



ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ ΚΑΙ
ΙΟΓΕΝΕΣΗΣ ΤΟΥ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ΣΕ
ΚΡΕΑΤΟΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ»
(ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ)**

ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΩΝ

Πάλλας Αντώνης ΑΜ: 18684097

Λαουτάρη Νικολιάννα ΑΜ: 18684028

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ

Χούχουλα Δήμητρα

ΑΘΗΝΑ 2023

ΘΕΜΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ

«Ανίχνευση γονιδίων αντοχής και ιογένεσης του *Klebsiella pneumoniae* σε κρεατοσκευάσματα με μοριακές τεχνικές»

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

01	ΧΟΥΧΟΥΛΑ ΔΗΜΗΤΡΑ	
02	ΜΠΑΤΡΙΝΟΥ ΑΝΘΙΜΙΑ	
03	ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΣ ΔΙΟΝΥΣΙΟΣ	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος Πάλλας Αντώνιος του Στυλιανού, με αριθμό μητρώου 18684097 και η κάτωθι υπογεγραμμένη Λαουτάρη Νικολιάννα του Γεωργίου, με αριθμό μητρώου 18684028, φοιτητές του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστήμων Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνουμε υπεύθυνα ότι:

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

Ο Δηλών

Πάλλας Αντώνιος



Η Δηλούσα

Λαουτάρη Νικολιάννα



Ευχαριστίες

Αρχικά, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε την επιβλέπουσα καθηγήτρια της πτυχιακής μας εργασίας, κυρία Χούχουλα Δήμητρα για την σημαντική προσφορά της, την συνεργασία που είχαμε μαζί της, για τις χρήσιμες πληροφορίες που μας μετέδωσε αλλά και για την καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της συγγραφής αυτής. Ακόμη, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε την Βουγιουκλάκη Δέσποινα και την Τσάκνη Αλίκη για την ευρύτερη συμβολή τους στην παρούσα εργασία.

Τις ευχαριστίες μας θα θέλαμε να εκφράσουμε και στα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής της πτυχιακής μας εργασίας, Μπατρίνου Ανθιμιά και Αντωνόπουλος Διονύσιος για την προσεκτική ανάγνωση της εργασίας μας.

Περίληψη

Σε αυτή τη μελέτη έγινε ανίχνευση των λοιμογόνων γονιδίων *MrkA*, *EcpA* και *FimH* αλλά και των γονιδίων αντίστασης στις καρβαπενέμες, *BlaIMP-1* και *BlaOXA-48* του μικροοργανισμού *Klebsiella pneumoniae*. Για τον σκοπό αυτό έγινε απομόνωση DNA από 17 ελληνικά δείγματα κρέατος από τοπικές αγορές. Το πείραμα περιλάμβανε 9 δείγματα κρεάτων (53%) από βοοειδή, 4 (23%) από χοιρινό, 3 (18%) από κοτόπουλο και 1 (6%) από αρνί. Οι επιθυμητές περιοχές των γονιδίων ενισχύθηκαν με PCR και το προϊόν που προέκυψε υποβλήθηκε στη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης. Τα αποτελέσματα της έρευνας που διεξήχθη υποδεικνύουν υψηλή συχνότητα εμφάνισης *Klebsiella pneumoniae* (58,8%). Πιο συγκεκριμένα, τα γονίδια *FimH* και *MrkA*, τα οποία κωδικοποιούν τις φιμπρίες συγκολλητίνες τύπου 1 και τύπου 3, ήταν παρόντα σε 8 (47,1%) και 3 (17,6%) απομονώσεις αντίστοιχα. Επιπλέον, στο 29,4% των απομονώσεων ανακαλύφθηκε τουλάχιστον ένα γονίδιο αντίστασης. Αναλυτικότερα, το *BlaOXA-48* ήταν το επικρατέστερο γονίδιο που εντοπίστηκε σε 4 από τις 17 (23,5%) απομονώσεις, ακολουθούμενο από το *BlaIMP-1* με γονοτυπική συχνότητα 5,9% (σε 1 από τα 17 δείγματα).

Λέξεις – Κλειδιά: *Klebsiella pneumoniae*, τρόφιμο, αντιμικροβιακή αντοχή, ιογένεση

Abstract

In this study, the virulence genes MrkA, EcpA and FimH as well as the carbapenem resistance genes BlaIMP-1 and BlaOXA-48 of *Klebsiella pneumoniae* were detected. For this purpose, DNA isolation was performed from 17 Greek meat samples from local markets. This experiment included 9 meat samples (53%) from cattle, 4 (24%) from pork, 3 (18%) from chicken and 1 (6%) from lamb. The desired gene regions were amplified by PCR and the resulting product was subjected to the electrophoresis procedure. The results of the survey conducted indicated a high prevalence of *Klebsiella pneumoniae* (58.8%). More specifically, the FimH and MrkA genes, which encode type 1 and type 3 fibrillar adhesins, were present in 8 (47.1%) and 3 (17.6%) isolates, respectively. In addition, at least one resistance gene was discovered in 29.4% of isolates. More specifically, BlaOXA-48 was the most predominant gene detected in 4 out of 17 (23.5%) isolates, followed by BlaIMP-1 with a genotypic frequency of 5.9% (1 out of 17 samples).

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, food, antimicrobial resistance, virulence

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	4
Abstract	5
Κατάλογος Εικόνων.....	8
Κατάλογος Πινάκων.....	10
1. Εισαγωγή.....	11
2. Γενικά χαρακτηριστικά του βακτηρίου <i>Klebsiella pneumoniae</i>.....	14
2.1 Κύρια χαρακτηριστικά	14
2.2 Εμφάνιση του <i>K. pneumoniae</i> σε νοσοκομειακές μονάδες.....	15
2.3 Παθογονικότητα του <i>K. pneumoniae</i>	16
2.3.1 Κάψα.....	16
2.3.2 Φίμπρια (Fimbriae).....	17
2.3.3 Λιποπολυσακχαρίτης.....	20
2.3.4 Σιδηροφόρια (Siderophores).....	22
2.4 Γονίδια ιογένεσης και ανθεκτικότητας.....	23
2.4.1 BlaIMP-1	24
2.4.2 BlaOXA-48.....	24
2.4.3 MgrA	25
2.4.4 EspA	25
2.4.5 FimH.....	27
2.5 Διάγνωση και Πρόληψη	27
2.6 Τρόπος Αντιμετώπισης.....	28
3. NG-Test CARBA-5.....	29
3.1 Αξιολόγηση και ερμηνεία αποτελεσμάτων NG-Test CARBA	29
4. Μέθοδος PCR (Polymerase Chain Reaction).....	29
5. Ηλεκτροφόρηση.....	30
5.1 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτική αγαρόζη.....	31
5.2 Διαδικασία λήψης φωτογραφιών.....	32
6. Βιβλιογραφική ανασκόπηση ανίχνευσης γονιδίων <i>Klebsiella pneumoniae</i>	33
7. Σκοπός	37
8. Υλικά και μέθοδοι.....	37
8.1 Συσκευές.....	37

8.2 Υλικά	37
8.3 Διαλύματα.....	38
8.4 Φαινοτυπική ανάλυση με NG-Test CARBA-5	43
8.4.1 Αναλυτικά η διαδικασία του NG-Test.....	43
8.5 Αναλυτικά η διαδικασία του πειράματος	44
8.6 Διάγραμμα ροής Πειραματικής Διαδικασίας	45
8.7 Συλλογή δειγμάτων	45
8.8 Απομόνωση DNA.....	46
8.8.1 Αναλυτικά η διαδικασία απομόνωσης με Monarch Genomic DNA Purification Kit	46
9. Ενίσχυση τμήματος DNA σύμφωνα με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction).....	49
9.1 Τα στάδια που επαναλαμβάνονται σε κάθε κύκλο της μεθόδου:.....	49
9.2 Προετοιμασία δειγμάτων PCR:	50
9.3 Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης	52
10. Αποτελέσματα μελέτης.....	54
10.1 NG-Test CARBA-5	54
10.2 Τρυβλία.....	54
10.3 PCR.....	59
10.4 Φαινοτυπική Ανάλυση.....	62
10.5 Γονίδια ιογένεσης και ανθεκτικότητας.....	63
11. Συζήτηση	64
12. Συμπεράσματα	70
Βιβλιογραφία.....	72

