



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

Σχολή Επιστημών Υγείας & Πρόνοιας

Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών

Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΠΟΒΑΘΡΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΕ ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΚΑΙ ΠΟΛΥΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ *ESCHERICHIA COLI*

Όνοματεπώνυμο Φοιτητή :

ΘΕΟΔΩΡΟΣ ΦΛΕΒΑΡΗΣ

A.M. : 62116082

Επιβλέπων Καθηγητής:

ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ ΜΠΕΛΟΥΚΑΣ

Τριμελής Επιτροπή:

ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ ΜΠΕΛΟΥΚΑΣ, ΟΛΓΑ ΠΑΠΠΑ, ΧΡΥΣΟΥΛΑ ΔΙΟΛΗ

Αθήνα, 2023



UNIVERSITY OF WEST ATTICA

Faculty of Health & Care Sciences

Department of Biomedical Sciences

Undergraduate Thesis

STUDY OF THE GENETIC BACKGROUND OF ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES IN RESISTANT AND MULTI-RESISTANT *ESCHERICHIA COLI* STRAINS

Name of Student

THEODOROS FLEVARIS

R.N.: 62116082

Name of Supervisor

APOSTOLOS BELOUKAS

Evaluation Committee

APOSTOLOS BELOUKAS, OLGA PAPPA, CHRYSOULA DIOLI

Athens, 2023

ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

Ημερομηνία Εξέτασης: 5/10/2023

ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ	ΥΠΟΓΡΑΦΗ
ΜΠΕΛΟΥΚΑΣ ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ	
ΠΑΠΠΑ ΟΛΓΑ	
ΔΙΟΛΗ ΧΡΥΣΟΥΛΑ	

ΔΗΛΩΣΗ ΠΕΡΙ ΛΟΓΟΚΛΟΠΗΣ

Με πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων, εγώ ο Φλεβάρης Θεόδωρος, δηλώνω ενυπογράφως ότι είμαι αποκλειστικός συγγραφέας της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για την ολοκλήρωση της οποίας κάθε βοήθεια είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται λεπτομερώς στην εργασία αυτή. Έχω αναφέρει πλήρως και με σαφείς αναφορές, όλες τις πηγές χρήσης δεδομένων, απόψεων, θέσεων και προτάσεων, ιδεών και λεκτικών αναφορών, είτε κατά κυριολεξία είτε βάσει επιστημονικής παράφρασης. Αναλαμβάνω την προσωπική και ατομική ευθύνη ότι σε περίπτωση αποτυχίας στην υλοποίηση των ανωτέρω δηλωθέντων στοιχείων, είμαι υπόλογος έναντι λογοκλοπής, γεγονός που σημαίνει αποτυχία στην διπλωματική μου εργασία και κατά συνέπεια αποτυχία απόκτησης Τίτλου Σπουδών, πέραν των λοιπών συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων. Δηλώνω, συνεπώς, ότι αυτή η διπλωματική εργασία προετοιμάστηκε και ολοκληρώθηκε από εμένα προσωπικά και αποκλειστικά και ότι, αναλαμβάνω πλήρως όλες τις συνέπειες του νόμου στην περίπτωση κατά την οποία αποδειχθεί, διαχρονικά, ότι η εργασία αυτή ή τμήμα της δεν μου ανήκει διότι είναι προϊόν λογοκλοπής άλλης πνευματικής ιδιοκτησίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα ερευνητική πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής.

Πολλές ευχαριστίες στο Διευθυντή του εργαστηρίου κ. Μπελούκα Απόστολο, Αναπληρωτή Καθηγητή, που δέχθηκε να πραγματοποιήσω την πτυχιακή μου εργασία στο ερευνητικό εργαστήριο της σχολής και με εμπιστεύθηκε με τη διεκπεραίωση αυτής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω εκ βάθους καρδιάς την υποψήφια διδάκτορα κ. Διολή Χρυσούλα για τη διαρκή και εμπειριστατωμένη βοήθεια της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας. Η συνδρομή της ήταν καταλυτική και απολύτως χρήσιμη. Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τη βαθιά μου εκτίμηση στην κ. Παππά Όλγα για την στήριξη και την καθοδήγηση στις επιλογές μου .

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια και φίλους μου για την κατανόηση, τη βοήθεια και το αμέριστο ενδιαφέρον προς το πρόσωπο και την προσπάθεια μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αντοχή των βακτηρίων στα αντιβιοτικά και η εμφάνιση βακτηριακών στελεχών με πολλαπλές αντοχές έχει οδηγήσει την επιστημονική κοινότητα σε ένα αγώνα δρόμου προκειμένου να είναι ένα βήμα μπροστά και να βρίσκει νέους τρόπους αντιμετώπισης.

Βασική αιτία της όξυνσης του φαινομένου της μικροβιακής αντοχής στα αντιβιοτικά αποτελεί η αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών στην ιατρική, τη κτηνιατρική/ κτηνοτροφία, τη γεωργία ακόμα και στις υδατοκαλλιέργειες. Μέσω της πίεσης που ασκούν τα αντιβιοτικά εμφανίζεται το φαινόμενο της φυσικής επιλογής, όπου στελέχη με χαρακτηριστικά που τους επιτρέπουν να επιβιώσουν των αντιβιοτικών, ανθίστανται, πολλαπλασιάζονται και επικρατούν.

Οι μηχανισμοί που ευθύνονται για την αντοχή των βακτηρίων στα αντιβιοτικά είναι πολλαπλοί. Ωστόσο αυτοί που σχετίζονται με την ύπαρξη γονιδίων αντοχής που εδράζονται σε συζευκτικά πλασμίδια απασχολούν περισσότερο την επιστημονική κοινότητα.

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη πραγματοποιήθηκε πλασμιδιακή ανάλυση (κατά Portnoy [\[22\]](#)) σε ανθεκτικά και πολυανθεκτικά στελέχη *Escherichia coli*, που είχαν απομονωθεί από περιβαλλοντικά (δείγματα λύματος και νερού ποταμών) και κλινικά δείγματα, στοχεύοντας στην εκτίμηση του πλήθους και των μεγεθών των πλασμιδίων των υπό μελέτη στελεχών. Τα πλασμιδιακά προφίλ των στελεχών εμφάνισαν ετερογένεια, ωστόσο κάποια στελέχη που διέθεταν το ίδιο γονίδιο αντοχής είχαν παρόμοιο προφίλ πλασμιδίων.

Λέξεις κλειδιά: αντοχή στα αντιβιοτικά, *Escherichia coli*, πλασμιδιακή ανάλυση, πλασμιδιακά προφίλ

ABSTRACT

Antibiotic resistance and the emergence of multidrug-resistant bacterial strains have led the scientific community to a race against time in order to be one step ahead and find new ways of dealing with it.

The imprudent use of antibiotics in medicine, veterinary medicine/livestock farming, agriculture and even aquaculture has been the main cause of the worsening of this phenomenon. Through the pressure of the antibiotics, the natural selection phenomenon arises. By this, bacterial strains that have characteristics that could possibly provide them with a way to survive, manage to do so and consequently multiply and spread.

Various mechanisms are responsible for the development of antibiotic resistance. Those that are related to the existence of resistance genes that are located on plasmids, have greater importance for the scientific community.

In this research study, plasmid analysis (based on the Portnoy protocol [\[22\]](#)) was performed on resistant and multi-drug resistant strains of *Escherichia coli*. These strains were isolated from environmental (samples of sewage and river water) and clinical samples. The goal was to estimate the number and sizes of the strains' plasmids. The plasmid profiles of the strains showed heterogeneity, however some strains that had the same resistance gene had similar plasmid profile.

Keywords: antibiotic resistance, *E. coli*, plasmid analysis, plasmid profile

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΕΞΕΤΑΣΗΣ.....	3
ΔΗΛΩΣΗ ΠΕΡΙ ΛΟΓΟΚΛΟΠΗΣ.....	4
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	7
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	8
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	10
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	12
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	14
ΚΥΡΙΟ ΜΕΡΟΣ.....	14
Τρόπος Δράσης Αντιβιοτικών και το Φαινόμενο Αντοχής.....	14
Αντοχή στις β-λακτάμες.....	20
β-λακταμάσες.....	21
Οριζόντια Μεταφορά και Κινητά Γενετικά Στοιχεία.....	23
Γενετικό Υπόβαθρο των ESBLs και AmpC β-λακταμασών.....	28
Επιδημιολογία των ESBL.....	33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	36
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	36
Στοιχεία των υπό μελέτη στελεχών.....	36
Μοριακή Ανίχνευση Γονιδίων Αντοχής Τύπου AmpC.....	38
Ανάλυση Πλασμιδίων – Μέθοδος Portnoy ^[22]	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	41
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	41
Αποτελέσματα PCR για ανίχνευση γονιδίων bla _{CMY} και bla _{FOX}	41
Αποτελέσματα Portnoy ^[22]	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	47
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	47
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	49

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Μηχανισμοί αντοχής στα αντιβιοτικά ^[2]	17
Εικόνα 2: Γενική δομή της κυριότερης οικογένειας αντλιών εκροής ^[2]	19
Εικόνα 3: Ταξινόμηση β-λακταμασών κατά Ambler ^[4]	22
Εικόνα 4: Λεπτομέρειες ταξινόμησης κατά Ambler και ταξινόμηση κατά Bush-Jacoby-Medeiros ^[3]	23
Εικόνα 5: Σύζευξη και μεταφορά γενετικού υλικού μεταξύ δύο βακτηρίων με τη βοήθεια τριχιδίου ^[18]	25
Εικόνα 6: Τρανσποζόνια τάξης I και II ^[7]	26
Εικόνα 7: Απεικόνιση ιντεγκρονίου και γονιδιακής κασέτας ^[19]	27
Εικόνα 8: Οι τύποι TEM που έχουν προκύψει από αλλαγές αμινοξέων στο TEM-1 ^[21]	29
Εικόνα 9: Γενετικές δομές που φέρουν γονίδια που κωδικοποιούν ESBL ^[9]	32
Εικόνα 10: Διασπορά CTX-M, TEM και SHV απομονωμένων στελεχών σε ΗΠΑ, Ασία-Ειρηνικό, Ευρώπη και Λατινική Αμερική ^[9]	34
Εικόνα 11: Τάση ποσοστών τύπων CTX-M στην Ευρώπη και παγκοσμίως σε τρεις χρονολογικές περιόδους ^[12]	35
Εικόνα 12: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των πλασμιδίων	46

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Αντιμικροβιακές ομάδες βάσει του μηχανισμού δράσεως ^[2]	15
Πίνακας 2: Είδη βακτηρίων με φυσική αντοχή ^[2]	16
Πίνακας 3: Οικογένειες των ESBL και τα χαρακτηριστικά τους.....	30
Πίνακας 4: Διαχωρισμός βάσει προφίλ αντοχής δειγμάτων.....	37
Πίνακας 5: Διαχωρισμός στελεχών βάσει του τύπου γονιδίου που εντοπίστηκε.....	38
Πίνακας 6: Αποτελέσματα PCR των AmpC: τύπου CMY και FOX.....	41
Πίνακας 7: Χαρακτηριστικά των 52 στελεχών με πλασμίδια μεγέθους >17 Mda και ομαδοποιήσεις σε συνδυασμό με το γονίδιο αντοχής.....	42
Πίνακας 8: Ενδεικτικά μη αξιολογήσιμα στελέχη.....	44

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΟ	ΠΛΗΡΗΣ ΟΝΟΜΑΣΙΑ
LPS	lipopolysacharide
OprD	Outer membrane porin D
CAT	chloramphenicol acetyltransferases
PBPs	Penicillin Binding Proteins
OmpF	Outer membrane porin F
OmpC	Outer membrane porin C
ESBL	Extended Spectrum B Lacatamase
KPC	Klebsiella pneumoniae carbapenemase
NDM	New Delhi metallo-beta-lactamase
VIM	Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase
IMP	Imipenemase
ESAC	Extended-Spectrum AmpC
ISCR	Integron-Associated site-specific recombinases
IS	Insertion Sequences
RC (transposition)	Rolling Circle (transposition)
ΜΕΛ	Μονάδα Επεξεργασίας Λυμάτων
R	Resistance
MDR	Multi-Drug Resistance
DDST	Double Disk Synergy Test

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Λίγοι είναι οι τομείς οι οποίοι έχουν μελετηθεί από την επιστημονική κοινότητα, όσο αυτός των μικροοργανισμών. Από την εποχή που ανακαλύφθηκαν, οι μικροοργανισμοί έχουν μελετηθεί εκτενώς, δεδομένου ότι αποτελούν αίτιο για διάφορες ασθένειες που απασχολούν τη δημόσια υγεία. Με τη μελέτη των μικροοργανισμών οι επιστήμονες κατάφεραν να εξηγήσουν πώς προκαλούνται τα λοιμώδη νοσήματα αλλά και να αναπτύξουν λύσεις προκειμένου να αντιμετωπιστεί ο αιτιολογικός παράγοντάς τους.

Από τις μεγαλύτερες ανακαλύψεις του 20^{ου} αιώνα ήταν αυτή των αντιβιοτικών, και ιδιαίτερα του τρόπου δράσης τους ενάντια στους μικροοργανισμούς. Με την ανακάλυψη αυτή, ο τομέας αυτός γνώρισε τεράστια ανάπτυξη ενώ η διαθεσιμότητά τους στο καταναλωτικό κοινό έγινε σταδιακά μαζική. Με την πάροδο των χρόνων ανακαλύφθηκαν νέα αντιβιοτικά που αντιμετώπιζαν πλήθος παθογόνων μικροοργανισμών, με κυριότερα τα βακτήρια.

Η αυξημένη, ωστόσο, χρήση των αντιβιοτικών οδήγησε στο φαινόμενο της αντοχής στα αντιβιοτικά. Το φαινόμενο αυτό βασίζεται στη διαδικασία της φυσικής επιλογής. Συγκεκριμένα, μέσω της υπερβολικής χρήσης των αντιβιοτικών, στελέχη που τυγχάνει να φέρουν χαρακτηριστικά ή μηχανισμούς που τους επιτρέπουν να επιβιώσουν, ανθίστανται της δράσης των αντιβιοτικών, με αποτέλεσμα την επικράτηση και διασπορά τους. Κατά συνέπεια, προκύπτουν πλέον νέα υπερανθεκτικά στελέχη, τα οποία είναι ευαίσθητα σε ελάχιστα ή και κανένα αντιβιοτικό.

Το φαινόμενο αυτό έχει κινητοποιήσει την επιστημονική κοινότητα τις τελευταίες δεκαετίες η οποία βρίσκεται σε διαρκή αναζήτηση νέων, πιο ισχυρών αντιβιοτικών, ενώ παράλληλα γίνεται προσπάθεια μετριασμού της χρήσης των υπάρχοντων αντιβιοτικών, όταν αυτό είναι δυνατόν.

Μέσω της εξέλιξης της μοριακής βιολογίας είναι εφικτό, πλέον, να κατανοηθούν ακριβώς οι μηχανισμοί ανάπτυξης της αντιβιοτικής αντοχής και έτσι να αναπτυχθούν νέοι τρόποι αντιμετώπισης. Η επιστημονική γνώση πάνω στην αντοχή στα αντιβιοτικά έχει αυξηθεί και πλέον πολλά υπόλογα γονίδια έχουν εντοπιστεί και ταυτοποιηθεί. Αυτά τα γονίδια μπορούν να βρίσκονται τόσο σε κύριο όσο και σε πλασμιδιακό γονιδίωμα, ενώ γνωστοί είναι και οι

τρόποι μεταφοράς των γονιδίων αντοχής που συμβάλλουν στην εξάπλωση του φαινομένου αντοχής.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα μελέτης βακτηρίου που εμφανίζει πολλαπλά πρότυπα (profile) αντοχής, είναι το βακτήριο *Escherichia coli*. Το βακτήριο *E. coli* είναι ένα κινητό, μαστιγοφόρο Gram αρνητικό βακτήριο ραβδοειδούς σχήματος που ανήκει στην οικογένεια των Εντεροβακτηριοειδών. Πρόκειται για το πιο καλά μελετημένο βακτηριακό είδος ενώ αποτέλεσε βασικό πρότυπο οργανισμού στη γενετική για την διαλεύκανση ποικίλων βιολογικών φαινομένων. Οι περισσότεροι τύποι του είδους είναι αβλαβείς ή και επωφελείς για τον οργανισμό καθώς αποτελούν τμήμα της φυσιολογικής χλωρίδας του γαστρεντερικού σωλήνα των θερμόαιμων ζώων, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου. Με τυχόν μεταφορά, ωστόσο, σε άλλες ανατομικές περιοχές δύναται να προκληθούν ευκαιριακές λοιμώξεις.

