχουν ανευρεθεί σε αρκετά εντεροβακτηριακά ( Liakopoulos, et al., 2016). Πρώτα έχουν απομονωθεί από *Klebsiella pneumoniae* αλλά έχει καταφέρει να επεκταθεί και σε άλλα εντεροβακτηριακά όπως *Enterobacter cloacae* οδηγώντας σε αρκετές μολύνσεις όπως μηνιγγίτιδα αλλά και ουρολοιμώξεις σε νοσοκομεία (Bourouis, et al., 2015). Έρευνα αναφέρει ότι η SHV-12 και η CTX-M 3 είναι οι πιο συχνές ευρέως φάσματος β λακταμάσες στα εντεροβακτηριακά *Enterobacter cloacae* και *Serratia Marcescens* (Yu, et al., 2006).

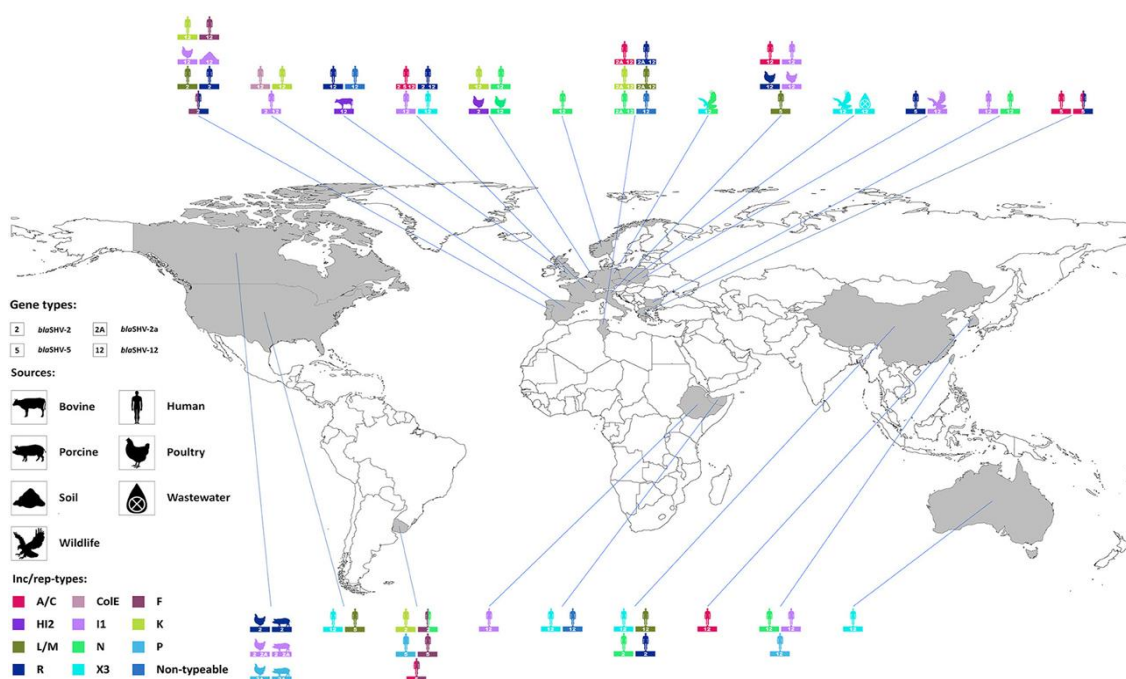
Υπάρχουν τουλάχιστον 46 γνωστές κατηγορίες SHV και ακόμα 150 που δεν ανήκουν στις ευρέως φάσματος β λακταμάσες. Πρώτα, η SHV-1 απομονώθηκε σε κλινικά δείγματα από *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae*, και *Serratia marcescens* το 1983. Στη συνέχεια, η SHV-2 αναφέρεται σε νοσοκομείο της Γαλλίας το 1988, κατά την προσπάθεια να θεραπευτεί ένας ασθενής. Σύντομα, αφού έγινε η περιγραφή της SHV-3 το 1988, έκανε την εμφάνισή της η SHV-4 σε 14 νοσοκομεία της Γαλλίας. Η SHV-5 δεν ανιχνεύεται για πρώτη φορά στην Ευρώπη αλλά στην Χιλή και συγκεκριμένα από *Klebsiella pneumoniae*. Στη Ελλάδα, για πρώτη φορά η SHV-9 και SHV-10 έκαναν την εμφάνισή τους το 1996 και 1997 αντίστοιχα. Στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, η SHV-8 το 1990 απομονώθηκε από *Escherichia coli* παρουσιάζοντας αντοχή στις κεφαλοσπορίνες και στις μονοβακτάμες (Heritage, et al., 1999). Στον πίνακα 2 παρατηρούμε και άλλες γνωστές SHV με τη χώρα της πρώτης απομόνωσης αλλά και το έτος.



Πίνακας 2. Κατηγορίες SHV με τη χώρα και το έτος της πρώτης απομόνωσης τους (Heritage, et al., 1999).

SHV	Πρώτη χώρα απομόνωσης	Έτος
SHV-1	Ελβετία	1974
SHV-2	Γερμανία	1983
SHV-2a	Γερμανία	1986
SHV-3	Γαλλία	1986
SHV-4	Γαλλία	1987
SHV-5	Χιλή	1987
SHV-6	Γαλλία	1991
SHV -7	Αμερική	1993
SHV-8	Αμερική	1990
SHV-9	Ελλάδα	1996
SHV-10	Ελλάδα	1997
SHV-11	Ελβετία	1997
SHV-12	Ελβετία	1997

Σημαντικό είναι το γεγονός ότι οι SHV εμφανίζονται πολύ συχνά σε υγιή ζώα, κτηνοτροφικές παραγωγές με αποτέλεσμα να επεκτείνονται και στον άνθρωπο. Πιο συγκεκριμένα, στην Κίνα και στην Ισπανία έχουν ανιχνευθεί σε δείγματα κοπράνων από χοίρους. Επιπλέον, στην Τυνησία έχει αναφερθεί ότι η SHV-5 που απομονώθηκε από *Escherichia coli* εμφανίστηκε στα κρεοπωλεία, στα πολυκαταστήματα και στην τοπική αγορά ( Liakopoulos, et al., 2016). Επίσης, έρευνα που έγινε το 2014 στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής σε αγελάδες με μαστίτιδα, έδειξε την απομόνωση του SHV-12 ( Timofte, et al., 2014).



Εικόνα 5. Επιδημιολογία των SHV. Χώρα και είδος εμφάνισης ( Liakopoulos, et al., 2016).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### 3.1 ANTIBIOTIKA

Η ανακάλυψη των αντιβιοτικών και η χρησιμότητά τους στην ιατρική πράξη αποτέλεσε επανάσταση τον 20 αιώνα για την επιστημονική κοινότητα και την κτηνοτροφία. Αποτελούν είτε φυσικές είτε συνθετικές ενώσεις που χορηγούνται τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα για την πρόληψη και τη θεραπεία λοιμώξεων ( Rolain, 2013). Έχουν βοηθήσει όχι μόνο τους ανθρώπους και τα ζώα για την αντιμετώπιση των μικροβιακών λοιμώξεων αλλά ενισχύουν και την προαγωγή της δημόσιας υγείας. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται ως αυξητικοί παράγοντες προκειμένου να αυξηθούν τα παραγωγικά οφέλη. Ωστόσο, η αλόγιστη κατανάλωση τους έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη πολυανθεκτικών μικροβίων σε όλο τον κόσμο με αποτέλεσμα να περιορίζονται οι αντιμικροβιακές θεραπείες. Η ικανότητα περιορισμού πρόσληψης του φαρμάκου εξαιτίας της δομής του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων, η μετάλλαξη ή αντικατάσταση του στόχου δράσης του φαρμάκου, η απενεργοποίηση του φαρμάκου καθώς και οι αντλίες εκροής, αποτελούν μηχανισμούς επικράτησης των μικροοργανισμών σε αντιμικροβιακές ενώσεις (Σωτήρχου, 2021). Το Ηνωμένο Βασίλειο προβλέπει ότι το 2050 περίπου 10 εκατομμύρια άνθρωποι το χρόνο θα πεθαίνουν εξαιτίας της ανάπτυξης της αντιμικροβιακής αντοχής (Hutchings, et al., 2019).

Για πολλά χρόνια, τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται στις κτηνοτροφικές μονάδες για τη βελτίωση της δημόσιας υγείας καθώς και τη μείωση της θνησιμότητας και της επίπτωσης από μολυσματικές ασθένειες. Όμως, είναι γεγονός ότι η ανεξέλεγκτη χρήση τους έχει προωθήσει την εξάπλωση των ESBL και άλλων β- λακταμασών ανάμεσα στα ζώα ( Dandachi, et al., 2018).