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Η κάψα στην λοιμογόνο δύναμη του <i>K. pneumoniae</i>	17
Εικόνα 2: Κροσσοί τύπου 1	19
Εικόνα 3: Κροσσοί τύπου 3	20
Εικόνα 4: Ο ρόλος του λιποπολυσακχαρίτη στην λοιμογόνο δράση του <i>K. pneumoniae</i>	21
Εικόνα 5: Η ίνα ECP του <i>E. coli</i>	26
Εικόνα 6: Αναλυτικός ζυγός.....	39
Εικόνα 7: Φυγόκεντρος	39
Εικόνα 8: Θερμομπλόκ	40
Εικόνα 9: Θερμοκυκλοποιητής.....	40
Εικόνα 10: Vortex.....	41
Εικόνα 11: Συσκευή ηλεκτροφόρησης.....	41
Εικόνα 12: Τροφοδοτικό ηλεκτροφόρησης.....	41
Εικόνα 13: Επωαστικός κλίβανος	42
Εικόνα 14: Συσκευή με λάμπα UV.....	42
Εικόνα 15: Αποτελέσματα ανάλυσης NG-Test CARBA-5 στα δείγματα 20, 22, 25.....	43
Εικόνα 16: Τρυβλίο CHROMagar ORIENTATION της εταιρείας BIOPREPARE.....	54
Εικόνα 17: Αποτελέσματα τρυβλίων C. Orient. για τα δείγματα 20-23.	55
Εικόνα 18: Αποτελέσματα τρυβλίων C. Orient. για τα δείγματα 24 και 25.....	55
Εικόνα 19: Αποτελέσματα τρυβλίων C. Orient. για τα δείγματα 26 και 27.....	56
Εικόνα 20: Αποτελέσματα τρυβλίων C. Orient. για τα δείγματα 28 και 29.....	56
Εικόνα 21: Αποτελέσματα τρυβλίων C. Orient. για τα δείγματα 30 και 31.....	57
Εικόνα 22: Αποτελέσματα τρυβλίων C. Orient. για τα δείγματα 32 και 33.....	57

Εικόνα 23: Αποτελέσματα τρυβλίων <i>C. Orient.</i> για τα δείγματα 34 και 35.....	58
Εικόνα 24: Αποτελέσματα τρυβλίων <i>C. Orient.</i> για το δείγμα 36.....	58
Εικόνα 25: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης για το γονίδιο <i>FimH</i>	60
Εικόνα 26: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης για το γονίδιο <i>EcpA</i>	60
Εικόνα 27: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης για το γονίδιο <i>FimH</i>	61

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Μορφολογικές και βιοχημικές ιδιότητες του <i>K. pneumoniae</i>	15
Πίνακας 2: Κύριες καρβαπενεμάσες που έχουν απομονωθεί σε στελέχη <i>K. pneumoniae</i>	23
Πίνακας 3: Αλληλουχίες εκκινητών ενίσχυσης τμήματος για τα γονίδια.....	51
Πίνακας 4: Σύσταση μίγματος αντίδρασης PCR.....	52
Πίνακας 5: Παρασκευή πηκτής αγαρόζης 2.2% και 3.3%.....	53
Πίνακας 6: Ανίχνευση του <i>Klebsiella pneumoniae</i> με ανάλυση PCR και τρυβλίο C. ORIENT.	62
Πίνακας 7: Στελέχη <i>Klebsiella pneumoniae</i> που φέρουν τα γονίδια EcpA, FimH και MrkA.	63

1. Εισαγωγή

Τα Εντεροβακτήρια βρίσκονται στο έδαφος, στο νερό και συναντώνται φυσιολογικά στον εντερικό σωλήνα και πιο σπάνια στο αναπνευστικό σύστημα του ανθρώπου και των ζώων (Κουρτίδου 2021). Η εύρεση των μελών της οικογένειας των Εντεροβακτηρίων σε κλινικά δείγματα, είναι επίσης ένα πολύ σύνηθες φαινόμενο τα τελευταία χρόνια (Κοντοπούλου 2019). Αρκετά από αυτά έχουν την ικανότητα να προκαλούν λοιμώξεις στον άνθρωπο, όπως τα είδη *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* άλλα και ορισμένα είδη που ανήκουν στα γένη *Shigella spp.*, *Salmonella spp.* (Κουρτίδου 2021). Μεγάλη ανησυχία, δημιουργεί η ανθεκτικότητα που έχουν αναπτύξει αυτά τα βακτήρια τα τελευταία χρόνια (Oplustil, Nunes, and Mendes 2001).

Το κολοβακτηρίδιο *Escherichia coli* ανήκει στην οικογένεια των *Enterobacteriaceae*, αποικοδομεί τη λακτόζη και παράγει αέριο σε θερμοκρασία 44° - 46°C (Brenner and Farmer 2015). Τα Εντεροβακτήρια αποτελούν δείκτες μόλυνσης των τροφίμων από κόπρανα και περιλαμβάνουν τα γένη *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* (Κουτζεκίδου-Ρούκα Π. 2016). Το στέλεχος της οικογένειας των Εντεροβακτηρίων που θα αναλύσουμε είναι τα βακτήρια του γένους *Klebsiella spp.* Η περιγραφή του *K. pneumoniae* είχε γίνει για πρώτη φορά από τον Γερμανό μικροβιολόγο και παθολόγο Carl Friedländer, (Friedlaender 1882) ως πιθανή βακτηριακή αιτία της πνευμονίας το 1882. Ωστόσο, πήρε το όνομα της από τον Theodor Albrecht Edwin Klebs, έναν από τους θεμελιωτές της μικροβιολογίας ο οποίος είχε δει αυτά τα βακτήρια στις αεροφόρους οδούς των ατόμων με πνευμονία το 1875 (Stürchler 2016).

Τα βακτήρια του γένους *Klebsiella spp.* (species in the plural form, περιγράφει την παρουσία ειδών του ίδιου γένους) ευδοκιμούν σε ενδονοσοκομειακό περιβάλλον, καθώς αναπτύσσονται εύκολα πάνω στο δέρμα και σε επιφάνειες, λόγω των χαμηλών απαιτήσεων σε θρεπτικά συστατικά (Anon n.d.). Μάλιστα σε έρευνα που έγινε το 2008 σε 40 Ελληνικά νοσοκομεία επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη του *Klebsiella pneumoniae* και συγκεκριμένα του γονιδίου BlaKPC-2, το οποίο έχει υψηλά ποσοστά αντοχής σε καρβαπενέμες, αντιβιοτικά β-λακτάμης (Giakkouri et al. 2009). Οι λοιμώξεις που μπορεί να προκαλέσει το *Klebsiella pneumoniae* σχετίζονται συνήθως με το πνευμονικό, κυκλοφορικό και ουροποιητικό σύστημα αλλά μπορεί να επηρεάσει και τα μαλακά μόρια (Hou et al. 2015, Mączgńska et al. 2021). Είναι γνωστό ότι τις

τελευταίες δεκαετίες τα στελέχη αυτά γίνονται όλο και πιο ανθεκτικά σε αντιβιοτικά, περιπλέκοντας έτσι τα θεραπευτικά σχήματα (Oplustil et al. 2001). Συνεπώς, δημιουργείται ανάγκη για εφαρμογή μέτρων απαραίτητα για την προστασία της δημόσιας υγείας.