Το βακτήριο *E.coli* δεν διαθέτει κανένα εγγενή μηχανισμό αντοχής στα αντιβιοτικά. Παρόλα αυτά, χαρακτηρίζεται από ικανότητα απόκτησης και συσσώρευσης γονιδίων αντοχής κυρίως μέσω της οριζόντιας μεταφοράς τους ^[11]. Παραδείγματα μηχανισμών αντοχής που εντοπίζονται συχνά σε βακτηριακά στελέχη *E. coli*, και έχουν προκαλέσει ιδιαίτερες ανησυχίες, είναι η απόκτηση γονιδίων εκτεταμένου φάσματος β-λακταμασών (που προσδίδουν αντοχή στις εκτεταμένου φάσματος κεφαλοσπορίνες) αλλά και καρβαπενεμασών (που ευθύνονται για την αντοχή στις καρβαπενέμες) ^[11, 116].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΚΥΡΙΟ ΜΕΡΟΣ

Τρόπος Δράσης Αντιβιοτικών και το Φαινόμενο Αντοχής

Για πολλά χρόνια ο άνθρωπος ήταν πλήρως εκτεθειμένος στις βακτηριακές λοιμώξεις, με μόνο τρόπο αντιμετώπισης το ίδιο του το ανοσοποιητικό ή/και κάποια υποτυπώδη και πολλές φορές αναποτελεσματικά αναχρονιστικά μέσα. Με την εξέλιξη, ωστόσο, της ιατρικής επιστήμης και την ανάπτυξη των αντιβιοτικών, κατέστη δυνατή η αποτελεσματική καταπολέμηση των λοιμώξεων.

Οι πρώτες αντιβιοτικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν στην ιατρική, όπως για παράδειγμα η πενικιλίνη, παρήχθησαν και απομονώθηκαν από ζωντανούς οργανισμούς. Με την πρόοδο, όμως, της επιστήμης και της τεχνολογίας, δόθηκε η δυνατότητα σχεδιασμού και σύνθεσης νέων πιο ισχυρών αντιβιοτικών. Σήμερα τα διαθέσιμα αντιβιοτικά (φυσικά, ημισυνθετικά και συνθετικά) είναι πολύάριθμα και βάσει του τρόπου δράσης τους, ταξινομούνται σε τέσσερις κατηγορίες (**Πίνακας 1**): ^[2]

- i. Παράγοντες που εμποδίζουν τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος
- ii. Παράγοντες που εκπολώνουν την κυτταρική μεμβράνη
- iii. Παράγοντες που εμποδίζουν την πρωτεϊνοσύνθεση
- iv. Παράγοντες που εμποδίζουν τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων
- v. Παράγοντες που εμποδίζουν μεταβολικά μονοπάτια του κυττάρου

Η κατάχρηση των αντιβιοτικών, όχι μόνο στην κλινική πράξη αλλά και στην κοινότητα, στην κτηνιατρική και στη γεωπονία, ευνόησε την επιβίωση των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά μικροοργανισμών. Στη σύγχρονη εποχή, η ευεργετική δράση των αντιβιοτικών απειλείται από τη συνεχή εμφάνιση στελεχών με αντοχή ακόμα και στα πιο ισχυρά αντιβιοτικά που είναι μέχρι στιγμής διαθέσιμα (π.χ. καρβαπενέμες, κολιστίνη) μέχρι στιγμής. Το φαινόμενο αυτό αναγνωρίζεται ως ένα από τα σοβαρότερα ζητήματα δημόσιας υγείας που καλείται να αντιμετωπίσει η επιστημονική κοινότητα.

Η αντοχή στα αντιβιοτικά διακρίνεται σε φυσική και σε επίκτητη. Η εγγενής (φυσική) αντοχή εμφανίζεται σε όλα τα στελέχη ενός είδους, δεν επηρεάζεται από εξωγενείς παράγοντες και δεν σχετίζεται με οριζόντια μεταφορά γονιδίων, δηλαδή είναι γνωστή και προκαθορισμένη. Για παράδειγμα τα Gram θετικά βακτήρια, λόγω της δομής τους, είναι εν γένει πιο ευαίσθητα από τα Gram αρνητικά. Παραδείγματα φυσικής αντοχής παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2**. Από την άλλη, η επίκτητη αντοχή, μπορεί να συμβεί με την απόκτηση εξωγενών γενετικών στοιχείων, όπως για παράδειγμα μέσω των πλασμιδίων ή μέσω τυχαίων μεταλλάξεων.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ο μέσος ρυθμός μεταλλάξεων στα βακτήρια μπορεί να φτάνει τις 1 ανά 10^6 έως 10^9 κυτταρικών διαιρέσεων ^[21]. Οι περισσότερες μεταλλάξεις θα αποβούν μοιραίες για το βακτήριο, ωστόσο, κάποιες, πιθανά, θα οδηγήσουν σε αντοχή στα αντιβιοτικά. Οι δεύτερες, συνήθως, προκύπτουν σε συγκεκριμένα είδη γονιδίων, όπως: αυτά που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που δρουν σε φάρμακα, αυτά που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που δρουν ως μεταφορείς φαρμάκων, αυτά που κωδικοποιούν ρυθμιστές που ελέγχουν τους μεταφορείς φαρμάκων, και αυτά που κωδικοποιούν ένζυμα που μεταβολίζουν/υδρολύουν τα αντιβιοτικά.

Πίνακας 1: Αντιμικροβιακές ομάδες βάσει του μηχανισμού δράσεως ^[21]

Μηχανισμός Δράσης	Αντιμικροβιακές Ομάδες
Αναστολή σύνθεσης κυτταρικού τοιχώματος	β-λακτάμες <ul style="list-style-type: none"> • Καρβαπενέμες • Κεφαλοσπορίνες • Μονοπακτάμες • Πενικιλίνες
	Γλυκοπεπίδια
Εκπόλωση κυτταρικής μεμβράνης	Λιποπεπίδια
Αναστολή πρωτεϊνοσύνθεσης	Πρόσδεση στην 30S ριβοσωμική υπομονάδα <ul style="list-style-type: none"> • Αμινογλυκοσίδες • Τετρακυκλίνες
	Πρόσδεση στην 50S ριβοσωμική υπομονάδα <ul style="list-style-type: none"> • Χλωραμφενικόλη • Λινκοσαμίδες

	<ul style="list-style-type: none"> • Μακρολίδες • Οξαζολιδινόνες • Στρεπτογραμίνες
Αναστολή σύνθεσης νουκλεϊκού οξέος	Κινολόνες <ul style="list-style-type: none"> • Φλουοροκινολόνες
Αναστολή μεταβολικών μονοπατιών	Σουλφοναμίδες Τριμεθοπρίμη

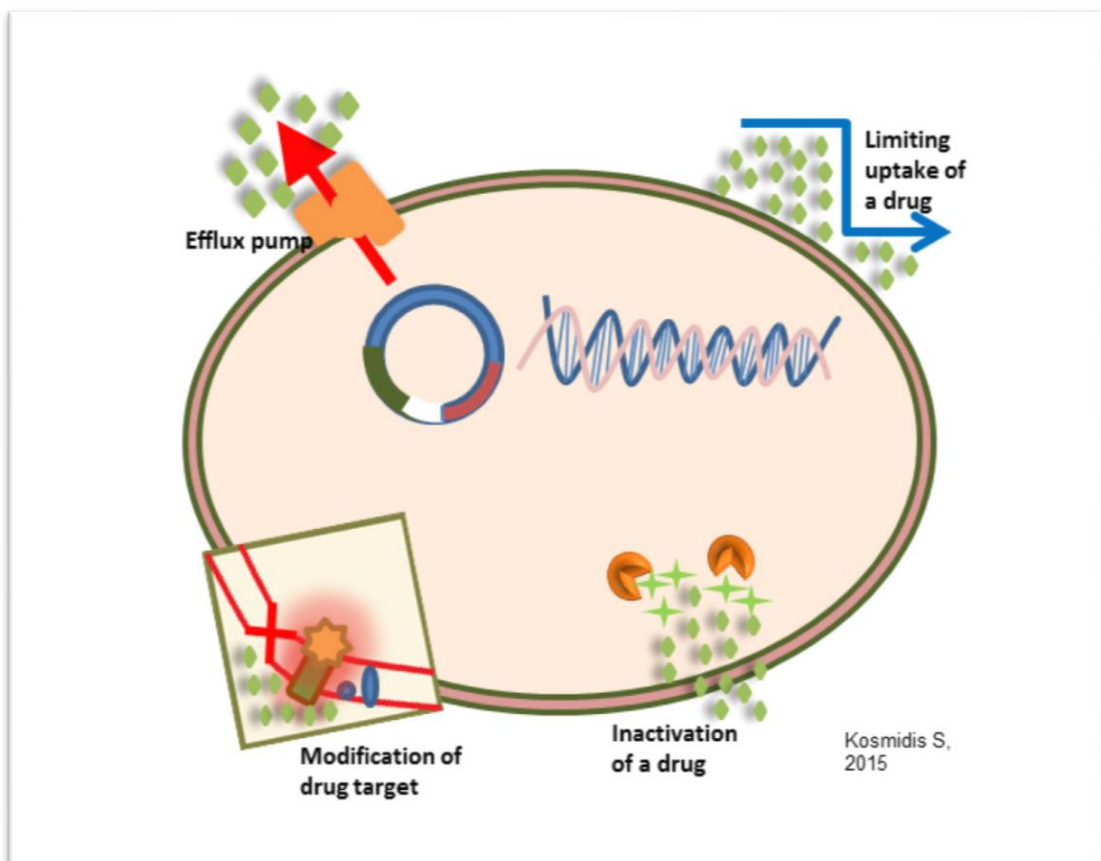
Πίνακας 2: Είδη βακτηρίων με φυσική αντοχή ^[2]

Οργανισμός	Εγγενής αντοχή
<i>Βακτηριοειδή (αναερόβια)</i>	Αμινογλυκοσίδες
Όλα τα gram θετικά βακτήρια	Αζτρεονάμη
Εντερόκοκκοι	Αμινογλυκοσίδες, κεφαλοσπορίνες, λινκοσαμίδες
<i>Listeria monocytogenes</i>	Κεφαλοσπορίνες
Όλα τα gram αρνητικά	Γλυκοπεπίδια, λιποπεπίδια
<i>Escherichia coli</i>	Μακρολίδες
<i>Klebsiella spp.</i>	Αμπικιλίνη
<i>Serratia marcescens</i>	Μακρολίδες
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Σουλφοναμίδες, αμπικιλίνη, 1 ^η και 2 ^η γενιά κεφαλοσπορινών, χλωραμφενικόλη, τετρακυκλίνη
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Αμινογλυκοσίδες, β-λακτάμες, καρβαπενέμες, κινολόνες
<i>Acinetobacter spp.</i>	Αμπικιλίνη, γλυκοπεπίδια

Μηχανισμοί Αντοχής ^[2]

Οι μηχανισμοί αντοχής στα αντιβιοτικά χωρίζονται σε 4 κατηγορίες:

- i. Μειωμένη πρόσληψη του αντιβιοτικού εντός του βακτηριακού κυττάρου
- ii. Δομική τροποποίηση του στόχου του αντιβιοτικού
- iii. Ταχεία αποβολή του αντιβιοτικού εκτός του βακτηριακού κυττάρου
- iv. Αδρανοποίηση του αντιβιοτικού



Εικόνα 1: Μηχανισμοί αντοχής στα αντιβιοτικά ^[2]

i. Αδυναμία πρόσληψης του αντιβιοτικού

Η πρόσληψη της αντιβιοτικής ουσίας ποικίλει ανάλογα με το είδος τους βακτηρίου. Η λιποπολυσακχαριδική στιβάδα (lipopolysaccharide layer – LPS layer) των Gram αρνητικών βακτηρίων φέρει τις πορίνες της εξωτερικής μεμβράνης D (Outer membrane porin D, OprD), οι οποίες επιτρέπουν την είσοδο αντιβιοτικών εντός του κυττάρου. Αντίθετα, τα Gram θετικά βακτήρια εξαιτίας της έλλειψης κυτταρικού τοιχώματος, και άρα και της LPS στιβάδας, εμφανίζουν φυσική αντοχή.

Στελέχη Gram αρνητικών βακτηρίων που φέρουν μειωμένο αριθμό OprD, θα εμφανίσουν αντοχή στα αντιβιοτικά.

ii. Δομική τροποποίηση του στόχου του αντιβιοτικού

Η τροποποίηση της δομής των στόχων των αντιβιοτικών, η οποία γίνεται μέσω αυτόματων μεταλλάξεων σε γονίδια αλλά και μέσω της φυσικής επιλογής παρουσία αντιβιοτικών, οδηγεί στην εμφάνιση αντοχής καθότι η αντιβιοτική ουσία αδυναμεί να συνδεθεί με τον αρχικό στόχο-δομή. Για παράδειγμα οι μεταλλάξεις που οδηγούν σε αλλαγές στην στερεοδιαμόρφωση των ριβοσωμικών υπομονάδων προσδίδουν αντοχή σε αντιβιοτικά όπως οι μακρολίδες, οι αμινογλυκοσίδες, οι τετρακυκλίνες, οι χλωραμφενικόλες και η λινεζολίδη, ενώ αυτές που οδηγούν σε αλλαγές στη δομή των ενζύμων DNA γυράση ή/ και τοποϊσομεράση IV (ένζυμα που συμμετέχουν στο ξετύλιγμα του DNA) προσδίδουν αντοχή στις κινολόνες και συγκεκριμένα στην σιπροφλοξασίνη, λεβοφλοξασίνη, μοξιφλοξασίνη, οφλοξασίνη και νορφλοξασίνη.