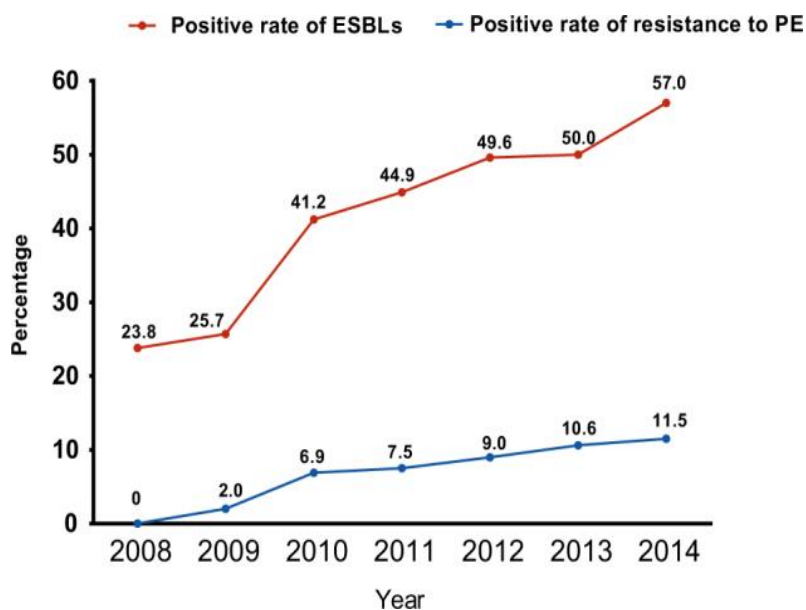
### 3.2 ΚΟΛΙΣΤΙΝΗ

Η παγκόσμια εξάπλωση των πολυανθεκτικών μικροβίων είναι απειλή για τη δημόσια υγεία. Σήμερα, συνήθη παράγοντες που χρησιμοποιούνται ενάντια αυτών των μικροβίων όπως καρβαπενέμες, κεφαλοσπορίνες, μονοβακτάμες δεν είναι αποτελεσματικοί. Το γεγονός αυτό απαιτεί να χρησιμοποιηθούν τα τελευταία γραμμής αντιβιοτικά (AI-Tawfig, et al., 2017). Η κολιστίνη ανήκει στην οικογένεια των πολυμυξινών και από το 1950 χρησιμοποιείται ενάντια της οικογένειας των εντεροβακτηριακών. Παράγεται από το βακτήριο *Bacillus polymyxa* και χαρακτηρίζεται για τη νεφροτοξικότητά της. Ωστόσο, δύο είναι οι πολυμυξίνες που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη, η Β και η Ε (κολιστίνη) όπου έχουν παρόμοια

βιολογική δραστηριότητα και διαφέρουν μόνο κατά ένα αμινοξύ (Tariero, 2008). Ο μηχανισμός δράσης τους χαρακτηρίζεται από την προσκόλλησή τους στην κυτταρική μεμβράνη των gram αρνητικών βακτηρίων, οδηγώντας σε αλλαγές της διαπερατότητας της και σε κυτταρικό θάνατο (Cassir, et al., 2014).

### 3.3 ΚΟΛΙΣΤΙΝΗ ΚΑΙ ΖΩΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Η κολιστίνη καταναλώνεται από το 1970 ως θεραπευτικό φάρμακο για τους ανθρώπους. Επίσης, ανήκει στην κατηγορία των αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται και για τα ζώα όπως κουνέλια, χοιρινά, πρόβατα για την παραγωγή ζωικών τροφών. Η αλόγιστη κατανάλωση της προτάθηκε ως ένας από τους κύριους λόγους για την παγκόσμια εξάπλωση αντίστασης στην κολιστίνη. Στην Ισπανία, η κολιστίνη είναι το πιο συχνό αντιβιοτικό για την θεραπεία των λοιμώξεων στα χοιρινά ( Dandachi, et al., 2018). Χρησιμοποιείται από το στόμα για δεκάδες χρόνια στην Ευρώπη για τη θεραπεία της μαστίτιδας στα χοιρινά, στα πουλερικά, στις κατσίκες και στα κουνέλια (Filioussis, et al., 2020). Εκτιμάται ότι το 2015 περίπου 12.000 τόνοι κολιστίνης χρησιμοποιήθηκαν στην παραγωγή ζωικών τροφών καθώς αυτή η ποσότητα αυξήθηκε σε 16.500 τόνους το 2021 ( Björn, 2019). Έρευνα που έγινε στην Κίνα από το 2008 έως το 2014 σε 821 κοτόπουλα από τα οποία είχε απομονωθεί το βακτήριο *Escherichia coli*, το 57% το στελεχών ήταν θετικά για ESBL. Το ποσοστό αυτό είναι αυξημένο σε σχέση με το 2008 που ήταν 23,8% και φαίνεται η αιτία να είναι η χορήγηση της κολιστίνης ( Wu, et al., 2018). Είναι σημαντικό να εστιάζουμε στην πρόληψη της υγείας των ζώων και των ανθρώπων όπως η χρήση καθαρού νερού και ο καθαρισμός των κτηνοτροφικών μονάδων και όχι στην υπερκατανάλωση αντιβιοτικών. Τέλος, είναι πιθανό, η αντίσταση στην κολιστίνη να ξεκίνησε από τα ζώα και στη συνέχεια να επεκτάθηκε στους ανθρώπους. Παρόλο αυτά, η χρήση της γίνεται ακόμα και σήμερα (Liu BS, et al., 2015).



Εικόνα 6. Αύξηση χρήσης κολιστίνης και αντοχής ESBL από το 2008 έως το 2014 ( Wu, et al., 2018).

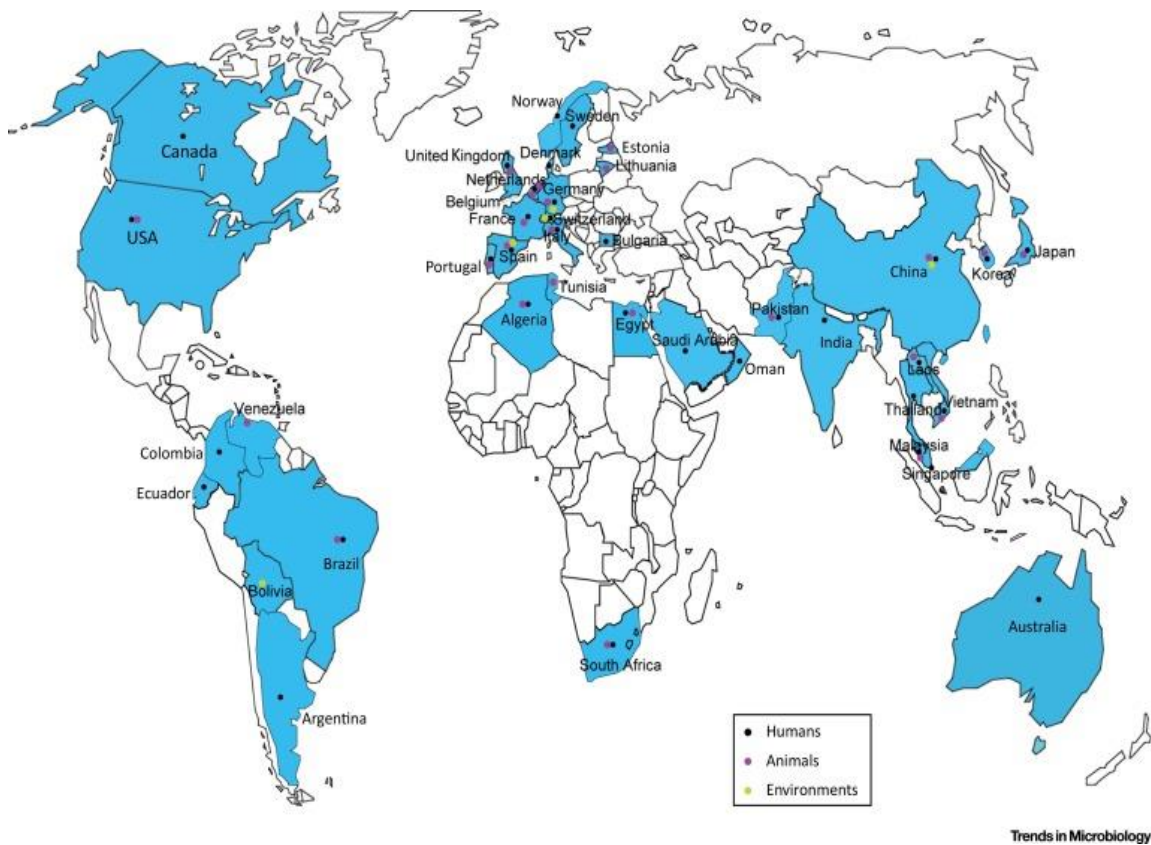
### 3.4 MCR-1

Η μαζική χρήση αντιβιοτικών στις κτηνιατρικές μονάδες έχει βάλει σε κίνδυνο την παγκόσμια υγεία και έχει αμφισβητήσει της μεθόδους αντιμετώπισης της μικροβιακής αντοχής. Έχουν ανιχνευθεί παθογόνα βακτήρια που είναι ανθεκτικά στην κολιστίνη ακόμα και στα τελευταίας γενιάς αντιβιοτικά. Έρευνες που έχουν γίνει σε δείγματα από ανθρώπους, κρέας από πουλερικά και χοιρινά εντοπίστηκε ένα γονίδιο αντοχής το οποίο εδράζεται πάνω σε πλασμίδιο και φέρει αντοχή στην αντιμικροβιακή ουσία κολιστίνη. Ονομάζεται *mcr-1* και η πρώτη αναφορά του έγινε σε εργαστήριο της Νότιας Κίνας όπου μελετούσαν δείγματα από χοίρους το 2015 (Liu BS, et al., 2015). Το γονίδιο αντοχής έχει εξαπλωθεί σε πάνω από 40 χώρες παγκοσμίως. Η ανεξέλεγκτη χορήγηση κολιστίνης στις τροφές για τα ζώα πιστεύεται ότι αποτελεί κινητήρια δύναμη για την επικράτηση του γονιδίου.

Η αντίσταση του γονιδίου αντοχής στις πολυμυξίνες είναι διαδεδομένη παγκοσμίως καθώς αναφορές επισημαίνουν ότι η αντοχή οφείλεται σε χρωμοσωματικές μεταλλάξεις και όχι στα πλασμίδια μεταφοράς των γονιδίων. Οι μεταλλάξεις αφορούν ρυθμιστικά συστήματα για το λιπίδιο A και τον λιποπολυσακχαρίτη. Από το 2015 και έπειτα, φαίνεται ότι ο μηχανισμός αντίστασης του γονιδίου αντοχής έχει εξαπλωθεί σε όλες τις ηπείρους (EUCAST, 2017).

### 3.5 ΕΠΙΚΡΑΤΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΑΝΤΟΧΗΣ ΠΑΓΚΟΣΜΙΩΣ

Πλέον, η διασπορά και η επικράτηση του γονιδίου αντοχής *mcr-1* είναι παγκόσμια και έχει ανησυχήσει την ιατρική κοινότητα. Αρχικά, η περιγραφή του γονιδίου αντοχής έγινε στους υγιείς χοίρους (21%), στα χοιρινά και στα κοτόπουλα προς κατανάλωση (15%) και τέλος σε νοσηλεύμενους ασθενείς (1%) στην Κίνα (AI-Tawfig, et al., 2017). Τα ταξίδια και η κατανάλωση κρέατος φαίνονται να βοηθάνε στη διασπορά μεταξύ των χωρών όλου του κόσμου. Πλέον, δεν έχει σημασία εάν το ταξίδι διαρκεί μικρό ή μεγάλο χρονικό διάστημα, εάν οι ταξιδιώτες είναι μικρής ή μεγάλης ηλικίας. Για παράδειγμα, στην Ολλανδία μελέτες που έχουν γίνει σε ταξιδιώτες, με ηλικίες 25 έως 62 χρονών και ταξίδεψαν από 8 έως 40 ημέρες έχει διαπιστωθεί ότι έχουν επιστρέψει στην πατρίδα τους με το γονίδιο αντοχής *mcr-1*. Οι χώρες οι οποίες είχαν επισκεφθεί ήταν το Περού, Βολιβία, Κολομβία, Τυνησία, Ταϊλάνδη, Κίνα και Βιετνάμ. Συγκεκριμένα 5 άτομα δήλωσαν ότι έπασχαν από διάρροια. Μία ακόμα μελέτη που έγινε στην Γερμανία που αφορούσε 122 υγιείς ταξιδιώτες με ηλικία 24 έως 69 χρονών όπου ταξίδεψαν από 5 έως 35 ημέρες και επισκέφθηκαν την Ασία και την Αφρική, ανιχνεύθηκε το γονίδιο *mcr-1* από δείγματα κοπράνων σε 6 άτομα. Όσον αφορά τη μετάδοση του γονιδίου σε Ευρωπαϊκές χώρες, δεν έχει περιοριστεί. Μελέτη που έγινε στο Ηνωμένο Βασίλειο, εντοπίστηκε το γονίδιο *mcr-1* σε ανθρώπους που είχαν ταξιδέψει σε χώρες της Ασίας και της Αφρικής καθώς και το γονίδιο *mcr-3* ανιχνεύθηκε σε ανθρώπους στην Δανία που είχαν ιστορικό ταξιδιού στην Ταϊλάνδη και στο Βιετνάμ. Επίσης, σημαντικό είναι το γεγονός ότι τα εντεροβακτηριακά που κουβαλάνε γονίδια αντοχής ανιχνεύονται και στα τρόφιμα των ζώων και μεταφέρονται στα ζωικά προϊόντα. Για παράδειγμα, στην αγορά της Βραζιλίας σε κοτόπουλα έγιναν 6 ταυτοποιήσεις του γονιδίου *mcr-1*. Παρομοίως, στην Ολλανδία σε κοτόπουλα. Επιπλέον, στο Βιετνάμ μελέτες που έγιναν σε χοιρινά και σε κοτόπουλα καθώς και σε θαλασσινά προϊόντα ανιχνεύθηκε το γονίδιο *mcr-1* και *mcr-3* (Hassan & Kassem, 2020). Τέλος, το γονίδιο *mcr-1* έχει ανιχνευθεί και στην Ελλάδα το 2020 σε έρευνα που έγινε στο μικροβιολογικό εργαστήριο του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης που αφορούσε δείγματα γάλακτος από 400 αγελάδες που προερχόταν από 23 διαφορετικές εκτροφές με ιστορικό μαστίτιδας (Filioussis, et al., 2020). Η μετάδοση των γονιδίων αντοχής αποτελεί παγκόσμια απειλή. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας προειδοποιεί ότι το 2050, 300 εκατομμύρια άνθρωποι πρόκειται να χάσουν τη ζωή τους εξαιτίας της μικροβιακής αντοχής (Hassan & Kassem, 2020).



Εικόνα 7. Εμφάνιση του γονιδίου αντοχής *mcr-1* στους ανθρώπους, στα ζώα και στο περιβάλλον παγκοσμίως (Sun, et al., 2018).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### 4.1 Σκοπός της διπλωματικής εργασίας

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας είναι η μοριακή ανίχνευση του πλασμιδιακού γονιδίου *mcr* και η διασπορά του σε κτηνοτροφικές παραγωγές της Ανατολικής Ηπειρωτικής Ελλάδας. Στο τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας στην Αθήνα, και συγκεκριμένα στο εργαστήριο Επιτήρησης Λοιμωδών Νοσημάτων (Ε. Ε. Λ. ΝΟ.) και στη μονάδα Επιτήρησης Νοσοκομειακών Λοιμώξεων και Μικροβιακής Αντοχής, ελέγχθηκαν 114 δείγματα για την ύπαρξη του γονιδίου αντοχής *mcr*. Τα απομονωμένα στελέχη αποτελούνται από *Escherichia coli* και περιλαμβάνονται στο Ευρωπαϊκό Πρόγραμμα «The COST Action Proposal OC-2021-1-25215 European Antimicrobial Resistance Surveillance network in Veterinary medicine» Αφορούν 5 διαφορετικές εκτροφές στην Ελλάδα και η απομόνωση τους έγινε 6/2/2021, 22/4/2021, 24/4/2021, 17/5/2021 και 21/5/2021. Η παραλαβή των δειγμάτων στα παραπάνω εργαστήρια έγινε 15/6/2021 και φυλάσσονται σε διάλυμα γλυκερόλης στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 4.2 Υλικά και μέθοδοι

### 4.2.1 Απομόνωση DNA με βρασμό

Καταρχάς έγινε απομόνωση ολικού DNA από θρεπτικό υλικό nutrient agar με βρασμό σύμφωνα με το πρωτόκολλο που προτείνεται από το STATENS SERUM INSTITUTE. Πιο αναλυτικά:

1. Με κρίκο 10  $\mu\text{L}$  παίρνουμε δύο μεγάλες ή αντίστοιχα μικρές αποικίες και τις εναιωρούμε σε 200  $\mu\text{L}$  νερό.
2. Vortex για 10 sec.
3. Τοποθετούμε τα erpendorfs σε υδατόλουτρο που βράζει για 10 λεπτά.
4. Μεταφέρουμε στην κατάψυξη για 3 λεπτά.
5. Φυγοκεντρούμε στις 10.000 rpm για 3 λεπτά.
6. Χρησιμοποιούμε 3  $\mu\text{L}$  από το υπερκείμενο για PCR.
7. Απορρίπτουμε τα erpendorfs στα μολυσματικά.

### 4.2.2 Έλεγχος παρουσίας γονιδίων που προσδίδουν αντοχή στην κολιστίνη με τη μέθοδο της multiplex (πολυπλεκτικής) PCR.

Τα δείγματα ελέγχθηκαν για την παρουσία των γονιδίων *mcr1*-, *mcr2*-, *mcr3*-, *mcr4*-, *mcr5* με τη μέθοδο πολλαπλής (multiplex) PCR. Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν και στον πίνακα 4 οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο του ECDC. Επίσης, στον πίνακα 5 παρατίθενται οι εκκινητές για τα αντίστοιχα γονίδια σύμφωνα με το πρωτόκολλο.

Πίνακας 3. Υλικά για την multiplex PCR.

DNA	3 $\mu\text{L}$
Buffer 10x	2,5 $\mu\text{L}$
dNTPs 10mM	0,5 $\mu\text{L}$
primer F1	0,5 $\mu\text{L}$
primer R1	0,5 $\mu\text{L}$
primer F2	0,5 $\mu\text{L}$
primer R2	0,5 $\mu\text{L}$
primer F3	0,5 $\mu\text{L}$
primer R3	0,5 $\mu\text{L}$
primer F4	0,5 $\mu\text{L}$
primer R4	0,5 $\mu\text{L}$
primer F5	0,5 $\mu\text{L}$
primer R5	0,5 $\mu\text{L}$
Taq 5u/λ	0,2 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O	13,8 $\mu\text{L}$

Πίνακας 4. Συνθήκες multiplex PCR.

Συνθήκες multiplex PCR			
Στάδια	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
Αρχική αποδιάταξη	94	5 λεπτά	1
Αποδιάταξη	94	30 δευτερόλεπτα	30
Υβριδισμός	58	30 δευτερόλεπτα	
Επέκταση	72	30 δευτερόλεπτα	
Τελική επέκταση	72	10 λεπτά	1
Συντήρηση	4		

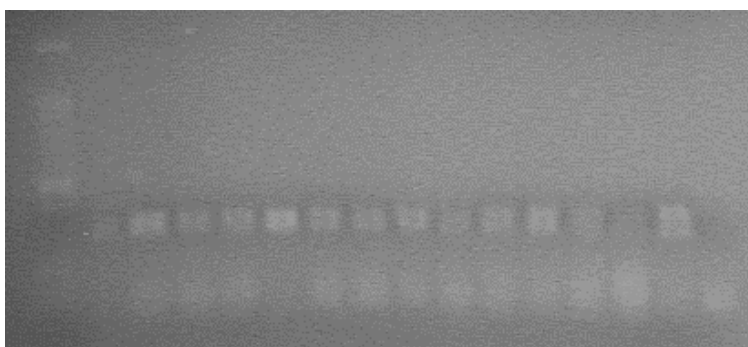
Πίνακας 5. Primers που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση του *mcr* γονιδίου.