Το βακτήριο *Klebsiella* αποτελεί ένα από τα αίτια βακτηριακής πνευμονίας της κοινότητας, με τα θύματά του να είναι κυρίως χρόνιοι αλκοολικοί, ανοσοκατασταλμένα άτομα που νοσηλεύονται για μεγάλο χρονικό διάστημα και πάσχουν από σοβαρά νοσήματα, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης (Κουρτίδου 2021). Αποτελεί αίτιο νοσοκομειακών επιδημιών λόγω της ραγδαίας διασποράς του στο περιβάλλον του νοσοκομείου. Στις Δυτικές περιοχές ευθύνεται για πάνω από το 8%, του συνόλου των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων, ενώ στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής για πάνω από το 9,9% των Νοσοκομειακών Λοιμώξεων (Hospital Acquired Infection HAI) έχοντας την 3^η θέση μετά από τα βακτήρια *Clostridium difficile* και *Staphylococcus aureus* (Magill et al. 2014).

Παρότι το *K. pneumoniae* συσχετίζεται με νοσοκομειακές λοιμώξεις, μπορεί να μεταδοθεί και μέσω των τροφίμων (Calbo et al. 2011). Πιο συγκεκριμένα, η πρώτη αναφορά που έγινε για το *Klebsiella pneumoniae* ως τροφιμογενές παθογόνο ήταν τον Ιανουάριο του 1998, σε έναν υγιή Αφροαμερικανό ο οποίος υπέστη μόλυνση έπειτα από κατανάλωση χάμπουργκερ με χοιρινό μπιφτέκι από γνωστή αλυσίδα γρήγορου φαγητού. Ο ασθενής εμφάνισε συμπτώματα γαστρεντερίτιδας και σοβαρή οργανική ανεπάρκεια, όμως εισήχθη σε μονάδα εντατικής θεραπείας με διαγνωσμένη σηψαιμία και μετά από χορήγηση αντιβιοτικής θεραπείας, επέζησε (Sabota et al. 1998).

Υπάρχουν και άλλες περιπτώσεις όπου το βακτήριο που μελετάμε έχει απομονωθεί από ωμό κρέας (Davis et al. 2015, Guo et al. 2016, Wu et al. 2012), αλλά και ωμά λαχανικά, (Davis and Price 2016 & Falomir, Rico, and Gozalbo 2013) χυμούς φρούτων (Ghenghesh et al. 2005) καθώς και τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση (Haryani et al. 2007; Sabota et al. 1998). Επίσης, η μελέτη που πραγματοποιήθηκε τον Φεβρουάριο του 2018 στην Ταϊλάνδη, έδειξε ότι από 35 δείγματα ψαριών που συλλέχθηκαν από 3 κεντρικές αγορές ήταν μολυσμένα με Εντεροβακτήρια, κυρίως των γενών *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Providencia*, *Serratia* και *Yersinia* σε ποσοστό 89% (Pongsilp and Nimnoi 2018). Η συγκέντρωση μεγάλου αριθμού κολοβακτηριδίων στα θαλασσινά και ειδικότερα των *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* και *Hafnia alvei* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης μόλυνσης των υδάτων από κόπρανα, καθώς

αυτά τα βακτήρια συναντώνται συνήθως στο έντερο του ανθρώπου. Σύμφωνα με τον Ενιαίο Φορέα Ελέγχου Τροφίμων (ΕΦΕΤ) η παρουσία των βακτηρίων αυτών επάγει την παραγωγή ισταμίνης η οποία σε μεγάλες ποσότητες προκαλεί τοξίνωση σε φρέσκα ή κατεψυγμένα ψάρια αλλά και σε κονσερβοποιημένα ή καπνιστά/ αλίπαστα ψάρια (ΕΦΕΤ 2014).

Ανησυχητικό κομμάτι αποτελεί η πολυανθεκτικότητα του *K. pneumoniae*, καθώς η ανθεκτικότητά του σε 3 ή περισσότερες κατηγορίες αντιβιοτικών, καθιστά πιο δύσκολη την αντιμετώπισή του (Haryani et al. 2007, Κουρτίδου 2021). Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας αναφέρει ότι τα τρόφιμα μπορούν να μεταφέρουν, στον άνθρωπο, βακτήρια ανθεκτικά στα αντιμικροβιακά φάρμακα και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απόκτηση λοιμώξεων που δεν απαντούν στα κοινά αντιβιοτικά (World Health Organization 2015). Γι' αυτό και τα ανθεκτικά στελέχη Εντεροβακτηρίων στις καρβαπενέμες και στις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς *Enterobacteriaceae* (συμπεριλαμβανομένου του *K. pneumoniae*) κατατάσσονται ως παθογόνα βακτήρια κρίσιμης προτεραιότητας, ανθεκτικά στα αντιβιοτικά και χρήζουν αναζήτησης νέων θεραπειών (World Health Organization 2015).

2. Γενικά χαρακτηριστικά του βακτηρίου *Klebsiella pneumoniae*

Το παθογόνο *Klebsiella pneumoniae* ή *Klebsiella* της πνευμονίας είναι ένα Gram αρνητικό, μη σπορογόνο, μη κινητό, προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο, με ραβδοειδές σχήμα μήκους 1-2 μm και με παχιά, περιβάλλουσα κάψα (Κοντοπούλου 2019). Έχει χαρακτηριστική μυρωδιά ζύμης και οι βακτηριακές αποικίες έχουν παχύρρευστη εμφάνιση, λόγω του ελύτρου πολυσακχαριδικής φύσεως το οποίο περιβάλλει τα κύτταρα του μικροβίου. Βρίσκονται φυσιολογικά στον εντερικό σωλήνα ορισμένων θηλαστικών αλλά και στο βλεννογόνο της ανώτερης αναπνευστικής οδού σε ποσοστό 10% των υγιών ανθρώπων (Κουρτίδου 2021).

2.1 Κύρια χαρακτηριστικά

Είναι σημαντική η αναφορά ορισμένων χαρακτηριστικών που είναι χρήσιμα στην ταυτοποίηση του βακτηρίου. Αρχικά, το παθογόνο *K. pneumoniae* καλλιεργείται εύκολα σε κοινά θρεπτικά υλικά και έχει άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης, τους 37°C. Έχει την ικανότητα να ζυμώνει τη λακτόζη και τη γλυκόζη με παραγωγή αερίου και του οξέος ακετυλομεθυλοκαρβινόλη (δοκιμασία Voges- Proskauer →θετική). Ακόμη, δίνει αρνητική τη δοκιμασία ερυθρού του μεθυλίου, μπορεί και αναπτύσσεται σε υλικό με μοναδική πηγή άνθρακα το κιτρικό νάτριο (IMViC= --++) και δεν παράγει ινδόλη από την τρυπτοφάνη. Το τελευταίο βιοχημικό χαρακτηριστικό είναι αυτό που ξεχωρίζει το *K. pneumoniae* από το *K. oxytoca*. (Δημητρακόπουλος 1987, Aryal 2015).

Πίνακας 1: Μορφολογικές και βιοχημικές ιδιότητες του *K. pneumoniae* (Argal 2015).