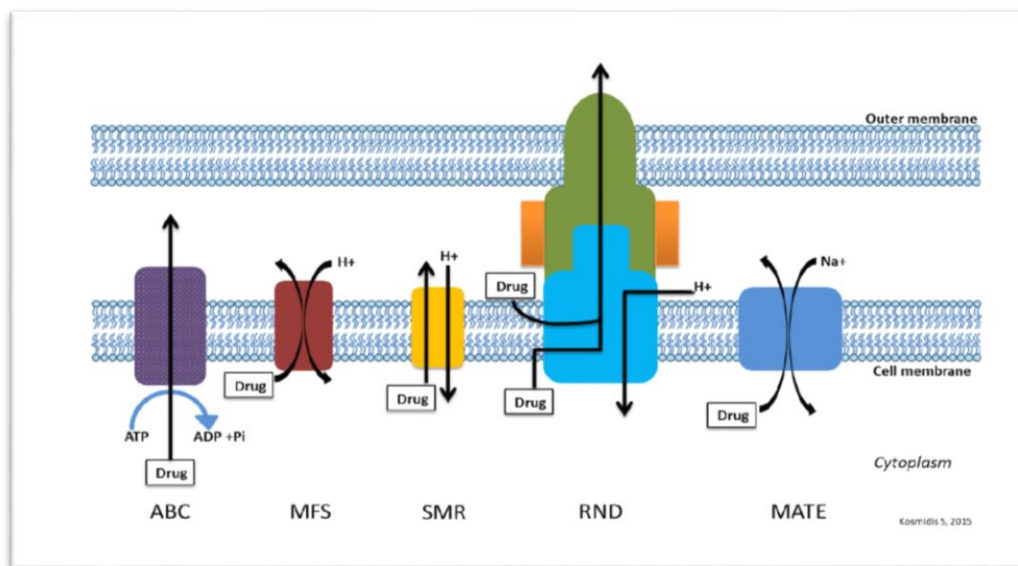
iii. Ταχεία αποβολή του αντιβιοτικού εκτός του βακτηριακού κυττάρου

Πραγματοποιείται με τη βοήθεια των αντλιών εκροής. Μέσω των αντλιών εκροής είναι δυνατή η αποβολή ουσιών από το κύτταρο που μπορεί να είναι τοξικές για αυτό. Τέτοιο παράδειγμα είναι και οι αντιβιοτικές ουσίες

iv. Αδρανοποίηση του αντιβιοτικού

Σε αυτήν την κατηγορία υπάρχουν δύο κύριοι τρόποι με τους οποίους τα βακτήρια αδρανοποιούν τα αντιβιοτικά. Ο πρώτος αφορά την αποδόμηση (υδρόλυση) της ίδιας της αντιβιοτικής ουσίας ενώ ο δεύτερος πραγματοποιείται μέσω προσθήκης μιας επιπλέον

χημικής ομάδας. Χαρακτηριστικό παράδειγμα του πρώτου τρόπου αποτελεί η υδρόλυση των β-λακτάμων (π.χ κεφαλοσπορίνες, κεφαμυκίνες, μονομπακτάμες) από β-λακταμάσες. Η αδρανοποίηση αντιβιοτικού μέσω μεταφοράς χημικής ομάδας μπορεί να γίνει με μεταφορά ακετυλίου, φωσφορικής ομάδας, και αδενυλικής ομάδας. Παράδειγμα αποτελεί η ακετυλίωση που στοχεύει κυρίως αμινογλυκοσίδες, χλωραμφενικόλες και στρεπτογραμίνες, η φωσφορυλίωση που δρα επίσης, σε αμινογλυκοσίδες και χλωραμφενικόλες και η αδενυλίωση που τροποποιεί αμινογλυκοσίδες και λινκοσαμίδες [15]. Παράδειγμα ενζύμων που σχετίζονται με τέτοιες διαδικασίες είναι τα CAT (chloramphenicol acetyltransferases - ακετυλοτρανσφεράση χλωραμφενικόλης) . Γονίδια τέτοιων ενζύμων εντοπίζονται τόσο σε gram αρνητικά όσο και σε gram θετικά βακτήρια.



Εικόνα 2: Γενική δομή της κυριότερης οικογένειας αντλιών εκροής [2]

Αντοχή στις β-λακτάμες

Η αντοχή στις β-λακτάμες ήταν από τα πρώτα ζητήματα που απασχόλησαν σχετικά με την αντοχή στα αντιβιοτικά. Στελέχη με αντοχή στις β-λακτάμες υπήρχαν ακόμη και πριν την ευρεία χρήση της πενικιλίνης ως αντιβιοτικό [14].

Η δομή αυτών των αντιβιοτικών αποτελείται από έναν τετράπλευρο δακτύλιο γνωστός ως β-λακταμικός δακτύλιος. Η αντοχή σε αυτού του είδους τα αντιβιοτικά είναι δυνατή μέσω 3 μηχανισμών [2]:

- i. Παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης της β-λακτάμης με τις πενικιλιοδεσμευτικές πρωτεΐνες (Penicillin Binding Proteins, PBPs). Οι PBPs αποτελούν απαραίτητα στοιχεία για τη δομή και λειτουργία του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων. Με τη δράση των β-λακταμών σε αυτές τις πρωτεΐνες, το κυτταρικό τοίχωμα αποσταθεροποιείται. Μέσω τυχαίων γενετικών μεταλλάξεων μπορεί να προκύψουν PBPs χαμηλής συγγένειας με τις β-λακτάμες οδηγώντας στην αδυναμία δράσης των β-λακτάμων.
- ii. Μειωμένη έκφραση ή απώλεια των γονιδίων που εκφράζουν για πορίνες, γεγονός που δεν επιτρέπει στο αντιβιοτικό να εισέλθει στο εσωτερικό του κυττάρου. Παράδειγμα πορινών του βακτηρίου *E. coli* που σχετίζονται με αντοχή στις β-λακτάμες είναι οι πορίνες της εξωτερικής μεμβράνης F (Outer membrane porin F, OmpF) και πορίνες της εξωτερικής μεμβράνης C (Outer membrane porin C, OmpC).
- iii. Υπερέκφραση αντλιών εκροής. Οι αντλίες εκροής μπορούν να αποβάλλουν ένα ευρύ φάσμα αντιβιοτικών εκτός του κυττάρου πολύ γρήγορα πριν προλάβουν να έρθουν σε επαφή με τον ενδοκυττάριο στόχο τους.
- iv. Με υδρόλυση της β-λακτάμης από τις β-λακταμάσες (π.χ πενικιλινάσες, κεφαλοσπορινάσες, καρβαπενεμάσες). Η κατηγορία των β-λακταμασών αναλύεται εκτενέστερα παρακάτω.

β-λακταμάσες

Η δράση των β-λακταμασών οδηγεί σε άνοιγμα του β-λακταμικού δακτυλίου με αποτέλεσμα να μην μπορεί να προσδεθεί στις PBPs.

Αυτός ο μηχανισμός αντοχής παρατηρείται κατά κύριο λόγο στα Gram αρνητικά βακτήρια και προσδίδει αντοχή σε β-λακταμικά αντιβιοτικά όπως οι πενικιλίνες, οι κεφαλοσπορίνες, οι μονοπακτάμες ακόμα και σε καρβαπενέμες.

Σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης κατά Ambler, οι β-λακταμάσες κατηγοριοποιούνται βάσει της μοριακής τους δομής σε 4 κατηγορίες: A, B, C και D. Από αυτές τις κατηγορίες υπάρχει και μια επιπλέον ομαδοποίηση. Οι β-λακταμάσες των A, C και D τάξεων ονομάζονται και β-λακταμάσες σερίνης, γιατί εντοπίζεται κατάλοιπο σερίνης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, ενώ οι β-λακταμάσες της B τάξης αποκαλούνται και μεταλλο-β-λακταμάσες γιατί διαθέτουν ιόν ψευδαργύρου.

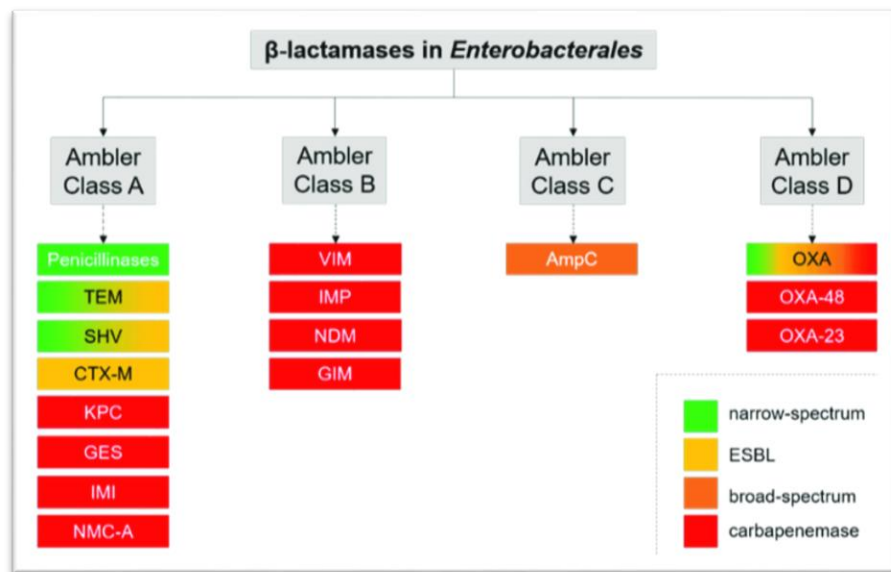
Ένα δεύτερο σύστημα ταξινόμησης είναι αυτό των Bush-Jacobi-Medeiros, βάσει του οποίου η κατηγοριοποίηση στηρίζεται στις λειτουργικές και μοριακές ιδιότητες των β-λακταμασών. Σε αυτό το σύστημα αναγνωρίζονται 3 ομάδες ^[4].

Επιπλέον, κατηγοριοποίηση μπορεί να γίνει και βάσει της οικογένειας γονιδίων που ανήκουν. Για παράδειγμα υπάρχουν οι εξής οικογένειες: TEM, SHV και CTX. Οι τρεις αυτές οικογένειες γονιδίων εκφράζουν εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες, γνωστές και ως ESBL (Extended Spectrum B-lactamases). Η συγκεκριμένη κατηγορία αναλύεται εκτενέστερα σε επόμενο κεφάλαιο.

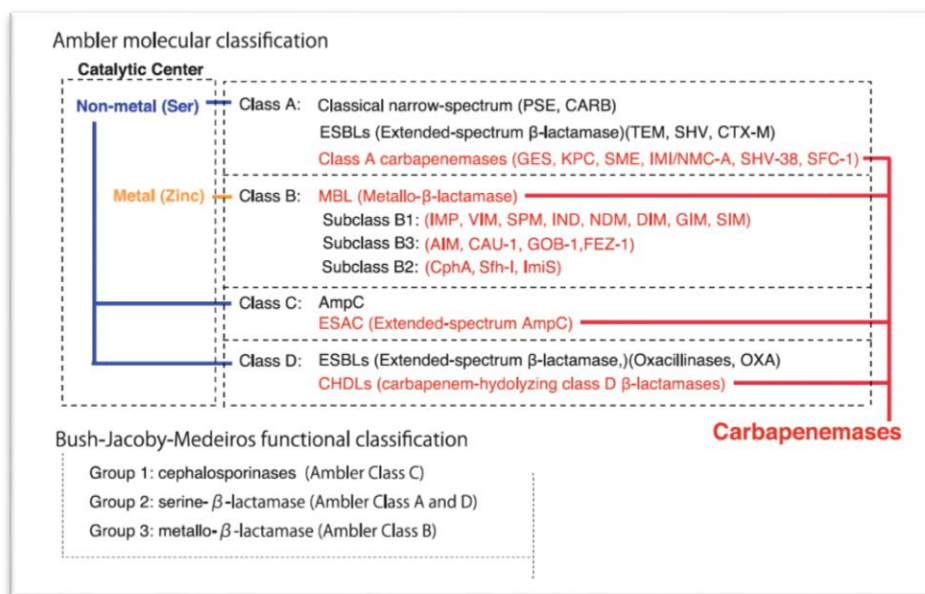
Στα Gram αρνητικά βακτήρια έχει παρατηρηθεί παραγωγή β-λακταμασών και των τεσσάρων δομικών ομάδων κατά Ambler, ενώ στα Gram θετικά κυρίως από των A και B ομάδων ^[2].

Τα γονίδια για αυτά τα ένζυμα μπορούν να εντοπιστούν τόσο σε χρωμοσωμικό, όσο και σε πλασμιδιακό DNA, ενώ το πρώτο γονίδιο που περιεγράφηκε και εντοπίστηκε στο βακτήριο *E. coli* βρίσκεται στο χρωμοσωμικό DNA και ονομάζεται *ampC* ^[2]. Αυτό το γονίδιο εκφράζεται συνεχώς. Ωστόσο, τυχαίες μεταλλάξεις μπορούν να οδηγήσουν σε υπερέκφραση αυτού του γονιδίου, με αποτέλεσμα της αυξημένη παραγωγή τους. Οι β-λακταμάσες τύπου AmpC στοχεύουν κυρίως στις πενικιλίνες αλλά και σε κεφαλοσπορίνες ^[2] ενώ εδράζονται τόσο στο χρωμοσωμικό όσο και στο πλασμιδιακό DNA. Επιπλέον, έχουν εντοπιστεί τύποι β-λακταμασών που ανθίστανται στην δράση των αναστολέων των β-λακταμασών και επομένως συνεπικουρούν στην αντοχή στα αντιβιοτικά.

Αξίζει να αναφερθεί και μια άλλη ομάδα β-λακταμασών οι οποίες δρουν κατά των καρβαπενεμών (καρβαπενεμάσες). Οι καρβαπενέμες χορηγούνται σε σοβαρά περιστατικά λοιμώξεων, με τις καρβαπενεμάσες ήδη να απειλούν τη δραστικότητα τους. Τα πιο γνωστά παραδείγματα καρβαπενεμασών είναι οι: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM), OXA-48-like carbapenemases, Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase (VIM), Imipenemase (IMP) όπως παρουσιάζονται στις **Εικόνες 3** και **4** ανάλογα με το σύστημα ταξινόμησης.



Εικόνα 3: Ταξινόμηση β-λακταμασών κατά Ambler ^[4]



Εικόνα 4: Λεπτομέρειες ταξινόμησης κατά Ambler και ταξινόμηση κατά Bush-Jacoby-Medeiros ^[3]

Οριζόντια Μεταφορά και Κινητά Γενετικά Στοιχεία

Μέσω μεταφοράς γονιδίων τα βακτήρια έχουν το πλεονέκτημα να αποκτούν νέες ιδιότητες στις οποίες περιλαμβάνεται και η εκάστοτε αντοχή στα αντιβιοτικά. Η απόκτηση νέων χαρακτηριστικών γίνεται μέσω της οριζόντιας μεταφοράς γενετικού υλικού που γίνεται μέσω τριών μηχανισμών : μετασχηματισμός, μεταγωγή και σύζευξη.

Στον μετασχηματισμό τα βακτήρια προσλαμβάνουν ξένο γενετικό υλικό από τον εξωκυττάριο χώρο ενώ στη μεταγωγή το γενετικό υλικό εισέρχεται στο κύτταρο με τη δράση βακτηριοφάγων. Κατά τη σύζευξη έχουμε ένωση δύο βακτηρίων και μεταφορά γενετικού υλικού μεταξύ αυτών ^[17]. Η πραγματοποίηση της μεταφοράς γενετικού υλικού μέσω σύζευξης γίνεται με τη βοήθεια των κινητών γενετικών στοιχείων τα οποία χωρίζονται σε δύο κατηγορίες:

A) Αυτά που μετακινούνται από το ένα κύτταρο στο άλλο:

- Συζευκτικά πλασμίδια
- Τρανσποζόνια

B) Αυτά που μετακινούνται από τη μία γενετική θέση στην άλλη μέσα στο ίδιο κύτταρο:

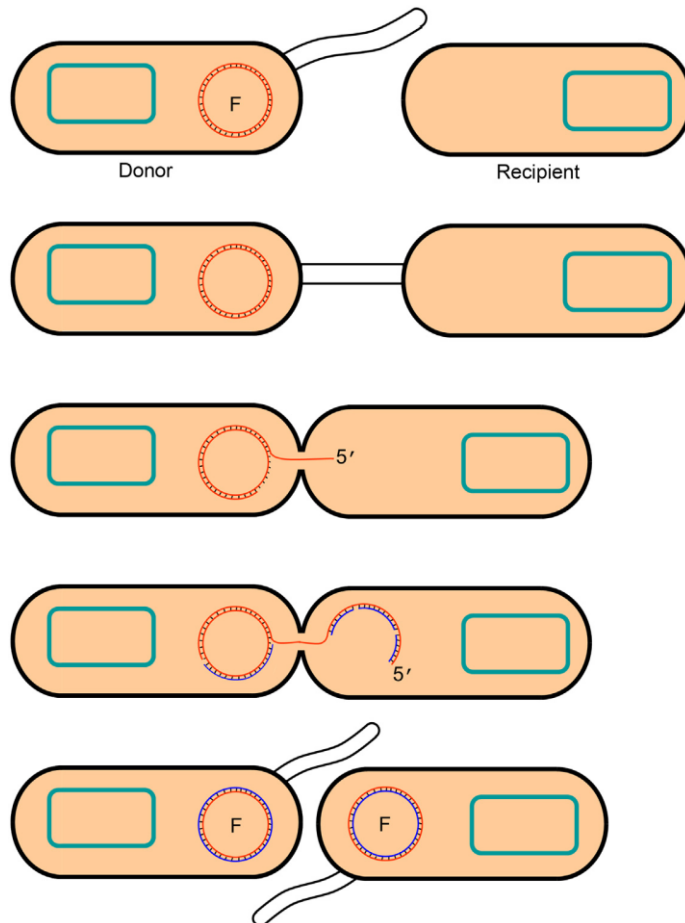
- Ιντεγκρόνια/γονιδιακές κασέτες
- ISCR (Integron-Associated site-specific recombinases) – μεσολαβούμενη γονιδιακή μεταφορά [\[6\]](#)

Βακτηριακά πλασμίδια

Τα πλασμίδια είναι αυτόνομες μονάδες με ικανότητα αυτό-αντιγραφής. Συνήθως πρόκειται για δίκλωνο, κυκλικό DNA με κάποιες εξαιρέσεις γραμμικών, ενώ το μέγεθός τους ποικίλει. Τα απαραίτητα εργαλεία για την αντιγραφή του πλασμιδίου παρέχονται από το βακτηριακό κύτταρο ενώ το ίδιο το πλασμίδιο περιέχει τις απαραίτητες αλληλουχίες για την αντιγραφή. Μερικά πλασμίδια, επίσης, περιέχουν γονίδια που σχετίζονται με τη μεταφορά γενετικού υλικού μεταξύ διαφορετικών βακτηρίων και επομένως δύναται να προσδώσουν νέες ιδιότητες στο βακτήριο-δέκτη όπως η αντοχή σε κάποιο αντιβιοτικό [\[5\]](#).

