



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών



ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μοριακή τυποποίηση περιβαλλοντικών στελεχών
*Escherichia coli***

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΦΟΙΤΗΤΗ:

ΣΟΦΙΑ ΜΠΕΡΝΤΑΛΛΙ

A.M. 62115059

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Μπελούκας Απόστολος

Αθήνα, 2021



UNIVERSITY OF WEST ATTICA
FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES
Department of Biomedical Sciences



UNDERGRADUATE THESIS

**Molecular typing of environmental *Escherichia coli* iso-
lates**

NAME OF STUDENT:

SOFIA BERDALLI

Registration Number: 62115059

NAME OF THE SUPERVISOR:

Beloukas Apostolos

Athens, 2021

Δήλωση περί λογοκλοπής

Με πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων, 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.

Σοφία Μπερντάλλι



A/α	Όνοματεπώνυμο μέλους εξεταστικής επιτροπής	Υπογραφή
1	Μπελούκας Απόστολος	
2	Γιαννουλάκη Ελένη	
3	Παπά Όλγα	

Ευχαριστίες

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας & Ανοσολογίας του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω το Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, Δρ. Απόστολο Μπελούκα για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, ένταξη στην επιστημονική του ομάδα και εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Θερμές ευχαριστίες στην υποψήφια διδάκτορα του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, Διολή Χρυσούλα για την καθοδήγησή της, υπομονή και χρόνο που αφιέρωσε καθ'όλη την διάρκεια εκπόνησης της εργασίας. Η βοήθεια της ήταν πολύτιμη. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου για την στήριξη όλα αυτά τα χρόνια, σε κάθε μου προσπάθεια. Χωρίς αυτούς δεν θα είχα καταφέρει τίποτα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Είναι πλέον γνωστό ότι η αντιμικροβιακή αντοχή αποτελεί μια από τις μεγαλύτερες απειλές της παγκόσμιας υγείας, φαινόμενο το οποίο δεν περιορίζεται μόνο στο χώρο του νοσοκομείου αλλά εμφανίζεται και στο περιβάλλον. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, το λύμα αποτελεί μια από τις κυριότερες δεξαμενές ανθεκτικών και πολύ-ανθεκτικών βακτηρίων τα οποία μπορούν να μεταδοθούν στους ανθρώπους, προκαλώντας σοβαρές λοιμώξεις. Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας, που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας & Ανοσολογίας (Ε.Μ.Μ.Α) του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, ήταν η μελέτη της αντιμικροβιακής αντοχής και η φυλογενετική τυποποίηση περιβαλλοντικών και κλινικών στελεχών *Escherichia coli* (*E. coli*), τα οποία είχαν συλλεχθεί κατά το διάστημα του Καλοκαιριού 2020. Τα περιβαλλοντικά απομονώθηκαν από δείγμα λύματος συλλεγμένο από την έξοδο της εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων (Ε.Ε.Λ.) της Λειβαδιάς, ενώ τα κλινικά από βιολογικά υγρά ασθενών που εξετάστηκαν στο Γενικό Νοσοκομείου Λειβαδιάς. Όλα τα στελέχη υποβλήθηκαν σε βιοχημική και μοριακή ταυτοποίηση, σε έλεγχο των επιπέδων ευαισθησίας σε αντιβιοτικά και ταξινομήθηκαν σε τέσσερις βασικές φυλογενετικές ομάδες A, B1, B2, και D. Συνολικά εξετάστηκαν εβδομήντα οχτώ στελέχη από τα οποία τα 66 (66/78, 85%) ταυτοποιήθηκαν ως *E. coli*. Η πλειοψηφία των στελεχών εμφάνιζε αντοχή στις πενικιλίνες [αμπικιλίνη (AMP), αμοξικιλίνη/κλαβουλανικό (AMC), πιπερακιλλίνη (PIP)] και σε ανάμεικτους παράγοντες όπως σουλφαμεθοξαζόλη-τριμεθοπρίμη (SXT). Βάσει των αποτελεσμάτων της τυποποιητικής μεθόδου διαπιστώθηκε ότι η επικρατέστερη ομάδα μεταξύ των περιβαλλοντικών στελεχών ήταν η A, ενώ μεταξύ των κλινικών η B2.

Λέξεις κλειδιά: *Escherichia coli*, λύμα, αντιμικροβιακή αντοχή, αντιβιοτικά, φυλογενετική τυποποίηση

ABSTRACT

It is well known that antimicrobial resistance is one of the greatest threats to global health, a phenomenon which is not limited to the hospital but also occurs in the environment. According to the international literature, effluent is one of the main reservoirs of resistant and highly resistant bacteria that can be transmitted and cause serious diseases in animals and humans. The aim of this research carried out in the Laboratory of Molecular Microbiology & Immunology (EMMA) of the University of West Attica was to study the antimicrobial resistance and phylogenetic standardization of environmental and clinical strains of *E. coli*, which were collected during Summer of 2020. The environmental ones were isolated from a wastewater sample collected from the exit of the effluent treatment plant of Livadia while the clinical ones from biological fluids of patients of the General Hospital of Livadia. All strains underwent biochemical and molecular identification, control of antibiotic susceptibility levels and were classified into four basic phylogenetic groups A, B1, B2, and D. A total of seventy-eight strains were examined of which 66 (66/78, 85%) were identified as *E. coli*. The majority of strains were resistant to penicillins [ampicillin (AMP), amoxicillin / clavulanate (AMC), piperacillin (PIP)] and to mixed agents such as sulfamethoxazole-trimethoprim (SXT). In addition, after the process of phylogenetic standardization, it was found that group A prevailed in environmental strains, while in clinics B2. Finally, the results of the work could be used locally in epidemiological and surveillance studies.

Key words: *Escherichia coli*, wastewater, antimicrobial resistance, antibiotics, phylogenetic typing

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	V
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	VII
ABSTRACT	VIII
1^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.2 <i>ESCHERICHIA COLI</i> : ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΟΧΗ.....	2
1.3. ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ.....	4
1.4 ΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ.....	5
1.4.1 Αναστολείς σύνθεσης κυτταρικού τοιχώματος.....	7
1.4.1.1 Β-Λακτάμες.....	8
1.4.1.2 Γλυκοπεπτίδια.....	9
1.4.2 Αναστολείς σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων.....	10
1.4.2.1 Κινολόνες.....	10
1.4.3 Αναστολείς πρωτεϊνοσύνθεσης.....	10
1.4.3.1 Αμινογλυκοσίδες.....	11
1.4.4 Αντιμεταβολίτες.....	12
1.5 ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΤΟΧΗ	12
1.5.1 Εγγενής αντοχή.....	12
1.5.2 Επίκτητη αντοχή.....	13
1.5.3 Μηχανισμοί αντοχής.....	16
1.5.3.1 Μείωση διαπερατότητας μεμβράνης.....	17
1.5.3.2 Αντλίες εκροής.....	17
1.5.3.3 Τροποποίηση στόχου.....	18
1.5.3.4 Απενεργοποίηση μέσω ενζύμων.....	18
1.6 ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ	18
1.6.1 Μέθοδοι μοριακής τυποποίησης.....	20
1.6.2 Φυλογενετική τυποποίηση- Phylogrouping.....	24
2^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΜΕΘΟΔΟΙ	27

2.1 Συλλογή στελεχών E.coli.....	27
2.2 Ταυτοποίηση κλινικών και περιβαλλοντικών στελεχών.....	28
2.3 Έλεγχος ευαισθησίας/ αντοχής στα αντιβιοτικά.....	29
2.4 Φυλογενετική τυποποίηση (Phylogrouping).....	32
3 ^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	34
3.1 Αποτελέσματα ταυτοποίησης περιβαλλοντικών στελεχών.....	34
3.2 Αποτελέσματα των επιπέδων αντοχής στα αντιβιοτικά των περιβαλλοντικών στελεχών.....	34
3.3 Αποτελέσματα φυλογενετικής τυποποίησης περιβαλλοντικών στελεχών.....	38
3.4 Αποτελέσματα ταυτοποίησης κλινικών στελεχών.....	40
3.5 Αποτελέσματα των επιπέδων αντοχής στα αντιβιοτικά των κλινικών στελεχών.....	40
3.6 Αποτελέσματα φυλογενετικής τυποποίησης κλινικών στελεχών.....	43
4 ^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ/ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	46
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	48

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Καλλιέργεια <i>E.coli</i> σε MacConkey υλικό (Εικόνα από Baban, 2017).....	3
Εικόνα 2: Μηχανισμοί δράσης των αντιβιοτικών σε ένα βακτήριο (Εικόνα από Tortora, Funke & Case, 2017).....	6
Εικόνα 3: Εικόνα με τον τρόπο δράσης των β-λακταμών ως αναστολέας σύνθεσης κυτταρικού τοιχώματος (Εικόνα από Zango et al, 2019).....	9
Εικόνα 4: Τρόποι με τους οποίους πραγματοποιείται η οριζόντια μεταφορά στα βακτήρια (von Winterdorff et al, 2016).....	15
Εικόνα 5: Μηχανισμοί που επιστρατεύουν τα βακτήρια έναντι των αντιβιοτικών (Εικόνα από Reygaert, 2018).....	16
Εικόνα 6: Εικόνα με την διαδικασία της PFGE (Εικόνα από cdc.com/pulse-net).....	21
Εικόνα 7: Ποσοστιαία αναλογία περιβαλλοντικών και κλινικών στελεχών της μελέτης.....	27
Εικόνα 8: Εικόνα με θετικό και αρνητικό αποτέλεσμα τεστ ινδόλης για την ταυτοποίηση της <i>E.coli</i> (Εικόνα από microbiologyinfo.com).....	28
Εικόνα 9: Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της triplex PCR (Εικόνα από Clermont et al, 2000).....	33
Εικόνα 10: Ραβδόγραμμα ποσοστών εμφάνισης ανθεκτικών (R), πολυανθεκτικών (MDR) και άγριου τύπου (WT) στελεχών στα περιβαλλοντικά στελέχη.....	37
Εικόνα 11: Διάγραμμα με τα ποσοστά αντοχής και ευαισθησίας στο κάθε αντιβιοτικό για τα περιβαλλοντικά στελέχη.....	37
Εικόνα 12: Διάγραμμα εμφάνισης προφίλ αντοχής ανά φυλογενετική ομάδα για τα περιβαλλοντικά στελέχη.....	39

Εικόνα 13: Πίτα με τα ποσοστά εμφάνισης της κάθε φυλογενετικής ομάδας των περιβαλλοντικών στελεχών.....	39
Εικόνα 14: Διάγραμμα με τα ποσοστά αντοχής και ευαισθησίας στο κάθε αντιβιοτικό για τα κλινικά στελέχη.....	42
Εικόνα 15: Ραβδόγραμμα με την συχνότητα εμφάνισης ανθεκτικών (R), πολυανθεκτικών (MDR) και άγριου τύπου (WT) στελεχών για τα κλινικά στελέχη.....	42
Εικόνα 16: Πίτα με τα ποσοστά της κάθε φυλογενετικής ομάδας για τα κλινικά στελέχη.....	44
Εικόνα 17: Πηκτή αγαρόζης μετά από ηλεκτροφόρηση των triplex PCR προϊόντων κάτω από λάμπα UV (Εικόνα από προσωπικό αρχείο).....	44

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Ομάδες αντιβιοτικών με βακτηριοκτόνο και βακτηριοστατική δράση.....	5
Πίνακας 2: Κατηγορίες αντιβιοτικών και ο τρόπος που δρούν (Πίνακας από Tortora, Funke & Case, 2017).....	6
Πίνακας 3: Οργανισμοί που εμφανίζουν εγγενή αντοχή και η ομάδα αντιβιοτικών που την εμφανίζουν (Reygaert <i>et al</i> , 2018).....	13
Πίνακας 4: Χαρακτηρισμός κάθε μεθόδου με βάσει κριτήρια απόδοσης και ευκολίας (Τροποποιημένος από Ranjbar <i>et al</i> , 2014, Sabat <i>et al</i> , 2013).....	24
Πίνακας 5: Επιδημιολογικά (ECOFF) και κλινικά όρια.....	30
Πίνακας 6: Κατηγορίες αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη.....	31
Πίνακας 7: Συνοπτική απεικόνιση του γονιδίου ή γονιδίων που χαρακτηρίζουν την κάθε φυλογενετική ομάδα.....	33
Πίνακας 8: Αποτελέσματα των επιπέδων αντοχής και DDST ελέγχου για τα 47 περιβαλλοντικά στελέχη.....	35
Πίνακας 9: Αντοχές των κλινικών στελεχών.....	41
Πίνακας 10: Φυλογενετικές ομάδες των κλινικών στελεχών.....	43

1^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Εισαγωγή

Είναι γεγονός ότι ένα από τα ζητήματα που απασχολεί την παγκόσμια επιστημονική κοινότητα είναι η μικροβιακή αντοχή. Στην Ευρώπη υπολογίζεται ότι οι θάνατοι κάθε χρόνο ανέρχονται στους 33.000 (ECDC, 10/2018), με το 39% αυτών να οφείλονται σε λοιμώξεις από ανθεκτικά βακτήρια. Είναι λοιπόν προφανές ότι τα δεδομένα αυτά όχι μόνο προκαλούν ανησυχία αλλά καθιστούν αναγκαίο τον σχεδιασμό στρατηγικών προκειμένου να αντιμετωπισθεί το πρόβλημα. Μια από τις στρατηγικές που υιοθετήθηκε σε παγκόσμιο επίπεδο είναι η Ενιαία Υγεία. Η Ενιαία υγεία υποστηρίζει πως η υγεία των ανθρώπων, των ζώων και του ευρύτερου περιβάλλοντος είναι αλληλένδετες. Πρόκειται για μια προσέγγιση παγκόσμιας εμβέλειας που περιλαμβάνει νομοθεσίες, πολιτικές, ερευνητικά προγράμματα και συνεργασίες μεταξύ ειδικών διαφορετικών επιστημονικών κλάδων, με κοινό σκοπό την προαγωγή και διατήρηση της δημόσιας υγείας.

Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση και την πρόληψη βακτηριακών λοιμώξεων τόσο στην ιατρική (νοσοκομείο και κοινότητα) όσο και στη κτηνοτροφία και στη γεωργία. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει πως στο περιβάλλον απελευθερώνονται, μέσω διάφορων οδών, υψηλές συγκεντρώσεις αντιβιοτικού, με αποτέλεσμα να ασκείται επιλεκτική πίεση στους βακτηριακούς πληθυσμούς ευνοώντας την επικράτηση των ανθεκτικών (CDC, WHO).

Παράλληλα, το λύμα (νοσοκομειακό και αστικό λύμα, κτηνοτροφικά απόβλητα) θεωρείται βασική δεξαμενή ανθεκτικών και πολύ-ανθεκτικών βακτηρίων. Μέσω του λύματος, το οποίο καταλήγει σε υδάτινα σώματα (όπως ποτάμια, θάλασσα, λίμνες) ή επαναχρησιμοποιείται ως βελτιωτικό εδάφους, διευκολύνεται η διασπορά τέτοιων ανθεκτικών στελεχών στο ευρύτερο περιβάλλον. Επιπλέον, στα επιβαρυμένα αυτά ενδιαιτήματα, τα βακτήρια συνεχίζουν να ανταλλάσσουν γενετικό

υλικό και γονίδια αντοχής, γεγονός που οδηγεί στην περαιτέρω εξάπλωση της αντοχής.

Εκτός από την μελέτη της αντοχής, σημαντική είναι και η εφαρμογή μοριακών τυποποιητικών μεθόδων ώστε να μελετηθούν οι γονότυποι που κυκλοφορούν στο εκάστοτε περιβάλλον (κλινικά, υδάτινα ενδαιτήματα, λύμα). Γενικά, οι τυποποιητικές μέθοδοι αποτελούν βασικό εργαλείο της μοριακής επιδημιολογίας, καθώς συμβάλλουν στην διερεύνηση επιδημικών εξάρσεων, τόσο σε τοπικό όσο και σε παγκόσμιο επίπεδο. Παράδειγμα αποτελεί μια πρόσφατη επιδημιολογική μελέτη 10 χωρών της Ευρώπης, συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας (Huijberts *et al*, 2020), όπου μελετήθηκαν στελέχη *E. coli* απομονωμένα από αστικά λύματα, τα οποία στη συνέχεια συγκρίθηκαν με κλινικά. Τα αποτελέσματα των τυποποιητικών μεθόδων που εφαρμόστηκαν, αποκάλυψαν σημαντική επιδημιολογική συσχέτιση μεταξύ των στελεχών διαφορετικής προέλευσης, γεγονός που αποδεικνύει πως τα πάντα συνδέονται!

1.2 *Escherichia coli*: Γενικά Χαρακτηριστικά και Αντοχή

Το βακτήριο *Escherichia coli* (*E. coli*) κατατάσσεται στην οικογένεια των Εντεροβακτηριακών. Πρόκειται για ένα Gram-αρνητικό, μη σπορογόνο, ραβδοειδούς σχήματος βακτήριο, μεγέθους 2-6 μm σε μήκος και 1,1-1,5 μm σε διάμετρο. Αναπτύσσεται εξίσου καλά σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες. Στην πλειοψηφία τους τα στελέχη είναι κινητά λόγω της παρουσίας περίτριχων μαστιγίων (peritrichous flagella). Η μορφολογία των αποικιών του είναι χαρακτηριστική: μεγάλες, κυκλικές, λείες και ροδέρυθρες, ενώ ορισμένα στελέχη μπορεί να εμφανίσουν και βλεννώδεις αποικίες [Εικόνα 1].

Το βακτήριο ζει ελεύθερο στο περιβάλλον και αποτελεί άποικο της φυσιολογικής χλωρίδας του ανθρώπου και άλλων θερμόαιμων ζώων. Θεωρείται βασικός δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης των υδάτων και η ανίχνευση υψηλών συγκεντρώσεων του στα ύδατα υποδεικνύει πρόσφατη μόλυνση. Ανήκει στα ευκαιριακά παθογόνα βακτήρια προκαλώντας ευκαιριακές λοιμώξεις όπως

ουρολοιμώξεις, μηνιγγίτιδα (κυρίως στα βρέφη), σηψαιμίες και γαστρεντερίτιδες.