Χαρακτηριστικά	Αποτελέσματα
Gram	Gram -
Κινητικότητα	-
Παραγωγή Ινδόλης	-
Παραγωγή Υδρόθειου (H ₂ S)	-
Διάσπαση Γλυκόζης (παραγωγή αερίου/οξέος)	+
Διάσπαση Λακτόζης (παραγωγή αερίου στους 44°C /οξέος)	+
Αποκαρβοξυλίωση Λυσίνης	+
Κιτρικά	+
Νιτρικά (μείωση)	+
Υδρόλυση Ουρίας	+
Methyl red	-
Voges- Proskauer	+
Φαινυλαλανίνη	-

+ θετικό, - αρνητικό

2.2 Εμφάνιση του *K. pneumoniae* σε νοσοκομειακές μονάδες

Η παρουσία του *Klebsiella spp.* σε μονάδες εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ) είναι από τις πιο συχνές. Πιο συγκεκριμένα το *K. pneumoniae* είναι το πιο διαδεδομένο *Enterobacteriaceae* που μπορεί να παράγει καρβαπενεμάση (Won et al. 2011). Η συχνή ύπαρξη του βακτηρίου αυτού ελλοχεύει μεγάλο κίνδυνο καθώς ευθύνεται για τη σημαντική αύξηση των θανάτων λόγω της αντίστασης του στα αντιμικροβιακά φάρμακα. Το ανθεκτικό στις καρβαπενέμες *K. pneumoniae* (CRKP), (Schwaber and Carmeli 2008) αποτελεί συχνή αιτία λοιμώξεων του ουροποιητικού και του πνευμονικού συστήματος. Επιπλέον, μπορεί να επηρεάσει ανοσοκατεσταλμένα άτομα (άτομα με AIDS ή καρκίνο) προκαλώντας από λοιμώξεις του αίματος (σηψαιμία) και μηνιγγίτιδα έως λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος, όπως πνευμονία (Κουρτίδου 2021).

Η πνευμονία μπορεί να έχει ενδονοσοκομειακά και εξωνοσοκομειακά αίτια. Η ενδο-νοσοκομειακή πνευμονία αποδίδεται σε Gram αρνητικά βακτήρια, όπως τα *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *H. influenza*, *Legionella spp.* και τα Εντεροβακτήρια που έχουν μεγαλύτερη θνησιμότητα συγκριτικά με την αντίστοιχη από τα Gram θετικά, σε ποσοστό 50-75%. Η πνευμονία αποτελεί το 20% περίπου των νοσοκομειακών λοιμώξεων και είναι η τρίτη σε σειρά

συχνότητας μετά από τις ουρολοιμώξεις και τις μετεγχειρητικές λοιμώξεις. Η μεγαλύτερη συχνότητα παρατηρείται στις μονάδες εντατικής νοσηλείας (20%), κατά την ανάρρωση μετά από χειρουργική επέμβαση (18%) και στις νεογνικές μονάδες εντατικής νοσηλείας (7%). Η πνευμονία είναι η πιο σημαντική λοίμωξη μεταξύ των θανατηφόρων νοσοκομειακών λοιμώξεων (XRISTAKIS B. and LEGAKIS I. 2002).

Υπάρχουν πολλοί παράγοντες οι οποίοι ευθύνονται στην εμφάνιση ενδονοσοκομειακής πνευμονίας. Ο κίνδυνος για την εμφάνιση ενδονοσοκομειακής πνευμονίας αυξάνεται κυρίως σε περιπτώσεις χρήσης μηχανημάτων αναπνευστικής υποστήριξης ή στην περίπτωση της τραχειοστομίας. Έχουν καταγραφεί επανειλημμένα επεισόδια εισρόφησης δυνητικά παθογόνων βακτηρίων τα οποία έχουν αποικίσει προηγουμένως σε στοματοφάρυγγα και είναι σύνηθες, οι μικροοργανισμοί αυτοί να φτάνουν πιο συχνά σε μορφή υγρής μάζας παρά σε μορφή αεροσταγονιδίων (XRISTAKIS B. and LEGAKIS I. 2002).

2.3 Παθογονικότητα του *K. pneumoniae*

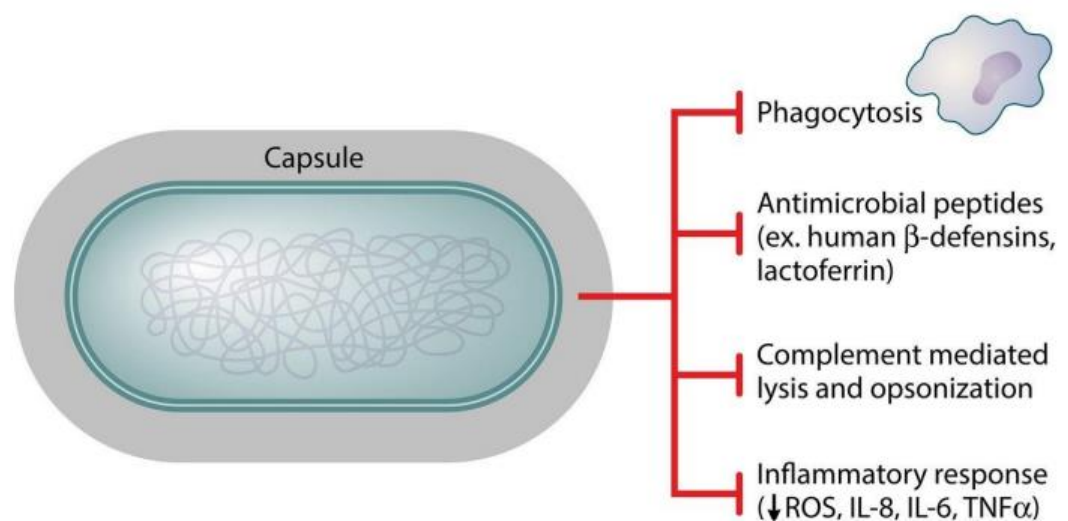
Η παθογένεια είναι όρος ο οποίος περιλαμβάνει την ιογένεση, την είσοδο και εξάπλωση του παθογόνου στον ξενιστή (Thomas and Elkinton 2004). Ο όρος παθογονικότητα περιλαμβάνει τους παράγοντες που επιτρέπουν στα βακτήρια να εισβάλλουν στον ξενιστή, παράγοντες που παράγονται από το βακτήριο και συμβάλλουν στην παθογένεια, και παράγοντες που αναστέλλουν την ικανότητα του ξενιστή να εξαλείψει τους οργανισμούς (Κοντοπούλου 2019).

Το χαρακτηριστικό που έχει το συγκεκριμένο παθογόνο είναι οι παράγοντες μολυσματικότητάς του, που του επιτρέπουν να προκαλεί λοίμωξη χωρίς αυτό εντοπίζεται από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Τα κύρια αντιγόνα του *Klebsiella*, είναι το K-αντιγόνο ελύτρου και το O-σωματικό LPS (λιποπολυσακχαριδικό) αντιγόνο (Κοντοπούλου 2019).

2.3.1 Κάψα

Η κάψα είναι ένα από τα πιο ουσιαστικά αντιγόνα της λοιμογόνου δύναμης του βακτηρίου και υπάρχουν 79 διαφορετικοί ορολογικοί τύποι πολυσακχαριτιδικών ελύτρων (K αντιγόνο) (Pan et al. 2015). Τα υλικά της, σε συνδυασμό με τις φίμπριες σχηματίζουν δεσμίδες

δημιουργώντας ένα παχύ στρώμα γύρω από την επιφάνεια του μικροβίου, σαν φραγμό προστατεύοντας έτσι το μικρόβιο από την φαγοκυττάρωση (Highsmith and Jarvis 1985). Το στρώμα αυτό αποτρέπει επίσης την ανίχνευση των αντιγόνων του μικροβίου από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος του ανθρώπου, μέσω της ενεργοποίησης του συμπληρώματος του ορού του ξενιστή (Podschun and Ullmann 1992). Τέλος, εμποδίζει τα συστατικά του συμπληρώματος, όπως το C3, από την αλληλεπίδραση με τη μεμβράνη, αποτρέποντας την οψωνοποίηση και την εισαγωγή του συμπλόκου επίθεσης στη μεμβράνη (MAC), η οποία οδηγεί στη λύση και έπειτα στο θάνατο του βακτηρίου.