Γονίδιο	Genbank	Αλληλουχία 5'-3'	Tm (°C)	Μέγεθος (bp)
<b>mcr-1 (40-359)</b>	KP347127	mcr1_F 5'-AGTCCGTTTGTCTTGTGGC-3' mcr1_R 5'-AGATCCTTGGTCTCGGCTTG-3'	58	320
<b>mcr-2 (401-1115)</b>	LT598652	mcr2_F 5'-CAAGTGTGTTGGTCGCAGTT-3' mcr2_R 5'-TCTAGCCCCGACAAGCATACC-3'	58	715
<b>mcr-3 (17-945)</b>	KY924928	mcr3_F 5'-AAATAAAAATTTGTTCCGCTTATG-3' mcr3_R 5'-AATGGAGATCCCCGTTTTT-3'	58	929
<b>mcr-4 (38-1153)</b>	MF543359	mcr4_F 5'-TCACTTTCATCACTGCGTTG-3' mcr4_R 5'-TTGGTCCATGACTACCAATG-3'	58	1116
<b>mcr-5 (1-1644)</b>	KY807921	mcr5_F 5'-ATGCGGTTGTCTGCATTTATC-3' mcr5_R 5'-TCATTGTGGTTGTCCTTTTCTG-3'	58	1644

#### 4.2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Είναι μία τεχνική εύκολη και γρήγορη για τον διαχωρισμό θραυσμάτων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Στην παρούσα εργασία έγινε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2 %. Η Εικόνα 8 απεικονίζει ένα παράδειγμα ηλεκτροφόρησης από προϊόν της multiplex PCR.

100bp 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 (+) (-)



Εικόνα 8. Αποτελέσματα multiplex PCR μετά από ηλεκτροφόρηση σε τζελ αγαρόζης για την ανίχνευση γονιδίου αντοχής *mcr*. Το γονίδιο *mcr-1* αντιστοιχεί στις 320 bp.

#### 4.2.4 Φαινοτυπική και γονοτυπική ανίχνευση ESBLs

Στη συνέχεια ακολουθεί έλεγχος των επιπέδων ευαισθησίας/αντοχής με τη μέθοδο Kirby-Bauer. Έγινε σύγκριση των ορίων ευαισθησίας σύμφωνα με τα επιδημιολογικά όρια που



ορίζει η Ευρωπαϊκή Επιτροπή Ελέγχου Μικροβιακής Αντοχής (EUCAST). Τα στελέχη ταξινομήθηκαν σε ευαίσθητα (E) και ανθεκτικά (A) έναντι των αντιβιοτικών σύμφωνα με τα αναθεωρημένα breakpoints της EUCAST v 12.0 για τα εντεροβακτηριακά. Εκτός από τον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιβιοτικά, ελέγχθηκε σε ορισμένα στελέχη και η παραγωγή εκτεταμένου φάσματος β λακταμάσες σε θρεπτικό υλικό Muller-Hinton.

Ακολουθεί multiplex PCR για τον προσδιορισμό εκτεταμένου φάσματος β λακταμάσες και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Στην Εικόνα 9 και 10 παρατηρούμε 2 παραδείγματα για την ανίχνευση CTX-M και SHV ESBLs. Το στέλεχος A365 λειτουργεί ως θετικός μάρτυρας στην PCR για CTX-M. Επιπλέον, στους πίνακες 6, 7, 8 βλέπουμε τις συνθήκες multiplex PCR που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση CTX-M, SHV και AmpC.

Πίνακας 6. Συνθήκες multiplex PCR για ανίχνευση CTX-M ESBLs (Woodford, et al., 2006).

Συνθήκες multiplex PCR (CTX-M)			
Στάδια	Θερμοκρασία(°C)	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
Αρχική αποδιάταξη	94	5 λεπτά	1
Αποδιάταξη	94	25 δευτερόλεπτα	30
Υβριδισμός	52	40 δευτερόλεπτα	
Επέκταση	72	50 δευτερόλεπτα	
Τελική αποδιάταξη	72	6 λεπτά	1

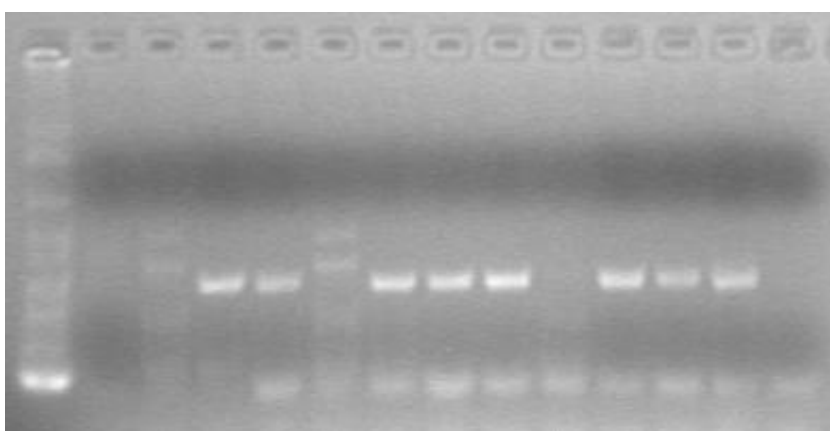
Πίνακας 7. Συνθήκες multiplex PCR για ανίχνευση SHV ESBLs (Szabó, et al., 2005).

Συνθήκες multiplex PCR (SHV)			
Στάδια	Θερμοκρασία(°C)	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
Αρχική αποδιάταξη	96	5 λεπτά	1
Αποδιάταξη	96	30 δευτερόλεπτα	30
Υβριδισμός	64	30 δευτερόλεπτα	
Επέκταση	72	1 λεπτό	
Τελική αποδιάταξη	72	5 λεπτά	1

Πίνακας 8. Συνθήκες multiplex PCR για ανίχνευση AmpC ESBLs ( Pérez-Pérez & Hanson, 2002).

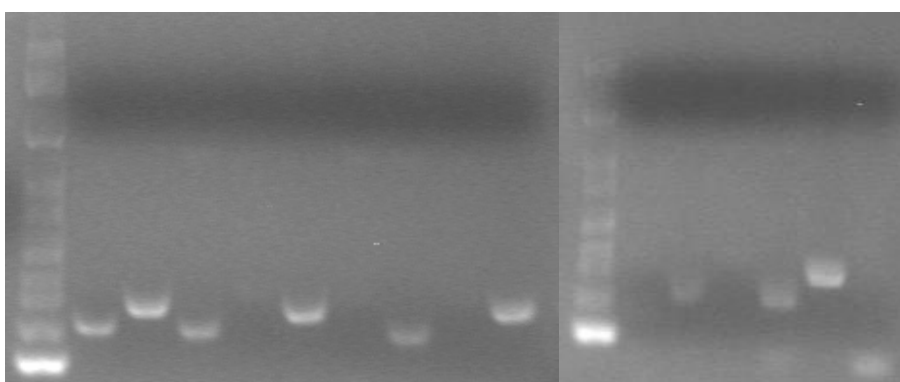
Συνθήκες multiplex PCR (AmpC)			
Στάδια	Θερμοκρασία(°C)	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
Αρχική αποδιάταξη	94	3 λεπτά	1
Αποδιάταξη	94	30 δευτερόλεπτα	25
Υβριδισμός	64	30 δευτερόλεπτα	
Επέκταση	72	1 λεπτό	
Τελική αποδιάταξη	72	7 λεπτά	1

100bp 324 354 358 359 361 363 364 365 369 370 371 375 (-)



Εικόνα 9. Multiplex PCR για την ανίχνευση CTX-M.

100bp 324 364 358 359 361 363 364 365 (+) 100bp 369 370 371 375 (+) (-)



Εικόνα 10. Multiplex PCR για την ανίχνευση SHV.

#### 4.2.5 Προσδιορισμός ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) στην κολιστίνη.

Η μέθοδος MIC βοηθάει στον έλεγχο της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης που προκαλεί ένα φάρμακο έτσι ώστε να αποτρέψει την ανάπτυξη ενός παθογόνου μικροοργανισμού.

σμού. Ο έλεγχος της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης του γονιδίου *mcr-1* στην κολιστίνη έγινε με τη μέθοδο broth microdilution σύμφωνα με το πρωτόκολλο MERLIN Diagnostika GmbH 2019 καθώς τα όρια συγκρίθηκαν με τα επιδημιολογικά όρια της EUCAST Breakpoints v 12.0. Περιληπτικά:

1. Δημιουργία εναιωρήματος 0.5 σε 1-5 ml 0,9% NaCl.
2. Μεταφορά 50  $\mu$ L εναιωρήματος σε ειδικό ζωμό Muller-Hinton Broth.
3. Μεταφορά 100  $\mu$ L δείγματος σε ειδική πλάκα εμποτισμένη με κολιστίνη.
4. Επώαση στους 37<sup>0</sup>C για 18-24 ώρες.

Πίνακας 9. Eucast Breakpoints (v 12.0) για τον χαρακτηρισμό των στελεχών για τα Εντεροβακτηριακά ενάντια στην κολιστίνη σε ευαίσθητα(S) και ανθεκτικά (R).