Κάποια στελέχη είναι ιδιαίτερα παθογόνα και ταξινομούνται στις εξής ομάδες:

- ❖ Εντεροπαθογόνα (Enteropathogenic *E.coli*, EPEC)
- ❖ Εντεροτοξινογόνα (Enterotoxigenic *E.coli*, ETEC)
- ❖ Εντεροδιδεισδυτικά (Enteroinvasive *E.coli*, EIEC)
- ❖ Εντεροσυσσωρευόμενα-Εντεροπροσκολλητικά (*Enteroaggregative E.coli*, EAEC)
- ❖ Εντεροαιμορραγικά (Enterohemorrhagic *E.coli*, EHEC)
- ❖ *Escherichia coli* που παράγει την τοξίνη Shiga (Shiga toxin-producing *E.coli*, STEC)



Εικόνα 1: Καλλιέργεια *E.coli* σε MacConkey υλικό. (Εικόνα από Baban, 2017)

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω το *E. coli* είναι ευκαιριακά παθογόνο προκαλώντας εντερικές και εξωεντερικές νόσους στον άνθρωπο, όπως και στα ζώα. Χαρακτηριστικά, το βακτήριο ευθύνεται για το 80% των εξωνοσοκομειακών ουρολοιμώξεων, για τις περισσότερες περιπτώσεις βακτηριαιμίας αλλά και γαστρεντερίτιδας στον άνθρωπο (Murray, Rosenthal & Pfaller, Εκδόσεις Παρισιάνου, 2016). Η θεραπεία των ουρολοιμώξεων βασίζεται κυρίως στην χορήγηση ευρέως φάσματος αντιβιοτικών μιας και το βακτήριο δεν διαθέτει εγγενή μηχανισμό αντοχής,

παρά μόνο στην πενικιλίνη G (Allocati *et al*, 2013). Σήμερα, ωστόσο τόσο στο κλινικό όσο και στο ευρύτερο περιβάλλον παρατηρούνται συνεχώς στελέχη που ανθίσταται σε διάφορες ομάδες αντιβιοτικών.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα στελέχη *E.coli* που διαθέτουν β-λακταμάσες ευρέως φάσματος (Extended Spectrum β-lactamases, ESBLs), δηλαδή ένζυμα που έχουν την ικανότητα να υδρολύουν ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες. Τα ESBLs κωδικοποιούνται από γονίδια σε πλασμίδια, γεγονός που αιτιολογεί την διασπορά τους (Ghafourian *et al*, 2014). Επιπλέον πολλές αναφορές γίνονται και στα στελέχη που εμφανίζουν κινητά γονίδια ανθεκτικότητας στην κολιστίνη (mobile colistin resistance genes, mcr) τα οποία προσδίδουν αντοχή στις πολυμυξίνες. Οι πολυμυξίνες χρησιμοποιούνται ως τελευταίας εκλογής αντιβιοτικά για την θεραπεία σοβαρών λοιμώξεων επομένως η εμφάνιση αντοχής σε αυτά έχει προκαλέσει σοβαρά προβλήματα στην υγεία των ανθρώπων και ζώων καθώς και αύξηση της θνησιμότητας (Yang *et al*, 2017).

1.3. Αντιβιοτικά

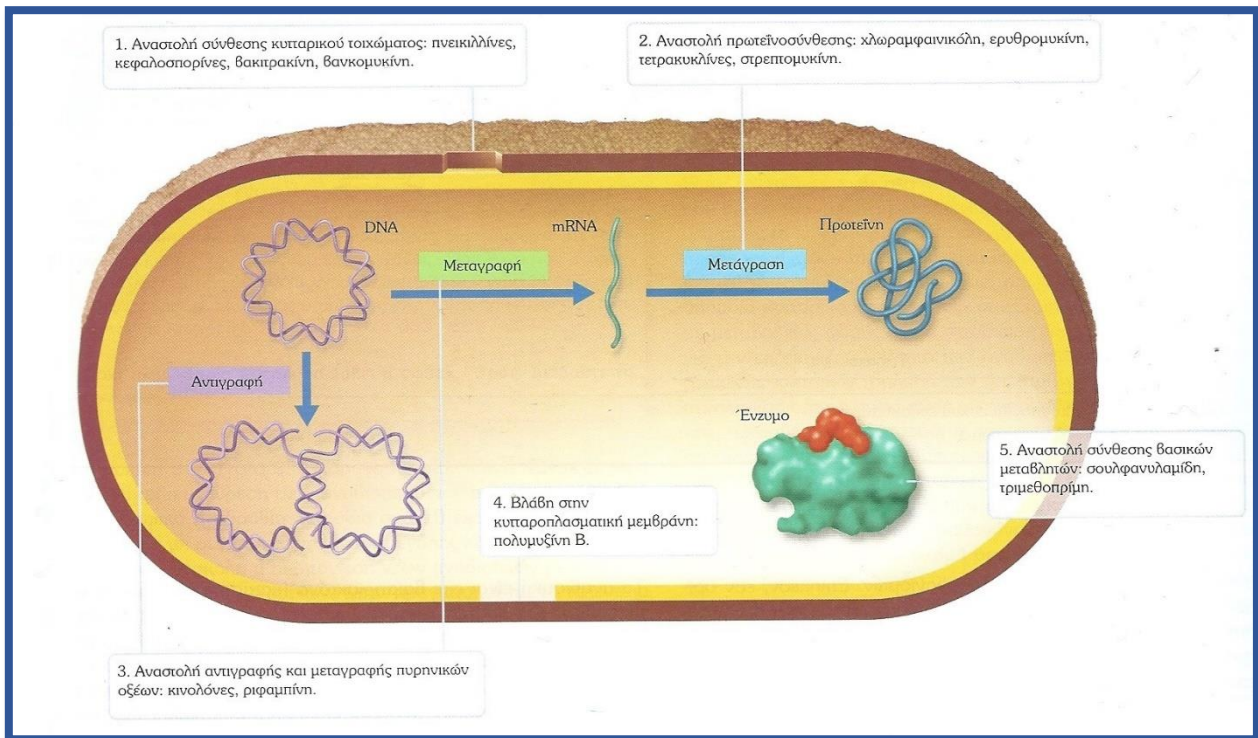
Ως αντιβιοτικά ορίζονται χημικές ουσίες ικανές να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό ή να καταστρέψουν βακτήρια (Merriam-Webster dictionary), (Χατζηπαναγιώτου & Λεγάκης, 2013). Είναι αντιμικροβιακά φάρμακα που διακρίνονται σε: α) φυσικά, τα οποία παράγονται από ζωντανούς οργανισμούς, β) ημισυνθετικά, τα οποία έχουν παραχθεί ύστερα από την τεχνητή τροποποίηση των φυσικών, και γ) τα συνθετικά. Επιπλέον, ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: α) βακτηριοστατικά, τα οποία αναστέλλουν την αύξηση του βακτηρίου και β) βακτηριοκτόνα, τα οποία θανατώνουν το βακτήριο [**Πίνακας 1**]. Κάποιες κατηγορίες αντιβιοτικών έχουν ευρύ μικροβιακό φάσμα, δρώντας αποτελεσματικά έναντι ενός μεγάλου αριθμού βακτηρίων, ενώ άλλες στενό με την αποτελεσματικότητά τους να περιορίζεται σε μικρότερο αριθμό βακτηρίων.

Πίνακας 1: Ομάδες αντιβιοτικών με βακτηριοστατική και βακτηριοκτόνα δράση αντίστοιχα.

ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΤΑΤΙΚΑ	ΒΑΚΤΗΡΙΟΚΤΟΝΑ
Πενικιλίνες	Τετρακυκλίνες
Κεφαλοσπορίνες	Σουλφοναμίδες
Κινολόνες	Μακρολίδες
Μονοβακτάμες	Χλωραμφαινικόλη
Καρβαπενέμες	Τριμεθοπρίμη
Γλυκοπεπτιδία	

1.4 Δράση αντιβιοτικών

Είναι γεγονός ότι τα διαθέσιμα για θεραπευτικούς σκοπούς αντιβιοτικά στοχεύουν έναντι πολλών βασικών λειτουργιών ενός μικροοργανισμού χωρίς ωστόσο να επιδρούν στα κύτταρα του ξενιστή (Tortora, Funke, & Case, 2017). Συγκεκριμένα οι λειτουργίες που μπορεί να ανασταλούν είναι: α) η σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, β) η παραγωγή πρωτεϊνών, γ) η σύνθεση νουκλεϊκών οξέων, δ) βασικές μεταβολικές διεργασίες. Επιπρόσθετα, κάποιες κατηγορίες αντιβιοτικών (π.χ. κολιστίνη) προκαλούν βλάβες στην κυτταρική μεμβράνη [**βλ. Εικόνα 2 και Πίνακα 2**]. Κάθε ομάδα αντιβιοτικών δρα με ένα συγκεκριμένο τρόπο ενώ έχει αποδειχθεί πως ο συνδυασμός ορισμένων αντιβιοτικών διαφορετικού τρόπου δράσης μπορεί να οδηγήσει σε μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα (Tortora, Funke, & Case, 2017. Murray *et al*, 2012).



Εικόνα 2: Μηχανισμοί δράσης των αντιβιοτικών σε ένα βακτήριο. Εικόνα από το βιβλίο "Εισαγωγή στην μικροβιολογία" Tortora, Funke & Case, 2017, 2η Ελληνική Έκδοση.

Πίνακας 2: Κατηγορίες αντιβιοτικών και ο τρόπος δράσης τους. Πληροφορίες από το βιβλίο "Εισαγωγή στην μικροβιολογία" των Tortora, Funke, & Case, σε συνδυασμό με πληροφορίες από μάθημα στο Coursera με τίτλο "Antimicrobial Resistance-Theory and methods".

Τρόπος δράσης Αντιβιοτικών	Ομάδες Αντιβιοτικών
1. Αναστολή σύνθεσης κυτταρικού τοιχώματος	<ul style="list-style-type: none"> Β-λακτάμες (Πενικιλίνες, Κεφαλοσπορίνες, Μονοβακτάμες, Καρβαπενέμες) (Εικόνα 3) Γλυκοπεπτίδια (Βανκομυκίνη, Τεϊκοπλανίνη, Βακιτρακίνη)
2. Αναστολή σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων	<ul style="list-style-type: none"> Αντιγραφή DNA: κινολόνες, μετρονιδαζόλη Μεταγραφή DNA σε RNA: Ριφαμπικίνη
3. Αναστολή πρωτεϊνοσύνθεσης-Υπομονάδα 50s ριβοσώματος	<ul style="list-style-type: none"> Μακρολίδες Χλωραμφαινικόλη Κλινδαμυκίνη
4. Αναστολή πρωτεϊνοσύνθεσης-Υπομονάδα 30s ριβοσώματος	<ul style="list-style-type: none"> Τετρακυκλίνες Αμινογλυκοσίδες Φουσιδικό οξύ

5. Βλάβες στην κυτταρική μεμβράνη	<ul style="list-style-type: none"> • Πολυμικίνη Β • Κολιστίνη • Αμφότερισίνη Β
6. Ανταγωνιστικοί αναστολείς βασικού μεταβολισμού	<ul style="list-style-type: none"> • Σουλφοναμίδες & Τριμεθοπρίμη → παρεμπόδιση παραγωγής φυλλικού οξέος

1.4.1 Αναστολή σύνθεσης κυτταρικού τοιχώματος

Βασικός στόχος των αντιβιοτικών που δρουν ως αναστολείς σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος (Cell Wall Biosynthesis Inhibitors, CBIs) είναι μια δομή που μοιάζει με πλέγμα, η πεπτιδογλυκάνη. Η πεπτιδογλυκάνη βρίσκεται σχεδόν σε όλα τα βακτήρια, διαθέτει δομικό και προστατευτικό ρόλο και είναι απαραίτητη για την επιβίωση τους. Ο σχηματισμός της από τα βακτήρια είναι μια αρκετά περίπλοκη διαδικασία, που πραγματοποιείται σε τρία στάδια. Τα ένζυμα που συμμετέχουν στη κατάλυση του κάθε σταδίου αποτελούν στόχο αντιβιοτικών, όπως για παράδειγμα των β-λακταμών και των γλυκοπεπτιδίων.

Η πεπτιδογλυκάνη αποτελείται από εναλλασσόμενες δομές N-ακετυλογλυκοζαμίνη, (N-acetylmuramic acid, NAG) και N-ακετυλομουραμικό οξύ, (N-acetylglucosamine, NAM), στενά συνδεδεμένες μεταξύ τους με β-1,4 γλυκοζιδικούς δεσμούς. Στα gram θετικά βακτήρια σε κάθε κατάλοιπο NAM συνδέεται ένα πενταπεπτίδιο που αποτελείται από τα αμινοξέα L-Αλανίνη (l-Ala)- D-γλουταμινικό οξύ (D-Glu)-L-Λυσίνη (L-Lys)- D-Αλανίνη (D-Ala)-D-Αλανίνη (D-Ala) ενώ στα gram αρνητικά η λυσίνη (L-Lys) αντικαθίσταται από το διαμινοπιμελικό οξύ, (Diaminopimelic acid, DAP) (Sarkar *et al.* 2017, Liu & Breukink. 2016). Τα ολιγοπεπτίδια συνδέονται διασταυρωτά (cross-linked) σχηματίζοντας μια σταθερή και άκαμπτη δομή. Ο σχηματισμός της πραγματοποιείται σε τρία βασικά στάδια με την συμμετοχή ενδιάμεσων μορίων και πολλών ενζύμων.

Τα κύρια συστατικά της βιοσυνθετικής οδού που αποτελούν στόχο των CBIs είναι τα ένζυμα της οικογένειας Mur που συμμετέχουν στον σχηματισμό:

- των πρώιμων μορίων UDP-N-ακετυλομουραμικό οξύ (Uridine diphosphate N-acetylmuramic acid, UDP-MurNAc) και UDP-N-

ακετυλογλυκοζαμίνη (Uridine diphosphate N-acetylglucosamine, UDP-GlcNAc) και

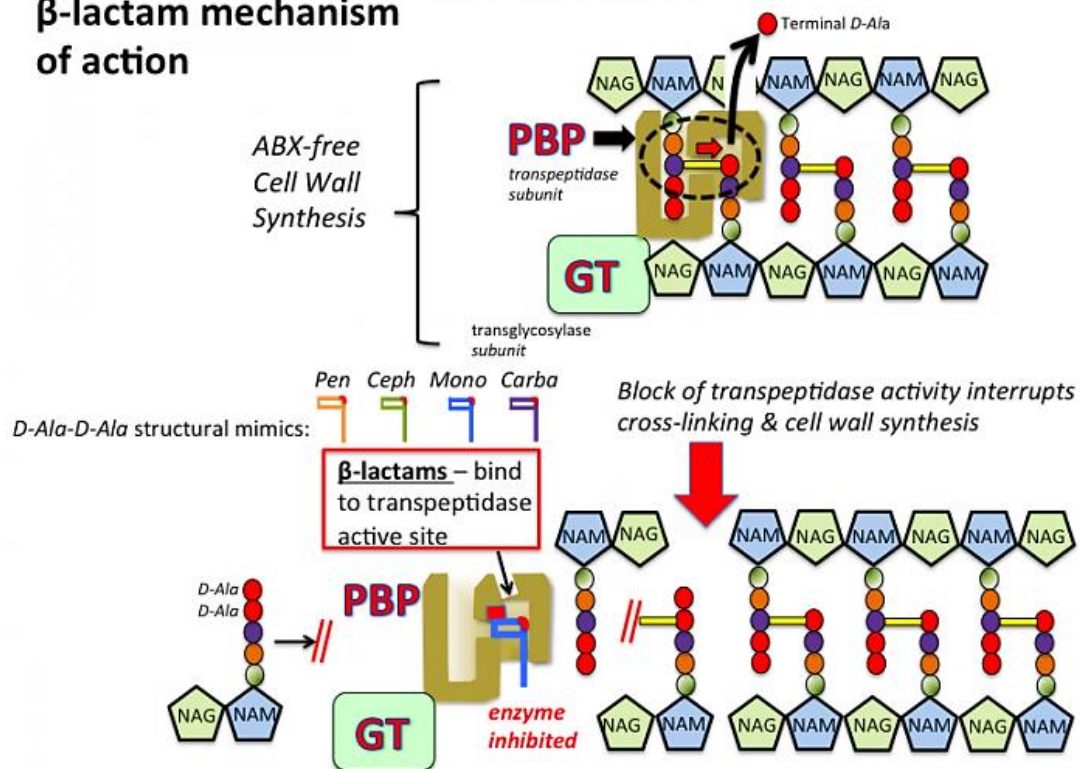
- στην ενσωμάτωση των αμινοξέων στο UDP-MurNAc

καθώς επίσης και τα λιπίδια I και II που είναι ενδιάμεσα μόρια της βιοσυνθετικής οδού της πεπτιδογλυκάνης. Επιπλέον ορισμένα στοχεύουν και τις τρανσγλυκοσυλάσες και τις πενικιλλοδεσμευτικές πρωτεΐνες (Penicillin-Binding Proteins, PBPs) που πλαισιώνουν τις τρανσπεπτιδάσες ο ρόλος των οποίων είναι να σχηματίζουν τις γέφυρες ανάμεσα στα πενταπεπτίδια δίνοντας την τελική μορφή της πεπτιδογλυκάνης (Sarkar *et al*, 2017).

1.4.1.1 Β-Λακτάμες

Είναι μια από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες κατηγορίες αντιβιοτικών (Hongbaek *et al*, 2014. Bush & Bradford, 2016), με βακτηριοκτόνο δράση και ευρύ μικροβιακό φάσμα (Georgorapadaku, 1993). Στην οικογένεια των β-λακταμών ανήκουν τέσσερις βασικές ομάδες: οι πενικιλίνες, οι κεφαλοσπορίνες, οι καρβαπενέμες και οι μονοβακτάμες. Το κοινό δομικό στοιχείο όλων αυτών των ομάδων είναι η παρουσία β-λακταμικού δακτυλίου, ωστόσο διαφέρουν ως προς τους υποκατάστατες των πλευρικών θέσεων (Γαζούλη Μαρία, 2002). Η αντιμικροβιακή δραστηριότητά αιτιολογεί και την κατάταξή τους στα CBIs καθώς έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν τις πενικιλλο-δεσμευτικές πρωτεΐνες (PBPs) με αποτέλεσμα να εμποδίζονται οι αντιδράσεις των τρανσπεπτιδασών [**Εικόνα 3**](Zango *et al*, 2019). Έτσι χάνεται η ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματος και επακολουθεί κυτταρική λύση (Hongbaek *et al*, 2014).

β-lactam mechanism of action



Εικόνα 3: Μηχανισμός δράσης της κατηγορίας αντιβιοτικών των β-λακταμών. Οι β-λακτάμες προσδένονται στις πενικιλοδεσμευτικές πρωτεΐνες των τρανσπεπτιδασών εμποδίζοντας τον cross-linked σχηματισμό της πεπτιδογλυκάνης με αποτέλεσμα να επέρχεται κυτταρική λύση (Εικόνα από Zango *et al*, 2019).

1.4.1.2 Γλυκοπεπτιδία

Πρόκειται για μία ομάδα φυσικών και ημισυνθετικών αντιβιοτικών με βακτηριοκτόνο δράση. Η αντιμικροβιακή τους δραστηριότητα περιορίζεται μόνο έναντι των gram θετικών βακτηρίων λόγω της αδυναμίας τους να διαπερνούν τους πόρους της εξωτερικής μεμβράνης των gram αρνητικών. Τα γλυκοπεπτιδία προσδένονται στο άκρο του διμερούς D-Ala-D-Ala του Λιπιδίου II, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζουν την διασταυρούμενη σύνδεση της πεπτιδογλυκάνης (Nikolaidis *et al*, 2014. Sarkar *et al*, 2017. Zeng *et al*, 2016). Αντιβιοτικά της οικογένειας των γλυκοπεπτιδίων είναι η βανκομυκίνη (vancomycin), είναι η νταλπαβανσίνη (dalbavancin), η οριταβανσίνη (oritavancin) και η τελαβανσίνη (telavancin).