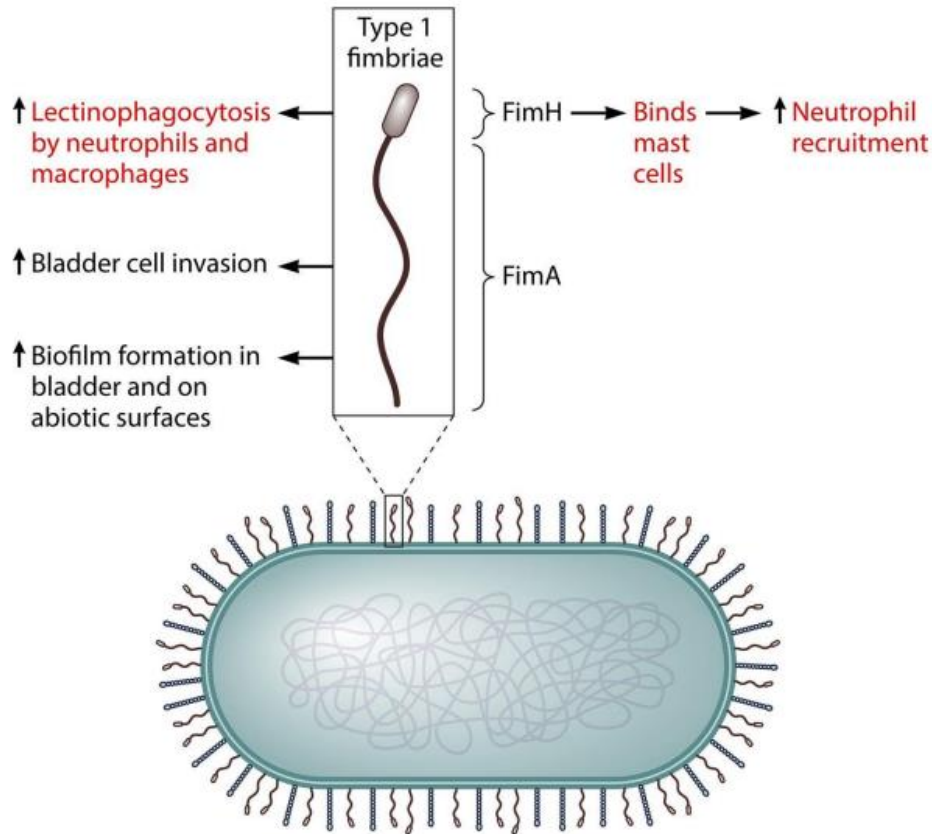
Εικόνα 1: Η κάψα στην λοιμογόνο δύναμη του *K. pneumoniae* (Paczosa and Mecsas 2016).

2.3.2 Φίμπρια (Fimbriae)

Η δημιουργία φλεγμονής ξεκινάει με την προσκόλληση του μικροβίου στα κύτταρα του ξενιστή με την βοήθεια των φιμπρίων. Οι φίμπριες είναι δομές που βρίσκονται στην επιφάνεια των μικροβίων με διάμετρο 1-11 nm και μήκος μέχρι τα 10 μ m. Οι τύποι που υπάρχουν στο *K. pneumoniae* είναι ο τύπος 1 (type 1 fimbriae), τύπος 3 (type 3 fimbriae), ο KPC fimbriae και η προσκολλητική ουσία (KPF-28 adhesin) (Li et al. 2014).

2.3.2.1 Type 1 fimbriae

Αρχικά, ο τύπος 1 (type 1 fimbriae) αποτελείται από λεπτά, άκαμπτα, νηματοειδή, οργανίδια (pilli), τα οποία δεν έχουν μαστίγια και αποτελούνται από μία κύρια δομική πρωτεΐνη (FimA). Μπορούν να ασκούν τις προσκολλητικές τους ιδιότητες με τη βοήθεια του μορίου FimH (adhesin) που βρίσκεται στην άκρη του οργανιδίου. Το σύμπλεγμα των γονιδίων Fim του *K. pneumoniae* έχει ένα μεταγραφικό ρυθμιστή FimK που βρίσκεται πίσω από το FimH (Kline et al. 2010). Τα fimbriae τύπου 1 εκτείνονται έξω από την κάψα και προσκολλώνται σε δομές οι οποίες περιέχουν μαννόζη, στα κύτταρα του ξενιστή ή στις εξωκυττάρειες μήτρες μέσω της FimH (Rosen et al. 2008). Ο υδρόφιλος χαρακτήρας των φιμπριών παίζει σημαντικό ρόλο στην λοιμογόνο δράση του μικροβίου και συμβάλλει στον αποικισμό του στα βλεννογόνα κύτταρα του ξενιστή. Τα fimbriae τύπου 1 μπορούν να εγκατασταθούν στα κύτταρα του ουροποιητικού συστήματος, αλλά δεν συνηθίζουν να πολλαπλασιάζονται στο έντερο ή στα κύτταρα των πνευμόνων.

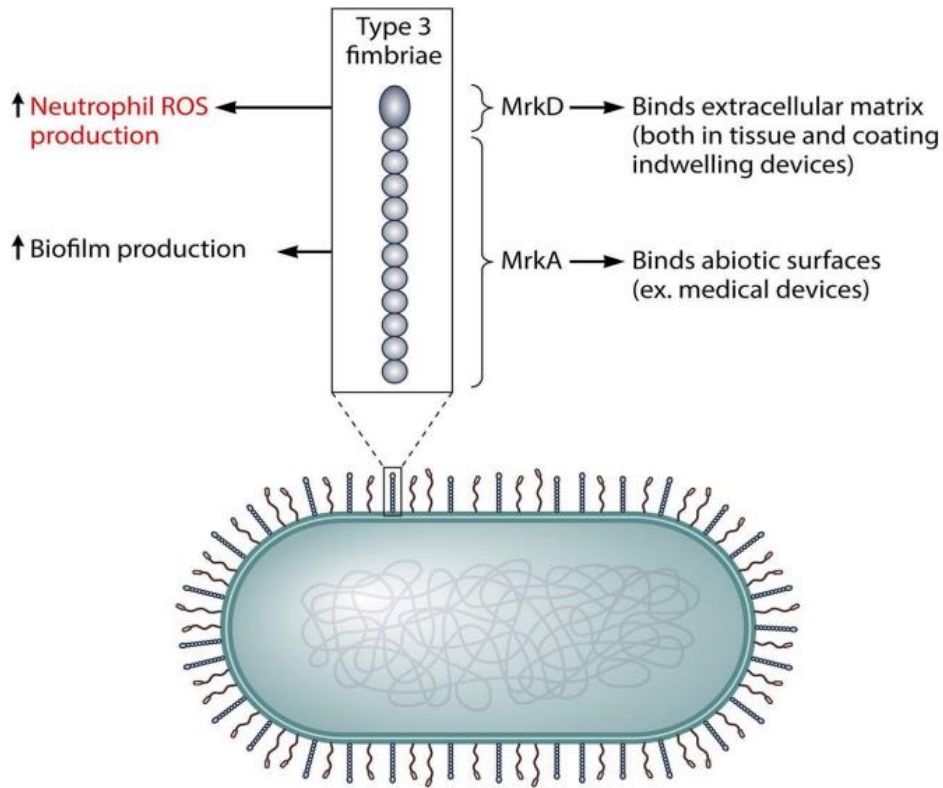


Εικόνα 2: Κροσσοί τύπου 1, η προσκόλληση των στελεχών *K. pneumoniae* στην ουροδόχο κύστη και ο σχηματισμός biofilm (Paczosa and Mecsas 2016)