Eucast breakpoints ( mg/L)		
Αντιμικροβιακός παράγοντας	S $\leq$	R >
κολιστίνη	2	2

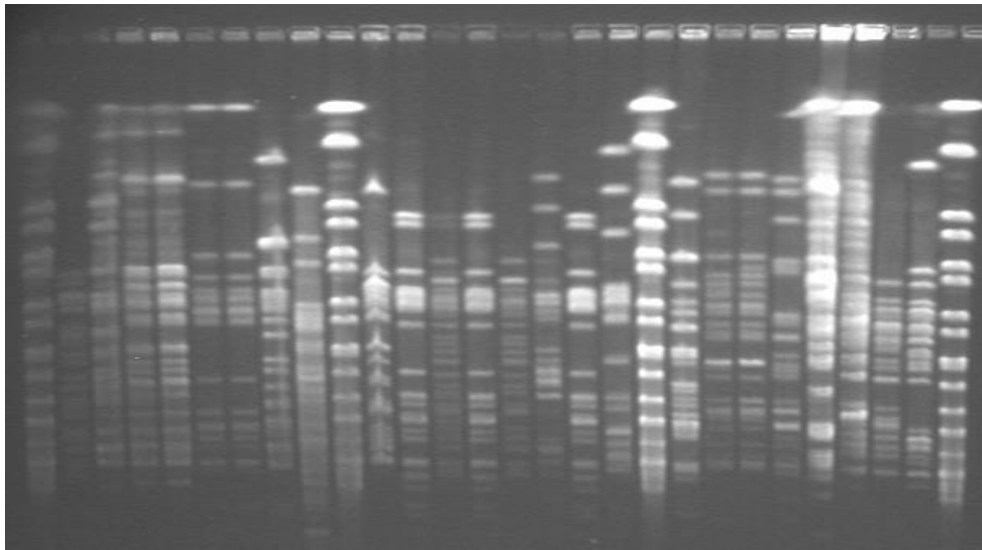
#### 4.2.6 Μοριακή τυποποίηση με τη μέθοδο PFGE

Η Pulsed-Field Gel Electrophoresis είναι η τεχνική η οποία επιτρέπει το διαχωρισμό μεγάλων τμημάτων DNA σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο που αλλάζει περιοδικά κατεύθυνση. Στη συγκεκριμένη εργασία έγινε μοριακή τυποποίηση με τη μέθοδο PFGE χρησιμοποιώντας περιοριστά ένζυμα *Xba*I για τον έλεγχο της επιδημιολογικής συσχέτισης μεταξύ των δειγμάτων σύμφωνα με το πρωτόκολλο Pulsenet International (2013). Επίσης, χρησιμοποιείται και η *S. Braenderup* H9812 ως στέλεχος αναφοράς, όπου απομονώνεται και επεξεργάζεται ακριβώς όπως και τα υπόλοιπα δείγματα καθώς η ηλεκτροφορητική της ικανότητα είναι γνωστή και χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των μοριακών βαρών των μοριακών αποτυπωμάτων.

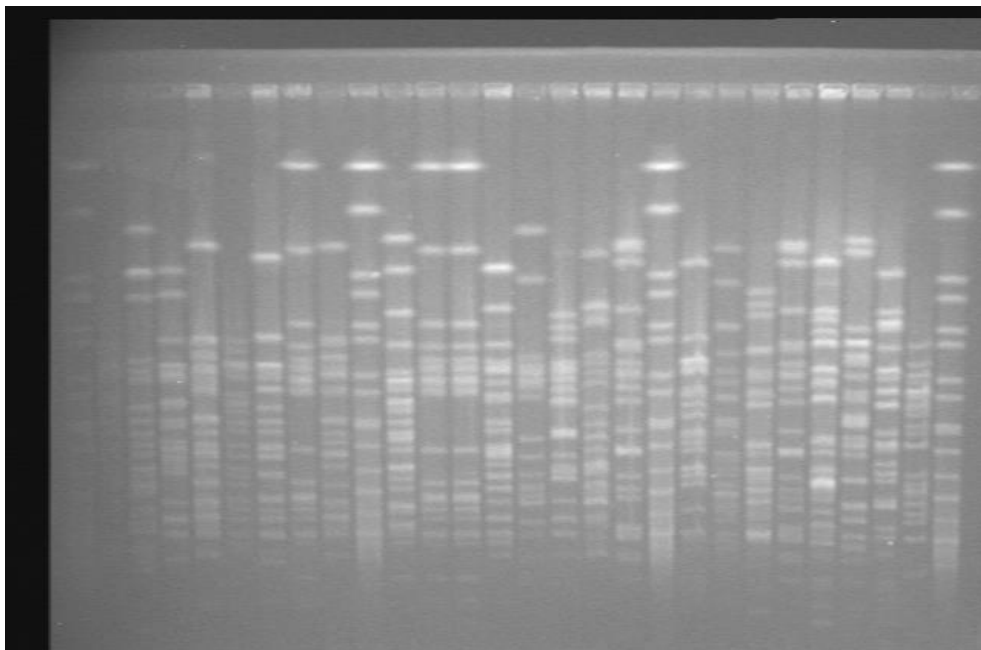
Πιο αναλυτικά:

1. Δημιουργία εναιωρήματος από στερεό θρεπτικό υλικό και αγαρόζη.
2. Τοποθέτηση σε μικρά καλούπια (plugs) όπου περιέχεται ολόκληρο το βακτήριο.
3. Λύση του κυτταρικού τοιχώματος και πέψη με το κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο.
4. Τμήματα αγαρόζης που περιέχουν χρωμοσωμικό DNA τοποθετούνται σε μικρές θέσεις σε τζελ αγαρόζης και ηλεκτροφορούνται σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο.
5. Ηλεκτροφόρηση όπου το DNA διαχωρίζεται σε ορατές ζώνες έπειτα από χρώση και φωτισμό με ακτινοβολία UV.

Bra 263 264 267 272 277 282 300 301 Bra 314 316 317 319 321 322 325 326 Bra 354 357 360 363 366 369 374 377 Bra



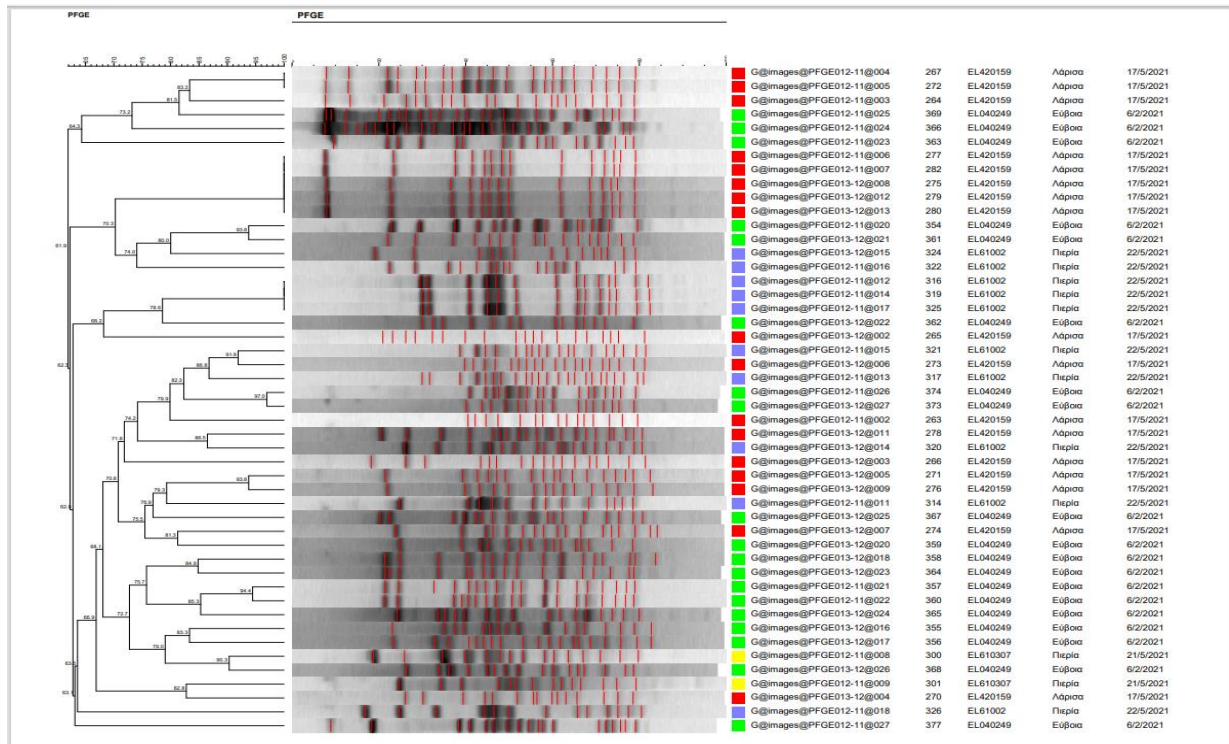
Εικόνα 11. 1<sup>η</sup> Μοριακή τυποποίηση 24 δειγμάτων με τη μέθοδο PFGE (Το ίδιο χρώμα δηλώνει στελέχη από την ίδια εκτροφή).



Εικόνα 12. 2<sup>η</sup> Μοριακή τυποποίηση 24 δειγμάτων με τη μέθοδο PFGE.