Τα πλασμίδια μεταφέρονται οριζόντια από ένα βακτήριο σε άλλο και διακρίνονται στα συζευκτικά ή μεταθετά πλασμίδια και στα μη συζευκτικά ή μη μεταθετά πλασμίδια. Τα συζευκτικά πλασμίδια φέρουν τα κατάλληλα γονίδια για την επίτευξη της σύζευξης. Μέσω αυτών, το βακτήριο μπορεί να σχηματίσει νηματοειδής προεκβολές, τα συζευκτικά τριχίδια (*pili*), μέσω των οποίων γίνεται η σύνδεση των παρακείμενων κυττάρων, η επαφή των δύο κυτταρικών μεμβρανών και τέλος η μεταφορά του γενετικού υλικού [\[18\]](#). Αντίθετα, τα μη συζευκτικά πλασμίδια δεν φέρουν τα απαραίτητα γονίδια για την έναρξη αυτής της διαδικασίας και επομένως χρειάζονται την βοήθεια των συζευκτικών πλασμιδίων για τη μεταφορά τους.

Αυτό που κάνει τόσο ιδιαίτερα τα πλασμίδια, πέρα από όσα προαναφέρθηκαν, είναι η ποικιλία των γονιδίων που μπορούν να φέρουν, όπως αυτά που σχετίζονται με την αντοχή στα αντιβιοτικά.



Εικόνα 5: Σύζευξη και μεταφορά γενετικού υλικού μεταξύ δύο βακτηρίων με τη βοήθεια τριχιδίου ^[18]

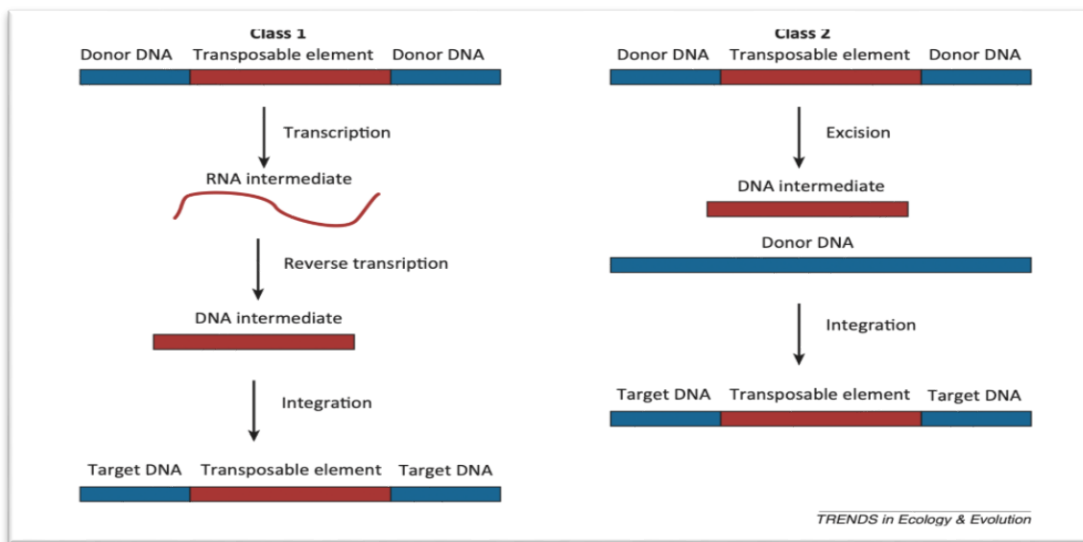
Τρανσποζόνια

Τα τρανσποζόνια είναι γενετικά στοιχεία τα οποία δύνανται να μεταφερθούν είτε εντός του ίδιου κυττάρου, είτε μεταξύ κυττάρων (μεταθετόνια) και τα οποία μπορεί να περιλαμβάνουν γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά ^[5].

Τα τρανσποζόνια διακρίνονται σε δύο τάξεις, τάξη I και II, βάσει του μηχανισμού μεταφοράς. Στην Τάξη I ανήκουν τα ρετροτρανσποζόνια, ενώ στην Τάξη II τα DNA τρανσποζόνια. Τα τρανσποζόνια τάξης I αφού πρώτα μεταγραφούν σε ένα ενδιάμεσο μόριο RNA, στη συνέχεια μέσω αντίστροφης μεταγραφής δίνουν ένα ίδιο με το αρχικό μόριο DNA. Η αντίστροφη μεταγραφή καταλύεται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση, που κωδικοποιείται από το

ίδιο το κομμάτι γενετικού υλικού που μεταγράφεται. Το τελικό μόριο DNA εγκαθίσταται σε άλλη γενετική θέση.

Τα τραπεζοζόνια τάξης II, δεν περιλαμβάνουν ενδιάμεσο μόριο RNA, αντιθέτως, κατά τη διάρκεια της μετάθεσης το τραπεζοζόνιο παραμένει σταθερά σε DNA μορφή. Τα τάξης II τραπεζοζόνια κωδικοποιούν ένζυμα, τις τραπεζοζάσες, τα οποία αναγνωρίζουν αλληλουχίες των 5' και 3' άκρων του τραπεζοζονίου, πάνω στις οποίες δρουν, με αποτέλεσμα την περικοπή του γενετικού υλικού. Το τμήμα του γενετικού υλικού που αποκόπτεται, μεταφέρεται και εγκαθίσταται σε μια άλλη γενετική θέση [18].



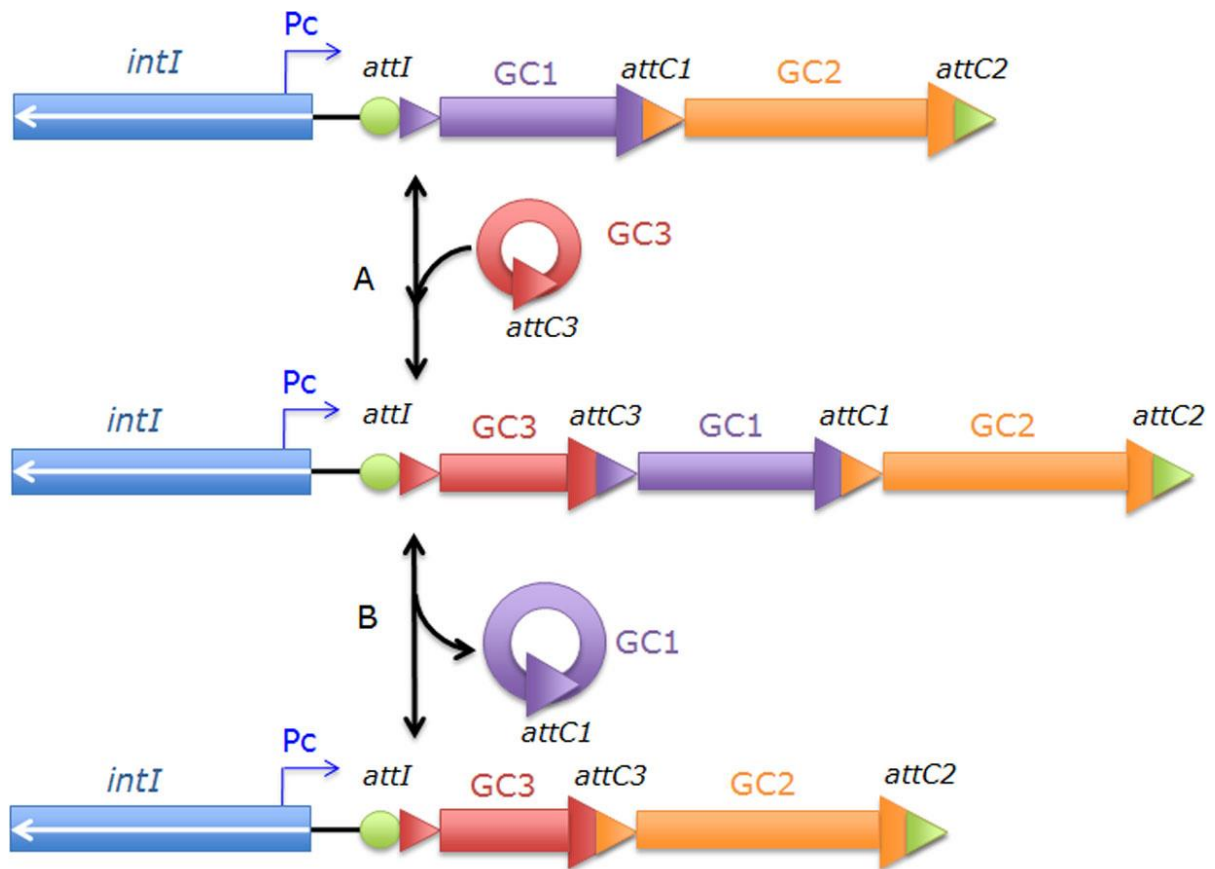
Εικόνα 6: Τραπεζοζόνια τάξης I και II [7]

Ιντεγκρόνια και Γονιδιακές Κασέτες

Τα ιντεγκρόνια είναι γενετικά στοιχεία που σχετίζονται με την απόκτηση και τη διασπορά γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων αυτών που σχετίζονται με την αντιμικροβιακή αντοχή. Τα ιντεγκρόνια περιλαμβάνουν τις γονιδιακές κασέτες, οι οποίες αποτελούν ένα σύστημα γενετικών στοιχείων με στόχο την έκφραση και τη μεταφορά γονιδίων.

Συγκεκριμένα, απαραίτητο στοιχείο για την ενσωμάτωση της γονιδιακής κασέτας, σε έναν άλλο γενετικό τόπο, είναι το γονίδιο *intI*. Το *intI* κωδικοποιεί το ένζυμο, ιντεγκράση, η οποία είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση της κασέτας. Βασικές αλληλουχίες, επίσης, είναι και οι θέσεις

ανασυνδυασμού, *attI* και *attC*. Στην παρακάτω **Εικόνα 7**, φαίνεται η δομή ενός τυπικού ιντεγκρονίου .



Εικόνα 7: Απεικόνιση ιντεγκρονίου και γονιδιακής κασέτας ^[19]

ISCR-μεσολαβούμενη γονιδιακή μεταφορά

Πρόκειται για μικρές, κρυφές, αλληλουχίες που ομοιάζουν σε μέγεθος με τα IS στοιχεία (Insertion Sequences). Μεταφέρονται, όπως τα IS στοιχεία, αλλά με διαφορετικό μηχανισμό που ονομάζεται “rolling circle (RC) transposition” ^[6].

Γενετικό Υπόβαθρο των ESBLs και AmpC β-λακταμασών

ESBLs

Όπως έχει προαναφερθεί οι εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (Extended Spectrum β-Lactamases – ESBLs) είναι ομάδα ενζύμων που εντοπίζεται σε στελέχη που εμφανίζουν αντοχή σε ένα ευρύτερο φάσμα β-λακταμών. Σε γενετικό επίπεδο τα ESBL χωρίζονται σε υποομάδες μεταξύ των οποίων οι πιο σημαντικές είναι οι εξής:

- CTX-M
- TEM
- SHV

Τα ένζυμα TEM και SHV έχουν μεγάλη συγγένεια με διαφορές ολίγων αμινοξέων ενώ τα CTX-M έχουν διαφορετική σύνθεση αμινοξέων. Κάθε μια από αυτές τις ομάδες έχει τα δικά της, μοναδικά, χαρακτηριστικά.