1.4.2 Αναστολείς σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων

Ένας άλλος μηχανισμός με τον οποίο μπορούν να διακόψουν την βακτηριακή ανάπτυξη ορισμένα αντιβιοτικά είναι η παρεμπόδιση της παραγωγής νουκλεϊκών οξέων. Μερικά από τα αντιβιοτικά της κατηγορίας αυτής είναι οι κινολόνες, η ριφαμπικίνη και η μετρονιδαζόλη.

1.4.2.1 Κινολόνες

Οι κινολόνες είναι αντιβιοτικά ευρέως φάσματος (Naeem *et al*, 2016, Drlica *et al*, 2009) με βακτηριστατική δράση. Πρόκειται για την πιο γνώστη ομάδα αναστολέων σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων που χορηγούνται για την θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων του ουροποιητικού, του γαστρεντερικού και του αναπνευστικού συστήματος (βρογχίτιδα, πνευμονία) αλλά και για λοιμώξεις του δέρματος και των μαλακών μορίων (Bush *et al*, 2020. Oliphant & Green, 2002). Ο βασικός στόχος τους είναι οι βακτηριακές τοποϊσομεράσες II, γυράση και τοποϊσομεράση IV που καταλύουν αλλαγές στην τοπολογία του DNA. Πιο συγκεκριμένα, η γυράση εισάγει αρνητικές υπερελικώσεις στο DNA (ιδίως μετά την αντιγραφή και μεταγραφή) (Heeb *et al*, 2011), ενώ η τοποϊσομεράση IV απομακρύνει θηλιές στο βακτηριακό χρωμοσωμικό DNA μετά την αντιγραφή (Jeffrey, 2014). Ουσιαστικά, οι κινολόνες εμποδίζουν τη λειτουργία των τοποϊσομερασών, με αποτέλεσμα τον κατακερματισμό του βακτηριακού γονιδιώματος και κατ' επέκταση τον θάνατο του βακτηρίου.

1.4.3 Αναστολείς πρωτεϊνοσύνθεσης

Η συγκεκριμένη κατηγορία αντιβιοτικών παρεμποδίζει τη σύνθεση των πρωτεϊνών, μια διαδικασία βασική για οποιοδήποτε ζωντανό οργανισμό. Η επιλεκτική δράση των αντιβιοτικών αυτής της κατηγορίας έγκειται στις δομικές διαφορές μεταξύ των ριβοσωμάτων των προκαρυωτών και αυτών των ευκαρυωτών. Ορισμένες από τις ομάδες αντιβιοτικών της κατηγορίας αυτής είναι οι τετρακυκλίνες, οι αμινογλυκοσίδες, οι μακρολίδες, η χλωραμφαινικόλη, η ερυθρομυκίνη κ. ά.

1.4.3.3 Αμινογλυκοσίδες

Ανήκουν στα βακτηριοκτόνα αντιβιοτικά. Η βασική χημική δομή των αμινογλυκοσίδων περιλαμβάνει έναν δακτύλιο αμινοκυκλιτόλης (συνήθως 2-δεοξυστρεπταμίνη) στον οποίο συνδέονται μέσω γλυκοζιδικών δεσμών αμινοσάκχαρα (Mingeot-Leclercq *et al.* 1999, Murray *et al.* 2012). Είναι αντιβιοτικά ευρέως φάσματος με ισχυρή δράση έναντι Εντεροβακτηριακών, ενώ η δράση τους ενισχύεται ακόμα περισσότερο μέσω συνέργειας με άλλες ομάδες αντιβιοτικών, όπως οι β-λακτάμες (Krause *et al.* 2016). Δρουν διακόπτοντας την πρωτεϊνοσύνθεση (Begg & Barclay, 1995). Η αναστολή επιτυγχάνεται με τη πρόσδεση στην Α-θέση του 16S ριβοσωμικού RNA της 30S υπομονάδας με αποτέλεσμα την πρόωπη απελευθέρωση του ριβοσώματος από το mRNA ή την παραγωγή μη-λειτουργικών πρωτεϊνών (Krause *et al.* 2016, Murray *et al.* 2012). Οι τελευταίες προκαλούν βλάβες στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και οδηγώντας τελικά το βακτήριο στον θάνατο. Η αντοχή στις αμινογλυκοσίδες οφείλεται σε πολλούς μηχανισμούς όπως η γρήγορη αποβολή του αντιβιοτικού εκτός του βακτηριακού κυττάρου, μεταλλάξεις στην θέση πρόσδεσης καθώς και στην τροποποίηση των ενζύμων-στόχων.

1.4.5 Αντιμεταβολίτες

Ορισμένα αντιβιοτικά μπορούν να αποτελέσουν τροχοπέδη και στις μεταβολικές λειτουργίες ενός βακτηρίου. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι σουλφοναμίδες και η τριμεθοπρίμη.

Οι σουλφοναμίδες είναι βακτηριοστατικά αντιβιοτικά ευρέως φάσματος με εξίσου αποτελεσματική δράση έναντι gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων. Αναστέλλουν τη σύνθεση πρόδρομων μορίων που συμμετέχουν στη σύνθεση του DNA, ικανότητα που οφείλεται στη δομική ομοιότητά τους με το παρα-αμινοβενζοϊκό οξύ (Para-aminobenzoic Acid, PABA). Το PABA είναι απαραίτητος παράγοντας παραγωγής φυλλικού οξέος, ουσία που συμβάλει στην σύνθεση νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών στα βακτήρια (Kalkut, 1998). Πολύ συχνά συν-χορηγείται με τη τριμεθοπρίμη.

Η τριμεθοπρίμη ανήκει επίσης στην ομάδα των αντιμεταβολίτων που αναστέλλουν την σύνθεση του φυλλικού οξέος. Συγκεκριμένα, εμποδίζει την παραγωγή τετραϋδροφυλλικού από το ένζυμο διϋδροφυλλική αναγωγή με αποτέλεσμα να αναστέλλεται ο σχηματισμός θυμιδίνης, πουρινών, μεθειονίνης και γλυκίνης (Murray et al, 2012).

Η αντοχή στα συγκεκριμένα αντιβιοτικά οφείλεται είτε στην παρουσία πλασμιδίων που φέρουν γονίδια αντοχής (π.χ. γονίδια sul και drf) (Skold, 2001), είτε στη μειωμένη διαπερατότητα της μεμβράνης (Murray et al, 2012).

1.5 Αντιμικροβιακή αντοχή

Με την ανακάλυψη της πενικιλίνης το 1929 από τον Flemming σύντομη ήταν και η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών. Σήμερα, η αντιμικροβιακή αντοχή (Antimicrobial Resistance, AR) αποτελεί παγκόσμια απειλή καθώς τα πολύ-ανθεκτικά στελέχη εξαπλώνονται διαρκώς και οι θεραπευτικές επιλογές στενεύουν.

Η αντιμικροβιακή αντοχή (antimicrobial resistance, AR) διακρίνεται σε α) εγγενή, που διαβιβάζεται κάθετα από το μητρικό βακτήριο στα θυγατρικά, β) επίκτητη που αποκτάται κατά την διάρκεια ζωής ενός βακτηριακού κυττάρου λόγω της οριζόντιας μεταφοράς κινητών γενετικών στοιχείων (Mobile Genetic Elements, MGEs) όπως τα πλασμίδια και γ) προσαρμοστική, που εμφανίζεται προσωρινά υπό καταστάσεις πίεσης. Ως «αντιμικροβιακή αντοχή στα αντιβιοτικά» εννοούμε όχι την εγγενή αντοχή, η οποία είναι γνωστή και προκαθορισμένη, αλλά την επίκτητη.

1.5.1 Εγγενής αντοχή

Η εγγενής αντοχή οφείλεται σε χαρακτηριστικά του γονιδιώματος ενός βακτηρίου και επιδεικνύεται σε όλα τα μέλη ενός είδους ή γένους. Πάρα πολλά βακτήρια διαθέτουν εγγενή μηχανισμό [βλ. Πίνακας 3] με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα να αποτελούν οι gram αρνητικοί μικροοργανισμοί που διαθέτουν μια επιπλέον εξωτερική μεμβράνη (OM), η δομή της οποίας (είναι πλούσια σε λιπαρά οξέα και αλυσίδες

υδρογονάνθρακα) περιορίζει τον αριθμό των μορίων που μπορούν να εισέλθουν στο εσωτερικό του κυττάρου.

Άλλος μηχανισμός φυσικής αντοχής είναι οι αντλίες εκροής (efflux pump). Οι αντλίες εξυπηρετούν την αποβολή τοξικών προϊόντων που οι ίδιοι οι μικροοργανισμοί παράγουν και συμβάλλουν στην επιβίωσή τους. Χαρακτηρίζονται από χαμηλό βαθμό ειδικότητας/επιλεκτικότητας σε υπόστρωμα με αποτέλεσμα να δεσμεύονται (συνήθως τυχαία) αντιβιοτικά και να εξωθούνται από το κύτταρο (Cox & Wright, 2013) πριν προλάβουν να αλληλοεπιδράσουν με το ενδοκυττάριο μόριο-στόχο.

Πίνακας 3: Οργανισμοί που εμφανίζουν εγγενή αντοχή και η κατηγορία των αντιβιοτικών που την εμφανίζουν (Πίνακας από Reygaert, 2018).

ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ	ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟ
<i>Bacteroides</i> (αναερόβιοι)	Αμινογλυκοσίδες, πολλές β-λακτάμες, Κινολόνες
Όλα τα gram θετικά	Αζτρεονάμη
Εντερόκοκκοι	Αμινογλυκοσίδες, Κεφαλοσπορίνες, Λινκοσαμίδες
<i>Listeria monocytogenes</i>	Κεφαλοσπορίνες
Όλα τα gram αρνητικά	Γλυκοπεπτίδια, Λιποπεπτίδια
<i>Escherichia coli</i>	Μακρολίδες
<i>Klebsiella</i> spp.	Αμπικιλίνη
<i>Serratia marcescens</i>	Μακρολίδες
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Σουλφοναμίδες, Αμπικιλίνη, 1 ^{ης} και 2 ^{ης} γενιάς κεφαλοσπορίνες, Χλωραμφαινικόλη, Τετρακυκλίνες
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Αμινογλυκοσίδες, β-λακτάμες, Καρβαπενέμες, Κινολίνες
<i>Acinetobacter</i> spp.	Αμπικιλίνη, γλυκοπεπτίδια

1.5.2 Επίκτητη αντοχή

Ως επίκτητη αντοχή ορίζεται η αντοχή σε κάποιο αντιβιοτικό που προηγουμένως εμφανιζόταν ευαισθησία. Η επίκτητη αντοχή οφείλεται είτε σε μεταλλάξεις, είτε στην

οριζόντια μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Σε αυτή θα μπορούσε να καταταχθεί και η προσαρμοστική αντοχή που εμφανίζουν τα βακτήρια σε καταστάσεις υψηλού στρες.

Οι μεταλλάξεις στα βακτήρια συμβαίνουν τυχαία. Κάποιες από αυτές αποδεικνύονται ωφέλιμες (θετική) καθώς το βακτήριο που τις φέρει αποκτά την ικανότητα προσαρμογής και επιβίωσης σε ένα συγκεκριμένο περιβάλλον. Για παράδειγμα όταν ένα βακτήριο φέρει μετάλλαξη (είτε στο βασικό χρωμόσωμα είτε στα πλασμιδιακό DNA) που του προσδίδει αντοχή στα αντιβιοτικά, αυτομάτως σημαίνει πως σε ένα περιβάλλον με συγκεντρώσεις αντιβιοτικού το βακτήριο αυτό θα καταφέρει να επιβιώσει και να πολλαπλασιαστεί, κληροδοτώντας τη θετική αυτή μετάλλαξη στις επόμενες θυγατρικές γενιές (κάθετη μεταφορά). Επομένως, ο ανθεκτικός αυτός πληθυσμός θα επικρατήσει στο συγκεκριμένο περιβάλλον. Σύνηθες παράδειγμα είναι η εμφάνιση αντοχής των gram αρνητικών βακτηρίων στις κινολόνες λόγω μεταλλαγών στα γονίδια *gyrA*, *gyrB*, *parC* και *parE* που κωδικοποιούν τις υπομονάδες της γυράσης και τοποϊσομεράσης IV. Οι μεταλλαγές συμβαίνουν σε καθορισμένες περιοχές (QRDR) και σχετίζονται με το σημείο πρόσδεσης του αντιβιοτικού (Woodford & Ellington 2007, van Hoek *et al.* 2011).

Εκτός από τις μεταλλάξεις, ένα βακτήριο μπορεί να εμφανίσει αντοχή στα αντιβιοτικά λόγω της οριζόντιας μεταφοράς γενετικών στοιχείων. Πρόκειται για ένα μηχανισμό ανταλλαγής γενετικού υλικού μεταξύ δύο οργανισμών (Andam *et al.*, 2011) που θεωρείται ως ο κύριος υπαίτιος της εμφάνισης και της διασποράς των ανθεκτικών και πολύ-ανθεκτικών στελεχών (Sun *et al.*, 2019). Τα βακτήρια έχουν την ικανότητα να αποκτούν εξωγενές γενετικό υλικό με τρεις τρόπους: 1) μετασχηματισμός (ενσωμάτωση γυμνού DNA), 2) μεταγωγή (μέσω φάγων) και 3) σύζευξη (Munita & Arias, 2016).

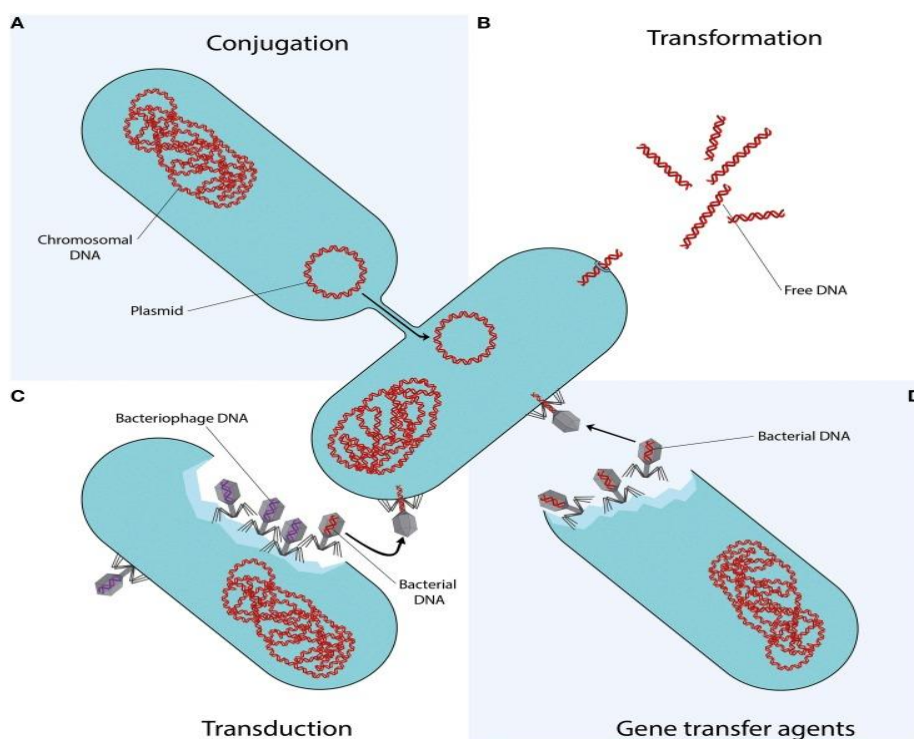
Στον μετασχηματισμό, τμήμα DNA που βρίσκεται ελεύθερο στο περιβάλλον των βακτηρίων ενσωματώνεται στο γονιδίωμά τους πιθανότερα μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού. Κατά την μεταγωγή φάγος που φέρει γενετικό υλικό από άλλο οργανισμό-δότη ενσωματώνεται και μεταφέρει την πληροφορία σε άλλο βακτηριακό κύτταρο-δέκτη. Τέλος στην σύζευξη δύο κύτταρα έρχονται σε στενή επαφή,

ενώνονται μέσω ινιδίων ή τριχιδίων σύζευξης (sex pili) και το γενετικό υλικό μεταφέρεται από το ένα στο άλλο μέσω κινητών στοιχείων.

Τα κινητά γενετικά στοιχεία (Mobile Genetic Elements, MGEs) περιλαμβάνουν τα πλασμίδια (plasmids), τα μεταθετά στοιχεία ή τρανσποζόνια (transposons) και τα ιντεργκρόνια (intergrons) [Εικόνα 4].

Σύμφωνα με τους Fernandez και Hancock (2012) ο όρος προσαρμοστική αντιμικροβιακή αντοχή αναφέρεται στη «προσωρινή αύξηση της ικανότητας των βακτηρίων να επιβιώνουν παρουσία αντιβιοτικού μέσω μεταβολών των επιπέδων έκφρασης ενός γονιδίου λόγω της έκθεσης σε περιβαλλοντικό ερέθισμα» (Sandoval-Motta & Aldana, 2016). Η εμφάνισή της εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως η παρουσία αντιβιοτικών στο περιβάλλον όπου αναπτύσσεται το βακτήριο, η παρουσία ή απουσία οξυγόνου και ιόντων, το pH και η πηγή άνθρακα του θρεπτικού μέσου (Fernandez et al, 2011).

Η έννοια της προσαρμοστικής αντοχής εμφανίστηκε προκειμένου να εξηγηθεί η διαφορά ανάμεσα στην in vivo και in vitro μικροβιακή απόκριση σε κάποιο αντιβιοτικό αλλά και η βαθμιαία αύξηση της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) με την πάροδο του χρόνου (Fernandez & Hancock, 2012).

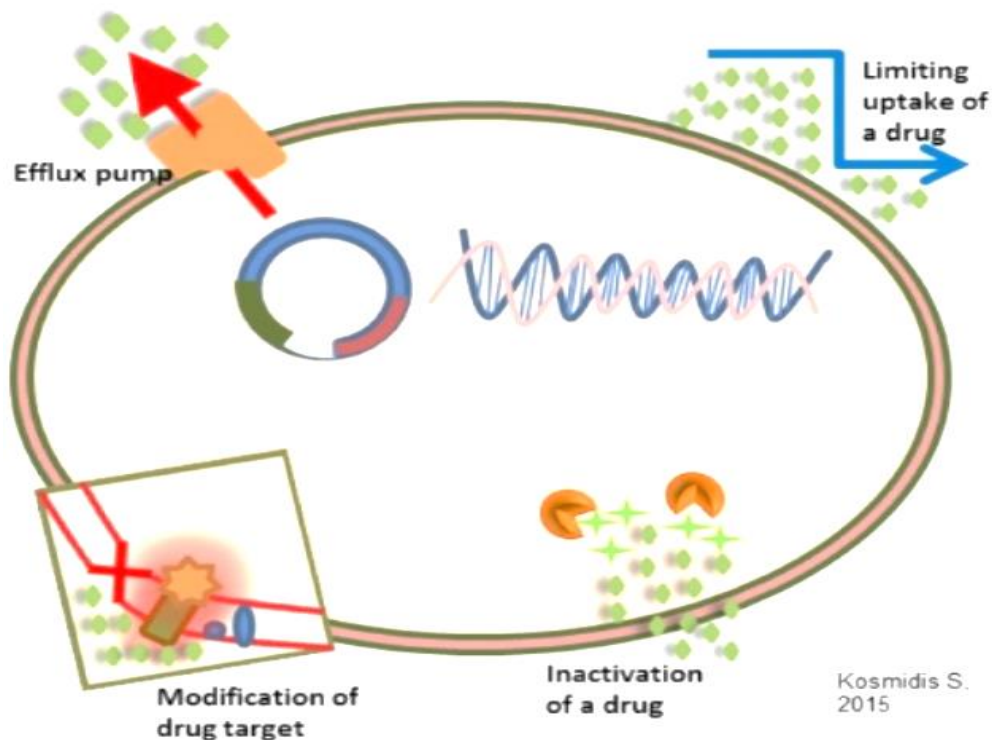


Εικόνα 4: Μηχανισμοί ανταλλαγής γενετικού υλικού (οριζόντια μεταφορά) μεταξύ των βακτηρίων. Α) Σύζευξη: μεταφορά γενετικού υλικού με άμεση επαφή μέσω των συζευκτικών τριχιδίων, Β) Μετασηματισμός: προσλήψη ελεύθερου DNA, (C&D)Γ) Μεταγωγή: DNA, που μπορεί να περιέχει γονίδια αντοχής, μεταφέρεται σε ένα βακτήριο μέσω των φάγων (Εικόνα από von Wintersdorff et al, 2016).