#### 4.2.7 Σύγκριση μοριακών αποτυπωμάτων με δενδρόγραμμα

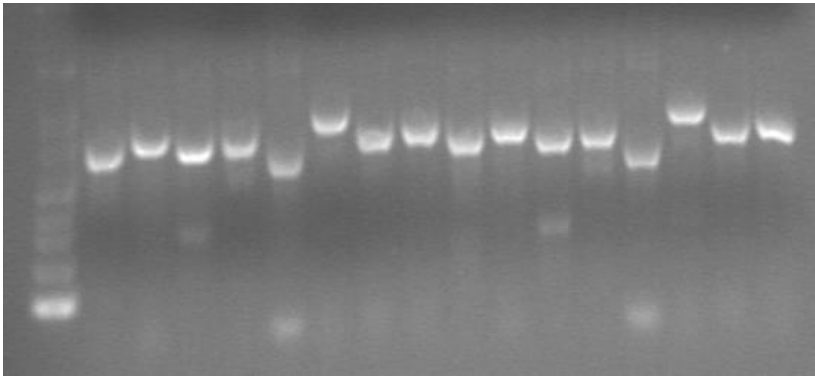
Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, έγινε σύγκριση και έλεγχος της ομοιότητας των μοριακών αποτυπωμάτων με το φυλογενετικό δένδρο. Πιο συγκεκριμένα το προϊόν επεξεργάστηκε από το υπολογιστικό πρόγραμμα GelCompar 2, Bionumerics. Τα στελέχη ταξινομήθηκαν σε 11 ομάδες.



Εικόνα 13. Δενδρόγραμμα σύγκριση ομοιότητας 48 μοριακών αποτυπωμάτων.

#### 4.2.8 MLST και sequencing

Στην συγκεκριμένη μελέτη η μοριακή τυποποίηση έγινε με τη μέθοδο MLST με σκοπό α) να τεκμηριωθεί τυχόν διασπορά ενός υποτύπου μέσα σε κάθε εκτροφή και β) να ανιχνευθεί ο κλώνος μέσω του οποίου διασπείρεται το γονίδιο *mcx* στους κτηνοτροφικούς πληθυσμούς και ακολουθεί sequencing καθώς τα οχτώ γονίδια μεταβολισμού (*dinB*, *icdA*, *rabB*, *polB*, *putP*, *trpA*, *trpB*, *uidA*) ενισχύθηκαν με την τεχνική της multiplex PCR. Όλες οι πληροφορίες για τον τύπο αλληλουχίας (ST) περιλαμβάνονται στην ιστοσελίδα του Ινστιτούτου Pasteur. [Escherichia coli locus/sequence definitions \(pasteur.fr\)](http://Escherichia coli locus/sequence definitions (pasteur.fr)) Στην Εικόνα 14 παρατηρούμε την ενίσχυση των οχτώ γονιδίων με multiplex PCR.



Εικόνα 14. Ενίσχυση 8 housekeeping γονιδίων με multiplex PCR.

#### 4.2.9 Πειράματα σύζευξης (conjugation)

Τα πλασμίδια είναι μικρά, κυκλικά μόρια DNA και χαρακτηρίζονται ως εξωχρωμοσωματικό υλικό είτε των προκαρυωτικών (βακτήρια) είτε κατώτερων ευκαρυωτικών (μύκητες) κυττάρων. Από τη φύση τους τα πλασμίδια διαθέτουν ένζυμα που υδρολύουν ορισμένα αντιβιοτικά δίνοντας αντοχή στα βακτήρια έναντι αυτών των αντιβιοτικών. Ορισμένα βακτήρια, έχουν πλασμίδια που μεταφέρουν τη γενετική πληροφορία σε άλλα βακτήρια όταν βρίσκονται σε άμεση επαφή (σύζευξη) προσδίδοντας νέα φαινοτυπικά χαρακτηρισικά όπως για παράδειγμα την ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό. Η σύζευξη είναι ο κυριότερος μηχανισμός μεταβίβασης γονιδίων αντοχής στα gram (-) βακτήρια. Στην παρούσα μελέτη έγιναν πειράματα σύζευξης σε υγρές καλλιέργειες όπου χρησιμοποιήθηκε ως δέκτης το εργαστηριακό στέλεχος *Escherichia coli* 1R716 str-R και τρυβλία επιλογής McConkey εμπλουτισμένα με str 2000 mg/L, col 2 mg/L, caz 1 mg/L & cro 4 mg/L. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε απομόνωση των συζευκτικών πλασμιδίων σύμφωνα με το πρωτόκολλο nucleospin plasmid καθώς έγινε η επιβεβαίωση τους με PCR για τον έλεγχο ύπαρξης του γονιδίου αντοχής *mcr* και ESBLs στα συγκεκριμένα πλασμίδια.

#### 4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

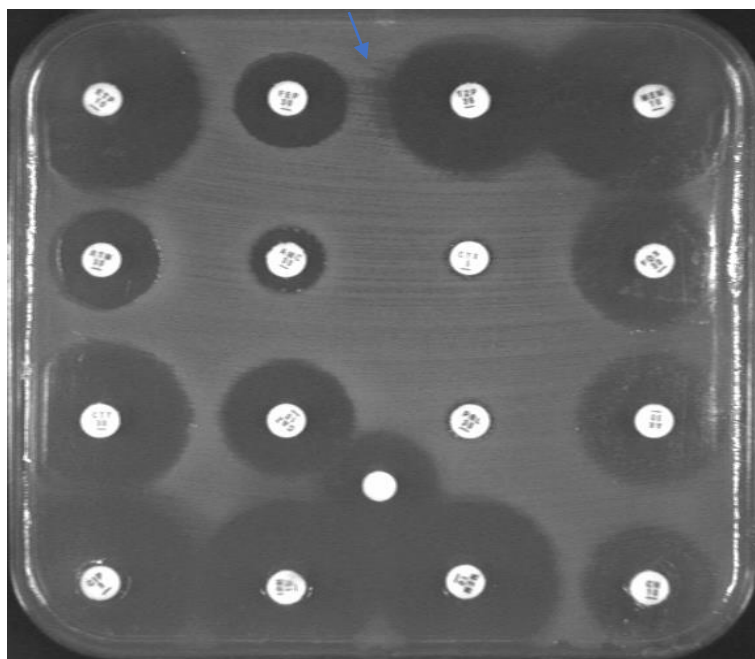
Τα αποτελέσματα της multiplex PCR μετά την ηλεκτροφόρηση έδειξαν ότι 54 δείγματα τα οποία ανήκουν στις 4 από τις 5 εκτροφές, έχουν το γονίδιο αντοχής *mcr-1* και καμία άλλη παραλλαγή του.

Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο διάχυσης των δίσκων που περιγράφεται στα πρωτόκολλα του EUCAST, ελέγχθηκε η ευαισθησία/αντοχή στα αντιβιοτικά αμπισιλίνη, ερταπενέμη, σεφοταξίμη και σιπροφλοξασίνη (fluoroquinolones). Τα ποσοστά αντοχής σε αμπισιλίνη (10 µg), ερταπενέμη (10 µg), σεφοταξίμη (5 µg) και σιπροφλοξασίνη (5 µg) ήταν

100%, 0%, 9% (10 στελέχη) και 31% αντίστοιχα. Στην Εικόνα 15 παρατηρούμε ένα ενδεικτικό αντιβιογράμμα του στελέχους A365 το οποίο φέρει το γονίδιο αντοχής αλλά και είναι αποδεικτικό παραγωγής ευρέος φάσματος β-λακταμασών. Παρατηρούμε την αντοχή του στελέχους στην κεφεπίμη (30 μg) που είναι 4<sup>ης</sup> γενιάς κεφαλοσπορίνη (<24 mm) και την ευαισθησία στην ταζομπακτάμη (≥20 mm) που είναι αναστολέας των β-λακταμασών, να δημιουργεί τη χαρακτηριστική διαταραχή της άλω.

Πίνακας 10. Όρια ευαισθησίας/αντοχής σύμφωνα με το Eucast breakpoints.

	MIC breakpoints ( mg/L)		Zone diameter breakpoints (mm)	
	S ≤	R >	S ≤	R >
<b>Ampicillin</b>	8	8	14	14
<b>Ertapenem</b>	0,5	0,5	25	25
<b>Cefotaxime</b>	1	2	20	20
<b>Ciprofloxacin</b>	0,25	0,5	25	22



Εικόνα 15. Φαινοτυπική ανίχνευση ESBLs.

Τα αποτελέσματα της multiplex PCR έδειξαν ότι οι ESBLs είναι CTX-M group 3 όπου σύμφωνα με τη βιβλιογραφία είναι αρκετά διαδεδομένη στα εντεροβακτηριακά και SHV όπου 2 είναι SHV-12 και 4 SHV-1 που ανευρίσκεται κυρίως στην κτηνοτροφία. Οι AmpC δεν ανιχνεύθηκαν.

Τα όρια της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης στην κολιστίνη για τα στελέχη με το γονίδιο αντοχής κυμαίνονται από 4 mg/L έως 16 mg/L καθώς για τα στελέχη χωρίς το mcr-1 από 0,5 mg/L έως > 64 mg/L με MIC<sub>50</sub> 8 mg/L και για τις 2 περιπτώσεις.

Η μοριακή τυποποίηση με την PFGE αποδεικνύει μεγάλη ανομοιογένεια μεταξύ των στελεχών, γεγονός που δεν βασίζεται σε επιδημία. Ωστόσο, τα στελέχη ταξινομήθηκαν σε 11 διαφορετικές ομάδες όπου κάθε μία ομάδα περιλάμβανε τα στελέχη που είχαν μεταξύ τους ποσοστό ομοιότητας 80% και πάνω (Πίνακας 11). Στη συνέχεια, έγινε τυποποίηση 5 στελεχών με τη μέθοδο Multi Locus Sequence Typing και sequencing.

Πίνακας 11. Ομάδες τυποποίησης.