2.3.2.2 Type 3 fimbriae

Τα οργανίδια αυτού του τύπου είναι ανθεκτικά στη μαννόζη (mannose – resistant *Klebsiella* – like) και δεν συντίθενται μόνο από το παθογόνο *K. pneumoniae* αλλά έχουν παρατηρηθεί και σε άλλα είδη Εντεροβακτηρίων (Clegg and Gerlach 1987). Το μήκος τους είναι 0,5-2 μm και το πλάτος τους 2-4 nm και συνήθως χαρακτηρίζονται ως προσαρτήματα (Li et al. 2014). Αποτελούνται από μία κύρια δομική πρωτεΐνη (MrkA) και από μία προσκολλητική (adhesin) πρωτεΐνη (MrkD). Το MrkA ευθύνεται για τον σχηματισμό του ελικοειδή άξονα ενώ η συγκολλητική πρωτεΐνη MrkD, η οποία βρίσκεται στην άκρη του οργανιδίου μπορεί να δεσμεύεται στα μόρια του κολλαγόνου. Υπάρχουν επίσης οι πρωτεΐνες MrkE, MrkB, MrkC και MrkF, οι οποίες είναι υπεύθυνες για συναρμολόγηση/σταθεροποίηση. Γενικότερα, τα βακτήρια που παράγουν φίμπριες τύπου 3 μπορούν να προσκολλώνται σε επιθηλιακά κύτταρα και στους

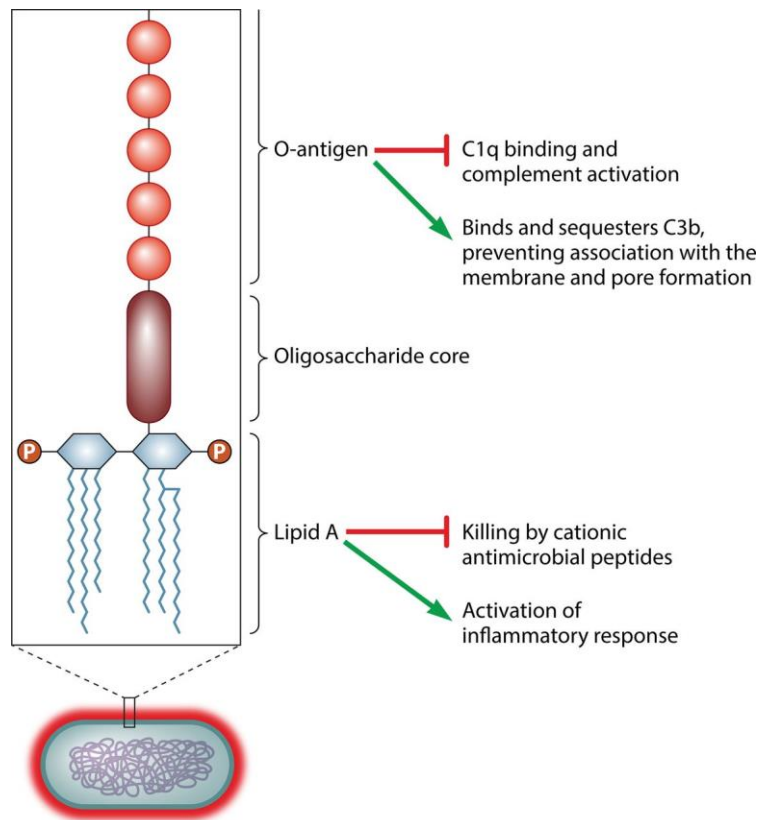
ιστούς των νεφρών και των πνευμόνων αλλά και στα κύτταρα του ουροποιητικού συστήματος και σχετίζονται κυρίως με τους ουροκαθετήρες (Murphy et al. 2013).



Εικόνα 3: Κροσσοί τύπου 3, σχηματισμός βιοφίλμ σε κατεστραμμένους ιστούς και σε ιατρικές συσκευές (Paczosa and Mecsas 2016).

2.3.3 Λιποπολυσακχαρίτης

Ο λιποπολυσακχαρίτης LPS χαρακτηρίζεται ως απαραίτητο συστατικό στοιχείο της εξωτερικής μεμβράνης των αρνητικών κατά gram βακτηρίων. Τα κύρια τμήματα από τα οποία αποτελείται είναι: το υδρόφοβο λιπίδιο A, το ολισακχαρίδιο του πυρήνα και το αντιγόνο O (επαναλαμβανόμενη πλάγια αλυσίδα ολιγοσακχαριτών) (Reeves et al. 1996). Ο πυρήνας core είναι η συνέχεια του λιπιδίου A, αποτελείται από ένα ζεύγος 8 υδρογονανθράκων γνωστών ως Kdo και μεταπίπτει στην πλάγια αλυσίδα του ολιγοσακχαρίτη O (Highsmith and Jarvis 1985).



Εικόνα 4: Ο ρόλος του λιποπολυσακχαρίτη στην λοιμογόνο δράση του *K. pneumoniae* (Paczosa and Mecsas 2016).

2.3.3.1 Λιπίδιο A

Το λιπίδιο A, γνωστό και ως ενδοτοξίνη, συντίθεται στο κυτταρόπλασμα και βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη του μικροβίου. Αποτελεί ισχυρό συνδέτη του TLR4, ενός υποδοχέα αναγνώρισης προτύπων, η διέγερση του οποίου οδηγεί στην παραγωγή κυτταροκινών και χημειοκινών. Αυτές βοηθούν στην προσέλκυση και ενεργοποίηση των κυτταρικών αποκρίσεων, συμπεριλαμβανομένων των ουδετερόφιλων και των μακροφάγων, τα οποία καθαρίζουν τη μόλυνση από *K. pneumoniae* και ελέγχουν την εξάπλωση σε άλλους ιστούς. Μάλιστα, σε πειράματα που έχουν γίνει σε ποντίκια έχει αποδειχθεί ότι η έλλειψη του λιπιδίου A κάνει τον οργανισμό πιο ευαίσθητο στην πνευμονία και συμβάλλει στη συστηματική εξάπλωσή της (Cai et al. 2009; Hirche et al. 2005 & Li et al. 2014). Τέλος, πειράματα τόσο in vitro όσο και in vivo έχουν αποδείξει ότι το λιπίδιο A προστατεύει από ορισμένα κατιονικά αντιμικροβιακά πεπτιδία (Anon n.d.-a & Clements et al. 2007).

2.3.3.2 Αντιγόνο O

Το O-αντιγόνο βοηθάει στην ταξινόμηση των διαφόρων οροτύπων του μικροβίου. Έχουν αναγνωρισθεί τουλάχιστον εννέα ομάδες O-αντιγόνων (O1, O2, O2ac, O3, O4, O5, O7, O8 και O12) στο *K. pneumoniae* (Hansen et al. 1999), αλλά μόνο οι τρεις από αυτές (O1, O2, O3) ευθύνονται για το 80% περίπου όλων των λοιμώξεων που αφορούν το *Klebsiella* (Follador et al. 2016). Ο ορότυπος O1 έχει την μεγαλύτερη συχνότητα απομόνωσης από κλινικά στελέχη *K. pneumoniae*. Ο τρόπος με τον οποίο προστατεύει το μικρόβιο από την θανάτωσή του είναι με την παρεμπόδιση της πρόσβασης των συστατικών του συμπληρώματος στους ενεργοποιητές (π.χ. πορίνες και τραχύ LPS).