1.5.4 Μηχανισμοί αντοχής

Χωρίς να αποτελεί έκπληξη τα βακτήρια έχουν αναπτύξει ειδικούς μηχανισμούς ώστε να διαφεύγουν της δράσης των αντιμικροβιακών παραγόντων και να επιβιώνουν.

Οι κύριοι μηχανισμοί που υιοθετούν τα βακτήρια ώστε να ανταπεξέλθουν στις πιέσεις που δέχονται από τα αντιβιοτικά και τελικά να επιβιώσουν είναι α) η τροποποίηση του μορίου-στόχου, β) η μείωση διαπερατότητας της μεμβράνης, γ) η υπερέκφραση αντλιών εκροής και δ) η παραγωγή ενζύμων που υδρολύουν αντιβιοτικά.



Εικόνα 5: Μηχανισμοί έναντι των αντιβιοτικών που μπορεί να χρησιμοποιήσει ένα βακτήριο (Εικόνα από Reygaert, 2018).

1.5.4.1 Μείωση της διαπερατότητας της μεμβράνης

Πολλά αντιβιοτικά στοχεύουν σε μόρια εντός του ενδοκυτταρικού χώρου και προκειμένου να εισέλθουν θα πρέπει να διαπεράσουν τις μεμβράνες του κυττάρου. Συνήθως, η είσοδος τους στο εσωτερικό εξασφαλίζεται μέσω πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης όπως είναι οι πορίνες. Μεταβολές στο είδος των πορινών, στην λειτουργία τους αλλά και στο επίπεδο έκφρασης τους σχετίζονται με την ανάπτυξη αντοχής. Ο μηχανισμός αυτός είναι εξαιρετικά σημαντικός στα gram αρνητικά βακτήρια που διαθέτουν εξωτερική μεμβράνη. Ανάμεσα στις πιο καλά μελετημένες πορίνες είναι η *OmpF*, *OmpC* και *PhoE* της *E.coli* και η *OprD* της *Pseudomonas aeruginosa*. Αλλαγές στην δομή του *OprD* μπορούν να οδηγήσουν σε εμφάνιση αντοχής ενώ συχνά συνδέεται με υπερέκφραση των αντλιών εκροής (Munita & Arias, 2016).

1.5.4.2 Αντλίες εκροής

Οι αντλίες εκροής είναι περίπλοκα βακτηριακά συστήματα που βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και αποβάλλουν τοξικά μόρια εκτός του κυττάρου. Μπορούν να εξωθήσουν εκτός του κυττάρου ένα πλήθος μη-συγγενικών (ως προς τη δομή και τη χημική σύσταση) μορίων (Christaki *et al*, 2020) και απαντώνται συχνά στα πολυ-ανθεκτικά στελέχη (Munita & Arias, 2016).

Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις αντλίες εδράζονται είτε σε κινητά γενετικά στοιχεία (π.χ. πλασμίδια), είτε στο βασικό χρωμόσωμα του βακτηρίου. Η παρουσία των γονιδίων αυτών στο βασικό βακτηριακό χρωμόσωμα σχετίζεται κυρίως με την εγγενή αντοχή σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά.

Η υπερέκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για αντλίες εκροής αποτελεί σημαντικό μηχανισμό αντοχής. Πλέον, αρκετές μελέτες επικεντρώνονται στον σχεδιασμό αναστολέων αντλιών εκροής (Efflux Pump Inhibitors, EPIs), δίνοντας μια ελπίδα στην καταπολέμηση αυτού του φαινομένου (Stavri *et al*, 2006).

1.5.4.3 Τροποποίηση στόχου

Τα ενδοκυττάρια μόρια-στόχοι των αντιβιοτικών είναι πάρα πολλά, επομένως μια πιθανή τροποποίηση αυτών θα προσέδιδε στο βακτήριο την ικανότητα να ανθίσταται στη αντιβιοτική δράση.

Για παράδειγμα οι β-λακτάμες στοχεύουν και αδρανοποιούν τις πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες (PBPs), ένζυμα που συμμετέχουν στη σύνθεση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος. Επομένως, μια πιθανή μετάλλαξη στη δομή των ενζύμων, που επηρεάζει το σημείο σύνδεσης με το αντιβιοτικό, θα ελαχιστοποιούσε την αντιβιοτική δράση (Reygaert, 2018).

1.5.4.4 Απενεργοποίηση μέσω ενζύμων

Οι β-λακταμάσες αποτελούν κλασικό παράδειγμα ενζύμων που απενεργοποιούν αντιβιοτικά της κατηγορίας β-λακτάμων. Παράδειγμα αποτελούν οι β-λακταμάσες ευρέως φάσματος (Extended Spectrum B- Lactamases, ESBLs) που εντοπίζονται συχνά στα Εντεροβακτηριακά (συμπεριλαμβανομένου του *E. coli*), οι οποίες υδρολύουν πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες 1^{ης}, 2^{ης} και 3^{ης} γενιάς και αζτρεονάμη. Ωστόσο, αναστέλλονται από αναστολείς β-λακταμασών όπως το κλαβουλανικό οξύ. Έχουν βρεθεί πάνω από 200 ένζυμα (Ghafourian *et al*, 2014) με τα πιο γνωστά να είναι τα TEM, CTX-M, OXA, SHV, PER, VEB-1, BES-1 κ.ά. (Paterson & Bonomo, 2005).

1.6 Μοριακή Τυποποίηση

Τυποποίηση είναι η φαινοτυπική ή γονοτυπική ανάλυση βακτηριακών στελεχών σε επίπεδο είδους/υποείδους που αποσκοπεί στην ομαδοποίησή τους με βάση τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους (van Belkum *et al*, 2007, Sabat *et al*, 2013). Παλαιότερα, για την τυποποίηση εφάρμοζαν τεχνικές που βασίζονταν σε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά όπως η βιοτυπία, η λυσιτυπία, η οροτυπία και ο έλεγχος αντιμικροβιακής αντοχής (Ranjbar *et all*, 2014), (Farber, 1996), (Wu&Dell-Latta, 2002). Με την άνθιση την επιστήμης της μοριακής βιολογίας, οι παραπάνω τεχνικές

αντικαταστάθηκαν από πιο σύγχρονες και αξιόπιστες μοριακές μεθόδους, οι οποίες στηρίζονται στην ανάλυση βιολογικών μορίων (Farber, 1996). Οι μέθοδοι μοριακής τυποποίησης βρίσκουν εφαρμογή στα περισσότερα κλινικά εργαστήρια τόσο για τη ταυτοποίηση των μικροοργανισμών όσο και για την γονοτυπική και φυλογενετική ανάλυση. Επίσης χρησιμοποιούνται ευρέως σε επιδημιολογικές μελέτες και συγκεκριμένα στη διερεύνηση των επιδημικών εκρήξεων.

Υπάρχουν πάρα πολλές μέθοδοι τυποποίησης που μπορούν να εφαρμοστούν ανάλογα με τις ανάγκες της εκάστοτε μελέτης. Μερικές από τις πιο γνωστές είναι η ηλεκτροφόρηση παλλόμενου πεδίου (Pulse field gel electrophoresis, PFGE) και η ανάλυση πολυμορφισμών μήκους περιοριστικών θραυσμάτων (Restriction fragment length polymorphism, RFLP ή REA) που βασίζονται στην δράση των περιοριστικών ενδονουκλεασών. Άλλες που βασίζονται στην μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR) είναι η ανάλυση τυχαία ενισχυμένων πολυμορφικών τμημάτων DNA ή PCR τυχαίων εκκινητών (Random amplification of polymorphic DNA, RAPD or Arbitrarily primed PCR, AP-PCR), η Repetitive PCR (rep-PCR) ή ERIC-PCR, η τυποποίηση πολυτοπικής νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (Multilocus sequence typing, MLST), η ανάλυση του μεταβλητού αριθμού διαδοχικών επαναλήψεων ενός γενετικού τόπου (Variable-number tandem repeat typing, VNTR) και η ανάλυση του πολυμορφισμού μήκους ενισχυμένου θραύσματος (Amplified fragment length polymorphism, AFLP) που συνδυάζει PCR με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Εξίσου αξιόπιστη είναι η μέθοδος των μικροσυστοιχιών (microarrays), η οποία λόγω του υψηλού κόστους δεν εφαρμόζεται τόσο συχνά στα μικροβιολογικά εργαστήρια. Τα τελευταία χρόνια χάρει στην ανάπτυξη εξοπλισμού τελευταίας τεχνολογίας δίνεται η δυνατότητα ανάλυσης και σύγκρισης ολόκληρου του γονιδιώματος [whole genome sequencing, WGS (αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος)]. Πρόκειται για μια πολλά υποσχόμενη τεχνική, η οποία τείνει να αντικαταστήσει όλες τις υπόλοιπες.

Για κάθε μελέτη επιλέγεται η κατάλληλη τυποποιητική μέθοδος με βάση κάποια κριτήρια που αφορούν την απόδοση και την ευκολία. Κατά την απόδοση εξετάζεται η σταθερότητα της μεθόδου, η τυποποιητική ικανότητα (δηλαδή η

ικανότητα ταξινόμησης όλων των στελεχών που απομονώνονται), η διακριτική ικανότητα, η αναπαραγωγικότητα και η συμβατότητα με υπάρχοντα επιδημιολογικά δεδομένα. Από την άλλη για να θεωρηθεί μια μέθοδος εύκολη θα πρέπει να είναι γρήγορη, προσαρμόσιμη στις ανάγκες της κάθε μελέτης, προσβάσιμη, εύκολη στη χρήση για τους ερευνητές, χαμηλή σε κόστος και τα αποτελέσματά της θα πρέπει να ερμηνεύονται με σχετική ευκολία (van Belkum *et al*, 2007). Στον **Πίνακα 4** παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά και τα πλεονεκτήματα τεσσάρων τυποποιητικών μεθόδων που αναλύονται παρακάτω

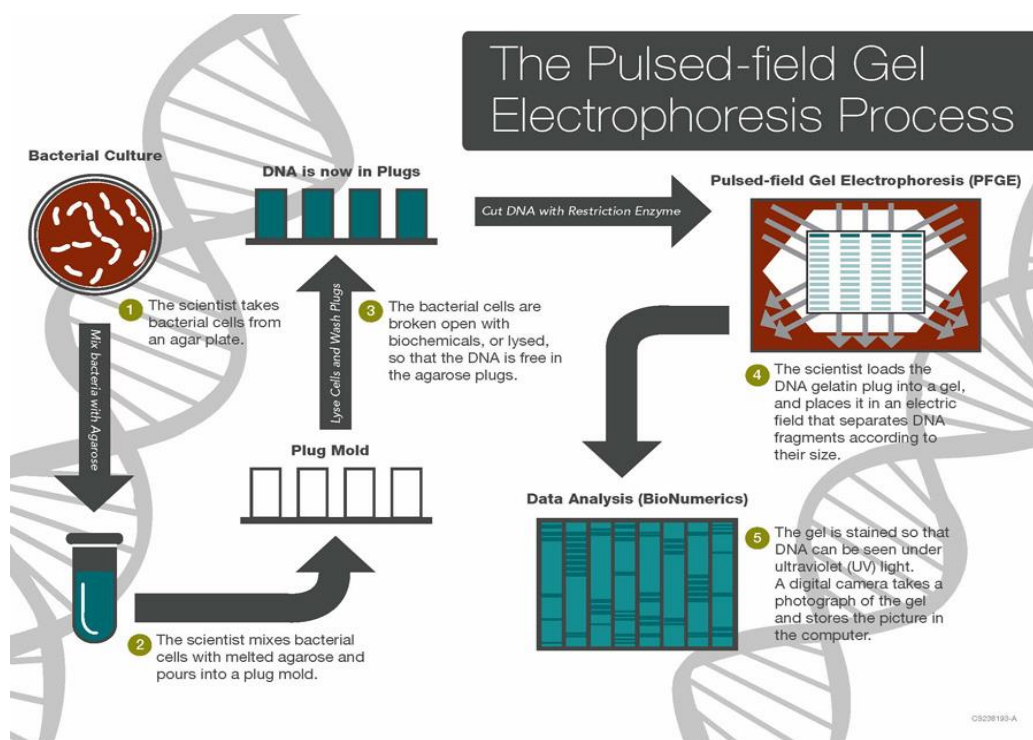
1.6.1 Μέθοδοι μοριακής τυποποίησης

1. Ηλεκτροφόρηση πηκτής παλλόμενου πεδίου- PFGE

Η μέθοδος ανακαλύφθηκε από τους Schwartz και Cantor το 1984 (Lin *et al*, 2014, Wu&Della-Latta, 2002). Θεωρείται η μέθοδος αναφοράς (“gold standard”) για την τυποποίηση βακτηρίων και μυκήτων. Κατά την PFGE το ολικό γονιδίωμα απομονώνεται και “κόβεται” από περιοριστικές ενδονουκλεάσες χαμηλής συχνότητας (rare ή infrequent cutters). Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των ενδονουκλεασών αυτών είναι ότι αναγνωρίζουν 6-8 βάσεις με αποτέλεσμα το DNA να διαιρείται σε μεγάλα τμήματα (συνήθως έχουν βάρος 10-800 kb). Προκειμένου να αποφευχθεί η καταστροφή του DNA κατά την απομόνωση η αρχική καθαρή καλλιέργεια των προς εξέταση μικροοργανισμών αναμειγνύεται με διάλυμα αγαρόζης και στερεοποιείται σε ειδικά καλούπια σχηματίζοντας βύσματα (plugs) αγαρόζης. Στην συνέχεια μέσα στα βύσματα γίνεται απελευθέρωση του DNA με λύση των κυττάρων και τεμαχισμός με τις ενδονουκλεάσες. Τα κομμάτια τοποθετούνται σε πηκτή αγαρόζης που περιέχει χρωστικές και εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο στο οποίο περιοδικά μεταβάλλεται η κατεύθυνση. Τα τμήματα μετακινούνται με βάση το μέγεθός τους κατά μήκος της πηκτής, με μπάντες να εμφανίζονται στο τέλος της ηλεκτροφόρησης. Το σύνολο και η διάταξη των μπαντών αποτελεί το γενετικό αποτύπωμα του κάθε μικροοργανισμού. Με βάση τα αποτελέσματα υπάρχουν οι εξής ερμηνείες: α) ταυτόσημα (κλώνοι) θεωρούνται τα στελέχη που έχουν ακριβώς

το ίδιο πρότυπο ζωνώσεων, β) στενά συσχετιζόμενα είναι τα στελέχη που εμφανίζουν διαφορές σε 1-3 μπάντες, που το πιθανότερο είναι να οφείλονται σε κάποια σημειακή μεταλλαγή, γ) πιθανόν συγγενή θεωρούνται τα στελέχη με διαφορά σε 4-6 μπάντες και δ) μη συσχετιζόμενα θεωρούνται τα στελέχη που εμφανίζουν από 7 και πάνω διαφορετικές μπάντες (Tenover *et al*, 1995).

Η μέθοδος εμφανίζει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Στα πλεονεκτήματα κατατάσσεται η επαναληψιμότητα, το χαμηλό κόστος, η ισχυρή διακριτική ικανότητα και η αξιοπιστία της εφόσον μελετάται το 90% του συνολικού γενετικού υλικού (Sabat *et al*, 2013). Ωστόσο η διαδικασία είναι αρκετά χρονοβόρα (συνήθως ολοκληρώνεται σε 3-5 ημέρες) και εμφανίζει τεχνικές δυσκολίες και απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό. Με την PFGE μπορεί να γίνει σύγκριση αποτελεσμάτων σε τοπικό επίπεδο.



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας που πραγματοποιείται η PFGE. (Εικόνα από cdc.com/pulsenet)

2. Ανάλυση πολυμορφισμού ενισχυμένου μήκους θραύσματος- AFLP

Πρόκειται για μια από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές αποτύπωσης DNA που συνδυάζει την λειτουργία των περιοριστικών ενδονουκλεασών με την PCR. Μόλις το γενετικό υλικό από κάποιο μικροοργανισμό καθαριστεί, τέμνεται με δύο περιοριστικές ενδονουκλεάσες, μια χαμηλής συχνότητας (π.χ. *Mse I*) και μια υψηλής (π.χ. *EcoR I*) (Rajbar et al, 2014). Στα μονόκλινα άκρα που προκύπτουν ενσωματώνονται ενισχυτές (adaptors) των οποίων η αλληλουχία είναι γνωστή. Συνήθως χρησιμοποιούνται δύο ενισχυτές, για κάθε ενδονουκλεάση. Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει την αντιγραφή με PCR σε δύο φάσεις. Στην πρώτη φάση, την προ-επιλεκτική αντιγραφή, εκκινητές εκτός από την συμπληρωματική προς τους ενισχυτές αλληλουχία, διαθέτουν επιπλέον 1-2 επιλεγμένα νουκλεοτίδια στο 3' άκρο τους επιτρέποντας την αντιγραφή μόνο ορισμένων θραυσμάτων περιορισμού. Στην δεύτερη φάση, την επιλεκτική αντιγραφή, προστίθενται εκκινητές με 3 αυτή την φορά νουκλεοτίδια στο 3' άκρο τους περιορίζοντας ακόμα περισσότερο τον αριθμό των αντιγράφων. Τα αποτελέσματα ερμηνεύονται είτε από αυτόματα μηχανήματα μέσω ειδικών λογισμικών (σε αυτή την περίπτωση οι εκκινητές και τα νουκλεοτίδια που χρησιμοποιούνται στη PCR είναι σημασμένα με φθορίζουσα ουσία), είτε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.

Η μέθοδος χρησιμοποιείται ευρέως λόγω της επαναληψιμότητας, υψηλής διακριτικής ικανότητας και αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων, ωστόσο όπως και η PFGE είναι αρκετά χρονοβόρα και απαιτητική.