ΟΜΑΔΕΣ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗΣ	ΣΤΕΛΕΧΟΣ
1 <sup>η</sup> ομάδα	267, 272,264,369
2 <sup>η</sup> ομάδα	354, 361, 324
3 <sup>η</sup> ομάδα	263,273, 317,321,374,373
4 <sup>η</sup> ομάδα	278,320
5 <sup>η</sup> ομάδα	271,276
6 <sup>η</sup> ομάδα	359,274
7 <sup>η</sup> ομάδα	314,358,364
8 <sup>η</sup> ομάδα	357,360,365
9 <sup>η</sup> ομάδα	355,356
10 <sup>η</sup> ομάδα	300,368
11 <sup>η</sup> ομάδα	270,301

Πίνακας 12. Αποτελέσματα sequencing σύμφωνα με τη βάση δεδομένων του Ινστιτούτου Pasteur.

AA	dinB	icdA	pabB	polB	putP	trpA	trpB	uidA	ST
267	32	47	4	10	16	7	4	5	88
314	32	47	4	10	16	7	4	5	88
321	32	47	4	10	16	7	4	5	88
354	3	43	31	33	8	3	5	11	77
365	76	2	7	3	60	1	4	2	823



Τέλος, σύμφωνα με τα πειράματα σύζευξης μπορούμε να πούμε ότι τα πλασμίδια έχουν τη δυνατότητα να μετακινούνται από βακτήριο σε βακτήριο με μεγάλη συχνότητα. Πιο συγκεκριμένα για τα πλασμίδια που μεταφέρουν το γονίδιο αντοχής *mcg-1* η συχνότητα είναι  $10^{-3}$  και  $10^{-4}$  για τα πλασμίδια που μεταφέρουν ESBLs αντίστοιχα.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η χορήγηση των αντιβιοτικών στην ανθρώπινη και την κτηνιατρική για πάνω από 50 χρόνια έχει ευνοήσει στην ανάπτυξη της μικροβιακής αντοχής (AMR). Στην Ελλάδα, τα τελευταία χρόνια έχουν σημειωθεί μεγαλύτερα ποσοστά αντοχής στα αντιβιοτικά από ότι σε άλλα κράτη μέλη της Ευρωπαϊκής ένωσης (Athanasakopoulou, et al., 2021). Η ικανότητα των μικροοργανισμών να αντέχουν στις αντιμικροβιακές θεραπείες έχει θέσει σε σοβαρό κίνδυνο τη δημόσια υγεία. Ένας τρόπος μετάδοσης των ανθεκτικών βακτηρίων μεταξύ ζώων και ανθρώπων είναι από τα ζωικά τρόφιμα καθιστώντας δύσκολη την αποτελεσματική θεραπεία στους ανθρώπους. Επίσης, χρησιμοποιούνταν και ως αυξητικοί παράγοντες στις ζωοτροφές γεγονός που απαγορεύτηκε τα τελευταία χρόνια στην Ευρώπη κάνοντας ένα βήμα για τον περιορισμό της αντιμικροβιακής αντοχής. Στην παρούσα μελέτη κανένα από τα στελέχη δεν είχε ευαισθησία (0%) στο ceftiofure όπου έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των Ηνωμένων Πολιτειών (13% αντίσταση στο ceftiofure) (Koutsianos, et al., 2020). Αντίθετα, για την ερταπενέμη όλα τα στελέχη ήταν ευαίσθητα (100%). 16 στελέχη ελέγχθηκαν για την ευαισθησία στο ciprofloxacin (68,75%). Έρευνα που έγινε το 2022 σε υγιείς χοίρους στην Ευρώπη, έδειξε ότι το ποσοστό αντοχής στις φλουοροκινολόνες ήταν κάτω από 1% σε αντίθεση με το ποσοστό αυτό να είναι υψηλότερο στην Ασία. Από την άλλη μεριά σε άρρωστους χοίρους το ποσοστό αντοχής στις φλουοροκινολόνες στην Ευρώπη είναι υψηλότερο κατά 0-10% (Hayer, et al., 2022).

Η κολιστίνη αποτελεί συνήθη αντιμικροβιακό παράγοντα που χρησιμοποιείται όχι μόνο στους ανθρώπους αλλά και στα ζώα κυρίως ενάντια των gram αρνητικών βακτηρίων. Χρησιμοποιείται για πολλά χρόνια στην κτηνιατρική με σκοπό τη δημόσια υγεία και την αποφυγή μολύνσεων. Έχει ψηφιστεί το πέμπτο πιο συχνό φάρμακο τα έτη 2013-2015 στην Ευρώπη. Από το 1960, χρησιμοποιείται με μεγάλη συχνότητα στα χοιρινά από το στόμα για να περιοριστούν λοιμώξεις όπως διάρροια. Ωστόσο, από το 2000 και μετά γίνονται αναφορές σχετικά με την αντοχή στα εντεροβακτηριακά που αφορούν τα χοιρινά. Το 2012, η χρήση της ήταν 600 φορές μεγαλύτερη στα ζωικά τρόφιμα από ότι στους ανθρώπους γεγονός που συνδέεται με την εμφάνιση του πλασμιδιακού γονιδίου αντοχής *mcg*. Άρα μπορούμε

να πούμε ότι το πρόβλημα της μικροβιακής αντοχής ξεκινάει περισσότερο από την κτηνοτροφία και λιγότερο από τους ανθρώπους (Lay, et al., 2021). Επιπλέον, ελέγχοντας την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση στην κολιστίνη και γνωρίζοντας ότι το όριο ευαισθησίας/αντοχής στο EUCAST είναι 2 mg/dl παρατηρήσαμε ότι τα περισσότερα στελέχη ανεξάρτητα εάν έχουν το γονίδιο αντοχής ή όχι είναι ανθεκτικά στο αντιβιοτικό γεγονός που αποδεικνύει ότι η αντοχή στην κολιστίνη δεν επηρεάζεται από τα πλασμίδια μεταφοράς αλλά από χρωμοσωματικές μεταλλάξεις.

Στην επικράτηση της μικροβιακής αντοχής συμβάλλουν και οι ESBLs. Μετά την ανακάλυψη της πενικιλίνης από το 1928 και έπειτα άλλων β λακταμικών αντιβιοτικών η παγκόσμια εξάπλωση των ESBLs τόσο στην κτηνοτροφία όσο και στα ζώα που αφορούν κυρίως εντεροβακτηριακά είναι δεδομένη. Οι κατηγορίες TEM, SHV και CTX-M είναι οι πιο συχνές ( Bergšpica, et al., 2020). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, το 9% των στελεχών είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ESBLs. Πιο συγκεκριμένα, 12 τυχαία στελέχη με ή χωρίς το γονίδιο αντοχής *mcr-1* έχουν ελεγχθεί για την παραγωγή *esbls*. Τα 8 παράγουν την CTX-M group 3 ενώ τα 7 επιβεβαιώνουν την ύπαρξη SHV όπου 2 είναι SHV-12 και 4 SHV-1 όπου και οι 2 κατηγορίες είναι πολύ συχνές στα εντεροβακτηριακά. Η οικογένεια CTX-M είναι η επικρατέστερη των *esbls* ανάμεσα στους ανθρώπους ενώ η SHV σε δείγματα γάλακτος από αγελάδες που παρουσίαζαν μαστίτιδα. Λοιμώξεις στους ανθρώπους στα νοσοκομεία και στο περιβάλλον έχουν παρατηρηθεί παγκοσμίως καθώς αυτά τα ένζυμα ανευρίσκονται ακόμα και σε χώρες με χαμηλή κατανάλωση αντιβιοτικών. Επιπλέον, υποστηρίζεται ότι τα ταξίδια είναι ένας σημαντικός παράγοντας για τη μετάδοσή τους (Athanasakopoulou, et al., 2021).

Συμπληρωματικά, παγκόσμια κατανομή έχει και το γονίδιο αντοχής *mcr-1* με μεγαλύτερη συχνότητα στους gram αρνητικούς μικροοργανισμούς. Στη συγκεκριμένη μελέτη το 47% των στελεχών παράγουν την *mcr-1*. Σε έρευνα στην οποία συλλέχθηκαν 5.924 στελέχη από όλο τον κόσμο έδειξε ότι τα 595 μετέφεραν το γονίδιο αντοχής *mcr* και συγκεκριμένα το *mcr-1* να καταλαμβάνει το 83,5% των θετικών στελεχών για *mcr* (Hayer, et al., 2022). Τα πλασμίδια μεταφοράς μέσω της σύζευξης μεταφέρονται σε διάφορα είδη διασπείροντας τις ιδιότητες των βακτηρίων για παράδειγμα την αντοχή σε κάποιο αντιβιοτικό και κατ' επέκταση τη μικροβιακή αντοχή (Bai, et al., 2018). Στη παρούσα έρευνα, ελέγχθηκε η ικανότητα 6 πλασμιδίων, όπου τα 4 παράγουν την *mcr-1* και 2 παράγουν *esbls*, μετά από επιβεβαίωση με PCR. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μεταφέρονται από είδος σε είδος με αρκετά υψηλή συχνότητα  $10^{-3}$  και  $10^{-4}$  αντίστοιχα αποδεικνύοντας τη διασπορά αντοχής στην κολιστίνη.

Τέλος, 3 στελέχη ανήκουν στον ST88 που είναι κλώνος υψηλού κινδύνου, 1 στον ST77 και ένας στον ST823, χωρίς να έχει βρεθεί ο ST131 (International High Risk Clone) όπου σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αποτελεί υψηλή κρισιμότητα για ανθρώπους και ζώα.