2.3.4 Σιδηροφόρια (Siderophores)

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών στον ανθρώπινο ιστό δεν επηρεάζεται μόνο από την άμυνα που έχει ο ίδιος μικροοργανισμός. Το αυξημένο ποσοστό σιδήρου που υπάρχει στην προσβαλλόμενη περιοχή επηρεάζει την ανάπτυξη των μικροβίων, καθώς ο σίδηρος λειτουργεί σαν καταλύτης στην διαδικασία μεταφοράς οξυγόνου και ηλεκτρονίων (Bullen, Rogers, and Griffiths 1978). Ορισμένοι μικροοργανισμοί προσπαθώντας να εξασφαλίσουν τις ανάγκες τους για σίδηρο, από τον ξενιστή εκκρίνουν υψηλής συγγένειας – χαμηλού μοριακού βάρους ουσίες οι οποίες καλούνται σιδηροφόρια (siderophores). Αυτές οι ουσίες ανταγωνίζονται την πρόσληψη σιδήρου από τις πρωτεΐνες του ξενιστή. Τα βακτήρια, χρησιμοποιούν τους υποδοχείς σιδηρονικελιούχων σιδηρόφιλων του ξενιστή κάτω από συνθήκες έλλειψης σιδήρου στο περιβάλλον του ξενιστή. Με αυτό τον τρόπο, ενεργοποιώντας το σύστημα αποσιδήρωσης με τη μεσολάβηση εντεροβακτίνης, ξεκινάει η βακτηριακή ανάπτυξη (Koczura and Kaznowski n.d.). Η εντεροβακτίνη (Ent) είναι από τα πιο κοινά σιδηροφόρα που εκκρίνουν τα στελέχη *K. pneumoniae* και κωδικοποιείται στο γονιδίωμα του πυρήνα. Δεδομένου ότι η Ent είναι ένα κοινό σιδηροφόρο, το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα έχει αναπτύξει έναν τρόπο δέσμευσης της Ent, ώστε τα βακτήρια να αδυνατούν να την αποκτήσουν (Highsmith and Jarvis 1985, Pollack and Neilands 1970).

2.4 Γονίδια ιογένεσης και ανθεκτικότητας

Η παραγωγή καρβαπενεμασών θεωρείται ένας από τους πιο σημαντικούς μηχανισμούς αντίστασης του *K. pneumoniae* καθώς το κάνει ανθεκτική σε ευρέως κοινά αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται για την θεραπεία των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων (UKHSA 2022). Οι τύποι των καρβαπενεμασών φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Η κατηγορία A περιλαμβάνει το KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase) και η κατηγορία B περιλαμβάνει το VIM (Verona Integron-encoded Metallo-β-lactamase), το IMP (Imipenemase) και πιο πρόσφατα το NDM (New Delhi Metallo-β-lactamase). Η κατηγορία D περιλαμβάνει το OXA (Oxacillin Hydrolysing). Οι πιο σημαντικές καρβαπενεμάσες στα Εντεροβακτήρια είναι το KPC της κατηγορίας A Ambler, και από την κατηγορία B τύπου Ambler, τα IMP, VIM και NDM. Αυτά τα ένζυμα δεν υδρολύουν μόνο τις καρβαπενέμες (εκτός από την αζτρεονάμη) αλλά και τις πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες και μονοβακτάμες (Khodadadian et al. 2018). Στην παρούσα εργασία θα αναλύσουμε τις καρβαπενεμάσες BlaIMP-1 και BlaOXA-48 και τα γονίδια προσκόλλησης MrkA, FimH και EcpA.

Πίνακας 2: Κύριες καρβαπενεμάσες που έχουν απομονωθεί σε στελέχη *K. pneumoniae*. Queenan et al, 2007, Grundmann et al, 2010, Wernli et al, 2011

Μοριακή ταξινόμηση	Λειτουργική ταξινόμηση	Τύπος καρβαπενεμάσης	Κοινά γονίδια
A	2f	KPC	KPC-2, -3, -4
B	3a	VIM	VIM-1, -2, -4, -5, -6
		IMP	IMP-1, -3, -4, -6, -8
		NDM	NDM-1, -4, -5, -6
D	2df	OXA	OXA-48, -163, -181

2.4.1 BlaIMP-1

Το IMP-1, απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1991 από το αρνητικό κατά Gram βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa*, στην Ιαπωνία. Είναι η πρώτη καρβαπενεμάση, που αποτελεί μέχρι σήμερα το κυρίαρχο ένζυμο στη χώρα αυτή (Haruta et al. 2000). Το πρώτο IMP- τύπου ένζυμο που απομονώθηκε στην Ευρώπη ήταν το IMP-2, το οποίο ανιχνεύτηκε σε στέλεχος του *Acinetobacter baumannii* στην Ιταλία (Ricchio et al. 2000). Είναι μεταλλοένζυμα που έχουν στην αντίστοιχη ενεργό περιοχή άτομα ψευδαργύρου. Μπορούν να κωδικοποιούνται φυσιολογικά είτε από το χρωμόσωμα είτε από μεταβιβάσιμα γονίδια. Τα χρωμοσωμικά ένζυμα δεν συνδέονται συχνά με σοβαρές ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις και δεν μεταφέρονται εύκολα, όμως τα επίκτητα και μεταβιβάσιμα μεταλλοένζυμα οφείλονται για την δραματική αύξηση και διασπορά των λοιμώξεων. Στον τύπο IMP παρατηρείται διαμεσολάβηση πλασμιδίου και ο τύπος αυτός ταξινομείται μοριακά κατά Ambler system στην B τάξη, μέταλλο- β- λακταμάσες (MBLs), ενώ στην κατάταξη κατά Bush βρίσκεται στο Group 3 metallo-β- lactamase. Οι MBLs υδρολύουν όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά (πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, κεφαμυσίνες, καρβαπενέμες) εκτός από την αζτρεονάμη (Versalovic 2011). Ο τύπος IMP-1 είναι πιο ανθεκτικός στην μιπενέμη από ότι στην μεροπενέμη, στην οποία είναι πιο ανθεκτικός ο τύπος IMP-6 (Nakano et al. 2018).

2.4.2 BlaOXA-48

Τα OXA- τύπου ένζυμα τα συναντάμε συνήθως στο *Acinetobacter spp* και ο τύπος ο οποίος είναι πιο διαδεδομένος είναι ο OXA-48. Τα γονίδια αυτά ανήκουν στις καρβαπενεμάσες μοριακής κλάσης D κατά Ambler system, ως β-λακταμάσες που έχουν σερίνη στην ενεργό περιοχή. Η κατάταξη τους κατά Bush είναι Group 2 penicillinases και υδρολύουν τις ισοξαζολοπενικιλίνες (οξακιλλίνη, κλοξακιλλίνη και δικλοξακιλλίνη) πολύ ταχύτερα από τη βενζυλοπενικιλίνη (Publishers 1999). Βρίσκονται στα Εντεροβακτήρια και έχουν εντοπισθεί σε χώρες της Βόρειας Αφρικής, της Μέσης Ανατολής, την Τουρκίας και την Ινδίας. Επίσης, έχουν αναφερθεί αρκετές περιπτώσεις σε κλινικά στελέχη *Acinetobacter spp*. σε πολλές χώρες της Ευρώπης όπως στην Γαλλία και στην Ελλάδα (Carrère et al. 2010, Pournaras 2003). Οι OXA- καρβαπενεμάσες υδρολύουν ασθενώς τις καρβαπενέμες, και αναστέλλονται ελαφρώς από το κλαβουλανικό οξύ. Υδρολύουν τις πενικιλίνες, 1ης και 2ης γενιάς και τις κεφαλοσπορίνες,

υδρολύουν ασθενώς τις κεφαλοσπορίνες ευρέως φάσματος αλλά δεν υδρολύουν την αζτρεονάμη. Η αναγνώριση και η ανίχνευση των OXA-48 μπορεί να είναι δύσκολη καθώς είναι ευαίσθητες στις ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες και μονοπακτάμες, ενώ εκφράζουν αντοχή/μειωμένη ευαισθησία στις καρβαπενέμες. Η OXA-48 είναι η μόνη καρβαπενεμάση κλάσης D που απομονώθηκε σε στελέχη *K. pneumoniae*. Η OXA-48 υδρολύει ασθενώς τις καρβαπενέμες, αποτελεσματικά τις β-λακτάμες στενού φάσματος, όπως οι πενικιλίνες, ενώ δεν υδρολύει τις κεφαλοσπορίνες ευρέως φάσματος. Η εξάπλωση του γονιδίου BlaOXA-48 συνδέεται κυρίως με τη διάδοση ενός μόνο πλασμιδίου τύπου IncL/M, 62 kb, το οποίο δεν φέρει κανένα πρόσθετο γονίδιο αντοχής (Poirel, Potron, and Nordmann 2012). Αυτό το πλασμίδιο οφείλεται για την κρυφή και ταχεία εξάπλωση των γονιδίων αυτών και δίνει την δυνατότητα απόκτησης ενδημικού χαρακτήρα.