3. *Τυποποίηση πολυτοπικής νουκλεοτιδικής αλληλουχίας-MLST*

Στην MLST επτά συντηρημένων γονιδίων (housekeeping genes), μεγέθους 450-500 bp (Perez-Losada et al, 2013), (Lin et al, 2014), (Sabat et al, 2013) ενισχύονται με την μέθοδο της PCR και στη συνέχεια αναλύεται η αλληλουχία τους με τη μέθοδο κατά Sanger (Larsen et al, 2012). Οι αλληλουχίες που προκύπτουν συγκρίνονται με προϋπάρχουσες. Κάθε αλληλουχία αποτελεί ένα αλληλόμορφο (Κυριαζής και συν, 2014). Το σύνολο των αλληλόμορφων υποδεικνύει το αλληλικό προφίλ ή τύπο αλληλουχίας (ST) ενός βακτηρίου. Κάθε νέο ST προφίλ καταχωρείται σε βάσεις

δεδομένων, δίνοντας τη δυνατότητα διεξαγωγής επιδημιολογικών και φυλογενετικών μελετών τόσο σε τοπικό όσο και σε παγκόσμιο επίπεδο. Τα στελέχη με ίδιο ST πιθανότατα ανήκουν στον ίδιο κλώνο, ενώ παράλληλα μπορεί να προσδιοριστεί η συγγένεια μεταξύ των στελεχών διαφορετικού ST.

Προς το παρόν διατίθενται MLST βάσεις δεδομένων για 79 μικροοργανισμούς μέσω των οποίων μπορεί να γίνει ταυτοποίηση, σύγκριση αλληλόμορφων γονιδίων, ταυτοποίηση ST προφίλ και ομαδοποίηση στελεχών και οργανισμών (Perez-Losada et al, 2013).

Η μέθοδος θεωρείται από την παγκόσμια επιστημονική κοινότητα ως ένα από τα πιο χρήσιμα εργαλεία επιδημιολογικής επιτήρησης, γενετικής μελέτης πληθυσμού και εξέλιξης βακτηρίων. Εξίσου σημαντική είναι η συμβολή της για διερεύνηση επιδημίας κάποιας βακτηριακής λοίμωξης. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα αιμολυτικού-ουραιμικού συνδρόμου και αιματηρής διάρροιας που ξέσπασε στην Ευρώπη το 2011 που οφειλόταν σε στέλεχος *E.coli* O104:H4. Η επιδημιολογική μελέτη, ώστε να βρεθεί η πηγή της λοίμωξης, στηρίχθηκε στην εφαρμογή της τυποποιητικής μεθόδου της MLST (Larsen et al, 2012), (Sabat et al, 2013).

4. Αλληλούχιση ολικού γονιδιώματος- WGS

Η αλληλούχιση ολικού γονιδιώματος (WGS) με τεχνολογίες αλληλούχισης δεύτερης γενιάς (NGS) αποτελεί την πιο πολλά υποσχόμενη μέθοδο αντικατάστασης των τυποποιητικών μεθόδων που βρίσκονται σε εφαρμογή στις μέρες μας, μερικές από τις οποίες περιεγράφηκαν παραπάνω. Με την NGS χιλιάδες τμήματα DNA από όλο το γενετικό υλικό ενός οργανισμού ενισχύονται ταυτόχρονα με μία μόνο εκτέλεση και στην συνέχεια συναρμολογούνται είτε μέσω επικαλυπτόμενων περιοχών, είτε σε σύγκριση με αλληλουχίες αναφοράς (Sabat et al, 2013), αποκαλύπτοντας την ακολουθία νουκλεοτιδίων για όλο το γονιδίωμα. Τα αποτελέσματα αποθηκεύονται σε συγκεκριμένες μορφές εγγράφων (π.χ. fasta) σε υπολογιστές και παραθέτονται σε βάσεις δεδομένων.

Το WGS προς το παρόν δεν εφαρμόζεται σε εργαστήρια εξετάσεων ρουτίνας. Υπάρχουν αρκετές δυσκολίες που πρέπει να αντιμετωπιστούν. Αρχικά, η ερμηνεία και ο υπολογισμός από μεγάλα σύνολα δεδομένων είναι προς το παρόν αδύνατη. Επιπλέον, η συναρμολόγηση των τμημάτων στις διαθέσιμες πλατφόρμες είναι αρκετά χρονοβόρα και δύσκολη, ενώ απαιτεί και γνώσεις βιοπληροφορικής. Σε αυτό προστίθεται και το γεγονός ότι τα τμήματα δεν μπορούν να επεξεργαστούν ως μια ενιαία αλληλουχία. Τέλος, το κόστος της μεθόδου είναι αρκετά μεγαλύτερο σε σχέση με τις υπόλοιπες μεθόδους για αυτό και δεν προτιμάται. Παρόλα αυτά γίνονται πολλές προσπάθειες επίλυσης των προβλημάτων αφού το WGS φαίνεται να πλεονεκτεί των υπολοίπων μεθόδων ως προς την ταχύτητα αλλά και το σύνολο των πληροφοριών που εκμαιεύονται για έναν οργανισμό.

Πίνακας 4: Πίνακας με τα χαρακτηριστικά κάθε μεθόδου με βάση κριτήρια απόδοσης και ευκολίας (Τροποποιημένος πίνακας από Ranjbar *et al*, 2014, Sabat *et al*, 2013)

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	PFGE	AFLP	MLST	WGS
Ικανότητα τυποποίησης	Όλα	Όλα	Όλα	Όλα
Επαναληψιμότητα	Υψηλή	Υψηλή	Υψηλή	Υψηλή
Αναπαραγωγιμότητα	Υψηλή	Καλή-Υψηλή	Υψηλή	Υψηλή
Διακριτική ικανότητα	Υψηλή	Υψηλή	Καλή-υψηλή	Υψηλή
Ευκολία ερμηνείας αποτελεσμάτων	Μέτρια-Καλή	Μέτρια-Καλή	Καλή	Μέτρια
Ευκολία χρήσης	Χαμηλή	Μέτρια-Χαμηλή	Μέτρια	Καλή
Κόστος	Μέτριο	Μέτριο-Υψηλό	Μέτριο	Μέτριο-Υψηλό
Διάρκεια	3 ημέρες	2 ημέρες	≥3 ημέρες	1 ημέρα

1.6.2 Φυλογενετική τυποποίηση-Phylogrouping

Στόχος των φυλογενετικών αναλύσεων είναι η μελέτη της εξελικτικής πορείας των οργανισμών προσδιορίζοντας την συγγένεια τους αλλά και οποιοδήποτε κοινό

πρόγονο. Οι σχέσεις αυτές αποτυπώνονται σε διαγράμματα με την κατασκευή φυλογενετικού δέντρου που βασίζονται σε μοντέλα εξέλιξης και τελικά οι οργανισμοί ομαδοποιούνται. Οι απαραίτητες πληροφορίες για την κατασκευή του δέντρου λαμβάνονται μετά από εφαρμογή κάποιας μοριακής τυποποιητικής μεθόδου και επεξεργάζονται μέσω ειδικών προγραμμάτων βιοπληροφορικής.

Όσο αφορά την *E.coli*, οι πρώτες μελέτες phylogrouping ξεκίνησαν την δεκαετία του '90 με τους Ochman και Selander το 1984 μελετώντας στελέχη της ECOR συλλογής, να προσδιορίζουν τέσσερις βασικές φυλογενετικές ομάδες που ονομάστηκαν A, B1, B2 και D και δύο προγονικές, την η C και E. (Chaudhuri & Henderson, 2012), (Tenaillon *et al*, 2010). Αργότερα σε επόμενες μελέτες με εφαρμογές MLST προσδιορίστηκε και άλλη μια υποομάδα της D, η F (Tenaillon *et al*, 2010).

Σήμερα για την φυλογενετική τυποποίηση στελεχών της *E.coli* έχει επικρατήσει η μέθοδος που αποτυπώθηκε για πρώτη φορά σε άρθρο των Clermont *et al* το 2000 (ClermontTyping). Τα πειράματά τους επικεντρώθηκαν στην ύπαρξη φυλογενετικών δεικτών που θα μπορούσαν να κατατάξουν με γρήγορο και εύκολο τρόπο ένα άγνωστο στέλεχος σε κάποια ομάδα. Συνολικά μελετήθηκαν 230 στελέχη στα οποία εφαρμόστηκε triplex PCR και η ανάγνωση των αποτελεσμάτων έγινε με Southern blotting. Ωστόσο στην πορεία αποδείχθηκε ότι και μια απλή ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων μπορεί να δώσει ισάξια αποτελέσματα. Τα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι το 99% (228 στα 230) των στελεχών κατατάχθηκαν στην αντίστοιχη ομάδα αποδεικνύοντας ότι η μέθοδος αποδίδει αξιόπιστα αποτελέσματα σε συνδυασμό με το χαμηλό κόστος της. Τους δείκτες αποτελούν : 1. το γονίδιο *yjaA* που ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά στο στέλεχος *E.coli* K-12 και κωδικοποιεί πρωτεΐνη που παράγεται σε καταστάσεις στρες (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene), 2. το γονίδιο *chuA* απαραίτητο για την μεταφορά αίμης στο εντεροαιμορραγικό *E.coli* O157:H7 και 3. ένα θραύσμα DNA, το TSPE4.C2, που αργότερα χαρακτηρίστηκε ως πιθανό γονίδιο λιπάσης/εστεράσης (Clermont *et al*, 2013). Σε συγκρίσεις της triplex PCR με άλλες μεθόδους αποδείχθηκε ότι έχει την ικανότητα να κατατάξει το 80-85% των *E.coli* στελεχών στην αντίστοιχη φυλογενετική ομάδα (Chaudhuri & Henderson, 2012).

Συσχετίσεις ανάμεσα στην λοιμογόνο ικανότητα και τις φυλογενετικές ομάδες, απέδειξε ότι τα κοινά, μη παθογόνα στελέχη *E.coli* (commensal *E.coli*), στην πλειοψηφία τους ανήκουν στην ομάδα A (Storpe et al , 2017), (Li et al , 2010), (Picard et al, 1999), (Smati et al, 2013), ενώ τα παθογόνα στελέχη και ιδίως αυτά που προκαλούν σοβαρές εξωεντερικές νόσους κατατάσσονται στην B2 (Javed *et al*, 2021), (Khairy *et al*, 2019), (Touchon et al, 2020), (Smati et al, 2013), (Picard et al, 1999).

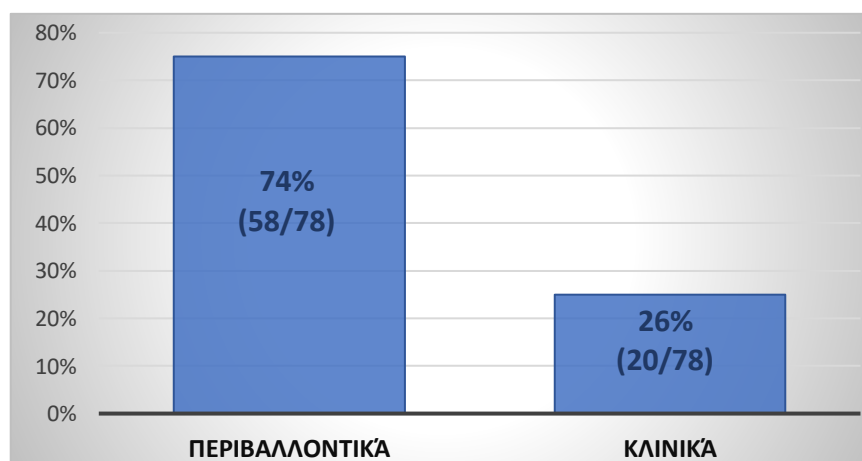
Πλέον υπάρχει και η αναθεωρημένη έκδοση της μεθόδου που κατατάσσει τα στελέχη και στις οχτώ αναγνωρισμένες για την *E.coli* φυλογενετικές ομάδες A, B1, B2, C, D, E, F και κλάδος I. Πραγματοποιείται με την εφαρμογή quadruplex PCR, ανιχνεύοντας τα τρία γονίδια που αναφέρθηκαν παραπάνω και ένα επιπλέον, το *arpA* (Clermont *et al*, 2013).

2^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Συλλογή στελεχών *E. coli*

Στα πλαίσια της παρούσας ερευνητικής πτυχιακής εργασίας, συνολικά μελετήθηκαν 78 στελέχη *E. coli*. Τα 58 στελέχη (περιβαλλοντικά) απομονώθηκαν από το λύμα που συλλέχθηκε από την έξοδο της Μονάδας Επεξεργασίας Λυμάτων (Ε.Ε.Λ.) της Λιβαδειάς, στην οποία καταλήγουν εκτός από τα αστικά απόβλητα και το νοσοκομειακό λύμα, που προέρχεται από το Γενικό Νοσοκομείο της περιοχής. Η δειγματοληψία και η απομόνωση των παραπάνω 58 περιβαλλοντικών στελεχών πραγματοποιήθηκε τον Ιούλιο 2020. Τα υπόλοιπα 20 στελέχη ήταν κλινικά, τα οποία αφού απομονώθηκαν από βιολογικά υλικά (αίμα/ούρα) ασθενών από το προσωπικό του Μικροβιολογικού εργαστηρίου του Γενικού Νοσοκομείου Λιβαδειάς (Γ.Ν. Λιβαδειάς), στάλθηκαν στο εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας. Τα κλινικά στελέχη απομονώθηκαν το ίδιο χρονικό διάστημα με τα περιβαλλοντικά στελέχη (Καλοκαίρι του 2020).

Όλα τα στελέχη φυλάχθηκαν σε ειδικά σωληνάρια κρυοσυντήρησης σε Brain Heart Infusion (BHI)/20% γλυκερόλη στους -80οC, στο αρχείο βιολογικών δειγμάτων του εργαστηρίου.

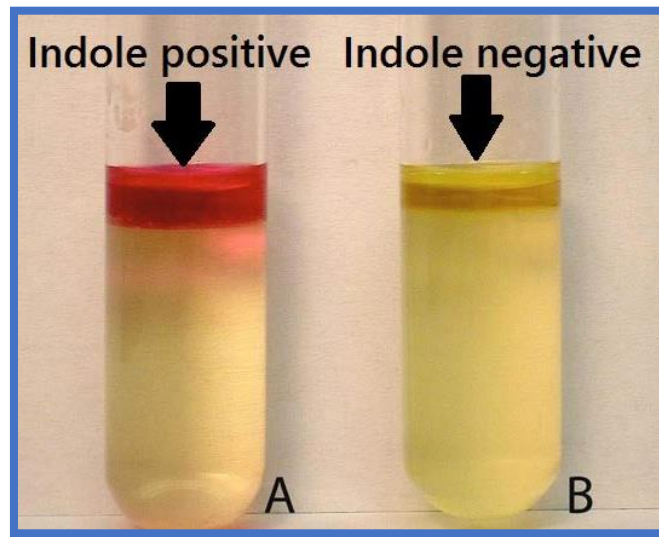


Εικόνα 7: Ποσοστιαία αναλογία περιβαλλοντικών και κλινικών στελεχών που μελετήθηκαν. Το 74% ή 58/78 δείγματα ήταν περιβαλλοντικά και το 26% ή 20/78 ήταν κλινικά.

2.2 Ταυτοποίηση κλινικών και περιβαλλοντικών στελεχών

Παρακάτω περιγράφεται η ροή των πειραμάτων ταυτοποίησης των 78 στελεχών (κλινικών και περιβαλλοντικών) *E. coli*.

Καλλιέργεια σε εκλεκτικό υλικό MacConkey agar και παρατήρηση αποικιών			
Κόκκινες/ ροζ αποικίες		Άχρωμες αποικίες	
Ανακαλλιέργεια μονής αποικίας σε Nutrient agar		Αποκλεισμός	
Ταυτοποίηση με την δοκιμασία της ινδόλης			
Θετικό αποτέλεσμα (κόκκινος δακτύλιος)	Αρνητικό αποτέλεσμα		
Μοριακή ταυτοποίηση με την ανίχνευση γονιδίου βασικού μεταβολισμού (housekeeping gene)			
Θετικό αποτέλεσμα	Αρνητικό αποτέλεσμα		
<i>E. coli</i>	Αποκλεισμός		



Εικόνα 8: Εικόνα με ινδόλη θετικό και αρνητικό αποτέλεσμα. Στο ινδόλη θετικό αποτέλεσμα εμφανίζεται ένας κόκκινος δακτύλιος στο υπερκείμενο. (Εικόνα από microbiologyinfo.com)

2.3 Έλεγχος ευαισθησίας/αντοχής σε αντιβιοτικά

Ο έλεγχος επιπέδων ευαισθησίας/αντοχής πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο Kirby-Bauer. Πρόκειται για μια ποιοτική μέθοδο που βασίζεται στην διάχυση δίσκων και την δημιουργία ζωνών αναστολής. Για τα περιβαλλοντικά στελέχη, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων βασίστηκε στα επιδημιολογικά όρια (ECOFF)¹ που ορίζει η Ευρωπαϊκή Επιτροπή Ελέγχου Αντιμικροβιακής Αντοχής (EUCAST)², ενώ για τα κλινικά λήφθηκαν υπόψη τα κλινικά όρια (clinical breakpoints) ευαισθησίας (sensitive, S) ή

¹ Επιδημιολογικό όριο (Epidemiological cut-off, ECOFF): είναι μια τιμή συγκέντρωσης ενός αντιβιοτικού που διαχωρίζει ένα μικροοργανισμό σε Άγριου τύπου (Wild type, WT), το οποίο δεν έχει κανέναν επίκτητο μηχανισμό αντοχής και σε μη Άγριου τύπου (Non Wild type, nWT). Στα μη Άγριου τύπου εμφανίζεται κάποιο πρότυπο ανθεκτικότητας, χωρίς να λαμβάνονται υπόψιν οι εγγενείς μηχανισμοί αντοχής. Μόνο τα μη Άγριου τύπου διαχωρίζονται στη συνέχεια σε ανθεκτικά (R), πολυανθεκτικά (MDR), πανανθεκτικά (PDR) και εκτενώς ανθεκτικά (XDR) (Magiorakos et al, 2012). Εκφράζεται σε $WT \leq X \text{ mg/L}$ όταν εφαρμόζονται ποσοτικές μέθοδοι ελέγχου αντιμικροβιακής αντοχής και $WT > X \text{ mm}$ όταν πρόκειται για μέτρηση ζώνης αναστολής.

² Κλινικά όρια ευαισθησίας S ή αντοχής R (clinical breakpoints): διαχωρίζουν σε ευαίσθητα S ή ανθεκτικά R τα κλινικά στελέχη ώστε να χορηγηθεί η κατάλληλη και αποτελεσματική θεραπεία για τον κάθε ασθενή. Τα κλινικά δείγματα κατατάσσονται σε ευαίσθητα (S), ενδιάμεσης ανθεκτικότητας (I) και ανθεκτικά (R). Εκφράζονται σε $MIC: S \leq X \text{ mg/L}$ και $R > Y \text{ mg/L}$ ή $S \geq X \text{ mm}$ και $R < Y \text{ mm}$ για τις ζώνες αναστολής. (moh.gov.gr/ Εθνική Επιτροπή Αντιβιογράμματος).

αντοχής (resistance, R), έτσι όπως έχουν καθοριστεί από τον ίδιο οργανισμό (Πίνακας 5). Στον Πίνακα 6 παρουσιάζονται τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν.

Στην συνέχεια, τα στελέχη ανάλογα με το πρότυπο αντοχής τους, κατηγοριοποιήθηκαν σε τέσσερις ομάδες: α) Ανθεκτικά (Resistant, R: αντοχή σε δύο αντιμικροβιακούς παράγοντες τουλάχιστον, μιας κατηγορίας), β) Πολύ-ανθεκτικά (Multi-drug Resistant, MDR: αντοχή σε έναν παράγοντα τουλάχιστον τριών διαφορετικών κατηγοριών), γ) Μη άγριου τύπου (non-Wild Type, n-WT: αντοχή σε ένα αντιβιοτικό) και δ) Άγριου τύπου (Wild type, WT: καμία επίκτητη αντοχή).

Πίνακας 5: Επιδημιολογικά (ECOFF) και κλινικά όρια

Αντιβιοτικό	ECOFF (WT > X mm)	Κλινικά όρια (S ≥ X mm, R < Y mm)
AMP	WT ≥ 14mm	S ≥ 14mm, R < 14mm
AMC	WT ≥ 19mm	S ≥ 19mm, R < 19mm
TZP	WT ≥ 20mm	S ≥ 20mm, R < 17mm
PIP	WT ≥ 20mm	S ≥ 20mm, R < 17mm
CXM	WT ≥ 18mm	S ≥ 19mm, R < 19mm
CAZ	WT ≥ 22mm	S ≥ 22mm, R < 19mm
CTX	WT ≥ 23mm	S ≥ 20mm, R < 17mm
FOX	WT ≥ 19mm	S ≥ 19mm, R < 19mm
FEP	WT ≥ 28mm	S ≥ 27mm, R < 24mm
CRO	WT ≥ 25mm	S ≥ 25mm, R < 22mm
ATM	WT ≥ 26mm	S ≥ 26mm, R < 21mm
MEM	WT ≥ 25mm	S ≥ 22mm, R < 16mm
IMP	WT ≥ 25mm	S ≥ 22mm, R < 17mm
GM	WT ≥ 16mm	S ≥ 17mm, R < 14mm
AN	WT ≥ 18mm	S ≥ 18mm, R < 15mm
SXT	WT ≥ 16mm	S ≥ 14mm, R < 11mm
CIP	WT ≥ 25mm	S ≥ 25mm, R < 22mm
NAL	WT ≥ 17mm	S ≥ mm, R < mm

Πίνακας 6: Κατηγορίες αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν

Αντιμικροβιακός Παράγοντας	Συντομογραφία	Κατηγορία
Αμπικιλίνη	AMP	Πενικιλίνη (Β-λακτάμες)
Αμοξικιλίνη/Κλαβουλανικό οξύ	AMC	
Πιπερακιλλίνη/Ταζοβακτάμη	TZP	
Πιπερακιλλίνη	PIP	
Κεφουροξίμη	CXM	Κεφαλοσπορίνη (Β-λακτάμες)
Κεφταζιδίμη	CAZ	
Κεφοταξίμη	CTX	
Κεφοξιτίνη	FOX	
Κεφεπίμη	FEP	
Κεφτριαξόνη	CRO	
Αζτρεονάμη	ATM	
Μεροπενέμη	MEM	Καρβαπενέμη (Β-λακτάμες)
Ιμιπενέμη	IMP	
Γενταμυκίνη	GM	Αμινογλυκοσίδες
Αμικασίνη	AN	
Τριμεθοπρίμη/Σουλφαμεθοξαζόλη	SXT	Ανάμεικτος παράγοντας (Αναστολέας διυδροφυλλικής ρεδοκτάσης+Σουλφοναμίδη)
Σιπροφλοξασίνη	CIP	Κινολόνες
Ναλιξιδικό οξύ	NAL	

Εκτός από τον έλεγχο ευαισθησίας ή αντοχής, ταυτόχρονα ελέγχθηκε η παραγωγή εκτεταμένου φάσματος β-λακταμασών (extended spectrum β-lactamases, ESBLs) με τη φαινοτυπική δοκιμασία συνέργειας με κλαβουλανικό οξύ (double disk synergy test, DDST).

DDS test: Γύρω από δίσκο που περιέχει κλαβουλανικό οξύ (π.χ. αμοξικιλίνη/κλαβουλανικό, AMC) τοποθετούνται δίσκοι αντιβιοτικών κεφαλοσπορίνης 3^{ης} γενιάς [κεφεπίμης (FEP) ή κεφταζιδίμης (CAZ), κεφτριαξόνης (CRO) ή κεφοταξίμης (CTX)] και αζτρεονάμης (ATM). Στο θετικό αποτέλεσμα παρατηρείται τάση αύξησης της ζώνης αναστολής (παρεκτροπή ζώνης αναστολής) προς το δίσκο του κλαβουλανικού.

2.4 Φυλογενετική τυποποίηση (Phylogrouping)

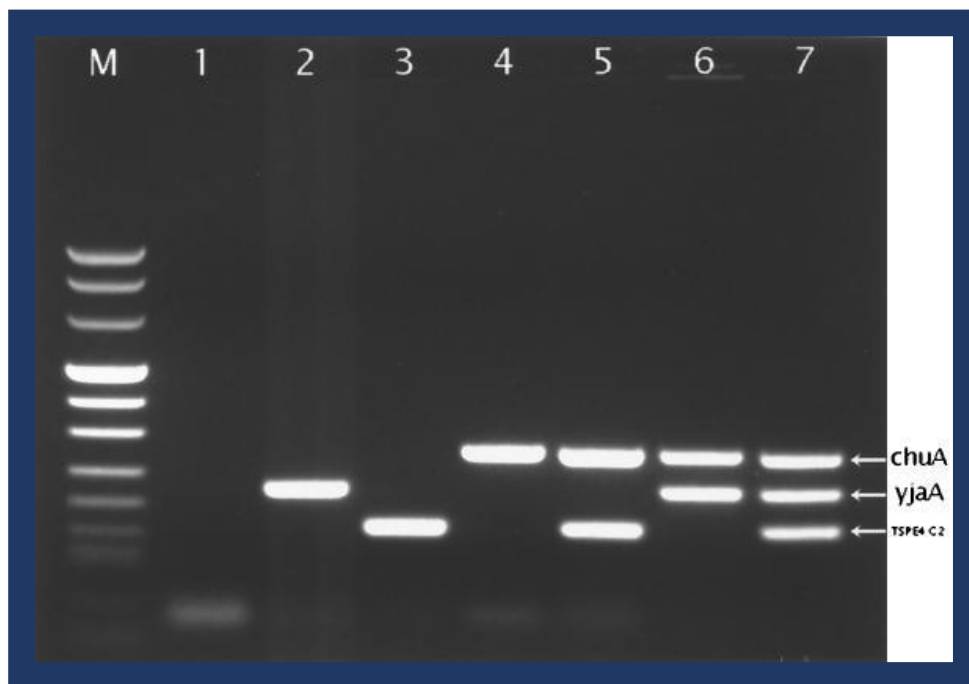
Για την κατάταξη των στελεχών (κλινικών και περιβαλλοντικών) σε φυλογενετικές ομάδες εφαρμόστηκε η μοριακή μέθοδος Phylogrouping-triplex PCR, η οποία δίνει τη δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης των γονιδίων *yjaA*, *chuA* και του γενετικού τύπου TSPE4.C2. Το μοριακό βάρος του γονιδίου *chuA* είναι 279 bp, του *yjaA* είναι 211 bp και του τμήματος TSPE4.C2 είναι 152 bp (Clermont *et al*, 2000).

Ανάλογα με το πρότυπο των ζωνώσεων (Εικόνα 10), κατά την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων, η ταξινόμηση των στελεχών στις τέσσερις ομάδες γίνεται ως εξής (Πίνακας 7):

- Ομάδα **B2**: παρουσία των γονιδίων *chuA* και *yjaA* ή και των τριών.
- Ομάδα **D**: παρουσία του γονιδίου *chuA* ή του *chuA* μαζί με τον γονιδιακό τύπο TSPE4.C2.
- Ομάδα **B1**: ανίχνευση του γενετικού τύπου TSPE4.C2, με ή χωρίς την παρουσία του *yjaA* και απουσία του γονιδίου *chuA*.
- Ομάδα **A**: ανίχνευση μόνο του γονιδίου *yjaA* ή κανενός από τα τρία.

Πίνακας 7: Συνοπτική απεικόνιση του γονιδίου ή του συνδυασμού γονιδίων που χαρακτηρίζουν τη κάθε φυλογενετική ομάδα.

Φυλογενετική ομάδα	Γονίδια
Ομάδα A	γjaA
	KANENA
Ομάδα B1	TSPE4.C2
	γjaA και TSPE4.C2
Ομάδα B2	chuA και γjaA
	chuA, γjaA, TSPE4.C2
Ομάδα D	chuA
	chuA και TSPE4.C2



Εικόνα 9: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της triplex PCR. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων βασίζεται στο πρότυπο των ζωνώσεων του κάθε δείγματος. Η υψηλότερη ζώνη αντιστοιχεί στο γονίδιο chuA, η μεσαία στο γjaA και η τρίτη (πιο χαμηλή) στο TSPE4.C2 (Εικόνα από Clermont et al, 2000).

3^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αποτελέσματα ταυτοποίησης περιβαλλοντικών στελεχών

Από τα 58 περιβαλλοντικά στελέχη μετά την βιοχημική και μοριακή ταυτοποίηση, διαπιστώθηκε ότι τα 11 (19%) δεν ήταν *E. coli* οπότε και απορρίφθηκαν από την μελέτη. Τα υπόλοιπα 47 επιβεβαιωμένα στελέχη *E. coli* μελετήθηκαν περαιτέρω.

3.2 Αποτελέσματα των επιπέδων αντοχής στα αντιβιοτικά των περιβαλλοντικών στελεχών

Στον Πίνακα 8 και στις Εικόνες 11 & 10 παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα των αντιβιογραμμάτων των 47 περιβαλλοντικών στελεχών, η ερμηνεία των οποίων βασίστηκε στα επιδημιολογικά όρια του EUCAST.

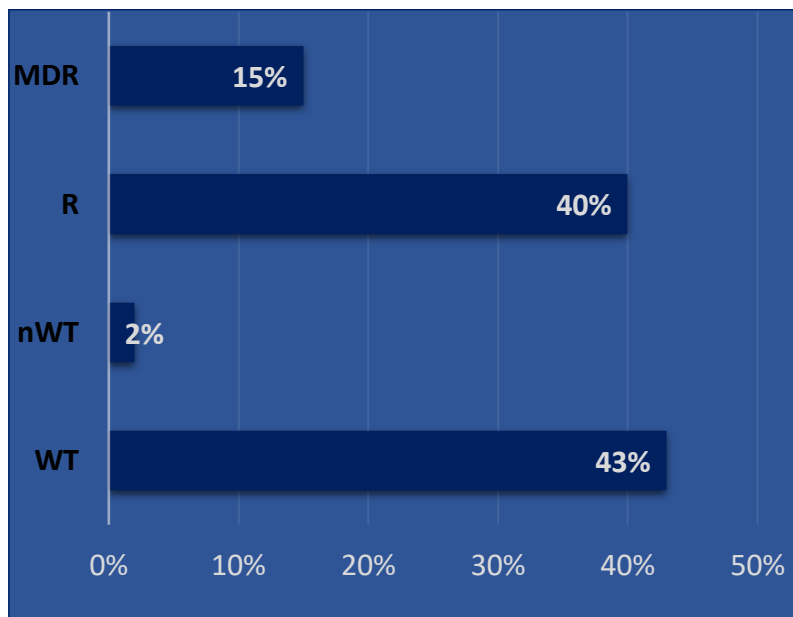
Σύμφωνα με τα παραπάνω από τα 47 στελέχη τα 19 (19/47 ή 40%) ήταν ανθεκτικά (R), τα 8 (8/47 ή 15%) πολύ-ανθεκτικά (MDR), τα 20 (20/47 ή 43%) άγριου τύπου (WT) ενώ ένα (1/47 ή 2%) μη-άγριου τύπου (nWT) (βλ. Εικόνα 11). Όπως φαίνεται στον Πίνακα 8, η πλειοψηφία των ανθεκτικών και των πολύ-ανθεκτικών στελεχών παρουσίαζαν αντοχή στις πενικιλίνες, με το μοτίβο AMP-AMC-PIP να παρατηρείται πιο συχνά. Συγκεκριμένα, το παραπάνω μοτίβο αντοχής εμφανίστηκε σε 17 (17/47 ή 36%) στελέχη, εκ των οποίων τα 12 χαρακτηρίστηκαν ως R (12/16 ή 75%) ενώ τα υπόλοιπα 5 ως MDR (5/16 ή 21%) (βλ. Εικόνα 11, Πίνακα 8).

Επιπλέον, 4 στελέχη (4/47 ή 8%), **494**, **497**, **506** και **510**, ανέδειξαν θετικό αποτέλεσμα στο DDST (Πίνακας 8), γεγονός αυτό υποδεικνύει την πιθανή ύπαρξη γονιδίων που εκφράζουν ένζυμα που υδρολύουν ευρέως φάσματος β-λακτάμες. Τα 4 DDST-θετικά στελέχη ήταν πολύ-ανθεκτικά (MDR).

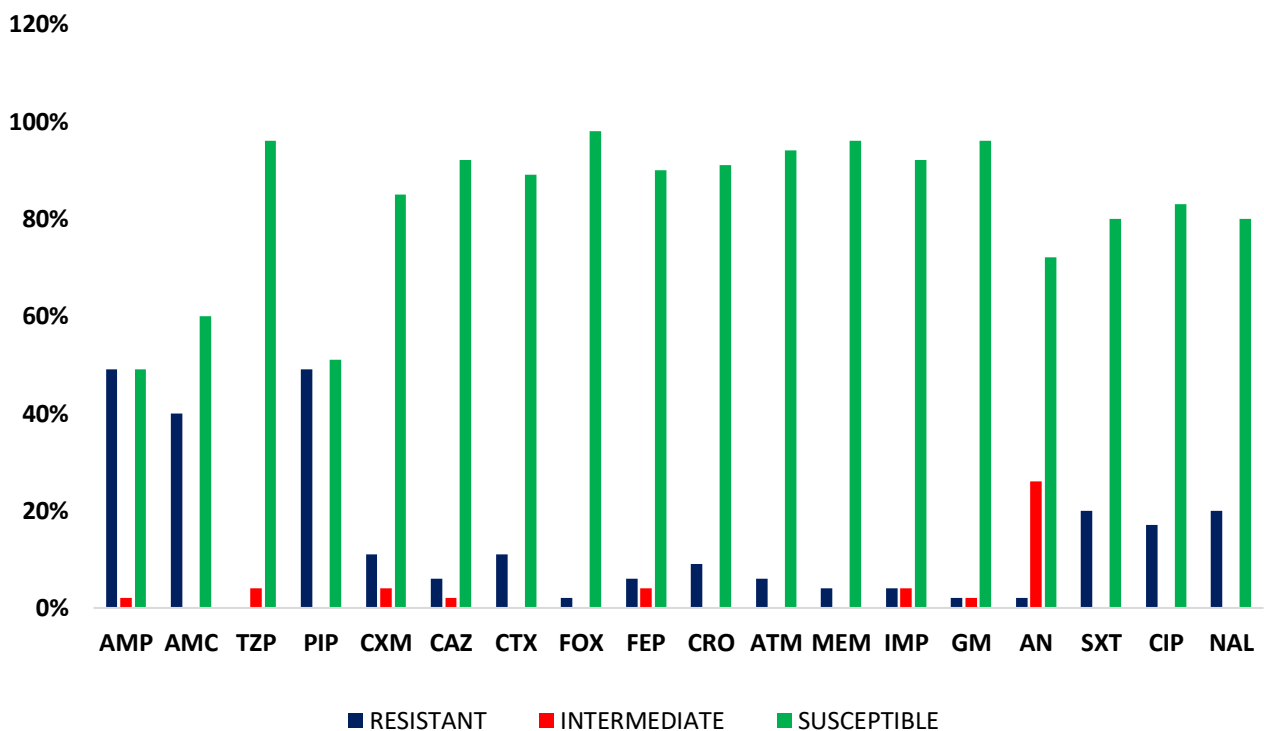
Πίνακας 8: Αποτελέσματα των επιπέδων αντοχής και DDST έλεγχου των 47 περιβαλλοντικών στελεχών

Στέλεχος	Πρότυπο Αντοχών	Προφίλ Αντοχής	DDST
482	AMP, AMC, PIP	R	
483	AMP, AMC, PIP, AN, CIP, NAL	MDR	
484	AMP, AMC, PIP, FOX, SXT, IMP	MDR	
485	AMP, AMC, PIP,	R	
486	AMP, AMC, PIP	R	
487	AMP, AMC, PIP, NAL	R	
488	AMP, AMC, PIP, NAL, CIP	R	
489	AMP, AMC, PIP	R	
490	AMP, AMC, PIP	R	
491	AMP, AMC, PIP, CXM, CTX, CRO, FEP, ATM, IMP	MDR	
492	AMP, AMC, PIP, SXT	R	
493	AMP, AMC, PIP, SXT	R	
494	AMP, AMC, PIP, CXM, CTX, CRO, SXT	MDR	+
495	AMP, PIP	R	
497	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, CIP, NAL	MDR	+
500	AMP, AMC, PIP, SXT, CIP	R	
501	AMP, AMC, PIP, GN, SXT	R	
505	AMP, PIP	R	
506	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, ATM, SXT, NAL	MDR	+
508	AMP, PIP, NAL	R	
510	AMP, PIP, CXM, CTX, CRO, NAL, SXT, CIP, NAL	MDR	+
511	KAMIA	WT	
512	KAMIA	WT	
513	KAMIA	WT	
514	KAMIA	WT	

516	KAMIA	WT	
517	KAMIA	WT	
518	CAZ	R	
519	AMP, PIP, SXT, CIP, NAL	MDR	
520	CIP, MEM	R	
522	KAMIA	WT	
523	KAMIA	WT	
525	KAMIA	WT	
526	KAMIA	WT	
527	AMC, NAL	R	
528	KAMIA	WT	
529	KAMIA	WT	
530	AMC	non-WT	
531	KAMIA	WT	
532	KAMIA	WT	
533	KAMIA	WT	
534	KAMIA	WT	
535 (2)	KAMIA	WT	
536	KAMIA	WT	
537	AMP, AMC, PIP	R	
538	KAMIA	WT	
539	KAMIA	WT	



Εικόνα 10: Ραβδόγραμμα του ποσοστού εμφάνισης των ανθεκτικών (R), πολύ-ανθεκτικών (MDR), μη-άγριου τύπου (n-WT) και άγριου τύπου (WT) στελεχών.



Εικόνα 11: Διάγραμμα με την ποσοστιαία αναλογία αντοχής ή ευαισθησίας όλων των περιβαλλοντικών στελεχών σε κάθε αντιβιοτικό ξεχωριστά. Στην πλειοψηφία παρατηρείται αυξημένη ευαισθησία.

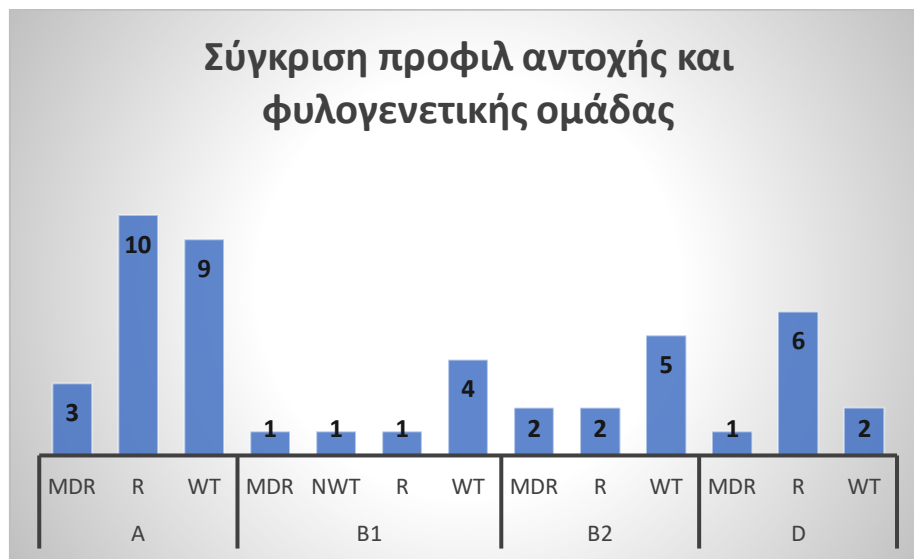
3.3. Αποτελέσματα φυλογενετικής τυποποίησης περιβαλλοντικών στελεχών

Βάσει των αποτελεσμάτων της μεθόδου τυποποίησης διαπιστώθηκε ότι η ομάδα A ήταν η επικρατέστερη μεταξύ των περιβαλλοντικών στελεχών. Παρακάτω παρουσιάζονται αναλυτικότερα τα αποτελέσματα:

- 22 στα 47 (47%) στελέχη ανήκαν στην A ομάδα
- 7 στα 47 (15%) στελέχη ανήκαν στην B1 ομάδα
- 9 στα 47 (19%) στελέχη ανήκαν στην B2 ομάδα
- 9 στα 47 (19%) στελέχη ανήκαν στην D ομάδα

Παρακάτω παρουσιάζονται αναλυτικά ο αριθμός και τα ποσοστά των ανθεκτικών (R), πολύ-ανθεκτικών (MDR), μη-άγριου τύπου (nWT) και άγριου τύπου στελεχών ανά φυλογενετική ομάδα (**Εικόνα 12**).

- ❖ Ομάδα A: 10 (10/22, 45%) χαρακτηρίστηκαν ως R, 3 (3/22, 14%) ως MDR και 9 (9/22, 41%) ως WT.
- ❖ Ομάδα B2: 2 (2/9, 22%) εμφανίστηκαν ως R, 2 (2/9, 22%) ως MDR και 5 (2/9, 56%) ως WT.
- ❖ B1 ομάδα: 1 στέλεχος χαρακτηρίστηκε ως R (1/7, 14%), 1 ως MDR (1/7, 14%), 1 ως nWT (1/7, 14%) και 4 ως WT (1/7, 58%)
- ❖ Ομάδα D: 6 (6/9, 67%) ήταν R, 1 (1/9, 11%) MDR, και 2 (2/9, 22%) WT.



Εικόνα 12: Διάγραμμα εμφάνισης προφίλ αντοχής ανά φυλογενετική ομάδα



Εικόνα 13: Γράφημα πίτας με τα ποσοστά εμφάνισης της κάθε ομάδας για τα περιβαλλοντικά στελέχη.

3.4 Αποτελέσματα ταυτοποίησης κλινικών στελεχών

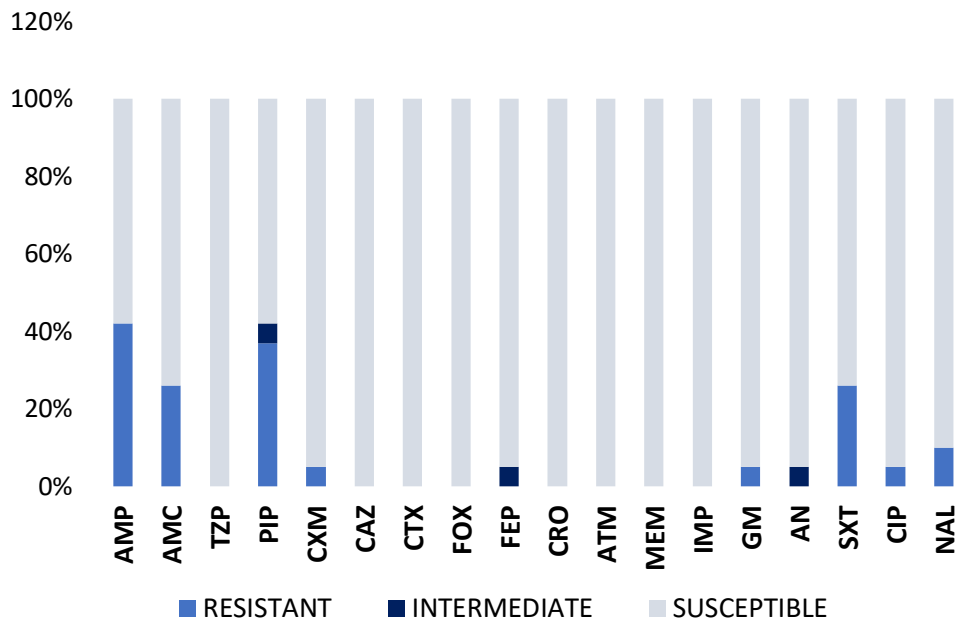
Από τα 20 στελέχη που μελετήθηκαν 1 (5%) εμφάνισε αρνητικό αποτέλεσμα στην δοκιμασία της ινδόλης οπότε και δεν συμπεριλήφθηκε στα στελέχη που μελετήθηκαν. Τα υπόλοιπα 19 υποβλήθηκαν σε έλεγχο των επιπέδων αντοχής στα αντιβιοτικά και τυποποιήθηκαν με την μοριακή μέθοδο του Phylogrouping.

3.5 Αποτελέσματα των επιπέδων αντοχής στα αντιβιοτικά των κλινικών στελεχών

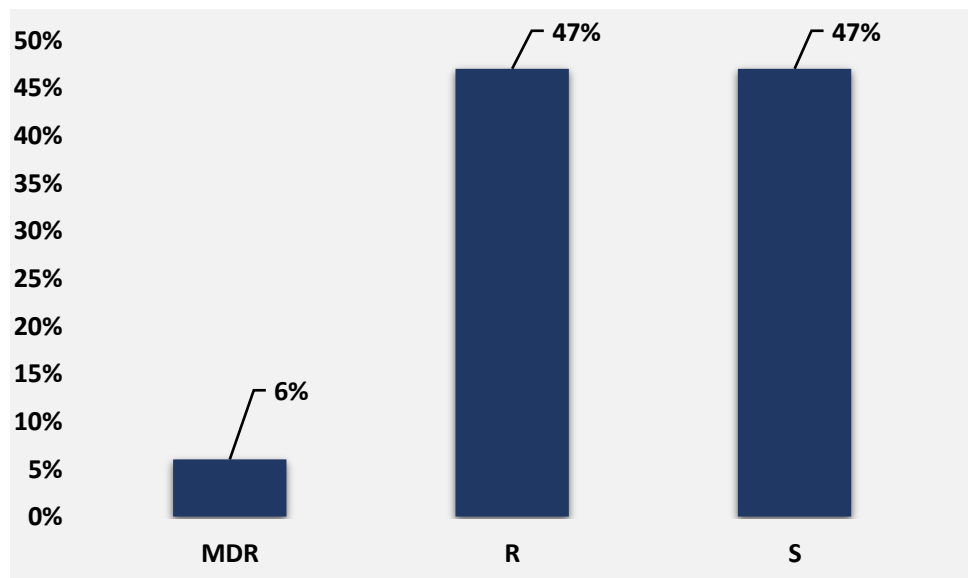
Στον Πίνακα 9 και Εικόνα 14 παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα των επιπέδων αντιμικροβιακής αντοχής των 19 κλινικών στελεχών. Σύμφωνα, λοιπόν, με τα κλινικά όρια που ορίζει το EUCAST, 9 από τα 19 στελέχη χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικά (9/19 ή 47%), ως ευαίσθητα 9 (9/19 ή 47%) ενώ ένα ως πολύ-ανθεκτικό (1/19 ή 6%) (βλ. Εικόνα 15). Από τα ανθεκτικά και πολύ-ανθεκτικά στελέχη (n=10), τα 9 (9/10 ή 90%) εμφάνισαν ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη (AMP), 7 (7/10 ή 70%) στην πιπερακιλλίνη (PIP) και 5 (5/10 ή 50%) στην αμοξικιλίνη/ κλαβουλανικό (AMC) (βλ. Εικόνα 14, Πίνακα 9). Κανένα κλινικό στέλεχος δεν εμφάνισε αντοχή σε κεφαλοσπορίνες (CAZ ,CTX, FOX, CRO) και ως εκ τούτου ούτε θετική δοκιμασία συνέργειας με κλαβουλανικό οξύ (DDST).

Πίνακας 9: Αντοχές των κλινικών στελεχών

Στέλεχος	Πρότυπο Αντοχής	Προφίλ Αντοχής
241	AMP, PIP	R
243	KAMIA	S
245	AMP, AMC, PIP, SXT	R
246	AMP, AMC, PIP	R
249	AMC, CXM	R
253	KAMIA	S
254	AMP, AMC, PIP	R
255	KAMIA	S
259	KAMIA	S
261	KAMIA	S
264	SXT, CIP, NAL	R
265	AMP, AMC, PIP, GM, SXT	MDR
267	KAMIA	S
269	KAMIA	S
272	AMP, PIP, SXT	R
276	KAMIA	S
278	AMP, PIP	R
281	AMP, SXT	R
284	KAMIA	S



Εικόνα 14: Διάγραμμα ποσοτών αντοχής ή ευαισθησίας των κλινικών στελεχών σε κάθε αντιβιοτικό. Στα περισσότερα παρατηρείται ευαισθησία.

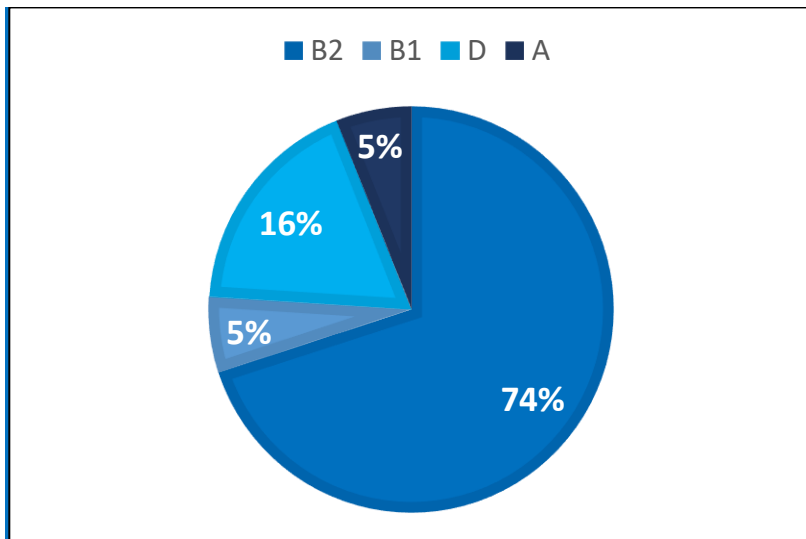


Εικόνα 15: Γράφημα που παρουσιάζει τη συχνότητα εμφάνισης πολύ-ανθεκτικών (MDR), ανθεκτικών (R) και ευαίσθητων (S) κλινικών στελεχών

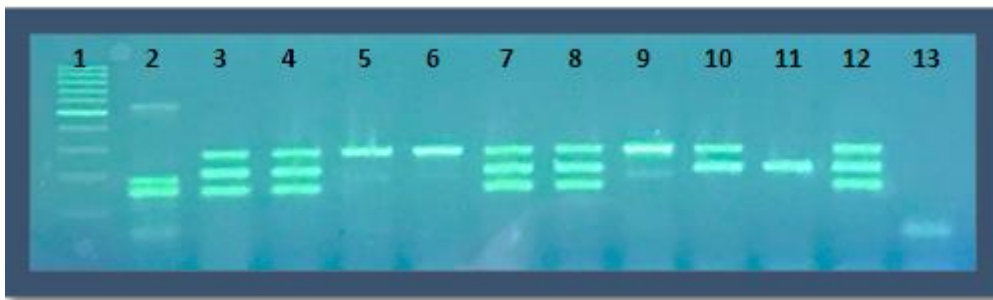
3.6 Αποτελέσματα φυλογενετικής τυποποίησης κλινικών στελεχών

Η ταξινόμηση των κλινικών στις φυλογενετικές ομάδες A, B1, B2 και D ολοκληρώθηκε βάσει του Πίνακα 7 και της Εικόνας 10. Η πλειοψηφία των κλινικών στελεχών, το 74 % (14 στα 19) κατατάχθηκαν στην ομάδα B2. Ακολούθησε η ομάδα D, με συχνότητα 16% (3 στα 19) και τέλος οι ομάδες B1 και A με ποσοστό εμφάνισης 1/ 19 (5%), αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 10 και στη Εικόνα 16. Η Εικόνα 17 απεικονίζει τα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης.

Πίνακας 10: Φυλογενετικές ομάδες των κλινικών στελεχών			
Αριθμός Στελέχους	Φυλογενετική Ομάδα	Αριθμός Στελέχους	Φυλογενετική ομάδα
241	B2	264	B1
243	A	265	B2
245	B2	267	B2
246	B2	269	D
249	B2	272	D
253	B2	276	B2
254	B2	278	B2
255	B2	281	D
259	B2	284	B2
261	B2		



Εικόνα 16: Γράφημα πίτας με τα ποσοστά εμφάνισης της κάθε ομάδας για τα κλινικά δείγματα της μελέτης.



Εικόνα 17: Παρατήρηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης σε τράπεζα ακτινοβολίας UV. Στην θέση 1 βρίσκεται ο Ladder (μάρτυρας), στις θέσεις 2-11 βρίσκονται κλινικά στελέχη *E. coli*, στην θέση 12 ο θετικός μάρτυρας και στην θέση 13 ο αρνητικός. (Εικόνα από προσωπικό αρχείο)

4^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ/ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο βιολογικός καθαρισμός και η επαναχρησιμοποίηση λυμάτων μετά την επεξεργασία τους για άρδευση των καλλιεργειών είναι μια διαδικασία που εφαρμόζεται κατά κόρον σε όλο τον πλανήτη. Πληθώρα μελετών υποδεικνύουν ότι η πρακτική αυτή μπορεί να προκαλέσει προβλήματα στο περιβάλλον και την δημόσια υγεία. Σοβαρότερο κίνδυνο φαίνεται να αποτελούν τα παθογόνα στελέχη που βρίσκονται στα λύματα και μεταδίδονται στον άνθρωπο προκαλώντας λοιμώξεις, ενώ ακόμα πιο δυσχερής γίνεται η κατάσταση όταν εμφανίζουν και αντοχές στα αντιβιοτικά.

Η *E.coli* είναι ένα από τα πιο κοινά βακτήρια που απομονώνεται από δείγματα λύματος ενώ ταυτόχρονα αποτελεί βασικό δείκτη κοπρανώδους μόλυνσης των υδάτων. Παρόλο που δεν διαθέτει εγγενής μηχανισμούς αντοχής συνεχώς ανιχνεύονται ανθεκτικά και πολυ-ανθεκτικά στελέχη σε αντιβιοτικά ύψιστης κλινικής σημασίας, κάτι που επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής εργασίας. Ειδικότερα τα μεγαλύτερα ποσοστά αντοχής παρατηρήθηκαν στα αντιβιοτικά AMP, AMC, PIP και SXT (Εικόνα 12 και Εικόνα 14), φάρμακα που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη για την αντιμετώπιση ουρολοιμώξεων και βακτηριαμιών. Τα πρότυπα αντοχής των στελεχών διαφορετικής προέλευσης παρουσίασαν ομοιότητες, εύρημα απολύτως αναμενομένο, καθότι το νοσοκομείο (Γενικό Νοσοκομείο Λιβαδειάς) επικοινωνεί με το εξωνοσοκομειακό περιβάλλον. Ένας τρόπος επικοινωνίας είναι μέσω του λύματος. Συγκεκριμένα, το λύμα από το υπο μελέτη νοσοκομείο καταλήγει και επεξεργάζεται στο Σταθμό Επεξεργασίας Λυμάτων της Λιβαδειάς.

Η κατάταξη των στελεχών σε φυλογενετικές ομάδες με τη μέθοδο του phylogrouping, συνέβαλε στην αδρή εκτίμηση των γονοτύπων που κυκλοφορούν στα υπο μελέτη περιβάλλοντα (λύμα και νοσοκομείο). Η πλειοψηφία των κλινικών στελεχών κατατάχθηκαν στην ομάδα B2, (Εικόνα 16), ενώ τα περισσότερα περιβαλλοντικά στην ομάδα A (Εικόνα 13). Ωστόσο, δεν ήταν εφικτός ο συσχετισμός προφίλ αντοχής και

φυλογενετικής ομάδας. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, τα περισσότερα παθογόνα στελέχη ταξινομούνται στις φυλογενετικές ομάδες B2 και D, λόγω της ύπαρξης του γονιδίου chuA (γονιδίο παθογονικότητας). Επομένως, η παρουσία στελεχών B2 στο λύμα (**Εικόνα 13**) και στο ευρύτερο περιβάλλον (έδαφος, ποτάμια κ.τ.λ) εκθέτει σε επιπλέον κίνδυνο τον άνθρωπο και τα ζώα.

Είναι λοιπόν, απόλυτα φυσιολογικό να υπάρχει προβληματισμός για την ανοδική πορεία εμφάνισης παθογόνων και παράλληλα ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στελεχών με ένα κύριο ερώτημα να τίθεται τα τελευταία χρόνια: *μέχρι πότε θα μπορούμε να αντιμετωπίζουμε αποτελεσματικά παθογόνα βακτήρια με σκοπό την προστασία της δημόσιας υγείας;*

Καταρχήν η μέθοδος επεξεργασίας και καθαρισμού των λυμάτων θα πρέπει να επανεξεταστεί ή να βελτιωθεί με προσθήκη νέων πρακτικών για την προστασία του υδάτινου οικοσυστήματος και κατ' επέκταση όσων έρχονται σε άμεση επαφή με αυτό. Στην συνέχεια θα πρέπει να υπάρξει ενημέρωση ως προς τα αντιβιοτικά και την σωστή χρήση αυτών, ιδιαίτερα σε επαγγελματίες υγείας. Τέλος θα ήταν καλό να γίνουν περισσότερες μελέτες που αφορούν το μικροβίωμα του υδάτινου περιβάλλοντος καθώς επίσης και ανάπτυξη μεθοδολογιών εκτίμησης κινδύνου ειδικά σε ότι αφορά την ανάπτυξη αντιμικροβιακής αντοχής.

Βιβλιογραφία

- Ajawatanawong P. (2017). Molecular Phylogenetics: Concepts for a Newcomer. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 160, pp.185–196.
- Aldred, K. J., Kerns, R. J., & Osheroff, N. (2014). Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, 53(10), pp.1565–1574.
- Andam, C. P., Fournier, G. P., & Gogarten, J. P. (2011). Multilevel populations and the evolution of antibiotic resistance through horizontal gene transfer. *FEMS microbiology reviews*, 35(5), pp.756–767.
- Antibiotics (χ.χ) Στο *Merriem-Webster dictionary online*. Ανακτήθηκε από: <https://www.merriam-webster.com/dictionary/antibiotics>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), pp.71–79.
- Baquero, F., & Martínez, J. L. (2000). MINIREVIEW Mutation Frequencies and Antibiotic Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(7), pp.1771–1777.
- Begg, E. J., & Barclay, M. L. (1995). Aminoglycosides--50 years on. *British journal of clinical pharmacology*, 39(6), pp.597–603.
- Beghain, J., Bridier-Nahmias, A., Le Nagard, H., Denamur, E., & Clermont, O. (2018). ClermonTyping: an easy-to-use and accurate *in silico* method for *Escherichia* genus strain phylotyping. *Microbial genomics*, 4(7), e000192.
- Blattner, F. R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., & Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5331), pp.1453–1462.
- Bush, N. G., Diez-Santos, I., Abbott, L. R., & Maxwell, A. (2020). Quinolones: Mechanism, Lethality and Their Contributions to Antibiotic Resistance. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(23), p.5662.
- C Reygaert, W. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), pp.482–501.
- Cabezón, E., Ripoll-Rozada, J., Peña, A., de la Cruz, F., & Arechaga, I. (2015). Towards an integrated model of bacterial conjugation. *FEMS microbiology reviews*, 39(1), pp.81–95.
- Chaudhuri, R. R., & Henderson, I. R. (2012). The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 12(2), pp.214–226.
- Cho, H., Uehara, T., & Bernhardt, T. G. (2014). Beta-lactam antibiotics induce a lethal malfunctioning of the bacterial cell wall synthesis machinery. *Cell*, 159(6), pp.1300–1311.
- Christaki, E., Marcou, M., & Tofarides, A. (2020). Antimicrobial Resistance in Bacteria : Mechanisms , Evolution , and Persistence. *Journal of Molecular Evolution*, 88(1), pp.26–40.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), pp.4555–4558.

- Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., & Gordon, D. M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), pp.58–65.
- Connor, E. E. (1998). Sulfonamide antibiotics. *Primary Care Update for Ob/Gyns*, 5(1), pp.32–35
- Coura, F. M., Diniz, S., Silva, M. X., Mussi, J. M., Barbosa, S. M., Lage, A. P., & Heine-mann, M. B. (2015). Phylogenetic Group Determination of *Escherichia coli* Iso-lated from Animals Samples. *TheScientificWorldJournal*, 2015, 258424.
- Cox, G., & Wright, G. D. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 303(6-7), pp.287–292.
- Cristea, V. C., Gheorghe, I., Czobor Barbu, I., Popa, L. I., Ispas, B., Grigore, G. A.,.....& Popa, I. M. (2019). Snapshot of Phylogenetic Groups, Virulence, and Resistance Markers in *Escherichia coli* Uropathogenic Strains Isolated from Outpatients with Urinary Tract Infections in Bucharest, Romania. *BioMed research interna-tional*, 2019, 5712371.
- Drlica, K., & Zhao, X. (1997). DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quin-olones. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 61(3), pp.377–392.
- Drlica, K., Hiasa, H., Kerns, R., Malik, M., Mustaev, A., & Zhao, X. (2009). Quinolones: Action and Resistance Updated. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 9(11), pp.981–998.
- Falagas, M. E., & Kasiakou, S. K. (2005). Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 40(9), pp.1333–1341.
- Farber J. M. (1996). An Introduction to the Hows and Whys of Molecular Typ-ing . *Journal of food protection*, 59(10), pp.1091–1101.
- Fernández, L., & Hancock, R. E. (2012). Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clinical microbiology reviews*, 25(4), pp.661–681.
- Fernández, L., Breidenstein, E. B., & Hancock, R. E. (2011). Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. *Drug resistance updates : reviews and com-mentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 14(1), pp.1–21.
- Georgopapadakou N. H. (1993). Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to beta-lactams. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 37(10), pp.2045–2053.
- Gleckman, R., Blagg, N., & Joubert, D. W. (1981). Trimethoprim: mechanisms of ac-tion, antimicrobial activity, bacterial resistance, pharmacokinetics, adverse reac-tions, and therapeutic indications. *Pharmacotherapy*, 1(1), pp.14–20.
- Hartl, D. L., & Dykhuizen, D. E. (1984). The population genetics of *Escherichia coli*. *An-nual Review of Genetics*, 18(3), pp.31–68.

- Hasman, H., Saputra, D., Sicheritz-Ponten, T., Lund, O., Svendsen, C. A., Frimodt-Møller, N., & Aarestrup, F. M. (2014). Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples. *Journal of clinical microbiology*, 52(1), pp.139–146.
- Heeb, S., Fletcher, M. P., Chhabra, S. R., Diggle, S. P., Williams, P., & Cámara, M. (2011). Quinolones: from antibiotics to autoinducers. *FEMS microbiology reviews*, 35(2), pp.247–274.
- Huddleston J. R. (2014). Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. *Infection and drug resistance*, 7, pp.167–176.
- Jang, J., Di, D. Y., Lee, A., Unno, T., Sadowsky, M. J., & Hur, H. G. (2014). Seasonal and genotypic changes in escherichia coli phylogenetic groups in the Yeongsan River basin of South Korea. *PloS one*, 9(7), e100585.
- Javed, S., Mirani, Z. A., & Pirezada, Z. A. (2021). Phylogenetic Group B2 Expressed Significant Biofilm Formation among Drug Resistant Uropathogenic Escherichia coli. *The Libyan journal of medicine*, 16(1), 1845444.
- Kalkut G. (1998). Sulfonamides and trimethoprim. *Cancer investigation*, 16(8), pp.612–615.
- Kazemnia, A., Ahmadi, M., & Dilmaghani, M. (2014). Antibiotic resistance pattern of different Escherichia coli phylogenetic groups isolated from human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Iranian Biomedical Journal*, 18(4), pp.219–224.
- Khairy, R. M., Mohamed, E. S., Abdel Ghany, H. M., & Abdelrahim, S. S. (2019). Phylogenetic classification and virulence genes profiles of uropathogenic E. coli and diarrhegenic E. coli strains isolated from community acquired infections. *PloS one*, 14(9), e0222441.
- Klotz, I. M. (1944). The Mode of Action of Sulfonamides. *Journal of the American Chemical Society*, 66(3), pp.459–464
- Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., & Connolly, L. E. (2016). Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(6), a027029.
- Landman, D., Georgescu, C., Martin, D. A., & Quale, J. (2008). Polymyxins revisited. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(3), pp.449–465.
- Larsen, M. V., Cosentino, S., Rasmussen, S., Friis, C., Hasman, H., Marvig, R. L., Jelsbak, L., Sicheritz-Pontén, T., Ussery, D. W., Aarestrup, F. M., & Lund, O. (2012). Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *Journal of clinical microbiology*, 50(4), pp.1355–1361.
- Lepuschitz, S., Weinmaier, T., Mrazek, K., Beisken, S., Weinberger, J., & Posch, A. E. (2020). Analytical Performance Validation of Next-Generation Sequencing Based Clinical Microbiology Assays Using a K-mer Analysis Workflow. *Frontiers in microbiology*, 11(8), 1883.
- LEWIN B. (2004), *Genes VIII*, Αλεξανδρούπολη : Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Μπάσδρα Ι. και ΣΙΑ .
- Li, B., Sun, J. Y., Han, L. Z., Huang, X. H., Fu, Q., & Ni, Y. X. (2010). Phylogenetic groups and pathogenicity island markers in fecal Escherichia coli isolates from asymptomatic humans in China. *Applied and environmental microbiology*, 76(19), pp.6698–6700.

- Lin, T., Lin, L., & Zhang, F. (2014). Review on Molecular Typing Methods of Pathogens. *Open Journal of Medical Microbiology*, 4(3), pp.147–152.
- Liu, Y., & Breukink, E. (2016). The Membrane Steps of Bacterial Cell Wall Synthesis as Antibiotic Targets. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 5(3), p.28.
- Lorenz, M. G., & Wackernagel, W. (1994). *Bacterial Gene Transfer by Natural Genetic Transformation in the Environment*. 58(3), pp.563–602.
- Lupo, A., Coyne, S., & Berendonk, T. U. (2012). Origin and evolution of antibiotic resistance: The common mechanisms of emergence and spread in water bodies. *Frontiers in Microbiology*, 3(1), pp.1–13
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G.,....., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(3), pp.268–281.
- Maiden M. C. (1998). Horizontal genetic exchange, evolution, and spread of antibiotic resistance in bacteria. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 27 Suppl 1, S12–S20.
- Martinez J. L. (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug discovery today. Technologies*, 11, pp.33–39.
- Martinez, O. V., Gratzner, H. G., Malinin, T. I., & Ingram, M. (1982). The effect of some beta-lactam antibiotics on Escherichia coli studied by flow cytometry. *Cytometry*, 3(2), pp.129–133.
- Mathers, A. J., Peirano, G., & Pitout, J. D. (2015). The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clinical microbiology reviews*, 28(3), pp.565–591.
- Maurer, J. J., Lee, M. D., Lobsinger, C., Brown, T., Maier, M., & Thayer, S. G. (1998). Molecular typing of avian Escherichia coli isolates by random amplification of polymorphic DNA. *Avian diseases*, 42(3), pp.431–451.
- Mingeot-Leclercq, M. P., Glupczynski, Y., & Tulkens, P. M. (1999). Aminoglycosides: Activity and resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(4), pp.727–737.
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum*, 4(2), 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
- MURRAY, P., RESENTHAL, S., & PFALLER, A. (2016). *ΙΑΤΡΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ*(2^η έκδ.). Αθήνα: Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε.
- Naeem, A., Badshah, S. L., Muska, M., Ahmad, N., & Khan, K. (2016). The Current Case of Quinolones: Synthetic Approaches and Antibacterial Activity. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(4), p.268.
- Nagarajan R. (1991). Antibacterial activities and modes of action of vancomycin and related glycopeptides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 35(4), pp.605–609.

- Neoh, H. M., Tan, X. E., Sapri, H. F., & Tan, T. L. (2019). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the "gold standard" for bacteria typing and current alternatives. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, *74*, 103935.
- NEWTON, B. A. (1956). The properties and mode of action of the polymyxins. *Bacteriological Reviews*, *20*(1), pp.14–27
- Nikolaidis, I., Favini-Stabile, S., & Dessen, A. (2014). Resistance to antibiotics targeted to the bacterial cell wall. *Protein science : a publication of the Protein Society*, *23*(3), pp.243–259.
- Nowrouzian, F. L., Clermont, O., Edin, M., Östblom, A., Denamur, E., Wold, A. E., & Adlerberth, I. (2019). Escherichia coli B2 Phylogenetic Subgroups in the Infant Gut Microbiota: Predominance of Uropathogenic Lineages in Swedish Infants and Enteropathogenic Lineages in Pakistani Infants. *Applied and environmental microbiology*, *85*(24), e01681-19
- Olyphant, C. M., & Green, G. M. (2002). Quinolones: a comprehensive review. *American family physician*, *65*(3), pp.455–464.
- Olyphant, C. M., Green, G. M., Drlica, K., Hiasa, H., Kerns, R., Malik, M.,....., & Khan, K. (2009). The current case of quinolones: Synthetic approaches and antibacterial activity. *American Family Physician*, *35*(4), pp.455–464.
- Pérez-Losada, M., Cabezas, P., Castro-Nallar, E., & Crandall, K. A. (2013). Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, *16*, pp.38–53.
- Picard, B., Garcia, J. S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E., Elion, J., & Denamur, E. (1999). The link between phylogeny and virulence in Escherichia coli extraintestinal infection. *Infection and immunity*, *67*(2), pp.546–553.
- Poirel, L., Jayol, A., & Nordmann, P. (2017). Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clinical microbiology reviews*, *30*(2), pp.557–596.
- Ranjbar, R., Karami, A., Farshad, S., Giammanco, G. M., & Mammina, C. (2014). Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide. *The new microbiologica*, *37*(1), pp.1–15.
- Roberts M. C. (2003). Tetracycline therapy: update. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *36*(4), pp.462–467.
- Sabat, A. J., Budimir, A., Nashev, D., Sá-Leão, R., van Dijk, J. M., Laurent, F., Grundmann, H., & Friedrich, A. W. (2013). Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Eurosurveillance*, *18*(4), pp.1–15.
- Sandoval-Motta, S., & Aldana, M. (2016). Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: a systems biology perspective. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine*, *8*(3), pp.253–267.
- Sarkar, P., Yarlagadda, V., Ghosh, C., & Haldar, J. (2017). A review on cell wall synthesis inhibitors with an emphasis on glycopeptide antibiotics. *MedChemComm*, *8*(3), pp.516–533.

- Schneider, C. L. (2021). Bacteriophage-Mediated Horizontal Gene Transfer: Transduction. In *Bacteriophages*. pp.151-183
- Sköld O. (2001). Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Veterinary research*, 32(3-4), pp.261–273.
- Smati, M., Clermont, O., Le Gal, F., Schichmanoff, O., Jauréguy, F., Eddi, A., Denamur, E., Picard, B., & Coliville Group (2013). Real-time PCR for quantitative analysis of human commensal *Escherichia coli* populations reveals a high frequency of subdominant phylogroups. *Applied and environmental microbiology*, 79(16), pp.5005–5012.
- Stavri, M., Piddock, L. J., & Gibbons, S. (2007). Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 59(6), pp.1247–1260.
- Stoppe, N. C., Silva, J. S., Carlos, C., Sato, M., Saraiva, A. M., Ottononi, L., & Torres, T. T. (2017). Worldwide Phylogenetic Group Patterns of *Escherichia coli* from Commensal Human and Wastewater Treatment Plant Isolates. *Frontiers in microbiology*, 8, 2512.
- Tagini, F., & Greub, G. (2017). Bacterial genome sequencing in clinical microbiology: a pathogen-oriented review. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 36(11), pp. 2007–2020.
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., & Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature reviews. Microbiology*, 8(3), pp.207–217.
- Tenover F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American journal of infection control*, 34(5 Suppl 1), S3–S73.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of clinical microbiology*, 33(9), pp.2233–2239.
- Tipper, D. J., & Strominger, J. L. (1965). Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 54(4), pp.1133–1141.
- Tomazi, T., Coura, F. M., Gonçalves, J. L., Heinemann, M. B., & Santos, M. V. (2018). Antimicrobial susceptibility patterns of *Escherichia coli* phylogenetic groups isolated from bovine clinical mastitis. *Journal of dairy science*, 101(10), pp.9406–9418.
- Tooke, C. L., Hinchliffe, P., Bragginton, E. C., Colenso, C. K., Hirvonen, V., Takebayashi, Y., & Spencer, J. (2019). β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *Journal of molecular biology*, 431(18), pp.3472–3500.
- TORTORA, FUNKE, & CASE (2017), ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ, (2^η έκδ.), Κύπρος: BROKEN HILL PUBLISHERS LTD
- Touchon, M., Perrin, A., de Sousa, J., Vangchhia, B., Burn, S., O'Brien, C. L., Denamur, E., Gordon, D., & Rocha, E. P. (2020). Phylogenetic background and habitat drive the genetic diversification of *Escherichia coli*. *PLoS genetics*, 16(6), e1008866.

- Trimble, M. J., Mlynářčík, P., Kolář, M., & Hancock, R. E. (2016). Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(10), a025288.
- van Belkum, A., & Dunne, W. M., Jr (2013). Next-generation antimicrobial susceptibility testing. *Journal of clinical microbiology*, 51(7), pp.2018–2024.
- van Hoek, A. H., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A. P., & Aarts, H. J. (2011). Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Frontiers in microbiology*, 2, 203.
- von Wintersdorff, C. J., Penders, J., van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., van Alphen, L. B., Savelkoul, P. H., & Wolffs, P. F. (2016). Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Frontiers in microbiology*, 7, p.173.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A.,....., & Kuiper, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research*, 23(21), pp.4407–4414.
- Woodford, N., & Ellington, M. J. (2007). The emergence of antibiotic resistance by mutation. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(1), pp.5–18.
- Wu, F., & Della-Latta, P. (2002). Molecular typing strategies. *Seminars in Perinatology*, 26(5), pp.357–366.
- Γαζούλη Μ. (2002). ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ, ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *Klebsiella pneumoniae* ΣΤΑ Β-ΛΑΚΤΑΜΙΚΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ (Διδακτορική Διατριβή). Διαθέσιμο από: Εθνικό Αρχείο Διδακτορικών Διατριβών.
- Κυριαζής, Ι. Δ., Καμπούρης, Μ. Ε., Πουλάς, Κ., & Πατρινός, Γ. Π. (2014). Μοριακές Τεχνικές Για Την Ανίχνευση Και Το Χαρακτηρισμό Μικροοργανισμών. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής*, 31(1), pp.23–40.
- Νικολάου, Χ., Χουβαρδάς, Π. 2015. Φυλογενετική Ανάλυση. [Κεφάλαιο Συγγράμματος]. Στο Νικολάου, Χ., Χουβαρδάς, Π. 2015. *Υπολογιστική βιολογία*. [ηλεκτρ. βιβλ.] Αθήνα:Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών. κεφ 7. Διαθέσιμο στο: <http://hdl.handle.net/11419/1584>
- Χατζηπαναγίωτου Σ., & Λεγάκης Ν,(2013), *Τα μικρόβια και ο άνθρωπος*, Αθήνα: αυτοεκδ.
- Χριστοδούλου Μ. (2012)., ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΑΝΤΙΒΙΟΑΝΤΟΧΗΣ ΤΗΣ *E. COLI* ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΕ ΑΠΟ ΖΩΑ ΚΑΙ ΕΡΓΑΤΕΣ ΚΤΗΝΟΤΡΟΦΙΚΩΝ ΜΟΝΑΔΩΝ, (Μεταπτυχιακή εργασία), Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα.
- Huijbers, P., Larsson, D., & Flach, C. F. (2020). Surveillance of antibiotic resistant *Escherichia coli* in human populations through urban wastewater in ten European countries. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 261, 114200.
- Baban T.S. (2017), Prevalence and Antimicrobial Susceptibility Pattern of Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infection among Infants and Young Children in Erbil City, <https://www.researchgate.net>
- WHO, Newsroom, One health approach, www.who.int/newsroom/q-a-detail/one-health
- CDC, One health, <https://www.cdc.gov/onehealth/index.html>

Ghafourian, S., Sadeghifard, N., Soheili, S., & Sekawi, Z. (2014). Extended spectrum beta-lactamases: Definition, classification and epidemiology. *Current Issues in Molecular Biology*, 17(1), pp.11–22.

Yang, D., Qiu, Z., Shen, Z., Zhao, H., Jin, M., Li, H., Liu, W., & Li, J. W. (2017). The Occurrence of the Colistin Resistance Gene *mcr-1* in the Haihe River (China). *International journal of environmental research and public health*, 14(6), p.576.