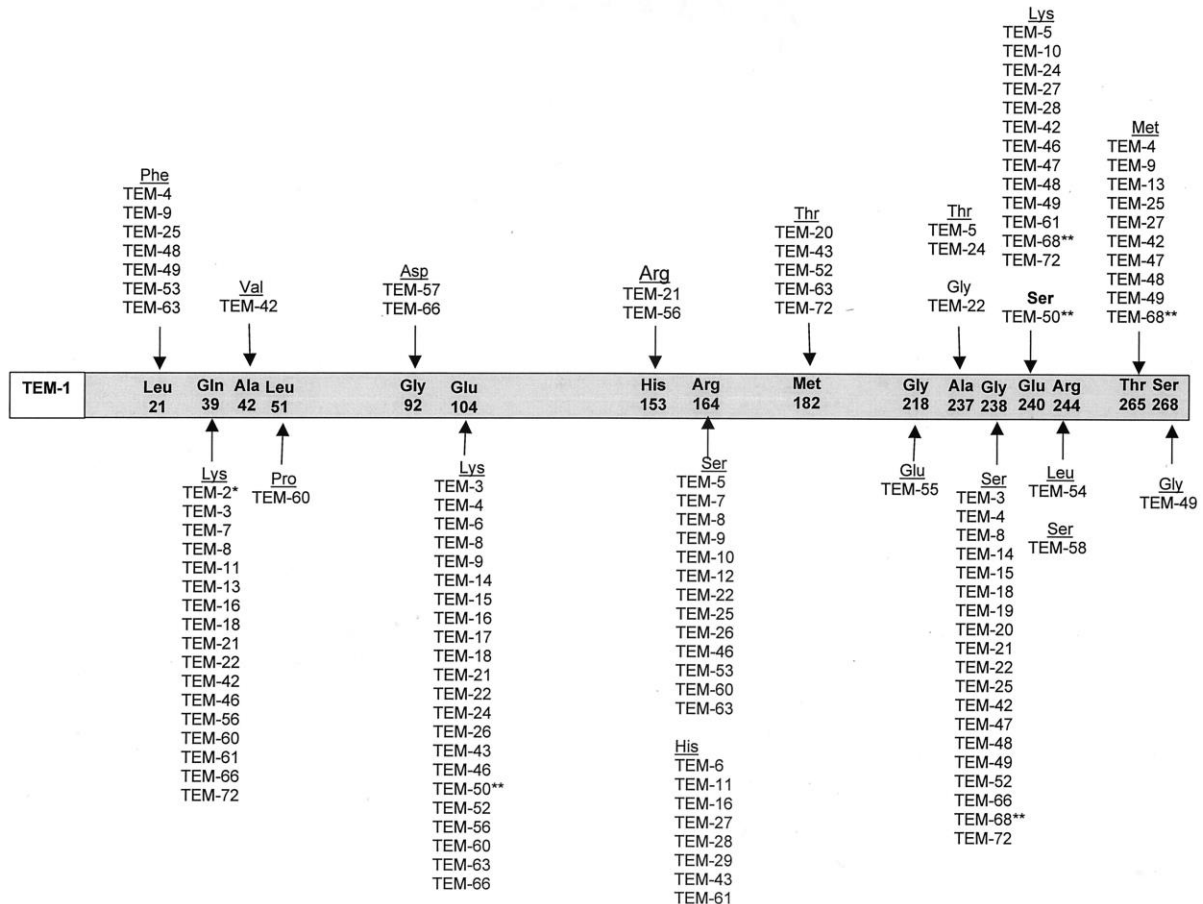
1) CTX-M

Τα CTX-M είναι ένζυμα που ανήκουν στην ομάδα A κατά Ambler και ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά το 1989. Από το 2000 και μετά ανήλθε ως ένας από τους πιο διαδομένους τύπους ενζύμων ESBL με κυριότερο εντοπισμό σε στελέχη του βακτηρίου *E. coli*. Αντίθετα με τους άλλους τύπους ESBL, τα CTX-M δεν προήλθαν από μεταλλάξεις σε γονίδια πλασμιδίων αλλά μέσω μεταφοράς χρωμοσωμικών γονιδίων β-λακταμασών (*bla*) του βακτηρίου *Kluyvera* spp. από κινητά γενετικά στοιχεία ^[20]. Από τους υπάρχοντες υπότυπους *bla*_{CTX-M} οι δύο πιο σημαντικοί είναι οι *bla*_{CTX-M-14} και *bla*_{CTX-M-15}, και εντοπίζονται πλέον σε κάθε τομέα της ανθρώπινης δραστηριότητας έως και το περιβάλλον ^[20]. Τα *bla*_{CTX-M} έχουν δείξει εντυπωσιακή διαφοροποίηση, με πλήθος υποτύπων να ανακαλύπτονται μέσα σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα. Ο λόγος για αυτή τη μεγάλη διαφοροποίηση πιθανόν να υπήρξε το αντιβιοτικό, κεφταζιδίμη. Αυτό γιατί, ενώ οι αρχικοί τύποι CTX-M έδιναν αντοχή στη κεφοταξίμη, με την πάροδο του χρόνου προστέθηκαν τύποι που παρείχαν αντοχή και για την κεφοταξίμη (με μεγαλύτερη ισχύ) αλλά και για την κεφταζιδίμη παράλληλα ^[20]. Την εξελικτική αυτή πορεία επιτάχυναν, παράλληλα, και οι τυχαίοι ανασυνδυασμοί των *bla*_{CTX-M} γονιδίων.

2) TEM

Το πρώτο γονίδιο που εκφράζει για TEM (bla_{TEM-1}) εντοπίστηκε σε βακτηριακό στέλεχος *E. coli* που απομονώθηκε από βιολογικό δείγμα ασθενούς στην Αθήνα το 1965. Γενικά, τα bla_{TEM} παρατηρούνται κυρίως σε Gram αρνητικά βακτήρια και προσδίδουν ανοχή στις πενικιλίνες. Αυτού του τύπου τα ESBLs προήλθαν από ένα κοινό πλασμιδιακό γονίδιο έπειτα από αλληπάλληλες μεταλλάξεις, που οδήγησαν σε αλλαγές ενός ή δυο αμινοξέων [8].

Όλα τα bla_{TEM} που έχουν ανακαλυφθεί μέχρι και σήμερα προήλθαν από τα αρχικά, bla_{TEM-1} και bla_{TEM-2} . Τα στελέχη τύπου TEM-1 υδρολύουν αμπικιλίνη, καρβενικιλίνη, οξακιλίνη και άλλα, ελάχιστα όμως της ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες [21]. Από το σύνολο των υποτύπων TEM ορισμένα δεν κατηγοριοποιούνται στα ESBLs. Μεταξύ αυτών, τα TEM-1, TEM-2 και TEM-13 καθώς έχουν ένα στενό φάσμα δράσης κατά αντιβιοτικών. Το TEM-3, που ανακαλύφθηκε το 1989, θεωρείται ως το πρώτο ESBL τύπου TEM [21]



Εικόνα 8: Οι τύποι TEM που έχουν προκύψει από αλλαγές αμινοξέων στο TEM-1 [21]

3) SHV

Οι β-λακταμάσες τύπου SHV, και συγκεκριμένα ο πρώτος υπότυπος που εντοπίστηκε, SHV-1, είναι ένζυμα που κωδικοποιούνται από γονίδια που εντοπίζονται τόσο σε χρωμοσωμικό (*Klebsiella* spp.) όσο και σε πλασμιδιακό γενετικό υλικό (*E. coli*).

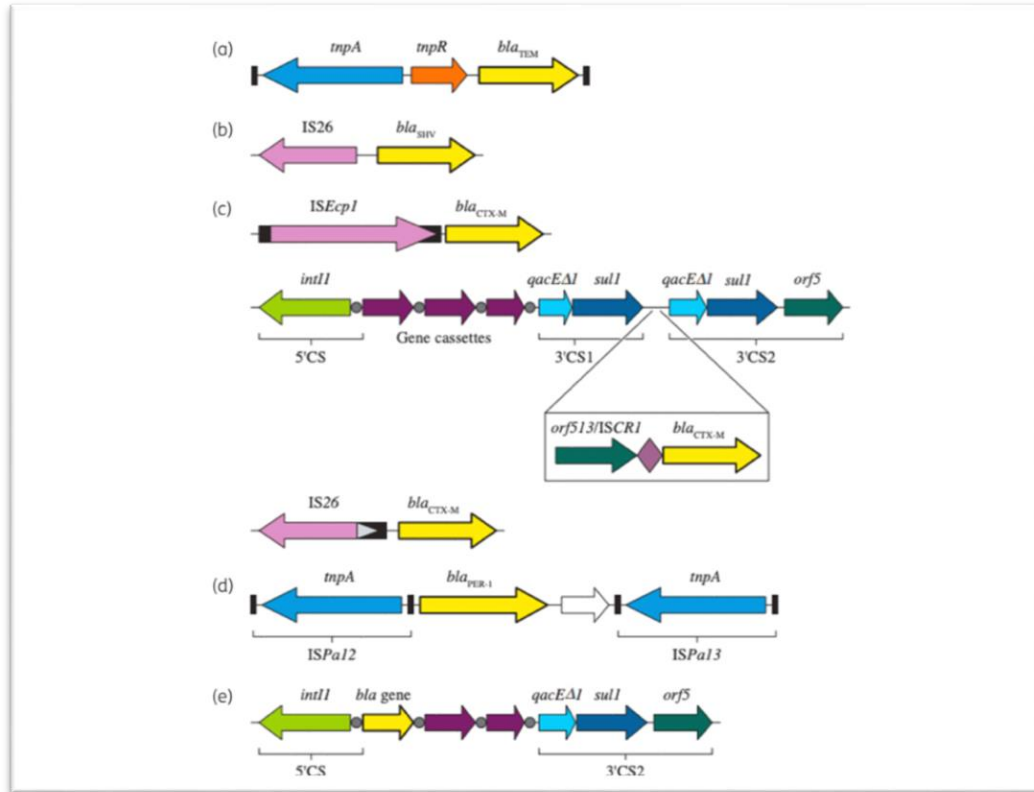
Το πρώτο SHV που περιεγράφηκε ήταν από ένα βακτηριακό στέλεχος *Klebsiella ozenae* το 1985 στη Γερμανία και διέφερε από το πρωταρχικό SHV-1 ως προς ένα αμινοξύ. Συγκεκριμένα, πρόκειται για αντικατάσταση Gly σε Ser στη θέση 238. Η κάθε μία αλλαγή παίζει σημαντικό ρόλο και επηρεάζει διαφορετικά την υδρολυτική ικανότητα του ενζύμου στα αντιβιοτικά.

Παγκοσμίως, οι πιο συνήθεις τύποι SHV είναι τα SHV-5 και SHV-12 ενώ τα περισσότερα εντοπίζονται σε στελέχη του βακτηρίου *K. pneumoniae* αλλά και σε στελέχη του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa* ^[9].

Πίνακας 3: Οικογένειες των ESBL και τα χαρακτηριστικά τους

Οικογένειες	Χαρακτηριστικά
TEM	Παραλλαγές που προέκυψαν από σημειακές μεταλλάξεις των TEM-1 και TEM-2
SHV	Παραλλαγές που προέκυψαν από σημειακές μεταλλάξεις του SHV-1
IRT	Παραλλαγές των TEM που είναι ανθεκτικές στο κλαβουλανικό και την σουλμπακτάμη ενώ έχουν και ESBL φαινότυπο
CMT	Παραλλαγές των TEM που είναι ανθεκτικές στο κλαβουλανικό και την σουλμπακτάμη ενώ έχουν και ESBL φαινότυπο
CTX-M	Προήλθε από την χρωμοσωμική β-λακταμάση του <i>Kluyvera</i> spp. Υδρολύει κεφοταξίμη

GES	Κυρίως εντοπίζεται στο <i>P. aeruginosa</i> σε σύγκριση με τα Εντεροβακτηριοόπωςρικές παραλλαγές υδρολύουν καρβαπενέμες
PER	Κυρίως εντοπίζεται στο <i>P. Aeruginosa</i> και στο <i>A. baumannii</i> σε σύγκριση με τα Εντεροβακτηριοειδή Η αναστολή από νεότερες β-λακταμάσες ποικίλλει
VEB	Κατά προτίμηση υδρολύει κεφαζιδίμη και αζτρεονάμη σε σύγκριση με τη κεφοταξίμη Η αναστολή από νεότερες β-λακταμάσες ποικίλλει
BEL	Κατά προτίμηση υδρολύει κεφαζιδίμη και αζτρεονάμη σε σύγκριση με τη κεφοταξίμη
TLA	Κατά προτίμηση υδρολύει κεφαζιδίμη και αζτρεονάμη σε σύγκριση με τη κεφοταξίμη
SFO	Επαγόγιμο
OXY	Χρωμοσωμικό



Εικόνα 9: Γενετικές δομές που φέρουν γονίδια που κωδικοποιούν ESBL [9]

AmpC

Οι AmpC β-λακταμάσες είναι κεφαλοσπορινάσες που προσδίδουν αντοχή σε β-λακτάμες όπως: οι περισσότερες πενικιλίνες, η κεφοξιτίνη, η κεφαζολίνη, η κεφαλοθίνη αλλά και σε συνδυασμούς αναστολέων β-λακταμασών με β-λακτάμες [7]. Αντοχή εμφανίζεται, επίσης, και σε β-λακτάμες ευρέως φάσματος όπως η κεφοταξίμη, η κεφτριαξόνη και η κεφταζιδίμη. Τα γονίδια των AmpC β-λακταμασών εντοπίζονται τόσο σε χρωμοσωμικό γενετικό υλικό όσο και σε πλασμιδιακό. Τα γονίδια που εντοπίζονται στα πλασμίδια προήλθαν μέσω κινητών γενετικών στοιχείων από κύριο χρωμοσωμικό γενετικό υλικό [7]. Όπως και στις περιπτώσεις των TEM και SHV, έτσι και στις AmpC β-λακταμάσες, αλλαγές στην αμινοξική αλληλουχία έχουν οδηγήσει σε πλήθος νέων υποτύπων [10]

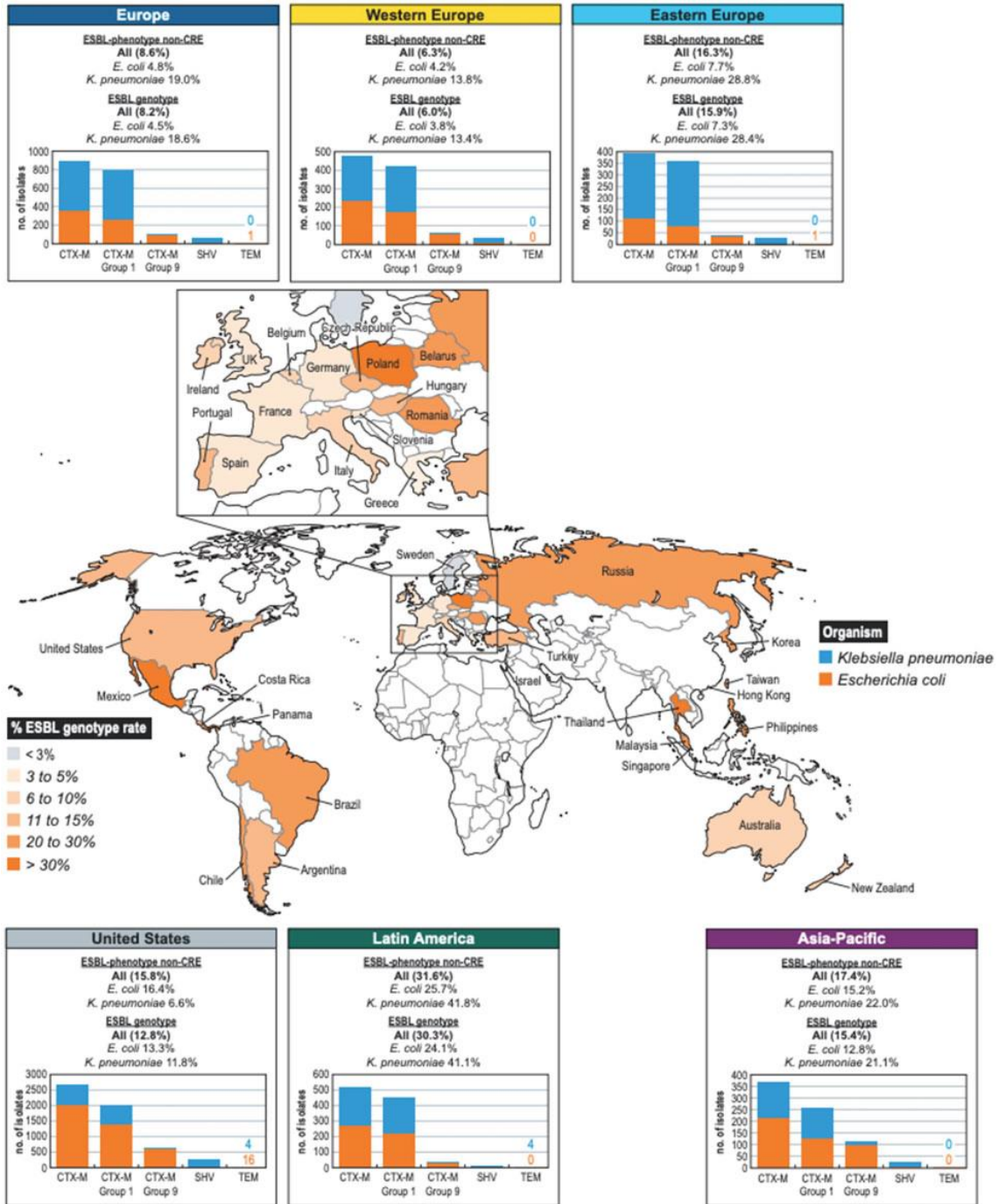
Επιδημιολογία των ESBL

Η επιδημιολογική μελέτη είναι σημαντική για την κατανόηση της διασποράς και της επικράτησης των γονιδίων που σχετίζονται με τα ESBL. Παγκοσμίως, πλήθος μελετών πραγματοποιούνται ανά χρονικά διαστήματα για την εκτίμηση αυτών των δεδομένων.