## Αναφορές

- Acharya, T., 2022. MacConkey Agar: Composition, Uses, Colony Characteristics. *Microbe Online*, May.
- Bergšpica, I. και συν., 2020. Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL) Producing *Escherichia coli* in Pigs and Pork Meat in the European Union. *National Library of Medicine*, October, pp. 1-23.
- Björn, B., 2019. Acquired Resistance to Colistin via Chromosomal And Plasmid-Mediated Mechanisms in *Klebsiella pneumoniae*. *Microbes and Diseases*, September, pp. 10-19.
- Bradford, P. A., 2001. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Pub Med*, October, pp. 933-951.
- Brejyeh, Z., Jubeh, B. & Karaman, R., 2020. Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Pub Med*, March, pp. 1-23.
- Castanheira, M., Simner, . P. J. & Bradford, . P. A., 2021. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. *Oxford Academy*, July, pp. 1-21.
- Dandachi, I., Chabou, S., Daoud, . Z. & Rolain, J.-M., 2018. Prevalence and Emergence of Extended-Spectrum Cephalosporin-, Carbapenem- and Colistin-Resistant Gram Negative Bacteria of Animal Origin in the Mediterranean Basin. *Frontiers in Microbiology*, September, pp. 1-26.
- Doi, Y., Iovleva, A. & Bonomo, R. A., 2017. The ecology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in the developed world. *Journal of Travel Medicine*, April, pp. 44-51.
- Gomes, T. A. και συν., 2016. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, December, pp. 3-30.
- Jang, J. και συν., 2017. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. *Journal of Applied Microbiology*, April, pp. 570-581.
- Liakopoulos, A., Mevius, D. & Ceccarelli, . D., 2016. A Review of SHV Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. *Antimicrobial Resistance and Chemotherapy*, September, pp. 1-27.
- Morrison, L. & Zembower, T., 2020. Antimicrobial Resistance. *PubMed*, October, pp. 619-635.
- Mukerji, S. και συν., 2017. Development and Transmission of antimicrobial resistance among Gram negative bacteria in animals and their public health impact. *ESSAYS IN BIOCHEMISTRY*, March, pp. 23-35.
- Pérez-Pérez, F. J. & Hanson, N. D., 2002. Detection of Plasmid-Mediated AmpC  $\beta$ -Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, June, pp. 2153-2162.

- Rolain, J.-M., 2013. Food and human gut as reservoirs of transferable antibiotic resistance encoding genes. *Antimicrobials, Resistance and chemotherapy*, June, pp. 1-10.
- Timofte, D. και συν., 2014. Detection and Molecular Characterization of Escherichia coli CTX-M-15 and Klebsiella pneumoniae SHV-12  $\beta$ -Lactamases from Bovine Mastitis Isolates in the United Kingdom. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, January, pp. 789-794.
- Wu, C. και συν., 2018. Rapid rise of the ESBL and mcr-1 genes in Escherichia coli of chicken origin in China, 2008-2014. *PubMed*, March, pp. 1-10.
- Al-Tawfig, J. A., Laxminarayan, R. & Mendelson, M., 2017. How should we respond to the emergence of plasmid-mediated colistin resistance in humans and animals?. *Internasional Journal of Infectious Diseases*, September, pp. 77-84.
- Allocati, N., Masulli, . M., Alexeyev, . M. F. & Di Ilio, C., 2013. Escherichia coli in Europe: An Overview. *PubMed Central*, November, pp. 6235-6254.
- Anon., 2015. Emergence of Antimicrobial-Resistant Escherichia coli of Animal Origin Spreading in Humans. *Advabce Access Articles*, November, pp. 898-914.
- Athanasakopoulou, Z. και συν., 2021. Antimicrobial Resistance Genes in ESBL-Producing Escherichia Isolates from Animals in Greece. *Antibiotics*, April, pp. 1-15.
- Bai, F. και συν., 2018. A mcr-1-Carrying Conjugative IncX4 Plasmid in Colistin-Resistant Escherichia coli ST278 Strain Isolated From Dairy Cow Feces in Shanghai, China. *Frontiers in Microbiology*, November, pp. 1-9.
- Berglund, B., 2019. Acquired Resistance to Colistin via Chromosomal And Plasmid-Mediated Mechanisms in Klebsiella pneumoniae. *Infectious Microbes and Diseases*, September, pp. 10-19.
- Bonomo, R. A., 2017.  $\beta$ -Lactamases: A Focus on Current Challenges. *Pub Med*, January, pp. 1-15.
- Bourouis, A., Ben moussa, M. & Belhadg, O., 2015. Multidrug-resistant phenotype and isolation of a Novel SHV- beta-Lactamase variant in a clinical isolate of Enterobacter cloacae. *Journal of Biomedical Science*, April, pp. 1-7.
- Bush, K., 1989. Characterization of r-Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, March, pp. 259-263.
- Bush, K., 2018. Past and Present Perspectives on  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, September, pp. 24-62.
- Cassir, N., Rolain, J.-M. & Brouqui, P., 2014. A new strategy to fight antimicrobial resistance: the revival of old antibiotics. *Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy*, October, pp. 1-15.
- Coque, T. M. & R Canton, F. B., 2008. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Eurosurveillance*, November, pp. 1-11.

- ECDC, 2019. Laboratory manual for carbapenem and colistin resistance detection and characterisation for the survey of carbapenem- and/or colistin-resistant Enterobacteriaceae. February, pp. 1-10.
- EUCAST, 2017. *EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance*, 4-43: s.n.
- Exner, M. και συν., 2017. Antibiotic resistance: What is so special about multidrug-resistant Gram-negative bacteria?. *PubMed*, April, pp. 1-24.
- Filioussis, G. και συν., 2020. Short communication: Bovine mastitis caused by a multidrug-resistant, mcr-1-positive (colistin-resistant), extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* clone on a Greek dairy farm. *American Dairy Science Association*, September, pp. 852-857.
- Guanglun, M. M., Yang, H. & Yan, W., 2017. Building resilience of students with disabilities in China: The role of inclusive education teachers. *Teacher and Teaching Education*, October, pp. 125-134.
- Hassan, J. & Kassem, I. I., 2020. Audacious Hitchhikers: The Role of Travel and the Travel and the International Food Trade in the Global Dissemination of Mobile Colistin-Resistance (mcr) Genes. *MDPI*, July, pp. 1-7.
- Hayer, S. S. και συν., 2022. Global Distribution of Fluoroquinolone and Colistin Resistance and Associated Resistance Markers in *Escherichia coli* of Swine Origin – A Systematic Review and Meta-Analysis. *frontiers in Microbiology*, March, pp. 1-13.
- Heritage, J., M'Zali, . F. H., Gascoyne-Binzi, D. & Hawkey, . P. M., 1999. Evolution and spread of SHV extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, September, pp. 309-318.
- Hidayet TUTUN1, A. K. L. A., 2019. *Ankara Univ Vet Fak* , August, pp. 407-416.
- Hutchings, M. I., Truman, A. W. & Wilkinson, . B., 2019. Antibiotics: past, present and future. *ELSEVIER*, November, pp. 72-80.
- Karczmarczyk, M. και συν., 2011. Characterization of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Animals Presenting at a University Veterinary Hospital. *American Society For Microbiology*, October, pp. 1-9.
- Koutsianos, D. και συν., 2020. Antibiotic Resistance Patterns and mcr-1 Detection in Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolates from Commercial Layer and Layer Breeder Flocks Demonstrating Colibacillosis in Greece. *Microbial Drug Resistance*, April, pp. 710-720.
- Krivonogova, A. S., Donnik, I. M., Isaeva, A. G. & Moiseeva, . K. V., 2020. Methodology for compiling a microbial resistance passport for dairy farms. *Аграрный вестник Урала*, pp. 42-47.
- Lay, K. K. και συν., 2021. Colistin Resistance and ESBL Production in *Salmonella* and *Escherichia coli* from Pigs and Pork in the Thailand, Cambodia, Lao PDR, and Myanmar Border Area. *National Library of Medicine*, May, pp. 1-13.

- Liu BS, Y.-Y. και συν., 2015. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet*, November, pp. 161-168.
- Mueller, M. & Tainter., C. R., 2021. Escherichia Coli. *NCBI*, October, pp. 1-34.
- Neil Woodford, E. J. F. a. M. J. E., 2005. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum b-lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, November, pp. 154-155.
- Oliveira, J. & Reygaert, W. C., 2019. Gram Negative Bacteria. *Eyrope PMC*, March.
- Scott A McEwen, P. J. C., 2017. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Pub Med*, March.
- Scott A McEwen, P. J. C., 2018. Antimicrobial Resistance: A New Health Perspective. *PubMed*, March.
- Sun, J., Zhang, H., Liu, Y.-H. & Feng, Y., 2018. Towards Understanding MCR-like Colistin Resistance. *Scence Direct*, September, pp. 794-808.
- Szabó, D. και συν., 2005. SHV-Type Extended-Spectrum Beta-Lactamase Production Is Associated with Reduced Cefepime Susceptibility in Enterobacter cloacae. *Journal of Clinical Microbiology*, October, pp. 5058-5064.
- Tapiero, J., 2008. Colistin. *Science Direct*, pp. 123-135.
- Woodford, N., Fagan, E. J. & Ellington, M. J., 2006. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding. *PubMed*, November, pp. 321-322.
- Yohei Doi, M. P. A. I. M. R. A. B. M., Doi, Y., Iovleva, A. & Bonomo, R. A., 2017. The ecology of extended-spectrum β-lactamases (ESBLs) in the developed world. *Journal of Travel Medicine*, April, pp. 44-51.
- Yu, W.-L., Chuang, Y.-C. & Walther-Rasmussen, J., 2006. Extended-spectrum beta-lactamases in Taiwan: epidemiology, detection, treatment and infection control.. *EUROPE PMC*, August, pp. 264-267.
- Zeinab Breijyeh, B. J. R. K., 2020. Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *PubMed*, March.
- Σωτήρχου, X., 2021. *Μηχανισμοί ανθεκτικότητας μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά*, Αθήνα: Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής.