



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
UNIVERSITY OF WEST ATTICA

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη επιπέδων αντοχής στα αντιβιοτικά και μοριακής τυποποίησης κλινικών
στελεχών *Escherichia coli***

Όνοματεπώνυμο Φοιτητριών (ΑΜ)

Χρυσάνθη Δανάλια (62117085) & Ελένη Χρυσοχόου (62117037)

Όνοματεπώνυμο Επιβλέποντα: Απόστολος Μπελούκας

Αθήνα, 2022



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
UNIVERSITY OF WEST ATTICA

UNIVERSITY OF WEST ATTICA

FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES

SECTION OF MEDICAL LABORATORIES

DISSERTATION

Study of antibiotic resistance levels and molecular standardization of *Escherichia coli* clinical strains

Students Name (CM)

Chrysanthi Danalia (62117085) & Eleni Chrysochoou (62117037)

Name of Supervisor: Apostolos Beloukas

Athens, 2022

ΜΕΛΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Απόστολος Μπελούκας

Όλγα Παππά

Χρυσούλα Διολή

Δήλωση συγγραφέα προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας

Οι κάτωθι υπογεγραμμένοι Χρυσάνθη Δανάλια του Κωνσταντίνου, με αριθμό μητρώου 62117085 και Ελένη Χρυσοχόου του Πασχάλη, με αριθμό μητρώου 62117037, φοιτήτριες του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνουμε ότι:

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

Ονόματα φοιτητριών

Χρυσάνθη Δανάλια & Ελένη Χρυσοχόου

Υπογραφές φοιτητριών

A handwritten signature in black ink, appearing to be the name 'Danaia' written in a cursive, stylized script. The signature is enclosed within a hand-drawn, irregular circular border.

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής στο Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας (Ε.Μ.Μ.Α) με υπεύθυνο καθηγητή τον Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του ΠΑΔΑ, Δρ. Απόστολο Μπελούκα, τον οποίο θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε για την εμπιστοσύνη που μας έδειξε με την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος.

Θερμές ευχαριστίες στην υποψήφια διδάκτορα του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, Χρυσούλα Διολή, η οποία ήταν πάντα δίπλα μας να μας καθοδηγεί, να μας στηρίζει, να μας συμβουλεύει και να μοιράζεται τις γνώσεις της μαζί μας ανά πάσα στιγμή με υπομονή και προθυμία.

Τέλος, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τις οικογένειές μας και τους φίλους μας από καρδιάς για την υποστήριξη, την κατανόηση και την αγάπη που μας έδωσαν κατά την διάρκεια της εργασίας καθώς επίσης που είναι πάντα παρόντες σε όλες τις σημαντικές στιγμές της ζωής μας.

Περίληψη

Η εξέλιξη της επιστήμης με την ανακάλυψη των αντιβιοτικών συνέβαλε στην πρόληψη και κυρίως στην θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων. Τα αντιβιοτικά είναι απαραίτητα για τον έλεγχο και τη θεραπεία λοιμώξεων του ανθρώπου. Ωστόσο, η αλόγιστη και μη ορθολογική χρήση τους οδήγησε στην αύξηση και στη διασπορά βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά. Ως εκ τούτου, η ευεργετική δράση των αντιβιοτικών απειλείται λόγω αυτής της κατάστασης. Το φαινόμενο της αντιμικροβιακής αντοχής δεν περιορίζεται μόνο στο νοσοκομειακό αλλά και στο ευρύτερο περιβάλλον. Ωστόσο, οι χώροι υγειονομικής περίθαλψης μπορούν να θεωρηθούν ως πηγή ανθεκτικών και πολύ-ανθεκτικών βακτηρίων και για αυτό κρίνεται απαραίτητη η συστηματική επιτήρηση, στοχεύοντας στο έλεγχο και τον περιορισμό του φαινομένου. Το βακτήριο *Escherichia coli* (*E. coli*) είναι ένα Gram αρνητικό βακτήριο το οποίο αποτελεί συχνή αιτία ουρολοιμώξεων, βακτηριαιμιών αλλά και γαστρεντερίτιδων, τόσο στο νοσοκομειακό χώρο όσο και στη κοινότητα. Η εμφάνιση και η διασπορά ανθεκτικών στελεχών *E. coli* στο ενδονοσοκομειακό περιβάλλον έχει προκαλέσει μεγάλη ανησυχία στην επιστημονική κοινότητα. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας αφορούσε τη μελέτη των επιπέδων αντοχής, την ανίχνευση μηχανισμών που προσδίδουν ανθεκτικότητα καθώς και τη μοριακή φυλογενετική τυποποίηση κλινικών στελεχών *E.coli*. Συνολικά μελετήθηκαν 139 στελέχη που είχαν συλλεχθεί από το Γενικό Νοσοκομείο Λιβαδειάς. Για τη φυλογενετική ταξινόμηση εφαρμόστηκε η μοριακή μέθοδο του Phylogrouping-triplex PCR. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η πλειοψηφία των στελεχών (75/139 ή 54%) εμφάνισε αντοχή σε τουλάχιστον ένα αντιβιοτικό παράγοντα. Σε 8 στελέχη ανιχνεύτηκαν γονίδια αντοχής της ομάδας CTX-M-group 1 ενώ σε 3 στελέχη ήταν ταυτόχρονα θετικά και για το γονίδιο της ομάδας TEM-A. Σύμφωνα με τη φυλογενετική τυποποίηση τους, τα στελέχη κατατάχθηκαν σε 4 φυλογενετικές ομάδες (A, B1, B2 και D), με την ομάδα B2 να είναι η επικρατέστερη.

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

Abstract

The evolution of science combined with the discovery of antibiotics has contributed to the prevention and especially to treatment of infections caused by bacteria. Antibiotics are essentials for the control and treatment of human infections. However, the irrational use of antibiotics has led to the growth and spread of resistant (AMR) bacteria. Therefore, the benefits of antibiotics are threatened due to this condition. The phenomenon of antimicrobial resistance does not exist only in hospitals but it is also spread to the environment. However, healthcare facilities can be considered as a source of resistant and multi-resistant bacteria and that is the reason why this problem has to be under control and reduced. *Escherichia coli* (*E.coli*) is a Gram-negative bacterium that is a common cause of urinary tract infections, bacteremias and gastroenteritis, both in hospital and community. The emergence and spread of resistant *E.coli* in hospitals has caused great concern in the scientific community. The purpose of this thesis is to study the antimicrobial resistance of clinical *E.coli* and as well as their molecular phylogenetic identification. A total of 139 clinical *E.coli* strains were studied, which had been collected from the General Hospital of Livadia. The molecular method that was applied for phylogenetic identification was Phylogrouping-triplex PCR. According to the results, the majority of the strains (75/139 or 54%) showed resistance to at least one antibiotic. In 8 strains, resistance genes of the CTX-M-group 1 were detected, while in 3 stains they were also positive for the gene of TEM- group1. According to phylogenetic identification, the stains were classified into 4 phylogenetic groups (A, B1, B2 and D), with group B2 being the most prevalent.

Key words: *Escherichia coli*, antimicrobial resistance, antibiotics, genotyping, resistance genes

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη.....	i
Abstract	ii
Εισαγωγή.....	1
Κεφάλαιο 1: Θεωρητικό μέρος.....	4
1.1 Γενικά χαρακτηριστικά του <i>E. coli</i>	4
1.2 Αντιβιοτικά και φαινόμενο αντιμικροβιακής αντοχής	5
1.3 Μηχανισμοί Αντοχής του <i>E. coli</i>	7
1.4 Δεδομένα Αντιμικροβιακής Αντοχής στην Ευρώπη.....	8
Κεφάλαιο 2: Πειραματικό μέρος.....	13
2.1 Σκοπός.....	13
2.2 Προέλευση στελεχών	13
2.3 Ταυτοποίηση στελεχών <i>E. coli</i>	14
2.4 Έλεγχος των επιπέδων ευαισθησίας στα αντιβιοτικά	16
2.5 Ανίχνευση γονιδίων αντοχής.....	19
2.6 Φυλογενετική τυποποίηση (Phylogrouping-Triplex pcr) στελεχών <i>E. coli</i>	21
Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα	23
3.1 Αποτελέσματα επιπέδων ευαισθησίας στα αντιβιοτικά.....	23
3.2 Αποτελέσματα ανίχνευσης γονιδίων αντοχής	26
3.3 Αποτελέσματα Φυλογενετικών ομάδων (Phylogroups)	26
Κεφάλαιο 4: Συζήτηση	28
Βιβλιογραφία.....	30
Παράρτημα.....	34

Πίνακας Εικόνων

Εικόνα 1: Οι τομείς της Ενιαίας Υγείας	3
Εικόνα 2: Οδοί διασποράς της αντιμικροβιακής αντοχής	7
Εικόνα 3: Οι υπό επιτήρηση ομάδες αντιμικροβιακών παραγόντων για το E. coli.....	9
Εικόνα 4: Πλήθος στελεχών E. coli που σχετίζονται με διηθητικές λοιμώξεις και τα ποσοστά (%) εμφάνισης επιπέδων αντοχής τους σε κάθε ομάδα αντιμικροβιακών παραγόντων κατά το διάστημα 2015-2019, στην Ευρώπη	10
Εικόνα 5: Πλήθος και ποσοστά (%) εμφάνισης του κάθε προτύπου αντοχής σε στελέχη E. coli που σχετίζονται με διηθητικές λοιμώξεις.	10
Εικόνα 6: Ποσοστά αντοχής στελεχών E. coli που σχετίζονται με διεισδυτικές λοιμώξεις σε φλουοροκινολόνες, ανά Ευρωπαϊκή Χώρα, 2019.....	11
Εικόνα 7: Ποσοστά αντοχής στελεχών E. coli που σχετίζονται με διεισδυτικές λοιμώξεις σε κεφαλοσπορίνες 3ης γενιάς, ανά Ευρωπαϊκή Χώρα, 2019.....	11
Εικόνα 8: Ποσοστά αντοχής στελεχών E. coli που σχετίζονται με διεισδυτικές λοιμώξεις σε καρβαπενέμες, ανά Ευρωπαϊκή Χώρα, 2019.....	12
Εικόνα 9: Καθαρή καλλιέργεια E. coli σε MacConkey άγαρ Νο 3	14
Εικόνα 10: Θετικό αποτέλεσμα ινδόλης - σχηματισμός κόκκινου δακτυλίου	15
Εικόνα 11: DDST θετικό αποτέλεσμα.....	17
Εικόνα 12: Α) Πρότυπο ζωνών κατά την ηλεκτροφόρηση, Β) Αλγόριθμος προσδιορισμού των φυλογενετικών ομάδων.....	21
Εικόνα 13: Γράφημα συχνότητας εμφάνισης ευαίσθητων (S), ανθεκτικών (R) και πολύ-ανθεκτικών (MDR) κλινικών στελεχών E. coli.....	24
Εικόνα 14: Διάγραμμα ποσοστών αντοχής ή ευαισθησίας των κλινικών στελεχών ανά αντιβιοτικό....	25
Εικόνα 15: Γράφημα ποσοστών εμφάνισης φυλογενετικών ομάδων	27
Εικόνα 16: Διάγραμμα συσχέτισης φυλογενετικών ομάδων με τα προφίλ αντοχής	27

Πίνακας Πινάκων

Πίνακας 1: Ομάδες αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν.....	18
Πίνακας 2: Κλινικά όρια αντοχής για το κάθε αντιβιοτικό παράγοντα βάσει του EUCAST	19
Πίνακας 3: Εκκινητές γονιδίων αντοχής.....	20
Πίνακας 4: Εκκινητές γονιδίων φυλογενετικών ομάδων.....	22
Πίνακας 5: Αποτελέσματα των προφίλ αντοχής.....	24
Πίνακας 6: Πρότυπο Αντοχής, Γονίδια Αντοχής και Φυλογενετική Ομάδα των DDST θετικών στελεχών.	25

Εισαγωγή

Η πρόοδος της επιστήμης και η ανακάλυψη των αντιβιοτικών βοήθησε στην αντιμετώπιση πολλών λοιμωδών νοσημάτων του ανθρώπων αλλά και των ζώων. Ωστόσο, το φαινόμενο της μικροβιακής αντοχής στα αντιβιοτικά που συνεχώς εξαπλώνεται αποτελεί ένα από τα πλέον μείζων ζητήματα που αφορούν την επιστημονική κοινότητα, σε παγκόσμιο επίπεδο [1]. Η εμφάνιση νέων «υπερβακτηρίων», δηλαδή βακτηρίων ανθεκτικών σε πολλαπλά αντιβιοτικά, ολοένα και αυξάνεται. Λοιμώξεις που σχετίζονται με τέτοια πολύ-ανθεκτικά βακτήρια οδηγούν σε σοβαρές ανίατες λοιμώξεις τόσο σε ενδονοσοκομειακά περιβάλλοντα όσο και στην κοινότητα [1].

Η ανίχνευση ανθεκτικών και πολυανθεκτικών στελεχών του βακτηρίου *E. coli* προκαλεί μεγάλη ανησυχία καθώς αποτελεί ένα από τα πιο κοινά Gram-αρνητικά ευκαιριακά παθογόνα που είναι υπεύθυνο για πολλές λοιμώξεις όπως ουρολοιμώξεις και γαστρεντερίτιδες. Το 2019 σε έρευνα που έγινε σε 30 χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης το 57,1% των απομονωθέντων στελεχών των *E. coli* από βιολογικά δείγματα παρουσίαζαν αντοχή σε μία τουλάχιστον από τους υπό επιτήρηση αντιμικροβιακούς παράγοντες [2, 3]. Εντούτοις, επειδή ανθεκτικά στελέχη *E.coli* εμφανίζονται και στη κοινότητα, οι παρεμβάσεις για τη μείωση αυτών των λοιμώξεων δεν θα πρέπει να περιορίζονται μόνο στο κλινικό περιβάλλον, αλλά θα πρέπει επίσης να στοχεύουν στην πρωτοβάθμια και κοινοτική φροντίδα [2, 3].

Η συστηματική επιτήρηση, τόσο στο νοσοκομειακό όσο και στο ευρύτερο περιβάλλον και ο σχεδιασμός νέων στρατηγικών κρίνονται απαραίτητα για τον έλεγχο του φαινομένου της αντιμικροβιακής αντοχής. Διεθνείς οργανισμοί, όπως ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ), το Ευρωπαϊκό Κέντρο Πρόληψης και Ελέγχου Νοσημάτων (ECDC) καθώς και στρατηγικές όπως η Ενιαία Υγεία υποστηρίζουν ότι η συνεργασία ειδικών από πολλούς διαφορετικούς τομείς σε τοπικό, εθνικό και παγκόσμιο επίπεδο μπορεί να αντιμετωπίσει πολύπλοκα προβλήματα Δημόσιας Υγείας όπως το ζήτημα της αντιμικροβιακής αντοχής [2, 4, 5]. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μέσω της ενίσχυσης των επιδημιολογικών μελετών, της παρακολούθησης της αντιμικροβιακής αντοχής, των πρωτόκολλων μοριακής τυποποίησης και φυλογένεσης, στα οποία βασίζεται η Δημόσια Υγεία για το σχεδιασμό, την εφαρμογή και την αξιολόγηση των προγραμμάτων πρόληψης και ελέγχου ασθενειών [4, 5, 6].

Η Ενιαία Υγεία είναι μία στρατηγική που υιοθετήθηκε σε παγκόσμιο επίπεδο, σύμφωνα με την οποία η υγεία των ανθρώπων σχετίζεται άμεσα με την υγεία ζώων και του υπόλοιπου περιβάλλοντος (**Εικόνα 1**). [4, 7]. Ο κύριος λόγος για την ανάπτυξη της Ενιαίας Υγείας αποτέλεσε το παγκόσμιο πρόβλημα της αντιμικροβιακής αντοχής σε σχεδόν όλα τα διαθέσιμα αντιβιοτικά και η ταχεία εξάπλωση των γονιδίων ανθεκτικότητας σε σχεδόν όλους τους βακτηριακούς πληθυσμούς [2, 8].

Η διατομεακή συνεργασία (Ιατρικής, Κτηνιατρικής και των τομέων που ασχολούνται με την παραγωγή τροφίμων) υποστηρίζεται και από την προσέγγιση «Ενιαία Υγεία» της Ευρωπαϊκής Επιτροπής, καθώς στην Ευρώπη συνεχώς καταγράφονται υψηλά επίπεδα αντοχής σε *E. coli* που απομονώνονται από ζώα παραγωγής [5, 6, 8].

Η χρήση αντιβιοτικών ευρέως φάσματος είναι ένας βασικός παράγοντας κινδύνου για τον αποικισμό και την εξάπλωση των ανθεκτικών στελεχών της οικογένειας των Enterobacteriales, συμπεριλαμβανομένου του *E. coli*. Πράγματι, σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες, ποσοστά αντοχής σε στελέχη *E. coli* που εμφανίζει κάθε χώρα σχετίζονται με τα ποσοστά κατανάλωσης αντιμικροβιακών, τόσο κατά την κλινική πράξη όσο και στη κοινότητα [5, 8]. Τα τελευταία δεδομένα από το Ευρωπαϊκό Δίκτυο Επιτήρησης Κατανάλωσης Αντιμικροβιακών (ESAC-Net) δείχνουν πως μεταξύ των χωρών σημειώνονται σημαντικές διαφορές ως προς την χρήση αντιβιοτικών ευρέως φάσματος [5]. Επομένως θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στη διαχείριση των αντιμικροβιακών ώστε να μειωθεί η κατανάλωση τους [5].



Εικόνα 1: Οι τομείς της Ενιαίας Υγείας

Κεφάλαιο 1: Θεωρητικό μέρος

1.1 Γενικά χαρακτηριστικά του *E. coli*

Το *E. coli* είναι Gram-αρνητικό βακτήριο ραβδοειδούς σχήματος (μεγέθους 2,5-10.000 μm και διάμετρο 0,8 μm) της οικογένειας των Enterobacteriaceae. Αποικίζει κυρίως την κατώτερη εντερική οδό θερμόαιμων ζώων, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου ενώ αποβάλλεται στο περιβάλλον μέσω περιττωμάτων [9, 10]. Είναι προαιρετικά αερόβιο γεγονός που καθιστά ικανή την επιβίωση και την προσαρμογή του, σε αερόβιες συνθήκες εκτός ξενιστή, σε πληθώρα ενδιαιτημάτων.

Μια φυσιολογική ποσότητα κοπράνων ενός υγιούς ατόμου περιέχει έως 10^{11} βακτήρια σε κυβικά εκατοστά και η πλειοψηφία αυτών είναι βακτήρια του είδους *E. coli* (συγκέντρωση μεγαλύτερη των 10^9 ανά cm^3). Ως εκ τούτου, το συγκεκριμένο βακτήριο εντοπίζεται στο λύμα, στο έδαφος αλλά και σε υδάτινα ενδιαιτήματα και αποτελεί τεκμηριωμένο δείκτη κοπρανώδους μόλυνσης των υδάτων (με ευρεία χρήση σε πολλά υδάτινα οικοσυστήματα όπως λίμνες, ποτάμια, θάλασσες, κολυμβητικές δεξαμενές) [8, 9, 10].

Είναι ένα από τα καλύτερα μελετημένα βακτήρια, το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί ως στέλεχος αναφοράς για πειράματα σύζευξης (μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας μέσω πλασμιδίων) ενώ ήταν το πρώτο βακτήριο στο οποίο εφαρμόστηκαν τυποποιητικές τεχνικές με βάση την αλληλούχηση του γονιδιώματός του. Η ανάλυση γονιδιώματος του πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1997 και έκτοτε, έχει προσδιοριστεί η αλληλουχία πάνω από 4800 γονιδιωμάτων βακτηριακών στελεχών του συγκεκριμένου είδους [9, 10, 11].

Το βακτήριο *E. coli* συγκαταλέγεται στα πιο κοινά ευκαιριακά παθογόνα και αποτελεί την πιο συχνή αιτία ουρολοιμώξεων αλλά και εντερίτιδας, σηψαιμίας καθώς και νεογνικής μηνιγγίτιδας. Το συγκεκριμένο βακτηριακό είδος, εκτός από τα κοινά ωφέλιμα στελέχη, που μπορεί περιστασιακά να προκαλέσουν κάποια ευκαιριακή λοίμωξη, περιλαμβάνει και αμιγώς παθογόνα στελέχη. Αυτά προκαλούν ποικιλία σοβαρών λοιμώξεων και σχετίζονται με περισσότερους από 2 εκατομμύρια θανάτους ετησίως [10, 12]. Υπάρχουν έξι καλά μελετημένοι εντερικοί τύποι παθογόνων *E. coli* που είναι οι εξής: 1) τα εντεροαιμορραγικά (Enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC) που παράγουν τοξίνες [βεροτοξίνες ή τοξίνες τύπου Shiga εξ' ου και το όνομα STEC (Shiga toxin-producing *E. coli*)] και προκαλούν αιμορραγική κολίτιδα και

αιμολυτικό-ουραιμικό σύνδρομο, 2) τα εντεροπαθογόνα (Enteropathogenic *E. coli*, EPEC) που προκαλούν εντερίτιδα στα βρέφη, 3) τα εντεροτοξινογόνα (Enterotoxigenic *E. coli*, ETEC), η λοιμογονικότητα των οποίων οφείλεται στις παραγόμενες τοξίνες που οδηγούν στην εκδήλωση διαρροϊκής νόσου και αποτελούν το συχνότερο αίτιο διάρροιας των ταξιδιωτών, 4) τα εντεροδιδεισδυτικά (Enteroinvasive *E. coli*, EIEC) τα οποία έχουν την ικανότητα εισβολής στα κύτταρα του επιθηλιακού ιστού του εντέρου και προκαλούν δυσεντερία, 5) τα εντεροσυσσωρευτικά (Enteroadherent *E. coli*, EAEC) που ευθύνονται για χρόνια διαρροϊκή νόσο κυρίως σε βρέφη και παιδιά και 6) τα εντεροδιαχερόμενα (Diffusely adherent *E. coli*, DAEC) που ευθύνονται για διάρροια σε νεαρά άτομα 1-5 ετών [10, 12, 13, 14, 15].

1.2 Αντιβιοτικά και φαινόμενο αντιμικροβιακής αντοχής

Τα αντιβιοτικά είναι χημικές ενώσεις, είτε φυσικές (που παράγονται από ακτινομύκητες, μύκητες, βακτήρια και φυτά) είτε τεχνητές, που παρεμποδίζουν σε κάποια βασική βακτηριακή διαδικασία χωρίς όμως να βλάπτουν τον ξενιστή [16].

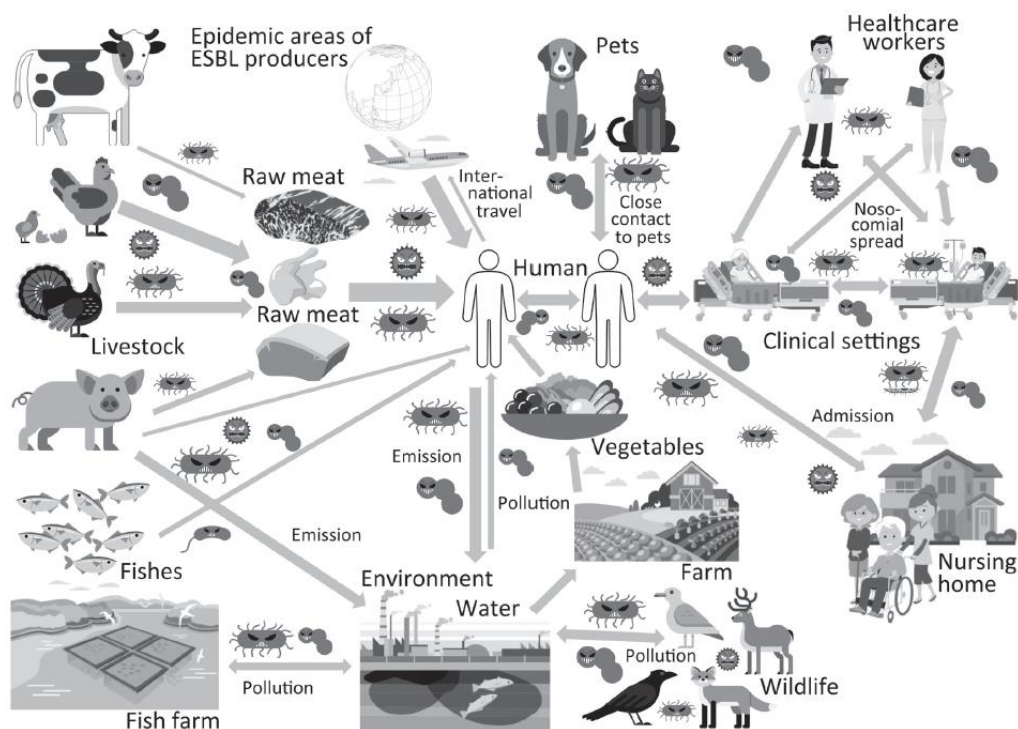
Υπάρχει πληθώρα αντιβιοτικών ωστόσο ο κάθε παράγοντας έχει ένα συγκεκριμένο τρόπο και στόχο δράσης. Ανάλογα με τρόπο δράσης τους διακρίνονται σε βακτηριοστατικά και σε βακτηριοκτόνα ενώ άλλοι τρόποι ταξινόμησης βασίζονται στη δομή τους και στο στόχο τους. Οι στόχοι δράσης των αντιβιοτικών μπορεί να είναι τα μόρια που συμμετέχουν στην βιοσύνθεση: (i) του κυτταρικού τοιχώματος, (ii) των πρωτεϊνών, (iii) του DNA και του RNA και (iv) του φυλλικού οξέος που συμμετέχει στο σχηματισμό πουρινών (αζωτούχες βάσεις του DNA και του RNA) [16].

Η ανακάλυψη των αντιβιοτικών θεωρείται σημείο σταθμός στην ιστορία της Ιατρικής. Ο Alexander Fleming ανακάλυψε το πρώτο αντιβιοτικό, την πενικιλίνη, το 1927. Μετά την πρώτη χρήση των αντιβιοτικών τη δεκαετία του 1940, μειώθηκαν κατακόρυφα οι ασθένειες και οι θάνατοι από λοιμώδεις νόσους βακτηριακής αιτιολογίας. Ωστόσο, αν και τα αντιβιοτικά μπορεί να έχουν ωφέλιμα αποτελέσματα, η αυξημένη κατανάλωση και η μη ορθολογική χρήση τους συνδράμει στην όξυνση του φαινομένου της μικροβιακής αντοχής στα αντιβιοτικά. Τα αντιβιοτικά ασκούν εξελικτική πίεση στους βακτηριακούς πληθυσμούς ευνοώντας την επιβίωση και

τελικά την επικράτηση των ανθεκτικών [3, 11]. Άλλοι παράγοντες που έχουν διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην παγκόσμια εξάπλωση της αντιμικροβιακής αντοχής είναι η ανταλλαγή πληθυσμών (π.χ. μεταναστευτικό), ο διεθνής τουρισμός και τα επαγγελματικά ταξίδια [1, 2, 3, 10].

Τα βακτήρια έχουν αποδείξει την εκπληκτική τους ικανότητα να εξελίσσονται και να αναπτύσσουν γρήγορα μηχανισμούς αντοχής στα αντιβιοτικά [17, 18]. Η αντοχή στα αντιβιοτικά μπορεί να είναι είτε εγγενής είτε επίκτητη. Ένα παράδειγμα εγγενούς αντοχής απαντάται στο βακτηριακό είδος *Pseudomonas aeruginosa* [3, 5]. Η μειωμένη διαπερατότητα της μεμβράνης πιθανότατα να είναι ο κύριος λόγος για την έμφυτη αντοχή που διαθέτει σε ορισμένες κατηγορίες αντιβιοτικών. Από την άλλη πλευρά, η επίκτητη αντοχή οφείλεται είτε σε τυχαίες μεταλλάξεις που συμβαίνουν στο βακτηριακό γονιδίωμα είτε στην πρόσληψη εξωγενών μεταθετών γενετικών στοιχείων, όπως πλασμίδια τα οποία φέρουν γονίδια που προσδίδουν αντοχή. Το γεγονός ότι τέτοιου είδους πλασμίδια έχουν την ικανότητα να μεταφέρονται μεταξύ των βακτηρίων (οριζόντια μεταφορά) συνδράμει στη περαιτέρω διασπορά της μικροβιακής αντοχής στα αντιβιοτικά [3, 16]. Έχει δε αποδειχθεί ότι στα φυσικά περιβάλλοντα (π.χ. υδάτινα ενδιαιτήματα) οι ανταλλαγές γενετικού υλικού μεταξύ των βακτηριακών πληθυσμών συμβαίνουν κανονικά και διαρκώς [10].

Ανθεκτικά και πολυανθεκτικά βακτήρια σε αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται εκτενώς για την αντιμετώπιση λοιμώξεων ανιχνεύονται συνεχώς, τόσο σε βιολογικά δείγματα ανθρώπου όσο σε δείγματα ζωικής αλλά και περιβαλλοντικής (π.χ. δείγμα νερού από ποτάμια, λίμνες, θάλασσες) προέλευσης [11]. Έτσι ο άνθρωπος μπορεί να εκτεθεί και να προσλάβει κάποιο ανθεκτικό στέλεχος μέσω πολλών διαφορετικών οδών όπως για παράδειγμα με άμεση επαφή με κάποιο ζώο ή κατανάλωση τροφίμων ζωικής προέλευσης και μέσω δραστηριοτήτων αναψυχής και άλλα (**Εικόνα 2**) [11].



Εικόνα 2: Οδοί διασποράς της αντιμικροβιακής αντοχής

1.3 Μηχανισμοί Αντοχής του *E. coli*

Το *E. coli* διαθέτει πολύ περιορισμένους εγγενείς μηχανισμούς αντοχής που του εξασφαλίζουν μειωμένη ευαισθησία στην πενικιλίνη G, η οποία ανήκει στις πρώτης γενιάς β-λακτάμες. Ωστόσο, στο *E. coli* η εμφάνιση αντοχής σε πολλαπλά αντιβιοτικά ευρέος φάσματος δεν οφείλεται στους εγγενείς μηχανισμούς αντοχής αλλά σε επίκτητους [19].

Συγκεκριμένα, ο βασικός μηχανισμός αντοχής του βακτηρίου στα αντιβιοτικά β-λακταμών ευρέος φάσματος είναι η πρόσληψη πλασμιδίων που φέρουν γονίδια που εκφράζουν για β-λακταμάσες. Οι β-λακταμάσες είναι μια οικογένεια ενζύμων που υδρολύουν (καταστρέφουν) τα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Εντοπίζονται πολύ συχνά σε βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae συμπεριλαμβανομένου του *E. coli* [19, 20].

Οι οικογένεια των β-λακταμασών χαρακτηρίζεται από υψηλή ετερογένεια και προσδίδουν αντοχή στις πενικιλίνες και τις κεφαλοσπορίνες. Οι εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (Extended Spectrum β-Lactamases, ESBLs) συνδέονται με

την ανθεκτικότητα σε κεφαλοσπορίνες εκτεταμένου φάσματος τρίτης (π.χ. κεφταζιδίμη, κεφτριαξόνη, κεφοταξίμη) και τέταρτης γενιάς (π.χ. κεφεπίμη) αλλά και σε μονοβακτάμες (αζτρεονάμη). Ο αριθμός των ESBL που έχουν χαρακτηριστεί ως τώρα υπερβαίνει τις 300. Οι συχνότεροι τύποι ESBL είναι οι TEM, SHV και CTX-M, με τα CTX-M να είναι ο επικρατέστερος [19, 21].

Τα πλασμίδια των CTX-M συχνά συν-μεταφέρουν και άλλα στοιχεία που προσδίδουν αντοχή μειώνοντας σημαντικά την απόκριση στη θεραπεία αντιβιοτικών. Μέχρι στιγμής, έχουν αναφερθεί παραπάνω από 172 παραλλαγές CTX-M και ανάλογα με την αλληλουχία των αμινοξέων τους ταξινομούνται σε 6 υποομάδες (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25) [19]. Στην Ευρώπη, οι ομάδες CTX-M-14 και CTX-M-15 συναντώνται πιο συχνά στους ανθρώπους ενώ η CTX-M-1 είναι πιο διαδεδομένη μεταξύ ζώων [11, 21].

1.4 Δεδομένα Αντιμικροβιακής Αντοχής στην Ευρώπη

Στην Ευρώπη, η αντιμικροβιακή αντοχή στα Gram-αρνητικά βακτήρια αυξάνεται. Διάφοροι οργανισμοί όπως το Ευρωπαϊκό Δίκτυο Επιτήρησης Κατανάλωσης Αντιμικροβιακών (European Antimicrobial Resistance-Net, EARS-Net), το Ευρωπαϊκό Σύστημα Εποπτείας (The European Surveillance System, TESSy) το Ευρωπαϊκό Κέντρο Πρόληψης και Ελέγχου Νοσημάτων (European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC) συλλέγουν από όλες τις χώρες της Ε.Ε. δεδομένα που αφορούν την αντιμικροβιακή αντοχή και τις ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις (ARHAI, Antimicrobial Resistance and Healthcare-Associated Infections). Η πιο πρόσφατη μελέτη αφορά την περίοδο 2015 έως 2019. Τα αποτελέσματα της αντιμικροβιακής αντοχής που παρουσιάζονται σε αυτήν την έκθεση αφορούν οκτώ βακτηριακά είδη και συγκεκριμένα το *E. coli* (το οποίο αποτελεί την συχνότερη αιτία διηθητικών λοιμώξεων), *P.aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, είδη *Acinetobacter*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* και *Enterococcus faecium*, τα οποία βρίσκονται υπό αυστηρή επιτήρηση [5].

Σύμφωνα με την αναφορά που εξέδωσε το EARS-Net για το 2019, το 57,1% των συνολικά απομονωθέντων *E.coli* ήταν ανθεκτικά σε τουλάχιστον μία από τις υπό επιτήρηση αντιμικροβιακές κατηγορίες, όπως αμινοπενικιλίνες, φθοριοκινολόνες,

τρίτης γενιάς κεφαλοσπορίνες, αμινογλυκασίδες και καρβαπενέμες (**Εικόνα 3**). Τα ποσοστά αντοχής ανά κατηγορία διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών βακτηριακών ειδών αλλά και μεταξύ των διαφορετικών χωρών [5].

Το υψηλότερο ποσοστό αντοχής σημειώθηκε στις αμινοπενικιλίνες (57,1%) ακολουθούμενη από τις φθοριοκινολόνες (23,8%), τρίτης γενιάς κεφαλοσπορίνες (15,1%) και αμινογλυκασίδες (10,8%) ενώ η αντοχή στις καρβαπενέμες παρέμεινε σε πολύ χαμηλό επίπεδο (0,3%) (**Εικόνα 4**). Γενικά κατά το διάστημα 2015 και 2019, παρατηρήθηκαν αυξητικές τάσεις στα ποσοστά αντοχή των κεφαλοσπορινών τρίτης γενιάς και των καρβαπενέμων (**Εικόνα 4**) [5].

Επιπρόσθετα, η αντοχή σε πολλαπλές ομάδες αντιβιοτικών ήταν πολύ συχνή. Μεταξύ των ανθεκτικών φαινοτύπων, η αντοχή στις αμινοπενικιλίνες, τόσο ως μεμονωμένη αντοχή όσο και σε συνδυασμό με άλλες αντιμικροβιακές ομάδες, είχε την υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης (**Εικόνα 5**). Το 2019, το ποσοστό συνδυασμένης αντοχής σε φθοριοκινολόνες, τρίτης γενιάς κεφαλοσπορίνες και αμινογλυκοσίδες άγγιξε το 5,9% [5].

Μεταξύ των χωρών, τα ποσοστά αντοχής ανά κατηγορία αντιβιοτικών σε *E. coli* που σχετίζονται με διεισδυτικές λοιμώξεις, σημειώθηκαν σημαντικές διαφορές. Γενικά, στις χώρες της νότιο-ανατολικής Ευρώπης παρατηρήθηκαν πολύ πιο υψηλά ποσοστά αντοχής συγκριτικά με αυτές της Βόρειας. Ωστόσο, τα ποσοστά αντοχής του συγκεκριμένου βακτηρίου στις καρβαπενέμες που διατηρούνται σε πολύ χαμηλά επίπεδα σε όλες τις χώρες τις Ε.Ε., στις (**Εικόνες 6, 7, 8**) [5].

Bacterial species	Antimicrobial group	Antimicrobial agents
<i>Escherichia coli</i>	Aminopenicillins	Ampicillin or amoxicillin
	Third-generation cephalosporins	Cefotaxime, ceftriaxone or ceftazidime
	Carbapenems	Imipenem or meropenem
	Fluoroquinolones	Ciprofloxacin, levofloxacin or ofloxacin
	Aminoglycosides	Gentamicin, tobramycin or netilmicin

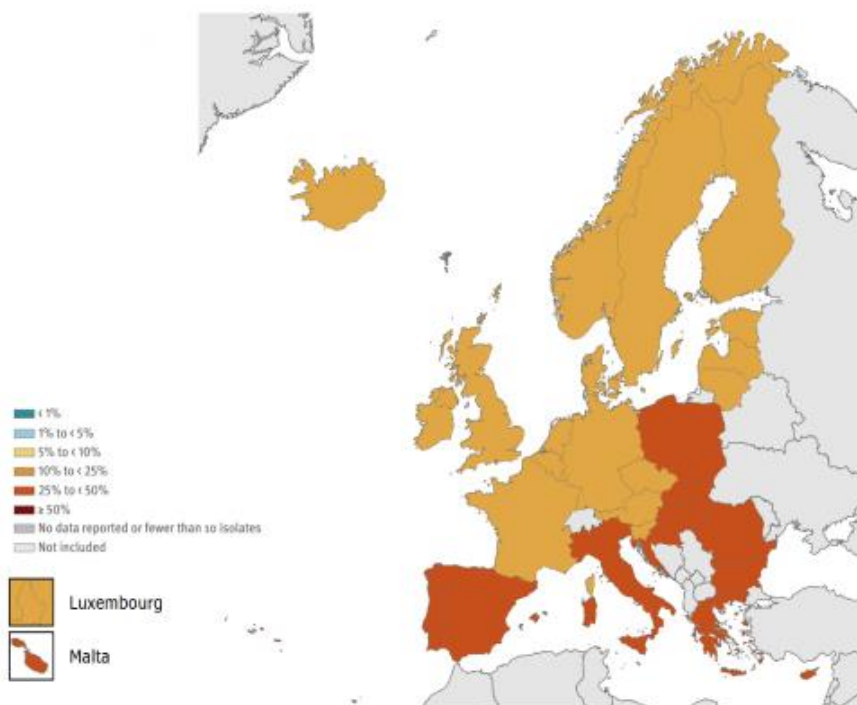
Εικόνα 3: Οι υπό επιτήρηση ομάδες αντιμικροβιακών παραγόντων για το *E. coli*

Bacterial species	Antimicrobial group	2015		2016		2017		2018		2019		2019 EU/EEA country range*	Trend 2015-2019**
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%		
<i>Escherichia coli</i>	Aminopenicillin (amoxicillin/ampicillin) resistance	79 507	58.9	108 239	59.0	125 866	58.7	133 700	57.5	129 576	57.1	35.5-71.7	↓
	Third-generation cephalosporin (cefotaxime/ceftriaxone/ceftazidime) resistance	91 822	14.6	123 944	14.9	140 584	14.9	152 720	15.1	156 887	15.1	6.2-38.6	↑#
	Carbapenem (imipenem/meropenem) resistance	88 020	0.2	122 437	0.1	140 438	0.1	151 457	0.1	155 841	0.3	0.0-1.6	↑
	Fluoroquinolone (ciprofloxacin/levofloxacin/ofloxacin) resistance	91 832	24.8	125 161	25.2	141 562	25.7	154 698	25.3	160 692	23.8	11.3-43.5	↓
	Aminoglycoside (gentamicin/netilmicin/tobramycin) resistance	91 746	11.6	124 480	11.6	141 788	11.4	154 266	11.1	160 406	10.8	4.7-24.4	↓
	Combined resistance to third-generation cephalosporins, fluoroquinolones, and aminoglycosides	89 780	6.3	121 582	6.4	135 108	6.3	148 206	6.2	153 818	5.9	0.4-19.0	↓

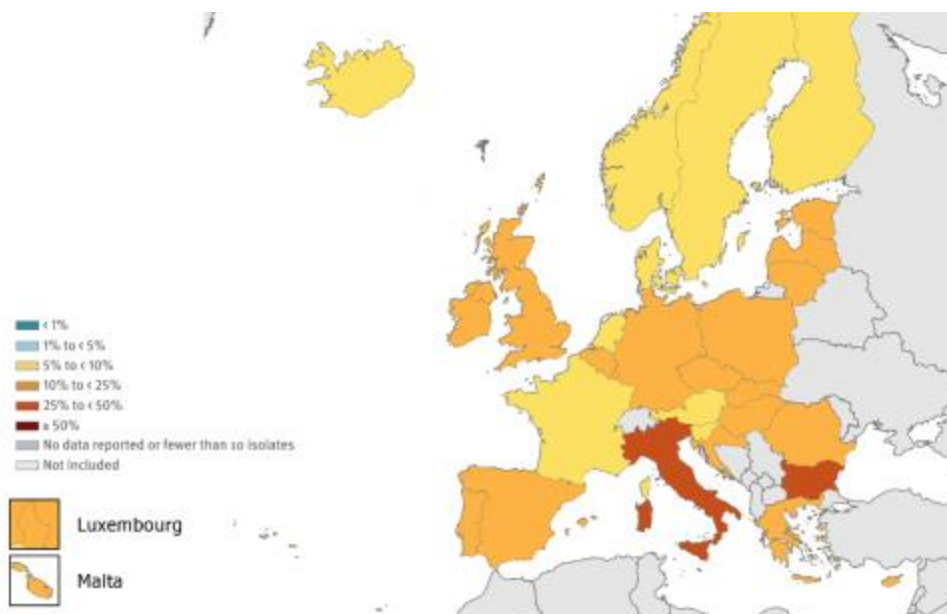
Εικόνα 4: Πλήθος στελεχών *E. coli* που σχετίζονται με διηθητικές λοιμώξεις και τα ποσοστά (%) εμφάνισης επιπέδων αντοχής τους σε κάθε ομάδα αντιμικροβιακών παραγόντων κατά το διάστημα 2015-2019, στην Ευρώπη

Resistance pattern	Number of isolates	% of total**
Fully susceptible	50 797	42.9
Single resistance (to indicated antimicrobial group)		
Total (all single resistance)	41 146	34.8
Aminopenicillins	37 854	32.0
Fluoroquinolones	2 783	2.4
Other antimicrobial groups	509	0.4
Resistance to two antimicrobial groups		
Total (all two-group combinations)	12 456	10.5
Aminopenicillins + fluoroquinolones	7 073	6.0
Aminopenicillins + third-generation cephalosporins	2 986	2.5
Aminopenicillins + aminoglycosides	2 190	1.8
Other antimicrobial group combinations ^a	207	0.2
Resistance to three antimicrobial groups		
Total (all three-group combinations)	8 620	7.3
Aminopenicillins + third-generation cephalosporins + fluoroquinolones	5 454	4.6
Aminopenicillins + fluoroquinolones + aminoglycosides	2 468	2.1
Other antimicrobial group combinations ^a	698	0.6
Resistance to four antimicrobial groups		
Total (all four-group combinations)	5 348	4.5
Aminopenicillins + third-generation cephalosporins + fluoroquinolones + aminoglycosides	5 305	4.5
Other antimicrobial group combinations ^a	43	<0.1
Resistance to five antimicrobial groups		
Aminopenicillins + third-generation cephalosporins + fluoroquinolones + aminoglycosides + carbapenems	32	<0.1

Εικόνα 5: Πλήθος και ποσοστά (%) εμφάνισης του κάθε προτύπου αντοχής σε στελέχη *E. coli* που σχετίζονται με διηθητικές λοιμώξεις.



Εικόνα 6: Ποσοστά αντοχής στελεχών *E. coli* που σχετίζονται με διεισδυτικές λοιμώξεις σε φλουοροκινολόνες, ανά Ευρωπαϊκή Χώρα, 2019



Εικόνα 7: Ποσοστά αντοχής στελεχών *E. coli* που σχετίζονται με διεισδυτικές λοιμώξεις σε κεφαλοσπορίνες 3ης γενιάς, ανά Ευρωπαϊκή Χώρα, 2019



Εικόνα 8: Ποσοστά αντοχής στελεχών *E. coli* που σχετίζονται με διεισδυτικές λοιμώξεις σε καρβαπενέμες, ανά Ευρωπαϊκή Χώρα, 2019

Κεφάλαιο 2: Πειραματικό μέρος

2.1 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη της αντοχής των επιπέδων αντοχής κλινικών στελεχών *E. coli* σε συνδυασμό με την ανίχνευση μηχανισμών που σχετίζονται με συγκεκριμένα πρότυπα αντοχής καθώς και η τυποποίησή τους με τη μοριακή μέθοδο της triplex PCR.

2.2 Προέλευση στελεχών

Στα πλαίσια της παρούσας ερευνητικής πτυχιακής εργασίας, μελετήθηκαν 139 κλινικά στελέχη *E.coli* που είχαν απομονωθεί από δείγματα ούρων, αίματος, τραύματος, πτυέλων και ιστού από το προσωπικό του μικροβιολογικού εργαστηρίου του Γενικού Νοσοκομείου της Λιβαδειάς κατά τις περιόδους:

- καλοκαίρι 2019
- φθινόπωρο 2019
- χειμώνα 2020
- καλοκαίρι 2020
- φθινόπωρο 2020

Τα παραπάνω στελέχη στάλθηκαν στο Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας & Ανοσολογίας (Ε.Μ.Μ.Α.) του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών με κατάλληλη συσκευασία, συνοδευόμενα από το σχετικό ανώνυμο ερωτηματολόγιο (ημερομηνία, βιολογικό δείγμα, ηλικία και φύλο ασθενούς) συμπληρωμένο από τον υπεύθυνο ιατρό. Τα παραπάνω στελέχη φυλάχθηκαν στους -80° C (βαθιά κατάψυξη) σε ειδικά σωληνάρια κρυοσυντήρησης (cryovials), σε διάλυμα Brain Heart Infusion +20% glycerol.

2.3 Ταυτοποίηση στελεχών *E. coli*

Αρχικά τα στελέχη καλλιεργήθηκαν σε MacConkey άγαρ Νο3, το οποίο είναι εκλεκτικό και διαφοροποιητικό καλλιεργητικό μέσο που επιτρέπει την ανάπτυξη μόνο των Gram αρνητικών βακτηρίων (**Εικόνα 9**).

Μετά από ολονύκτια επώαση στους 37° C, ακολούθησε παρατήρηση των αποικιών και ανακαλλιέργεια στο γενικό θρεπτικό υλικό Nutrient agar, προκειμένου να εφαρμοστούν περαιτέρω ταυτοποιητικές δοκιμασίες.



Εικόνα 9: Καθαρή καλλιέργεια *E. coli* σε MacConkey άγαρ Νο 3

Για την βιοχημική ταυτοποίηση των δειγμάτων εφαρμόστηκε η δοκιμασία ινδόλης, η οποία χρησιμοποιείται ως μέρος των δοκιμασιών IMViC, που έχουν σχεδιαστεί για τον διαχωρισμό των διαφορετικών ειδών της οικογένειας Enterobacteriaceae [22].

Σκοπός της δοκιμασίας ινδόλης είναι ο έλεγχος της ικανότητας ενός βακτηρίου να αποδομεί το αμινοξύ τρυπτοφάνη και να παράγει ινδόλη. Η τρυπτοφάνη είναι ένα αμινοξύ που μπορεί να υποστεί απαμίνωση και υδρόλυση από βακτήρια που παράγουν το ένζυμο τρυπτοφανάση [22].

Περιγραφή δοκιμασίας:

- Απομόνωση 2-3 αποικιών από καθαρή καλλιέργεια *E. coli* σε Nutrient agar.
- Ενοφθαλμισμός σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει ζωμό τρυπτόνης (tryptone water).
- Ολονύκτια επώαση στους 37° C.
- Προσθήκη μικρής ποσότητας (5 σταγόνες) από το αντιδραστήριο Kovacs.

Σε ένα θετικό τεστ ινδόλης παρατηρείται σχηματισμός δακτυλίου ροζ-κόκκινου χρώματος στο πάνω μέρος του υλικού εντός ολίγων δευτερολέπτων (**Εικόνα 10**).

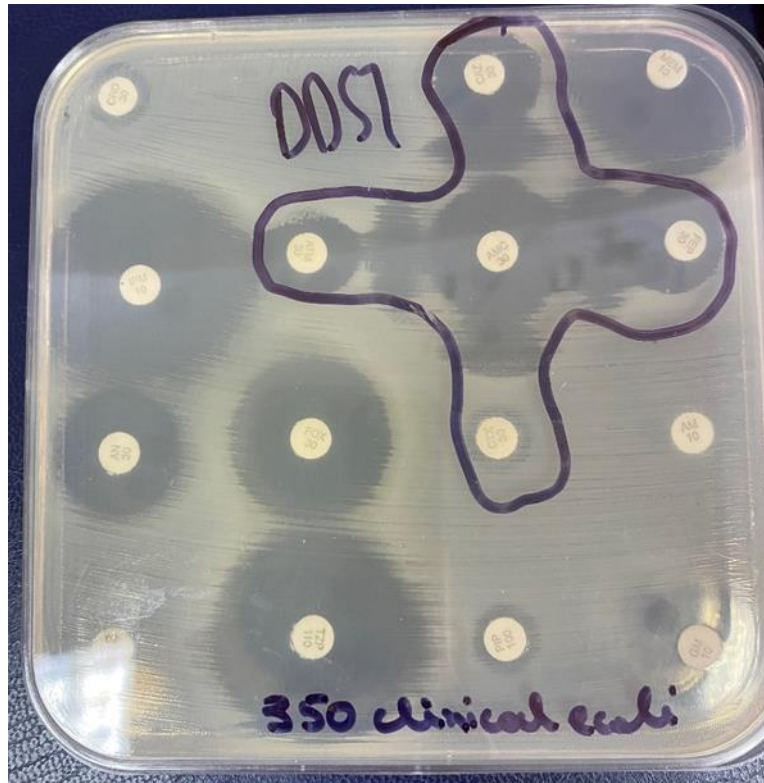


Εικόνα 10: Θετικό αποτέλεσμα ινδόλης - σχηματισμός κόκκινου δακτυλίου

2.4 Έλεγχος των επιπέδων ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

Για τον έλεγχο των επιπέδων ευαισθησίας εφαρμόστηκε η μέθοδος διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών σε άγαρ (Kirby-Bauer). Τα στελέχη εξετάστηκαν ως προς την ευαισθησία τους σε αντιβιοτικά διαφορετικών τάξεων, όπως σε πενικιλίνες (αμπικιλίνη, πιπερακιλλίνη) σε συνδυασμούς πενικιλινών με αναστολείς [αμοξικιλίνη/κλαβουλανικό (AMC), πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη (TZP), κεφαλοσπορίνες (2^{ης}, 3^{ης} και 4^{ης} γενιάς), κεφαμυκίνες (κεφοξιτίνη), καρβαπενέμες, μονομπακτάμες, αμινογλυκοσίδες και φλουοροκινολόνες. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων και ο χαρακτηρισμός των στελεχών ως ευαίσθητα (sensitive, S: δεν εμφανίζουν καμία αντοχή), ανθεκτικά (resistant, R: παρουσιάζουν αντοχή σε δύο αντιβιοτικά τουλάχιστον, μιας κατηγορίας) και πολυανθεκτικά (multidrug, MDR: παρουσιάζουν αντοχή σε 3 τουλάχιστον κατηγορίες αντιβιοτικών) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις προτεινόμενες οδηγίες τόσο από το EUCAST όσο και από δημοσιευμένες κατευθύνσεις [23, 24]. Στον **Πίνακα 1** παρουσιάζονται τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία και στον **Πίνακα 2** τα κλινικά όρια του καθενός από αυτά.

Παράλληλα εφαρμόστηκε και φαινοτυπικός έλεγχος παραγωγής εκτεταμένου φάσματος β-λακταμασών (Extended Spectrum β-Lactamases, ESBLs) μέσω της μεθόδου συνέργειας με κλαβουλανικό (Double-disk synergy test, DDST). Συγκεκριμένα, για την πραγματοποίηση του DDST test γύρω από ένα δίσκο που περιέχει κλαβουλανικό οξύ (όπως AMC) τοποθετούνται δίσκοι με αντιβιοτικά κεφαλοσπορινών 3^{ης} και 4^{ης} γενιάς. Ως θετικό αποτέλεσμα ερμηνεύεται η παρεκτροπή της ζώνης αναστολής προς τη πλευρά του δίσκου με το κλαβουλανικό οξύ (**Εικόνα 11**) [24].



Εικόνα 11: DDST θετικό αποτέλεσμα

Πίνακας 1: Ομάδες αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν

ΟΜΑΔΕΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ		
Β-λακταμικά (B-lactams)	Πενικιλίνες (Penicillins)	Αμπικιλίνη (Ampicillin - AMP)
		Πιπερακιλλίνη (Piperacillin - PIP)
	Συνδυασμοί αναστολέα Πενικιλίνης (Inhibitor - Penicillin Combinations)	Αμοξικιλίνη / Κλαβουλανικό οξύ (Amoxicillin/ Clavulanic acid - AMC)
		Πιπερακιλλίνη / Ταζοβακτάμη (Piperacillin/ Tazobactam - TZP)
	Κεφαλοσπορίνες (Cephalosporins)	Κεφτριαξόνη (Ceftriaxone - CRO)
		Κεφουροξίμη (Cefuroxime - CXM)
		Κεφταζιδίμη (Ceftazidime - CAZ)
		Κεφοταξίμη (Cefotaxime - CTX)
		Κεφεπίμη (Cefepime - FEP)
	Κεφαμυκίνες (Cephamycins)	Κεφοξιτίνη (Cefoxitin - FOX)
	Μονοβακτάμες (Monobactams)	Αζτρεονάμ (Aztreonam - ATM)
	Καρβαπενέμες (Carbapenems)	Ιμιπενέμη (Imipenem - IMP)
		Μεροπενέμη (Meropenem - MEM)
Αμινογλυκοσίδες (Aminoglycosides)	Αμικακίνη (Amikacin - AN)	
	Γενταμικίνη (Gentamicin - GM)	
Κινολόνες (Quinolones)	Σιπροφλοξασίνη (Ciprofloxacin - CIP)	
	Ναλιδιξικό οξύ (Nalidixic acid - NAL)	
Συνδυασμός	Σουλφαμεθοξαζόλη / Τριμεθοπρίμη (Sulfamethoxazole/Trimethoprim - SXT)	

Πίνακας 2: Κλινικά όρια αντοχής για το κάθε αντιβιοτικό παράγοντα βάσει του EUCAST

Αντιβιοτικά	Ευαίσθητο (S)	Ανθεκτικό (R)
AMC	≥ 19	< 19
AMP	≥ 14	< 14
AN	≥ 18	< 15
ATM	≥ 26	< 21
CAZ	≥ 22	< 19
CIP	≥ 25	< 22
CRO	≥ 25	< 22
CTX	≥ 20	< 17
CXM	≥ 19	< 19
FEP	≥ 27	< 24
FOX	≥ 19	< 19
GM	≥ 17	< 14
IMP	≥ 22	< 17
MEM	≥ 22	< 16
PIP	≥ 20	< 17
SXT	≥ 14	< 11
TZP	≥ 20	< 17
NAL	≥ 14	< 14

2.5 Ανίχνευση γονιδίων αντοχής

Τα στελέχη που ανέδειξαν DDST θετικό αποτέλεσμα μελετήθηκαν περαιτέρω για την παρουσία γονιδίων που εκφράζουν για ESBLs, με τη μοριακή μέθοδο της PCR βάσει δημοσιευμένων πρωτοκόλλων [25, 26]. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκαν για τα γονίδια CTX-M-group1, CTX-M-group2, CTX-M-group9 και TEM_A. Στον **Πίνακα 3** παρουσιάζονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 3: Εκκινητές γονιδίων αντοχής

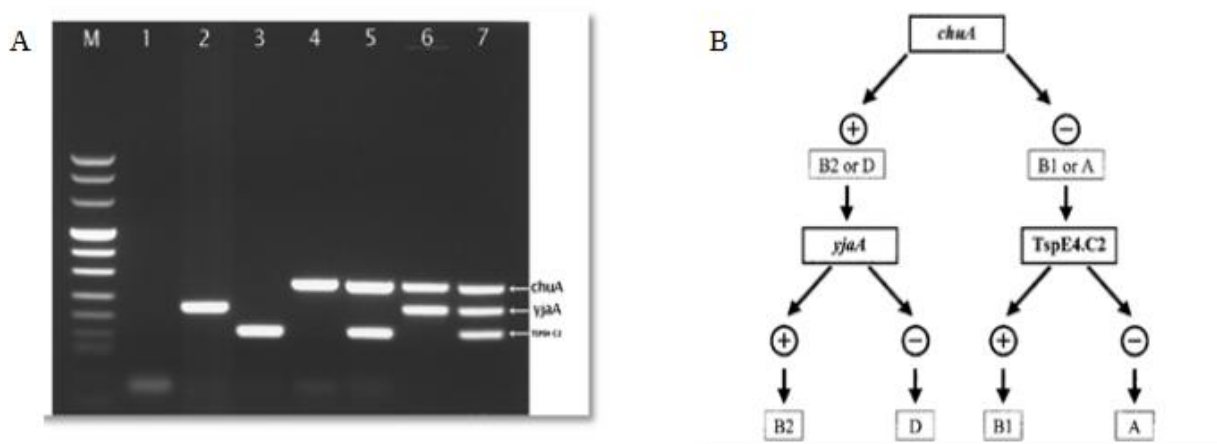
Γονίδιο	Αλληλουχίες	Βιβλιογραφική πηγή
TEM_A	Εμπρόσθιος: 5'-GAGACAATAACCCTGGTAAAT-3' Ανάστροφος: 5'-AGAAGTAAGTTGGCAGCAGTG-3	[26]
CTX-M-group1	Εμπρόσθιος: 5'-AAA AAT CAC TGC GCC AGT TC Ανάστροφος: 5' -AGC TTA TTC ATC GCC ACG TT	[25]
CTX-M-group2	Εμπρόσθιος: 5' - CGA CGC TAC CCC TGC TAT T Ανάστροφος: 5' -CCA GCG TCA GAT TTT TCA GG	
CTX-M-group9	Εμπρόσθιος: 5' -CAA AGA GAG TGC AAC GGA TG Ανάστροφος: 5'-ATT GGA AAG CGT TCA TCA CC	

2.6 Φυλογενετική τυποποίηση (Phylogrouping-Triplex pcr) στελεχών *E. coli*

Για την φυλογενετική τυποποίηση των στελεχών *E. coli* εφαρμόστηκε η μοριακή μέθοδος, Phylogrouping_triplex PCR βάσει δημοσιευμένου πρωτοκόλλου [27]. Σύμφωνα με αυτή, τα στελέχη *E. coli* μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις κύριες φυλογενετικές ομάδες A, B1, B2 και D ανάλογα με τη παρουσία ή απουσία τριών δεικτών: τα γονίδια *chuA* και *yjaA* και τον γενετικό τόπο TSPE4.C2. Το γονίδιο *yjaA* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που εκφράζεται σε καταστάσεις στρες και εντοπίζεται κυρίως σε στελέχη *E. coli* K-12 [28], ενώ το *chuA* είναι απαραίτητο για την μεταφορά αίμης στα εντεροαιμορραγικά στελέχη *E. coli* O157:H7. Ο γενετικός τόπος TSPE4.C2 εικάζεται πως εκφράζει για ένζυμο λιπάσης/εστεράσης.

Οι ομάδες B2 και D σχετίζονται με παθογονικότητα (λόγω της ύπαρξης του γονιδίου *chuA*) και σε αυτές κυρίως κατατάσσονται παθογόνα στελέχη που προκαλούν εξωεντερικές λοιμώξεις [27, 29].

Η κατάταξη των στελεχών στις τέσσερις αυτές ομάδες πραγματοποιείται βάσει των ζωνώσεων που παρατηρούνται κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR (**Εικόνα 12A**) και του αλγορίθμου της **Εικόνας 12B**. Στον **Πίνακα 4** παρουσιάζονται οι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν.



Εικόνα 12: A) Πρότυπο ζωνών κατά την ηλεκτροφόρηση, B) Αλγόριθμος προσδιορισμού των φυλογενετικών ομάδων

Πίνακας 4: Εκκινητές γονιδίων φυλογενετικών ομάδων

Γονίδιο	Αλληλουχίες	Βιβλιογραφική πηγή
ChuA	ChuA.1: 5' – GACGAACCAACGGTCAGGAT – 3' ChuA.2: 5' – TGCCGCCAGTACCAAAGACA – 3'	[27]
YjaA	YjaA.1: 5' – TGAAGTGTCAGGAGACGCTG – 3' YjaA.2: 5' – ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC 3'	
TspE4C2	TspE4C2.1: 5' – GAGTAATGTCGGGGCATTCA – 3' TspE4C2.2: 5' – CGCGCCAACAAAGTATTACG – 3'	

Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα

3.1 Αποτελέσματα επιπέδων ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

Στην **Εικόνα 13** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των προφίλ αντιμικροβιακής αντοχής των 139 κλινικών στελεχών που μελετήθηκαν. Σύμφωνα με τα κλινικά όρια που προτείνει ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός EUCAST (βλ. **Πίνακα 2**), από τα 139 κλινικά στελέχη *E.coli* που μελετήθηκαν τα 64 χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητα (S) (64/139, 46%), τα 58 ως ανθεκτικά (R) (58/139, 42%) και 17 ως πολυανθεκτικά (MDR) (17/139, 12%) (**Πίνακας 5**).

Σημαντική αναφορά πρέπει να γίνει στο ότι τα περισσότερα στελέχη ανέπτυξαν αντοχή στα αντιβιοτικά αμικιλίνη (AMP) σε ποσοστό 39,10%, πιπερακιλλίνη (PIP) σε ποσοστό 32,60% και στο συνδυασμό αμοξικιλίνης/κλαβουλανικού οξέος (AMC) σε ποσοστό 26% (**Εικόνα 14**).

Επιπλέον, 10 από τα 139 στελέχη έδωσαν θετικό DDST αποτέλεσμα. Όλα τα DDST θετικά στελέχη ήταν πολύ-ανθεκτικά (MDR) και παρατηρήθηκαν εκτεταμένες αντοχές όπως παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6**.

Όσον αφορά την προέλευση των στελεχών, από τα 64 κλινικά στελέχη που χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητα (S), τα 51 είχαν απομονωθεί από ούρα (51/64, 79,69%), 13 από αίμα (13/64, 20,31%). Από τα 58 στελέχη που χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικά (R), τα 42 προέρχονταν από δείγμα ούρων (42/58, 72,41%), τα 12 από αίμα (12/58, 20,69%), 2 από τραύμα (2/58, 3,45%), 1 από ιστό (ΠΟΥ) (1/58, 1,72%) και 1 από πτύελα (1/58, 1,72%). Τέλος, από τα 17 στελέχη που χαρακτηρίστηκαν ως πολύ-ανθεκτικά (MDR), τα 12 είχαν απομονωθεί από ούρα (12/17, 70,59%), 4 από αίμα (4/17, 23,53%) και 1 από τραύμα (1/17, 5,88%) (βλ. **Συμπληρωματικός Πίνακας 7 του Παραρτήματος**).

Πίνακας 5: Αποτελέσματα των προφίλ αντοχής

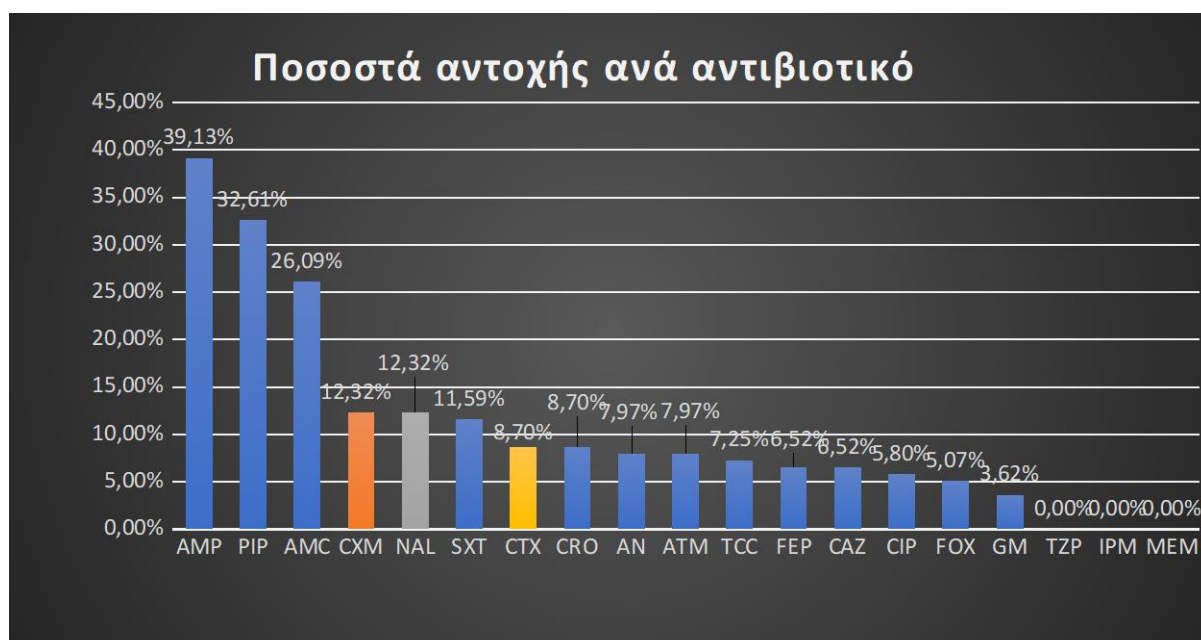
Προφίλ Αντοχής	R	S	MDR	Σύνολο
Πλήθος του κάθε προφίλ αντοχής	58	64	17	139
Ποσοστό	41,73%	46,04%	12,23%	



Εικόνα 13: Γράφημα συχνότητας εμφάνισης ευαίσθητων (S), ανθεκτικών (R) και πολύ-ανθεκτικών (MDR) κλινικών στελεχών *E. coli*

Πίνακας 6: Πρότυπο Αντοχής, Γονίδια Αντοχής και Φυλογενετική Ομάδα των DDST θετικών στελεχών

Στέλεχος	Δείγμα	Πρότυπο Αντοχής	Προφίλ Αντοχής	Γονίδια Αντοχής	Φυλογενετική Ομάδα
22	ΟΥΡΑ	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, AN, CIP, NAL	MDR	CTX-M-group1	B2
54	ΟΥΡΑ	AMP, AMC, PIP, TCC, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, GN, AN, CIP, NAL	MDR	CTX-M-group1, TEM_A	B2
60	ΟΥΡΑ	AMP, AMC, PIP, TCC, CXM, CTX, CRO, ATM, AN, SXT, CIP, NAL	MDR	CTX-M-group1	B2
84	ΟΥΡΑ	AMP, AMC, PIP, CXM, CTX, FEP, CRO	MDR	CTX-M-group1	D
117	ΟΥΡΑ	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, STX	MDR	CTX-M-group1, TEM_A	A
294	ΟΥΡΑ	AMP, PIP, CXM, CTX, CRO, ATM	MDR	CTX-M-group1	B2
325	ΑΙΜΑ	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, CRO, ATM	MDR	CTX-M-group1	A
333	ΤΡΑΥΜΑ	AMP, AMC, PIP, CXM, CTX, FEP, CRO, ATM, GM, CIP, NAL	MDR	CTX-M-group1	B2
350	ΟΥΡΑ	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, CRO, FEP, ATM, SXT, CIP, NAL	MDR	CTX-M-group1	B2
203	ΑΙΜΑ	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FOX, CRO, ATM, STX, NAL	MDR	CTX-M-group1, TEM_A	D



Εικόνα 14: Διάγραμμα ποσοστών αντοχής ή ευαισθησίας των κλινικών στελεχών ανά αντιβιοτικό

3.2 Αποτελέσματα ανίχνευσης γονιδίων αντοχής

Τα 10 DDST θετικά στελέχη μελετήθηκαν περαιτέρω για την παρουσία γονιδίων που εκφράζουν ESBLs με τη μοριακή μέθοδο της PCR. Σε όλα τα DDST θετικά στελέχη (10/10, 100%) ανιχνεύθηκε το γονίδιο blaCTX-M-group1. Επίσης, τα 3 από αυτά τα 10 ήταν ταυτόχρονα θετικά και για το γονίδιο blaTEM_A. (βλ. **Πίνακα 6**)

Όπως φαίνεται και στον **Πίνακα 6**, η πλειοψηφία των στελεχών αυτών (7/10, 70%) απομονώθηκε από ούρα ενώ τα υπόλοιπα από αίμα και τραύμα [2, (2/10, 20%) και 1 (1/10, 10%), αντίστοιχα].

3.3 Αποτελέσματα Φυλογενετικών ομάδων (Phylogroups)

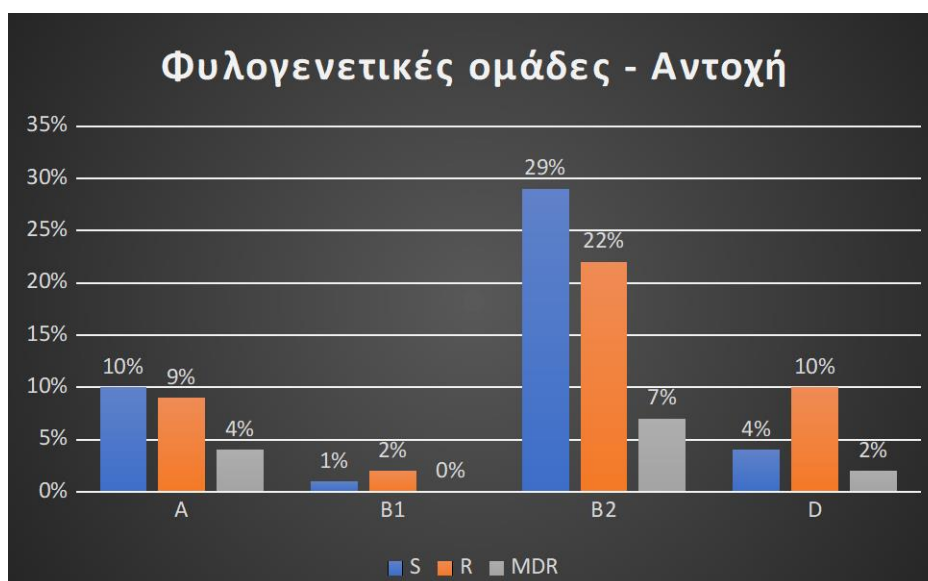
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Phylogrouping η επικρατέστερη ομάδα είναι η B2 με ποσοστό 58% (81/139) ενώ ακολούθησαν οι ομάδες A (31/139, 22%), D (23/139, 17%) και τέλος η B1 (4/139, 3%) (**Εικόνα 15**).

Όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 16** η κάθε ομάδα περιλαμβάνει τόσο ευαίσθητα (S) όσο και ανθεκτικά (R) και πολυανθεκτικά (MDR) στελέχη. Ωστόσο η πλειοψηφία των στελεχών που κατατάχθηκαν στην ομάδα D χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικά (R). Αντίθετα, τα περισσότερα στελέχη των ομάδων A και B2 ήταν ευαίσθητα (S).

Επιπρόσθετα, η πλειοψηφία των στελεχών που παράγουν ESBLs (6/10 συνολικά) ταξινομήθηκαν στην ομάδα B2 ενώ τα υπόλοιπα στις ομάδες D (2/10) και A (2/10) (**Πίνακα 6**).



Εικόνα 15: Γράφημα ποσοστών εμφάνισης φυλογενετικών ομάδων



Εικόνα 16: Διάγραμμα συσχέτισης φυλογενετικών ομάδων με τα προφίλ αντοχής

Κεφάλαιο 4: Συζήτηση

Η αντιμικροβιακή αντοχή αποτελεί μείζον παγκόσμιο ζήτημα Δημόσιας Υγείας. Τα ανθεκτικά και πολυ-ανθεκτικά εντεροβακτηριακά είδη προκαλεί έντονη ανησυχία για την επιστημονική κοινότητα λόγω έλλειψης διαθέσιμων αποτελεσματικών θεραπευτικών επιλογών [3, 11,].

Το φαινόμενο αυτό δεν περιορίζεται μόνο στο νοσοκομειακό χώρο αλλά και στο ευρύτερο περιβάλλον. Έτσι, η προσέγγιση της Ενιαίας Υγείας, με την διατομεακή συνεργασία, καθίσταται ως η πιο αποτελεσματική για τον περιορισμό του φαινομένου [3, 11, 30, 31].

Το *E. coli* είναι η πιο κοινή αιτία ενδοноσοκομειακών ουρολοιμώξεων αλλά και βακτηραιμίας. Για τη θεραπεία των ουρολοιμώξεων, τα αντιμικροβιακά που συνιστώνται είναι η τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη (SXT), η σιπροφλοξασίνη (CIP) και η αμοξικιλίνη-κλαβουλανικό οξύ (AMC) [5]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αρκετά από τα απομονωθέντα στελέχη *E. coli* εμφάνισαν αντοχή σε αυτές τις κατηγορίες αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται ευρέως κατά την κλινική πράξη. Τα αποτελέσματα αυτά συμβαδίζουν με αυτά άλλων δημοσιευμένων άρθρων [5, 32].

Σύμφωνα με δημοσιεύσεις, τα *E. coli* που παράγουν ESBLs και ειδικά οι υπότυποι της ομάδας CTX-M-1, που είναι οι επικρατέστεροι, συνεχώς απομονώνονται από βιολογικά δείγματα νοσηλεύομενων ασθενών και ευθύνονται για συχνά για ενδοноσοκομειακές λοιμώξεις [32, 33]. Ομοίως, στην βάση των αποτελεσμάτων της πτυχιακής αυτής εργασίας στην πλειοψηφία των στελεχών *E. coli*, που εμφάνισαν αντοχή σε κεφαλοσπορίνες 3ης και 4ης γενιάς, ανιχνεύθηκε το γονίδιο της ομάδας CTX-M_{group 1}.

Η φυλογενετική ομάδα B2 έχει αποδειχθεί ως η κυρίαρχη σε νοσοκομειακά περιβάλλοντα [34, 35, 36]. Ομοίως στην παρούσα εργασία, επικράτησε έναντι των υπόλοιπων ομάδων. Γενικά, τα στελέχη που κατατάσσονται στις ομάδες B2 και D, διαθέτουν το γονίδιο chuA [27, 29], το οποίο είναι υπεύθυνο για την μεταφορά αίμης και κυρίως εντοπίζεται σε παθογόνα στελέχη του είδους (όπως εντεροαιμορραγικό *E.coli* O157:H7) [37, 38]. Αυτό υποδηλώνει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ παθογένειας και των φυλογενετικών ομάδων B2 και D. Το γεγονός ότι ένα ποσοστό MDR και R στελεχών ταξινομήθηκε στις φυλογενετικές ομάδες B2 και D, είναι πολύ σοβαρό καθώς τα στελέχη αυτά εκτός από ανθεκτικά μπορεί να είναι και παθογόνα. Αυτό

υπογραμμίζει την ανάγκη για περαιτέρω ανάλυση και την εφαρμογή της τεχνικών τελευταίας τεχνολογίας για την αποκάλυψη της ακριβής γενετικής σύστασης των στελεχών, όπως τη παρουσία παραγόντων με λοιμογόνο δράση (π.χ. γονίδια τοξινών).

Βιβλιογραφία

1. Davies, J. and Davies, D., 2010. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), pp.417-433.
2. ECDC, EFSA and EMA. ECDC/EFSA/EMA first joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. *EFSA Journal*. 2015;13. www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4006 Accessed 20.12.2017
3. <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html>
4. Solomon S.L., The Unique Contribution of One Health to combating Antibiotic Resistance (2017). <https://www.cdc.gov/onehealth/multimedia/factsheet.html> (accessed on 20.12.2017)
5. ECDC, 2020. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report for 2019. [online] European Centre for Disease Prevention and Control. Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2019>> [Accessed 10 February 2022].
6. European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2019. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017. *EFSA Journal* 2019;17(2):5598. Available at: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5598>
7. Sah, R., Dhungel, B., Yadav, B., Adhikari, N., Thapa Shrestha, U., Lekhak, B., Banjara, M., Adhikari, B., Ghimire, P. and Rijal, K., 2021. Detection of TEM and CTX-M Genes in *Escherichia coli* Isolated from Clinical Specimens at Tertiary Care Heart Hospital, Kathmandu, Nepal. *Diseases*, 9(1), p.15.
8. <https://www.cdc.gov/onehealth/basics/index.html>
9. Berg, H., 2004. *E. coli in Motion*. [online] [Link.springer.com](https://link.springer.com). Available at: <<https://link.springer.com/book/10.1007/b97370>> [Accessed 10 February 2022].
10. Jang J, Hur HG, Sadowsky MJ, Byappanahalli MN, Yan T, Ishii S. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a

- review. *J Appl Microbiol.* 2017 Sep;123(3):570-581. doi: 10.1111/jam.13468. Epub 2017 Jul 3. PMID: 28383815
11. Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. and Di Ilio, C., 2013. *Escherichia coli* in Europe: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(12), pp.6235-6254
 12. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2004 Feb;2(2):123-40. doi: 10.1038/nrmicro818. PMID: 15040260.
 13. Greenwood, D., Slack, R., Peutherer, J., & Barer, M. *IATPIKH MIKROBIOLOGIA*. Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης. 2016.
 14. Monteiro R, Ageorges V, Rojas-Lopez M, Schmidt H, Weiss A, Bertin Y, Forano E, Jubelin G, Henderson IR, Livrelli V, Gobert AP, Rosini R, Soriani M, Desvaux M. A secretome view of colonisation factors in Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* (STEC): from enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) to related enteropathotypes. *FEMS Microbiol Lett.* 2016 Aug;363(16):fnw179.
 15. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Escherichia coli* (*E. coli*). <https://www.cdc.gov/ecoli/index.html>
 16. Yoneyama, H. and Katsumata, R., 2006. Antibiotic Resistance in Bacteria and Its Future for Novel Antibiotic Development. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(5), pp.1060-1075.
 17. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med.* 2006 Jun; 119 (6 Suppl 1): S3-10; discussion S62-70. doi: 10.1016/j.amjmed.2006.03.011. PMID: 16735149.
 18. Zinner, S., 2007. Antibiotic use: present and future. [online] PubMed. Available at: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17802919/>> [Accessed 10 February 2022].
 19. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Jan;48(1):1-14
 20. Oh EJ, Lee S, Park YJ, Park JJ, Park K, Kim SI, Kang MW, Kim BK. Prevalence of metallo-beta-lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean university hospital and comparison of screening methods for detecting metallo-beta-lactamase. *J Microbiol Methods.* 2003 Sep;54(3):411- 8.
 21. Bush K. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018 Sep 24;62(10):e01076-18.

22. MacWilliams, M. P. (2012). Indole test protocol. *American Society for Microbiology, Washington, DC.*
23. 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.
24. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance Version 2.01 July 2017
25. Woodford, N., & Ellington, M. J. (2007). The emergence of antibiotic resistance by mutation. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(1), pp.5–18.
26. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(1):15-22. doi:10.1128/AAC.48.1.15-22.2004
27. 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.
28. www.ncbi.nlm.nih.gov/gene
29. 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.
30. WHO, Newsroom, One health approach, www.who.int/newsroom/q-a-detail/onehealth
31. CDC, One health, <https://www.cdc.gov/onehealth/index.htm>
32. Hassan, Shafaq & Jamal, Syed & Kamal, Mustafa. (2011). Occurrence of multidrug resistant and ESBL producing *E. coli* causing urinary tract infections. *Journal of Basic and Applied Sciences*. 7. 39-43.
33. Pandit R, Awal B, Shrestha SS, Joshi G, Rijal BP, Parajuli NP. Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL) Genotypes among Multidrug-Resistant Uropathogenic *Escherichia coli* Clinical Isolates from a Teaching Hospital of

- Nepal. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2020;2020:6525826. Published 2020 Apr 15. doi:10.1155/2020/6525826
34. Lee JH, Subhadra B, Son YJ, et al. Phylogenetic group distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infections in South Korea. *Lett Appl Microbiol*. 2016;62(1):84-90. doi:10.1111/lam.12517
 35. Dadi, B.R., Abebe, T., Zhang, L. *et al.* Distribution of virulence genes and phylogenetics of uropathogenic *Escherichia coli* among urinary tract infection patients in Addis Ababa, Ethiopia. *BMC Infect Dis* 20, 108 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12879-020-4844-z>
 36. Iranpour D, Hassanpour M, Ansari H, Tajbakhsh S, Khamisipour G, Najafi A. Phylogenetic groups of *Escherichia coli* strains from patients with urinary tract infection in Iran based on the new Clermont phylotyping method. *Biomed Res Int*. 2015;2015:846219. doi:10.1155/2015/846219
 37. Spurbeck RR, Dinh PC Jr, Walk ST, et al. *Escherichia coli* isolates that carry *vat*, *fyuA*, *chuA*, and *yfcV* efficiently colonize the urinary tract. *Infect Immun*. 2012;80(12):4115-4122. doi:10.1128/IAI.00752-12
 38. Nagy G, Dobrindt U, Kupfer M, Emödy L, Karch H, Hacker J. Expression of hemin receptor molecule *ChuA* is influenced by *RfaH* in uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect Immun*. 2001;69(3):1924-1928. doi:10.1128/IAI.69.3.1924-1928.2001

Παράρτημα

No	Δείγμα	Φυλογενετική Ομάδα	Προφίλ Αντοχής	Πρότυπο Αντοχής
1	ΟΥΡΑ	A	R	AMC
2	ΟΥΡΑ	D	S	
3	ΟΥΡΑ	B2	S	
5	ΟΥΡΑ	A	R	AMP, AMC, PIP, TCC (I), FOX
6	ΟΥΡΑ	A	R	AMP, AMC, PIP, TCC (I)
8	ΟΥΡΑ	B2	S	
9	ΟΥΡΑ	B2	R	AMP, AMC, PIP, TCC
10	ΑΙΜΑ	B2	R	AMP, AMC, PIP, TCC (I)
13	ΟΥΡΑ	D	R	NAL
17	ΠΤΥΕΛ A	A	R	AMP, AMC
22	ΟΥΡΑ	B2	MDR	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, AN (I), CIP, NAL
27	ΟΥΡΑ	B1	R	AMP, AMC, FEP
28	ΟΥΡΑ	B2	R	AMC
29	ΟΥΡΑ	D	R	AMP, AMC, PIP, SXT
31	ΟΥΡΑ	B2	S	
34	ΟΥΡΑ	A	R	AMP, AMC, FOX
36	ΟΥΡΑ	A	MDR	AMP, AMC, PIP, TCC, CXM, CAZ, CTX, FOX, FEP, CRO, ATM, GN (I)
40	ΟΥΡΑ	B2	R	AMP, AMC, PIP, TCC
43	ΟΥΡΑ	D	S	
46	ΟΥΡΑ	A	S	
47	ΟΥΡΑ	B2	MDR	AMP, AMC, PIP, TCC, CXM, CAZ, CTX, FOX, FEP, CRO, ATM
48	ΟΥΡΑ	B2	S	
51	ΟΥΡΑ	B2	S	
54	ΟΥΡΑ	B2	MDR	AMP, AMC, PIP, TCC, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, GN, AN (I), CIP, NAL
58	ΟΥΡΑ	B2	R	AN (I)
60	ΟΥΡΑ	B2	MDR	AMP, AMC, PIP, TCC, CXM, CTX (I), CRO, ATM (I), AN, SXT, CIP, NAL
61	ΟΥΡΑ	B2	S	
62	ΟΥΡΑ	A	S	
64	ΟΥΡΑ	B2	S	

65	OYPA	B2	R	AMP, AMC, PIP, TCC, CXM
66	OYPA	A	R	AMC (I)
68	OYPA	B2	S	
69	OYPA	A	S	
70	OYPA	B2	R	AMP, PIP, TCC (I), AN (I), SXT (I)
77	AIMA	B2	R	AMP, PIP
79	AIMA	B2	R	AMP, PIP
80	AIMA	A	S	
82	OYPA	A	R	AMP, SXT
84	OYPA	D	MDR	AMP, AMC, PIP, CXM, CTX, FEP, CRO
85	OYPA	B2	S	
86	OYPA	B2	S	
87	OYPA	A	S	
90	OYPA	D	R	AMP, STX
93	OYPA	B2	S	
97	AIMA	B2	S	
99	OYPA	A	R	CXM, FOX
110	OYPA	B2	S	
112	AIMA	B2	R	AMP, PIP
117	OYPA	A	MDR	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, STX
118	OYPA	D	MDR	AMP, AMC, CXM, CAZ, FOX, SXT
120	AIMA	B2	S	
122	OYPA	B2	R	AN
123	OYPA	B2	R	AMP, AMC, PIP
129	OYPA	B2	S	
130	OYPA	B2	R	AMC, CXM, AN, STX
133	AIMA	B2	S	
135	OYPA	B2	S	
137	AIMA	B2	S	
139	AIMA	A	S	
145	OYPA	B2	S	
149	OYPA	A	R	PIP
155	AIMA	A	R	AMP, PIP
157	OYPA	B2	R	AN
165	OYPA	D	S	
168	OYPA	A	S	
171	OYPA	A	S	
174	OYPA	A	S	

175	OYPA	B2	R	NAL
181	OYPA	B2	S	
185	TPAYM A	B2	R	GM,AN,NAL
191	OYPA	D	S	
197	OYPA	B2	S	
202	OYPA	B2	R	NAL
203	AIMA	D	MDR	AMP, AMC, PIP CXM, CAZ, CTX, FOX, CRO, ATM, STX, NAL
204	AIMA	B2	MDR	AMP, AMC, PIP, SXT, NAL
210	TPAYM A	B2	R	CIP,NAL
241	OYPA	B2	R	AMP,PIP
243	OYPA	A	S	
245	OYPA	A	MDR	AMP, AMC, PIP, AN, STX
246	AIMA	B2	R	AMP,AMC,PIP
249	AIMA	A	R	AMC,CXM
253	OYPA	B2	S	
254	OYPA	B2	R	AMP,AMC,PIP
255	AIMA	B2	S	
259	OYPA	B2	S	
261	OYPA	B2	S	
264	AIMA	B1	R	STX,CIP,NAL
265	AIMA	B2	MDR	AMP, AMC, PIP, GM, STX
267	AIMA	B2	S	
269	AIMA	D	S	
272	OYPA	D	R	AMP,PIP,SXT
276	OYPA	B2	S	
278	OYPA	B2	R	AMP,PIP
281	OYPA	D	R	AMP,PIP,SXT
284	AIMA	B2	S	
286	OYPA	B2	S	
287	OYPA	B2	R	AMP,SXT,NAL
288	AIMA	B2	S	
291	OYPA	B2	S	
292	ΠΟΥ	B1	R	AMP
294	OYPA	B2	MDR	AMP, PIP, CXM, CTX, CRO, ATM
296	OYPA	D	R	SXT
297	OYPA	D	R	GM

301	AIMA	B1	S	
303	OYPA	B2	R	AMP,PIP,
304	OYPA	B2	S	
305	AIMA	B2	S	
307	OYPA	A	MDR	AMP, PIP, GM, AN
309	OYPA	D	R	STX
311	OYPA	B2	S	
313	OYPA	D	R	AMP,PIP,SXT
314	AIMA	D	R	AMP,AMC,PIP
318	OYPA	B2	S	
320	OYPA	B2	S	
324	OYPA	A	S	
325	AIMA	A	MDR	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, CRO, ATM
328	OYPA	B2	R	AMP,PIP
331	OYPA	A	R	STX
333	TPAYM A	B2	MDR	AMP, AMC, PIP, CXM, CTX, FEP, CRO, ATM, GM, CIP, NAL
334	OYPA	B2	R	CIP,NAL
335	AIMA	D	R	NAL
336	OYPA	B2	R	AMP
350	OYPA	B2	MDR	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, CRO, FEP, ATM, SXT, CIP, NAL
355	OYPA	B2	S	
359	OYPA	B2	S	
360	OYPA	A	S	
361	OYPA	B2	R	AMP, AMC, PIP
362	OYPA	B2	R	AMP, AMC, PIP
363	OYPA	A	S	
364	OYPA	B1	R	AMP, PIP, SXT
365	OYPA	B2	S	
366	OYPA	B2	S	
367	OYPA	D	R	AMP, AMC, PIP, SXT, NAL
368	OYPA	D	S	
375	OYPA	A	S	
378	AIMA	B2	R	AMP, PIP, SXT
381	AIMA	D	R	SXT
387	AIMA	B2	S	
390	OYPA	D	R	AMP, AMC