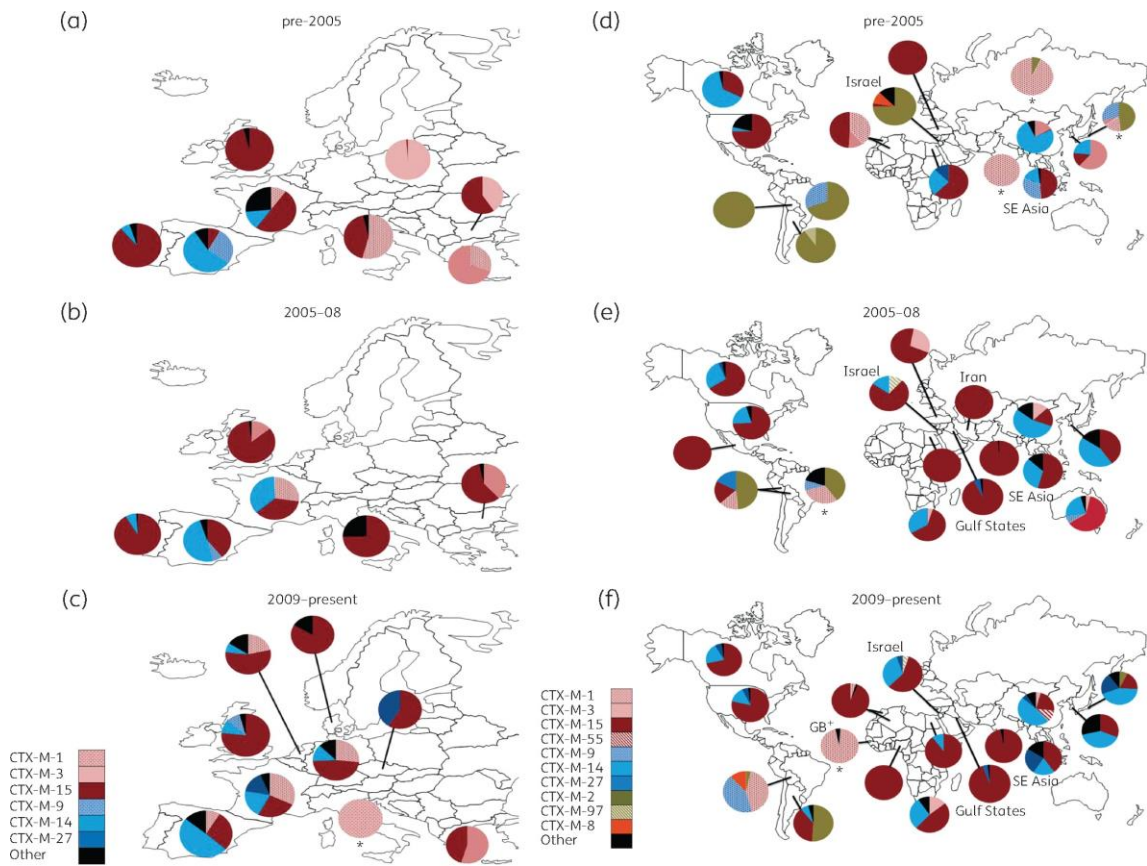
Τα πρώτα δεδομένα σχετικά με τα ESBL έδειχναν ότι ο εντοπισμός τους περιοριζόταν σε κλινικά δείγματα. Το γεγονός αυτό μεταβλήθηκε γρήγορα και πλέον τα ESBL εντοπίζονται ακόμα και σε μη νοσηλευόμενους ασθενείς ^[24]. Η διασπορά των διάφορων γονιδίων ESBL εξαρτάται από πολυποίκιλους παράγοντες όπως η γεωγραφική θέση της περιοχής, η πυκνότητα του πληθυσμού, οι κανόνες υγιεινής και φυσικά ο βαθμός χρήσης αντιβιοτικών. Ακόμα και εντός της Ευρώπης τα δεδομένα διαφέρουν σε ορισμένες περιπτώσεις. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ισχυρότερη παρουσία των ESBL στις περιοχές της Μεσογείου, σε σύγκριση με βόρειες περιοχές όπως η Σκανδιναβία ^[9].

Στην Ευρώπη αλλά και σε πολλές άλλες περιοχές παγκοσμίως, μέχρι και πριν τρεις δεκαετίες, τα CTX-M δεν είχαν επικρατήσει σε υπό μελέτη στελέχη, όπως τα τύπου TEM και SHV, ενώ τα στελέχη που εξέφραζαν τέτοια ένζυμα προέρχονταν κυρίως από κλινικά δείγματα MEΘ ^[11].

Η επικράτηση των CTX-M τύπων παρουσιάζεται και από την **Εικόνα 10**, όπου φαίνεται η συνολική διασπορά των ESBL σε ΗΠΑ, Ασία-Ειρηνικό, Ευρώπη και Λατινική Αμερική, στα δύο είδη που εντοπίζονται περισσότερο, τα βακτήρια *E. coli* και *K. pneumoniae*. Συγκεκριμένα, στην **Εικόνα 11** παρουσιάζεται η διασπορά των τύπων CTX-M τόσο ε Ευρωπαϊκό όσο και σε παγκόσμιο επίπεδο ^[12].



Εικόνα 10: Διασπορά CTX-M, TEM και SHV απομονωμένων στελεχών σε ΗΠΑ, Ασία-Ειρηνικό, Ευρώπη και Λατινική Αμερική [9]



Εικόνα 11: Τάση ποσοστών τύπων CTX-M στην Ευρώπη και παγκοσμίως σε τρεις χρονολογικές περιόδους [\[12\]](#)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στοιχεία των υπό μελέτη στελεχών

Συνολικά μελετήθηκαν 87 ανθεκτικά βακτηριακά στελέχη *E. coli* εκ των οποίων 75 (86,21%) είχαν απομονωθεί από περιβαλλοντικές πηγές και 12 (13,79%) από κλινικά δείγματα.

Αναλυτικές πληροφορίες για όλα τα παραπάνω στελέχη και για την διαδικασία απομόνωσης τους αναφέρονται στο δημοσιευμένο άρθρο Dioli *et al* ^[23]

Όσον αφορά τα 12 κλινικά στελέχη, είχαν απομονωθεί από βιολογικά υλικά ασθενών που είχαν νοσηλευτεί ή επισκεφτεί το Γενικό Νοσοκομείο της Λιβαδειάς:

- a. Τα 8 από ούρα ασθενών
- b. Τα 3 από αίμα ασθενών
- c. Το 1 από τραύμα ασθενή

Όσον αφορά τα 75 περιβαλλοντικά στελέχη:

1. Τα 35 (35/75, 46,67%) απομονώθηκαν από δείγμα λύματος το οποίο είχε συλλεχθεί από σηπτική δεξαμενή εξωτερικά του Γενικού Νοσοκομείου της Λιβαδειάς
2. Τα 15 (15/75, 20%) από δείγμα λύματος το οποίο είχε συλλεχθεί από την έξοδο της Μονάδας Επεξεργασίας Λυμάτων (Μ.Ε.Λ.) της Λιβαδειάς.
3. Τα 18 (18/75, 24%) από δείγμα νερού το οποίο είχε συλλεχθεί από τον Ποταμό Έρκυνα και συγκεκριμένα από σημείο που απέχει 100 μ. από το σημείο εκβολής των λυμάτων της παραπάνω Μ.Ε.Λ.
4. Τα 7 (7/75, 9,33%) από δείγμα νερού το οποίο είχε συλλεχθεί από τον Ποταμό Βοιωτικό Κηφισό και συγκεκριμένα από το σημείο συνάντησης με την Έρκυνα, που απέχει περίπου 6 χλμ. από το σημείο εκβολής των λυμάτων της Μ.Ε.Λ.

Στον **Πίνακα 4** αναφέρονται τα στελέχη που μελετήθηκαν κατηγοριοποιημένα βάσει του προφίλ αντοχής τους. Όλα τα στελέχη που υποβλήθηκαν σε πλασμιδιακή ανάλυση ήταν ανθεκτικά (Resistant - R) και πολύ-ανθεκτικά (Multi Drug Resistant - MDR).

Πίνακας 4: Διαχωρισμός βάσει προφίλ αντοχής δειγμάτων

Δείγμα προέλευσης	Κλινικά	
	Προφίλ αντοχής	
	MDR	R
Αίμα 3	(2/3)	(1/3)
Ούρα 8	(7/8)	(1/8)
Τραύμα 1	(1/1)	(0/1)
	Περιβαλλοντικά	
Λύμα νοσοκομείου 35	(35/35)	(0/35)
Λύμα Μ.Ε.Λ. 15	(14/15)	(1/15)
Νερό ποταμού Έρκυνα 18	(16/18)	(2/18)
Νερό ποταμού Β. Κηφισού 7	(5/7)	(2/7)

Πίνακας 5: Διαχωρισμός στελεχών βάσει του τύπου γονιδίου που εντοπίστηκε

	Τύποι Γονιδίων						
	CTX-M group 1	CTX-M group 9	TEM	SHV	OXA-48	FOX	CMY
Αριθμός στελεχών	52	7	12	17	1	1	1

Μοριακή Ανίχνευση Γονιδίων Αντοχής Τύπου AmpC

Τα στελέχη που είχαν αναδείξει αρνητική δοκιμασία συνέργειας με κλαβουλανικό οξύ (Double Disc Synergy Test, DDST) ενώ παράλληλα εμφάνισαν αντοχή σε κεφαμυκίνες (κεφοξιτίνη) και σε αναστολείς β-λακταμασών (συνδυασμός αμοξικιλίνης-κλαβουλανικού οξέος), ελέγχθηκαν για την παρουσία γονιδίων που εκφράζουν για τύπου AmpC β-λακταμάσες βάσει δημοσιευμένου πρωτοκόλλου [\[13\]](#), [\[23\]](#).

Η ανίχνευση των γονιδίων *bla_{ampc}* (τύπου FOX και τύπου CMY) βασίστηκαν στα δημοσιευμένα πρωτόκολλα [\[13\]](#), [\[23\]](#).

Ανάλυση Πλασμιδίων – Μέθοδος Portnov ^[22]

Υλικά/Διαλύματα

- HCl
- NaOH
- EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)
- SDS (*sodium dodecyl sulfate*)
- 0.5M EDTA pH 8.0 (ρύθμιση pH με NaOH)
- 1M Tris-HCl pH 8.0 (ρύθμιση pH με HCl)
- Ρυθμιστικό διάλυμα TE (50mM Tris-HCl, 10mM EDTA) pH 8.0

- Lysis Buffer: TE Buffer, 0.4% SDS pH 12.39-12,42 (ρύθμιση pH με NaOH υγρής μορφής).
- Tris-HCl 2M pH 7.0
- NaCl 5M
- CH₃COONa 3M pH 5.2 (ρύθμιση pH με acetic acid)
- Φαινόλη (με Tris-HCl 1M, κατάλληλη για απομόνωση DNA) pH 8.

Αναλυτική Περιγραφή Πρωτοκόλλου

1^η ημέρα

Καλλιέργειες στελεχών σε γενικό θρεπτικό μέσο (Nutrient agar)

2^η ημέρα

1. Εναιώρηση μικροβιακού καλλιεργήματος από στερεό θρεπτικό υλικό (Nutrient Agar) σε 60ml ρυθμιστικού διαλύματος TE.
2. Προσθήκη 600ml φρέσκου διαλύματος λύσης (ρύθμιση με NaOH), ήπια ανάδευση για αύξηση ιξώδους.
3. Επώαση για 20 λεπτά στους 37°C.
4. Προσθήκη 45ml Tris-HCL 2M και αργή ανάδευση ώσπου να μειωθεί το ιξώδες.
5. Προσθήκη 160ml NaCl 5M. Σύντομη ανακίνηση ώστε να κατακρημνιστεί το χρωμοσωμικό DNA.
6. Παραμονή σε παγόλουτρο για 1 ώρα.
7. Φυγοκέντρηση στους 4°C στις 14.000 rpm για 20 λεπτά.
8. Μετάγγιση υπερκείμενου (περίπου 700ml) σε καθαρό Eppendorf και απόρριψη του ιζήματος.
9. Προσθήκη φαινόλης ίσου όγκου με το δείγμα μας.
10. Έντονη ανάδευση με vortex και φυγοκέντρηση στους 4°C στις 14.000 rpm για 20 λεπτά.
11. Μετάγγιση της υπερκείμενης υδατικής φάσης σε καθαρό Eppendorf και προσθήκη CH₃COONa 3M σε όγκο ίσο με το 1/10 του συνολικού όγκου.

12. Πλήρωση με παγωμένη αιθανόλη 99% (απόλυτη).
13. Ολονύκτια παραμονή των δειγμάτων στους -20 °C.

3^η ημέρα

14. Φυγοκέντρωση στους 4°C στις 14.000 rpm για 15 λεπτά και απόρριψη του υπερκείμενου.
15. Προσθήκη 200μl αιθανόλης 70% και παραμονή στον πάγο για 10 λεπτά.
16. Φυγοκέντρωση στους 4°C στις 14.000 rpm για 15 λεπτά και απόρριψη του υπερκείμενου
17. Τοποθέτηση των δειγμάτων σε επωαστικό κλίβανο (37 °C) για 1 ώρα για ξήρανση του ιζήματος.
18. Αναδιάλυση του ιζήματος σε 20-25μl TE buffer.
19. Προσθήκη loading buffer και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0,72% (90 Volts για περίπου 3,5 ώρες).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αποτελέσματα PCR για ανίχνευση γονιδίων *bla_{CMY}* και *bla_{FOX}*

Τα DDST αρνητικά στελέχη που εμφάνισαν αντοχή στην κεφοξιτίνη (FOX) και στον συνδυασμό αμοξικιλίνης-κλαβουλανικού οξέος (AMC) ήταν συνολικά πέντε. Από αυτά μόνο στα δύο ανιχνεύθηκε γονίδιο τύπου *bla_{ampc}*. Συγκεκριμένα ένα στέλεχος (858) ήταν θετικό για το γονίδιο *bla_{CMY}* και ένα στέλεχος θετικό για γονίδιο τύπου *fox* (581). Στον **Πίνακα 6** αναγράφονται τα χαρακτηριστικά των δύο αυτών στελεχών.

Πίνακας 6: Αποτελέσματα PCR των AmpC: τύπου CMY και FOX

Στελέχη	Δείγμα προέλευσης	Φυλογενετική Ομάδα	Πρότυπο Αντοχής	Προφίλ Αντοχής	DDST	Γονίδιο Αντοχής	Plasmid Size (Mda)
858	ΝΟΣΟΚΟΜ. ΛΥΜΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	A	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FOX, CRO, ATM, IMP	MDR	-	CMY	50.3, 42.8, 8.3, 6.9, 4.2, 2.9, 2.2, 1.9, 1.6, 1.2, 0.8
581	ΝΟΣΟΚΟΜ. ΛΥΜΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	A	AMP, AMC, TZP, PIP, CXM, FOX, FEP, GM, SXT, NAL, CIP	MDR	-	FOX	35.6, 3.3, 0.8

Αποτελέσματα Portnov ^[22]

Από τα 87 στελέχη που μελετήθηκαν, στα 52 ανιχνεύθηκαν πλασμίδια μεγέθους >17Mda. Μελετώντας τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε μεγάλη ετερογένεια στα πλασμιδιακά προφίλ των στελεχών. Στον **Πίνακα 7**, παρουσιάζονται αναλυτικά τα χαρακτηριστικά (δηλαδή δείγμα προέλευσης, πρότυπο και προφίλ αντοχής, γονίδια αντοχής που φέρουν και πλασμιδιακό προφίλ) των 52 αυτών στελεχών. Τα στελέχη ομαδοποιήθηκαν βάσει του πλασμιδιακού προφίλ και του γονιδίου αντοχής (βλ **Πίνακα 7**).

Παρά την ετερογένεια που σημειώθηκε, ορισμένα στελέχη που έφεραν τον ίδιο τύπο γονιδίου είχαν παρόμοιο πλασμιδιακό προφίλ. Συγκεκριμένα τα στελέχη 601, 611, 614, 616 και 618

που φέρουν όλα γονίδιο *bla_{CTX-M group 9}*, έχουν ίδιο πλασμιδιακό προφίλ (βλ. **Πίνακα 7** και **Εικόνα 12**). Επίσης στελέχη που φέρουν *bla_{CTX-M group 1}*, όπως τα 405, 638, 645, 748, 791, 792 (βλ. **Πίνακας 7**), εμφάνισαν παρόμοιο προφίλ πλασμιδίων. Γενικά, από όλο το πλήθος των στελεχών τα μεγαλύτερα πλασμίδια εντοπίστηκαν σε στελέχη που έφεραν το γονίδιο *bla_{CTX-M group 1}*. Ακόμα, από τα 17 στελέχη με γονίδιο αντοχής *bla_{SHV}*, τα 12 είχαν πλασμίδια >20Mda ενώ παρατηρήθηκαν τρία διαφορετικά πλασμιδιακά προφίλ. Συγκεκριμένα πανομοιότυπο πλασμιδιακό προφίλ εμφάνισαν τα στελέχη:

- a) 297, 436, 477, 546, 739 με μέγεθος πλασμιδίου περίπου στα 21 Mda
- b) 427 και 431 με μεγέθη πλασμιδίων 39.1, 7.14, 6.6 Mda
- c) 345, 426 και 556 με μεγέθη πλασμιδίων 40.2, 32.15, 9.5, 40.2, 32.15, 9.5 Mda

Ενδεικτικά στον **Πίνακα 8** παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά κάποιων στελεχών στα οποία εντοπίστηκαν πλασμίδια πολύ μικρού μεγέθους της τάξης ≤ 4 Mda ή και καθόλου, αποτελέσματα που δεν συνάδουν με το γονίδιο αντοχής που φέρουν.

Στην **Εικόνα 12** παρατίθεται ενδεικτικά τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των πλασμιδίων.

Πίνακας 7: Χαρακτηριστικά των 52 στελεχών με πλασμίδια μεγέθους >17 Mda και ομαδοποιήσεις σε συνδυασμό με το γονίδιο αντοχής

No.	Στέλεχη	Δείγμα Προέλευσης	Πρότυπο Αντοχής	Προφίλ Αντοχής	Γονίδιο Αντοχής	Plasmid size (MDa)
1	553	ΝΟΣΟΚΟΜ. ΛΥΜΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, AMC, PIP, CXM, CTX, CRO, ATM, SXT, CIP, NAL	MDR	CTX-M group 1	24.5, 5.8, 4.1
2	595	ΝΕΡΟ ΠΟΤΑΜΟΥ ΕΡΚΥΝΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM	MDR	CTX-M group 1	25.4, 4.5
3	740	ΝΕΡΟ ΠΟΤΑΜΟΥ ΕΡΚΥΝΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, SXT	MDR	CTX-M group 1	25.4, 1.9, 1
4	497	ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΜΕΝΟ ΛΥΜΑ/ ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, NAL	MDR	CTX-M group 1	22.7, 1.7
5	506	ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΜΕΝΟ ΛΥΜΑ/ ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, ATM, SXT, NAL	MDR	CTX-M group 1	31.47
6	294cli	ΟΥΡΑ/ΚΛΙΝΙΚΟ	AMP, PIP, CXM, CTX, CRO, ATM	R	CTX-M group 1	29.4
7	598	ΝΕΡΟ ΠΟΤΑΜΟΥ ΕΡΚΥΝΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, GN, SXT, NAL	MDR	CTX-M group 1	28.6, 1.7
8	610	ΝΕΡΟ ΠΟΤΑΜΟΥ ΕΡΚΥΝΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, GN, SXT, NAL	MDR	CTX-M group 1	28.6, 1.6

9	802	ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΜΕΝΟ ΛΥΜΑ/ ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, SXT	MDR	CTX-M group 1	32.28, 1.24
10	678	ΝΟΣΟΚΟΜ. ΛΥΜΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, GN, SXT, CIP, NAL	MDR	CTX-M group 1	31, 6.8, 3.1, 2.1, 1.7, 0.7, 0.2
11	682	ΝΟΣΟΚΟΜ. ΛΥΜΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, GN, SXT, CIP, NAL	MDR	CTX-M group 1	32.8, 2.2, 1.7, 1.3, 0.6, 0.4, 0.3, 0.2, 0.18
12	838	ΝΟΣΟΚΟΜ. ΛΥΜΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, GM, SXT, CIP, NAL	MDR	CTX-M group 1	38.6, 29.4, 26.4, 5.5, 4.6, 3.7, 1.8, 1.6, 1.3, 0.7, 0.5, 0.18
13	839	ΝΟΣΟΚΟΜ. ΛΥΜΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, GM, SXT, CIP, NAL	MDR	CTX-M group 1	37.2, 6.3, 4.5, 1.6, 1.3, 0.9, 0.5, 0.3, 0.1
14	852	ΝΟΣΟΚΟΜ. ΛΥΜΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, AN, CIP, NAL	MDR	CTX-M group 1	44.2
15	325cli	ΑΙΜΑ/ΚΛΙΝΙΚΟ	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, CRO, ATM	R	CTX-M group 1	40.2
16	683	ΝΟΣΟΚΟΜ. ΛΥΜΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, GN, SXT, CIP, NAL	MDR	CTX-M group 1	55.4, 40.2, 6.9, 5, 3.3, 2.6, 2.1
17	350cli	ΟΥΡΑ/ΚΛΙΝΙΚΟ	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, CRO, FEP, ATM, SXT, CIP, NAL	MDR	CTX-M group 1	50.3, 40.2, 5.3, 3.6
18	405	ΝΕΡΟ ΠΟΤΑΜΟΥ ΕΡΚΥΝΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, AMC, PIP, CXM, CTX, CRO, ATM, CIP, NAL	MDR	CTX-M group 1	32.2, 23.9
19	638	ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΜΕΝΟ ΛΥΜΑ/ ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, SXT, NAL	MDR	CTX-M group 1	33.76, 22.6
20	645	ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΜΕΝΟ ΛΥΜΑ/ ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, NAL	MDR	CTX-M group 1	30.9, 27.00
21	748	ΝΕΡΟ ΠΟΤΑΜΟΥ ΕΡΚΥΝΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, NAL	MDR	CTX-M group 1	32.2, 25.4
22	791	ΝΕΡΟ ΠΟΤΑΜΟΥ Β. ΚΗΦΙΣΣΟΥ/ΚΑΛΑΜ ΟΣ ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, CIP, NAL	MDR	CTX-M group 1	28.24, 23.62, 7.4, 4.14, 0.42
23	792	ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΜΕΝΟ ΛΥΜΑ/ ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, SXT	MDR	CTX-M group 1	29.53, 24.7, 2.4, 1.85, 1.24, 0.4
24	801	ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΜΕΝΟ ΛΥΜΑ/ ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, SXT	MDR	CTX-M group 1	29.53, 17.28, 2.77, 2.4, 1.3, 0.4
25	408	ΝΕΡΟ ΠΟΤΑΜΟΥ ΕΡΚΥΝΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, AMC, TZP, PIP, TCC, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, MEM, SXT	MDR	CTX-M group 1, OXA-48	37.7, 16.4, 12.7
26	333cli	ΤΡΑΥΜΑ/ΚΛΙΝΙΚΟ	AMP, AMC, PIP, CXM, CTX, FEP, CRO, ATM, GM, CIP, NAL	MDR	CTX-M group 1, SHV	27.9
27	203cli	ΑΙΜΑ/ΚΛΙΝΙΚΟ	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FOX, CRO, ATM, STX, NAL	MDR	CTX-M group 1, TEM	44.3, 40.2
28	54cli	ΟΥΡΑ/ΚΛΙΝΙΚΟ	AMP, AMC, PIP, TZP, TCC, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, GM, AN, CIP, NAL	MDR	CTX-M group 1, TEM	43, 27.8
29	117cli	ΟΥΡΑ/ΚΛΙΝΙΚΟ	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, STX	MDR	CTX-M group 1, TEM	40.2, 29.2, 5.8, 5, 4.2, 3.6
30	601	ΝΕΡΟ ΠΟΤΑΜΟΥ ΕΡΚΥΝΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO	R	CTX-M group 9	28.6, 5, 1.9, 0.8, 0.3
31	611	ΝΕΡΟ ΠΟΤΑΜΟΥ ΕΡΚΥΝΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, PIP, CXM, CTX, FEP, CRO	R	CTX-M group 9	28.6, 4.8, 1.8, 0.8, 0.3
32	614	ΝΕΡΟ ΠΟΤΑΜΟΥ Β. ΚΗΦΙΣΣΟΥ/ΚΑΛΑΜ ΟΣ ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, PIP, CXM, CTX, FEP, CRO	R	CTX-M group 9	30.9, 5.1, 2.3, 0.9, 0.4
33	616	ΝΕΡΟ ΠΟΤΑΜΟΥ Β. ΚΗΦΙΣΣΟΥ/ΚΑΛΑΜ ΟΣ ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, PIP, CXM, CTX, FEP, CRO	R	CTX-M group 9	30.9, 5.1, 2.2, 0.9, 0.4

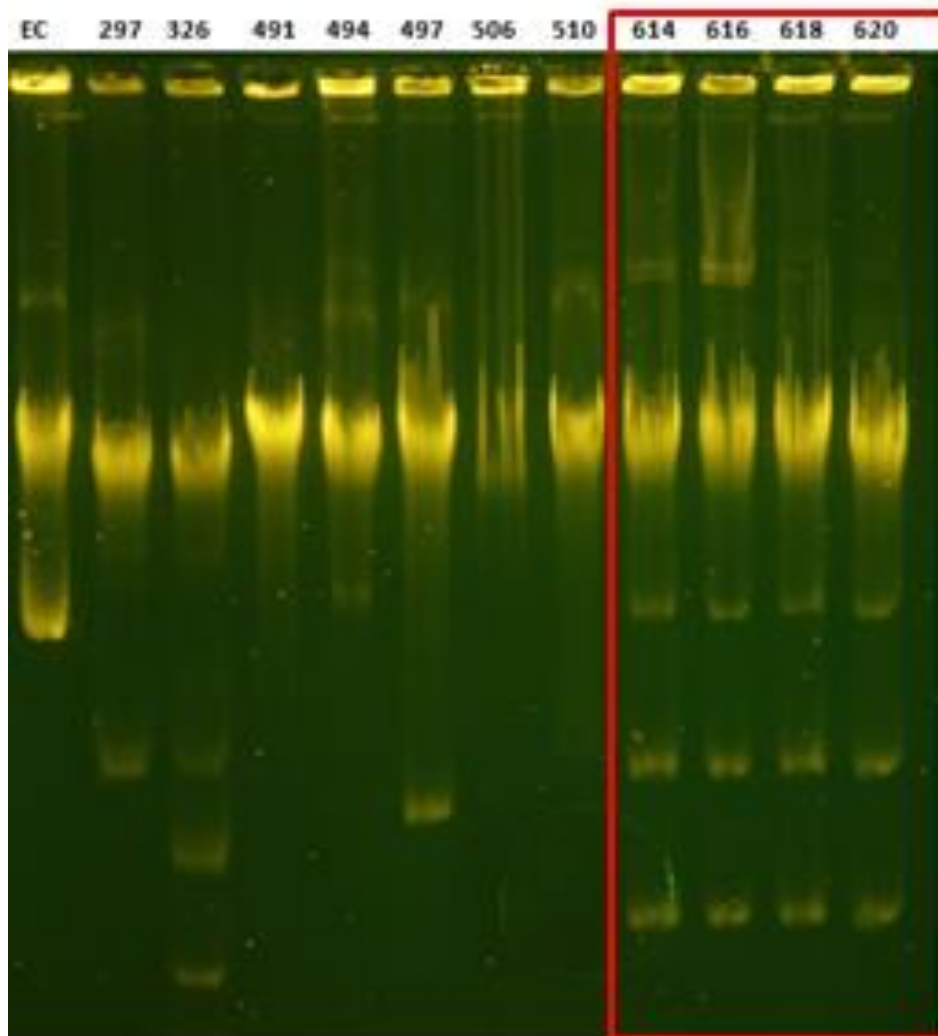
34	618	ΝΕΡΟ ΠΟΤΑΜΟΥ Β. ΚΗΦΙΣΣΟΥ/ΚΑΛΑΜΟΣ ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM	MDR	CTX-M group 9	29.8, 4.9, 2.3, 0.9, 0.4
35	472	ΝΕΡΟ ΠΟΤΑΜΟΥ ΕΡΚΥΝΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, AMC, PIP, CXM, CTX, CRO, ATM, NAL	MDR	CTX-M group 9, TEM	28.6, 2.9, 1.4
36	810	ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΜΕΝΟ ΛΥΜΑ/ ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, STX	MDR	CTX-M group 9	28.24, 18.89, 7.4, 3.46, 2.77
37	581	ΝΟΣΟΚΟΜ. ΛΥΜΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, AMC, TZP, PIP, CXM, FOX, FEP, GM, SXT, NAL, CIP	MDR	FOX	35.6, 3.3, 0.8
38	858	ΝΟΣΟΚΟΜ. ΛΥΜΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FOX, CRO, ATM, IMP	MDR	CMY	50.3, 42.8, 8.3, 6.9, 4.2, 2.9, 2.2
39	494	ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΜΕΝΟ ΛΥΜΑ/ ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, AMC, PIP, CXM, CTX, CRO, SXT	MDR	TEM	21.8, 5.6, 0.4
40	556	ΝΟΣΟΚΟΜ. ΛΥΜΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, CIP, NAL	MDR	SHV	48.7, 27.4, 10.8, 3.11, 2.2, 1.9, 1.5, 1.2
41	345	ΝΟΣΟΚΟΜ. ΛΥΜΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, PIP, CAZ, CTX, CRO, ATM, NAL	MDR	SHV	40.2, 32.15, 9.5, 5.8, 2.6, 2.2, 2
42	426	ΝΟΣΟΚΟΜ. ΛΥΜΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, CRO, ATM, CIP, NAL	MDR	SHV	37.7, 30.4, 12.7, 7.14, 6.4, 5.8, 3, 2.7
43	427	ΝΟΣΟΚΟΜ. ΛΥΜΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, CRO, ATM, AN, CIP, NAL	MDR	SHV	39.1, 7.14, 6.6, 3.9, 3.5
44	431	ΝΟΣΟΚΟΜ. ΛΥΜΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, CRO, ATM, AN, CIP, NAL	MDR	SHV	39.1, 7.14, 6.6, 3.9, 3.5
45	673	ΝΟΣΟΚΟΜ. ΛΥΜΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, PIP, CAZ, CRO, ATM, NAL	MDR	SHV	43.2, 29.3, 4.2, 2.1, 1.3
46	434	ΝΟΣΟΚΟΜ. ΛΥΜΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, AMC, PIP, CAZ, CTX, CRO, ATM, CIP, NAL	MDR	SHV	33.9, 17.7, 10.3, 6.4
47	477	ΝΕΡΟ ΠΟΤΑΜΟΥ ΕΡΚΥΝΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, PIP, CXM, CAZ, CRO, ATM, CIP, NAL	MDR	SHV	25.4, 3.9, 2.8, 2, 1.2, 0.5, 0.3
48	546	ΝΟΣΟΚΟΜ. ΛΥΜΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, CRO, ATM, NAL	MDR	SHV	24.4, 1.8, 1.6, 1, 0.2
49	739	ΝΕΡΟ ΠΟΤΑΜΟΥ ΕΡΚΥΝΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, CRO, ATM, CIP, NAL	MDR	SHV	25.4, 1.6, 0.4
50	297	ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΜΕΝΟ ΛΥΜΑ/ ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, AMC, PIP, CAZ, CRO, ATM, AN	MDR	SHV	21.8, 2.2
51	436	ΝΟΣΟΚΟΜ. ΛΥΜΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, CRO, ATM, AN, CIP, NAL	MDR	SHV	22.3, 2.9, 1.9, 1.05, 0.21
52	344	ΝΟΣΟΚΟΜ. ΛΥΜΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, CIP, NAL	MDR	SHV	23.6, 15.77, 4.98, 2.2, 1.87, 1.7, 0.6

Πίνακας 8: Ενδεικτικά μη αξιολογήσιμα στελέχη

Στελέχη	Δείγμα Προέλευσης	Πρότυπο Αντοχής	Προφίλ Αντοχής	Γονίδιο Αντοχής	Plasmid size (MDa)
326	ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΜΕΝΟ ΛΥΜΑ/ ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, PIP, MEM	R	TEM	7.3, 2.2, 1.4, 0.7, 0.4
356	ΝΕΡΟ ΠΟΤΑΜΟΥ ΕΡΚΥΝΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM	MDR	CTX-M group 1	6.4, 3.7, 1.6
367	ΝΕΡΟ ΠΟΤΑΜΟΥ ΕΡΚΥΝΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, AMC, TZP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, FOX, CRO, ATM, MEM, IMP	MDR	-	4.36
491	ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΜΕΝΟ ΛΥΜΑ/ ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, AMC, PIP, CXM, CTX, CRO, FEP, ATM, NAL	MDR	CTX-M group 1	-

540	ΝΟΣΟΚΟΜ. ΛΥΜΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, GM, SXT, CIP, NAL	MDR	CTX-M group 1	4,8, 3.7, 1, 0.7, 0.5, 0.3
542	ΝΟΣΟΚΟΜ. ΛΥΜΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, AMC, PIP, CXM, CTX, CRO, CIP, NAL	MDR	CTX-M group 1	-
543	ΝΟΣΟΚΟΜ. ΛΥΜΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, AMC, PIP, CXM, CTX, CRO, FEP, ATM, GN, SXT, CIP, NAL	MDR	CTX-M group 1, TEM	-
550	ΝΟΣΟΚΟΜ. ΛΥΜΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, AMC, TZP, PIP, CXM, FOX, FEP, GM, SXT, CIP, NAL	MDR	-	5.6, 4.2, 0.7
552	ΝΟΣΟΚΟΜ. ΛΥΜΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO ATM, GM, SXT, CIP, NAL	MDR	CTX-M group 1	0.2, 0.1
555	ΝΟΣΟΚΟΜ. ΛΥΜΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, GM, SXT, CIP, NAL	MDR	CTX-M group 1	4,8, 3.7, 1, 0.7, 0.5, 0.3
557	ΝΟΣΟΚΟΜ. ΛΥΜΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, AMC, PIP, CXM, CTX, FEP, CRO, ATM, GN, SXT, CIP, NAL	MDR	CTX-M group 1, TEM, SHV	6.3, 4.2, 2.3, 0.9, 0.7, 0.5, 0.2
558	ΝΟΣΟΚΟΜ. ΛΥΜΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, AMC, PIP, CXM, CTX, FEP, CRO, ATM, GN, SXT, CIP, NAL	MDR	CTX-M group 1	4,8, 3.7, 1, 0.7, 0.5, 0.3
594	ΝΕΡΟ ΠΟΤΑΜΟΥ ΕΡΚΥΝΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, CRO, ATM, CIP, NAL	MDR	SHV	2.2, 1.6, 1.2, 0.7, 0.5
680	ΝΟΣΟΚΟΜ. ΛΥΜΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, GN, SXT, CIP, NAL	MDR	CTX-M group 1	2.8, 2, 1.5, 0.6, 0.5, 0.32, 0.27, 0.19, 0.17
681	ΝΟΣΟΚΟΜ. ΛΥΜΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, PIP, CXM, CTX, FEP, CRO, ATM, GN, SXT, CIP, NAL	MDR	CTX-M group 1	2.18, 1.6, 1.3, 0.5, 0.3, 0.22
684	ΝΟΣΟΚΟΜ. ΛΥΜΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, PIP, CXM, CTX, CRO, ATM, GN, SXT, CIP, NAL	MDR	CTX-M group 1, TEM, SHV	2.4, 1.6, 0.5, 0.2, 0.15
685	ΝΟΣΟΚΟΜ. ΛΥΜΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, PIP, CXM, CTX, CRO, ATM, GN, SXT, CIP, NAL	MDR	CTX-M group 1	-
686	ΝΟΣΟΚΟΜ. ΛΥΜΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, AMC, PIP, CXM, CTX, FEP, CRO, ATM, GN, SXT, CIP, NAL	MDR	CTX-M group 1	-
737	ΝΕΡΟ ΠΟΤΑΜΟΥ ΕΡΚΥΝΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, AMC, TZP, PIP, CXM, FOX, CTX, CAZ, GM, AN	MDR	TEM	-
738	ΝΕΡΟ ΠΟΤΑΜΟΥ ΕΡΚΥΝΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, AMC, TZP, PIP, CXM, FOX, CAZ, GM, AN	MDR	TEM	-
785	ΝΕΡΟ ΠΟΤΑΜΟΥ Β. ΚΗΦΙΣΣΟΥ/ΚΑΛΑΜΟΣ ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, IMP, SXT, NAL	MDR	CTX-M group 1	-
803	ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΜΕΝΟ ΛΥΜΑ/ ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, SXT	MDR	CTX-M group 1	3.4, 1.4, 0.85
806	ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΜΕΝΟ ΛΥΜΑ/ ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, STX	MDR	CTX-M group 1	5.4, 4.5, 1.8
836	ΝΟΣΟΚΟΜ. ΛΥΜΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, GM, CIP, NAL	MDR	CTX-M group 1	-
837	ΝΟΣΟΚΟΜ. ΛΥΜΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, GM, AN, CIP, NAL	MDR	CTX-M group 1	-
841	ΝΟΣΟΚΟΜ. ΛΥΜΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, GM, AN, CIP, NAL	MDR	CTX-M group 1	-

22cli	ΟΥΠΑ/ΚΛΙΝΙΚΟ	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, AN (I), CIP, NAL	MDR	CTX-M group 1	-
59cli	ΑΙΜΑ/ΚΛΙΝΙΚΟ	AMP, AMC, PIP, TZP, TCC, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, SXT, NAL	MDR	CTX-M group 1, TEM	-
60cli	ΟΥΠΑ/ΚΛΙΝΙΚΟ	AMP, AMC, PIP, TCC, CXM, CTX (I), CRO, ATM (I), AN, SXT, CIP, NAL	MDR	CTX-M group 1	-



Εικόνα 12: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των πλασμιδίων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η συλλογή και η ανάλυση βακτηριακών στελεχών *E. coli* από κλινικά δείγματα, δείγματα νοσοκομειακών λυμάτων, δείγματα επεξεργασμένων λυμάτων και δείγματα από νερό παρακείμενων ποταμών, είναι μεγίστης σημασίας για την παρακολούθηση και αξιολόγηση της εξέλιξης του φαινομένου της αντιβιοτικής αντοχής με επεκτάσεις στην τοπική αλλά και στην ευρύτερη δημόσια υγεία όπως και στο ίδιο το περιβάλλον. Στελέχη με αντοχή στα αντιβιοτικά εντοπίζονται πλέον τόσο στο νοσοκομειακό όσο και στο εξωτερικό περιβάλλον, όπως στα ποτάμια και τα λύματα, ενώ η πλειονότητα αυτών των στελεχών είναι τύπου ESBL.

Μετά το πέρας των πειραμάτων και τη συλλογή των αποτελεσμάτων που παρατίθενται παραπάνω, έχουμε καταλήξει σε κάποια συμπεράσματα.

Αρχικά, παρατηρώντας τα πρότυπα και τα προφίλ αντοχής, είναι φανερό ότι υπάρχει διάσπαρτη αναπτυγμένη αντοχή στα αντιβιοτικά. Η πλειοψηφία των στελεχών με προφίλ αντοχής R, είναι δείγματα που συλλέχθηκαν από τους παρακείμενους ποταμούς Έρκυνα και Β. Κηφισού. Παράλληλα, όμως, εντοπίζεται και ένας μεγαλύτερος αριθμός στελεχών που προήλθαν από τα εν λόγω ποτάμια που εμφανίζουν προφίλ αντοχής MDR. Το ίδιο ισχύει και για τα δείγματα του νοσοκομειακού λύματος, του επεξεργασμένου λύματος αλλά και των κλινικών δειγμάτων που στην πλειοψηφία τους είναι πολυανθεκτικά στελέχη (MDR). Είναι φανερό λοιπόν ότι η πολυανθεκτικότητα είναι πλέον το πιο σύνηθες προφίλ αντοχής που συναντάται.

Στο σύνολο των στελεχών που μελετήθηκαν επικρατούν τα ESBLs γονίδια, συγκεκριμένα η πλειοψηφία αφορά τα *bla_{CTX-M}* και *bla_{SHV}*. Πιο ειδικά, στην περίπτωση των CTX-M έχουμε αποκλειστικά τους τύπους CTX-M group 1 και CTX-M group 9. Βάσει της **Εικόνας 10** που μας δίνει πληροφορίες για τη εμφάνιση του κάθε τύπου τόσο Ευρωπαϊκά όσο και παγκοσμίως βλέπουμε ότι η ισχυρή παρουσία του τύπου CTX-M group 1 στην Ελλάδα επαληθεύεται. Τα ποσοστά εμφάνισης των γονιδίων είναι τόσο δυναμικά που μπορούν να αλλάζουν σε σύντομα χρονικά διαστήματα, με αποτέλεσμα να έρχονται στην επιφάνεια τύποι που άλλοτε δεν εντοπίζονταν ή/και να περιορίζονται τύποι που άλλοτε ήταν επικρατείς.

Όσον αφορά τα πλασμιδιακά προφίλ που σημειώθηκαν, υπήρχε έντονη ετερογένεια, ωστόσο υπήρξαν ομάδες στελεχών που είχαν ομοιογενές πλασμιδιακό προφίλ ενώ παράλληλα έφεραν και το ίδιο γονίδιο αντοχής. Χαρακτηριστικό παράδειγμα ήταν ομάδες στελεχών που έφεραν το γονίδιο *bla*CTX-M group 1 και *bla*CTX-M group 9.

Τέλος, σχετικά με τα πλασμιδιακά μεγέθη, παρατηρήθηκαν σχετικά μεγάλα μεγέθη, κάτι σύνθητες σε παρουσία γονιδίων ESBL. Το γεγονός αυτό, μπορεί να είναι ενδεικτικό για παρουσία και συμμεταφορά γονιδίων που σχετίζονται με άλλους μηχανισμούς αντοχής.

Η παρούσα εργασία δίνει ένα στίγμα της εικόνας που παρουσιάζεται στον νοσοκομειακό χώρο και τα λύματα του σε μια πόλη του μεγέθους της Λειβαδιάς αλλά και της ποιότητας της επεξεργασίας των τελευταίων. Είναι σημαντικό να εκτιμηθεί βάσει των αποτελεσμάτων ο βαθμός χρήσης των αντιβιοτικών καθώς και η αποτελεσματικότητα της υπάρχουσας επεξεργασίας λυμάτων από τη μονάδα επεξεργασίας λυμάτων.

Σε κάθε περίπτωση, η επιστημονική κοινότητα οφείλει να συνεχίσει να επαγρυπνεί όσον αφορά την αναπτυσσόμενη αντοχή των μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά και να συλλέγει δεδομένα, όπως η παρούσα μελέτη, προκειμένου να είναι προετοιμασμένη για την μελλοντική εξέλιξη του φαινομένου της αντοχής.

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

1. Poirel, L., Madec, J., Lupo, A., Schink, A., Kieffer, N., Nordmann, P., & Schwarz, S. (2018). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 6(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0026-2017>
2. Reygaert W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS microbiology*, 4(3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
3. Sawa, T., Kooguchi, K., & Moriyama, K. (2020, January 28). *Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance - Journal of Intensive Care*. BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/s40560-020-0429-6>
4. Noster, J., Thelen, P., & Hamprecht, A. (2021). Detection of Multidrug-Resistant *Enterobacteriales*-From ESBLs to Carbapenemases. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(9), 1140. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091140>
5. Bennett P. M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British journal of pharmacology*, 153 Suppl 1(Suppl 1), S347–S357. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707607>
6. Ågren J. A. (2014). Evolutionary transitions in individuality: insights from transposable elements. *Trends in ecology & evolution*, 29(2), 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.10.007>
7. Cantón, R., González-Alba, J. M., & Galán, J. C. (2012). CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Frontiers in microbiology*, 3, 110. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00110>
8. Ur Rahman, S., Ali, T., Ali, I., Khan, N. A., Han, B., & Gao, J. (2018). The Growing Genetic and Functional Diversity of Extended Spectrum Beta-Lactamases. *BioMed research international*, 2018, 9519718. <https://doi.org/10.1155/2018/9519718>
9. Castanheira, M., Simner, P. J., & Bradford, P. A. (2021). Extended-spectrum β -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC-antimicrobial resistance*, 3(3), dlab092. <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlab092>

10. Jacoby G. A. (2009). AmpC beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews*, 22(1), 161–182. <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-08>
11. Cantón, R., Novais, A., Valverde, A., Machado, E., Peixe, L., Baquero, F., & Coque, T. M. (2008). Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 14 Suppl 1, 144–153. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01850.x>
12. Bevan, E. R., Jones, A. M., & Hawkey, P. M. (2017). Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 72(8), 2145–2155. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx146>
13. 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*, 40(6), 2153–2162. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.6.2153-2162.2002>
14. King, D. T., Sobhanifar, S., & J. Strynadka, N. C. (2014, November 13). *The Mechanisms of Resistance to β -Lactam Antibiotics*. The Mechanisms of Resistance to β -Lactam Antibiotics | SpringerLink. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0667-3_10-1
15. Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum*, 4(2), 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
16. Hammoudi Halat, D., & Ayoub Moubareck, C. (2020). The Current Burden of Carbapenemases: Review of Significant Properties and Dissemination among Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(4), 186. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040186>
17. Villa, T. G., Feijoo-Siota, L., Sánchez-Pérez, A., Rama, J. R., & Sieiro, C. (2019). Horizontal gene transfer in bacteria, An overview of the mechanisms involved. In *Horizontal Gene Transfer* (pp. 3–76). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21862-1_1

18. Blakely, G. W. (2015). Mechanisms of Horizontal Gene Transfer and DNA Recombination. In *Molecular Medical Microbiology* (2nd ed., Vol. 1, pp. 291–302). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-397169-2.00015-9>
19. Stalder, T., Barraud, O., Casellas, M., Dagot, C., & Ploy, M. (2012). Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology*, *3*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00119>
20. Cantón, R., González-Alba, J. M., & Galán, J. C. (2012). CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Frontiers in Microbiology*, *3*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00110>
21. Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, *18*(4), 657–686. <https://doi.org/10.1128/cmr.18.4.657-686.2005>
22. Portnoy, D. A., Blank, H. F., Kingsbury, D. T., & Falkow, S. (1983). Genetic analysis of essential plasmid determinants of pathogenicity in *Yersinia pestis*. *The Journal of infectious diseases*, *148*(2), 297–304. <https://doi.org/10.1093/infdis/148.2.297>
23. Dioli, C., Pappa, O., Siatravani, E., Bratakou, S., Tatsiopoulos, A., Giakkoupi, P., Miriagou, V., & Beloukas, A. (2023). Molecular Characterization and Prevalence of Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* Isolates Derived from Clinical Specimens and Environmental Habitats. *Microorganisms*, *11*(6), 1399. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061399>
24. Ibrahim, D. R., Dodd, C. E. R., Stekel, D. J., Meshioye, R. T., Diggle, M., Lister, M., & Hobman, J. L. (2023). Multidrug-Resistant ESBL-Producing *E. coli* in Clinical Samples from the UK. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, *12*(1), 169. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12010169>