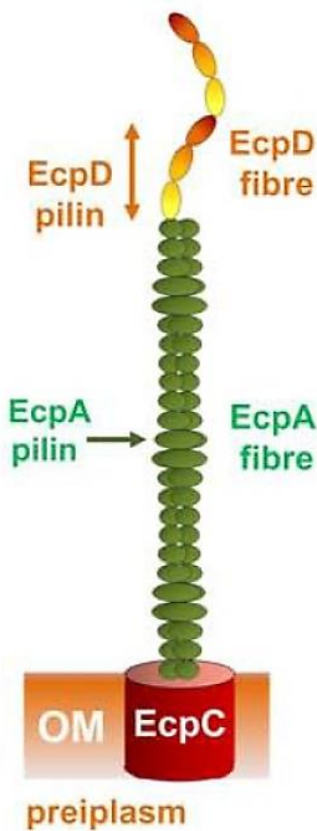
2.4.3 MrkA

Τα πρωτεϊνικά αυτά νημάτια ανήκουν στις φιμπρίες τύπου 3, βρίσκονται στην επιφάνεια των βακτηρίων και έχουν επίμηκες σχήμα. Αποτελούνται από μία κύρια δομική πρωτεΐνη (MrkA) και από μία προσκολλητική (adhesin) πρωτεΐνη (MrkD). Το MrkA είναι υπεύθυνο για τον σχηματισμό του ελικοειδή άξονα ενώ η συγκολλητική πρωτεΐνη MrkD, η οποία βρίσκεται στην άκρη του οργανιδίου μπορεί να δεσμεύεται στα μόρια κολλαγόνου. Οι πρωτεΐνες MrkE, MrkB, MrkC και MrkF είναι υπεύθυνες για τη διατήρηση της σταθερότητας του οργανιδίου στην επιφάνεια του κυττάρου. Αυτός ο τύπος δίνει ανθεκτικότητα στη μαννόζη (mannose – resistant *Klebsiella* – like), και συντίθενται στο *K. pneumoniae* και σε πολλά είδη Εντεροβακτηρίων (Clegg and Gerlach 1987). Προσβάλλουν συνήθως το ουροποιητικό σύστημα αλλά μπορούν να προσκολλώνται στα επιθηλιακά κύτταρα και στους ιστούς των νεφρών και των πνευμόνων (Murphy et al. 2013).

2.4.4 EcpA

Το ECP ή αλλιώς *E. coli* common pilus είναι ένας παράγοντας προσκόλλησης ο οποίος προέρχεται από το *Enterohemorrhagic Escherichia coli* (EHEC) O157:H. Αυτό είναι ένα τρο-

φιμογενές παθογόνο το οποίο προκαλεί αιμορραγική κολίτιδα και αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο. Η πλειονότητα των ECP αποτελείται από μια μοναδική πρωτεΐνη ~18-kDa που ονομάζεται EcpA και περιέχει μια πρωτογενή μη ανιχνεύσιμη αλληλουχία σε αντίθεση με οποιαδήποτε άλλη υπομονάδα πιλίνης ή φιμπρίας με γνωστή δομή (Rendón et al. 2007). Η κολλητική αυτή ίνα κωδικοποιείται από το οπερόνιο *ecpRABCDE*, ενώ ένα ομόλογο του οπερονίου υπάρχει στο γονιδίωμα του *K. pneumoniae* (Garnett et al. 2012). Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με έρευνα, το γονίδιο *γkgK* του *K. pneumoniae* έχει 86% ομοιότητα με το γονίδιο EcpR του *Escherichia coli*. Αυτό αποδείχθηκε μέσω της ευθυγράμμισης αλληλουχιών νουκλεοτιδίων όπου βρέθηκε παρόμοιο σύμπλεγμα γονιδίων ECP fimbria το οποίο περιλαμβάνει έξι γονίδια στο *K. pneumoniae*, και ανήκει στο ίδιο οπερόνιο (Shen et al. 2022).



Εικόνα 5: Η ίνα ECP της *E. coli* που εμφανίζεται στην επιφάνεια του κυττάρου με τον πόρο (EcpC), τον κύριο άξονα του pilus (EcpA) και την πολυμερισμένη προσκολλητική ουσία (EcpD) (Garnett et al. 2012)

2.4.5 FimH

Είναι λεπτά, άκαμπτα, νηματοειδή, χωρίς μαστίγια οργανύλλια (pilli) τύπου 1, τα οποία αποτελούνται από μία κύρια δομική πρωτεΐνη (FimA). Μπορούν να ασκούν τις προσκολλητικές τους ιδιότητες με τη βοήθεια του μορίου FimH (adhesin) που βρίσκεται στην άκρη του οργανιδίου. Το σύμπλεγμα των γονιδίων Fim του *K. pneumoniae* έχει ένα μεταγραφικό ρυθμιστή FimK που βρίσκεται πίσω από το FimH (Kline et al. 2010). Τα fimbriae τύπου 1 εκτείνονται έξω από την κάψα και προσκολλώνται σε δομές οι οποίες περιέχουν μαννόζη, στα κύτταρα του ξενιστή ή στις εξωκυττάρια μήτρες μέσω του FimH (Rosen et al. 2008). Ο υδρόφιλος χαρακτήρας των φιμπριών παίζει σημαντικό ρόλο στην λοιμογόνο δράση του μικροβίου και συμβάλλει στον αποικισμό του στα βλεννογόνα κύτταρα του ξενιστή. Τα fimbriae τύπου 1 μπορούν να εγκατασταθούν στα κύτταρα του ουροποιητικού συστήματος, αλλά δεν συνηθίζουν να πολλαπλασιάζονται στο έντερο ή στα κύτταρα των πνευμόνων

2.5 Διάγνωση και Πρόληψη

Η διάγνωση της μόλυνσης με *Klebsiella* γίνεται μέσω μικροσκοπικής εξέτασης και καλλιέργειας. Ακολουθεί έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά (αντιβιογράμμα). Το υλικό που εξετάζεται είναι ανάλογο με τη λοίμωξη όπως αίμα, ούρα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, (ενυ)αρθρικό υγρό, πτύελα, βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (bal), βιοπτικό υλικό και άλλα βιολογικά υλικά (1).

Τα γένη του *Klebsiella* μπορούν να επιβιώσουν για πολλές μέρες σε εξωτερικό περιβάλλον. Ο συχνότερος τρόπος μετάδοσης τους είναι αερογενώς από μολυσμένες κλιματιστικές εγκαταστάσεις με υγραντικά μηχανήματα που χρησιμοποιούν μολυσμένο νερό (Κουρτίδου 2021). Συνεπώς το βασικότερο προληπτικό μέτρο αποφυγής μετάδοσης μικροβίων με άμεση επαφή είναι το σωστό πλύσιμο των χεριών, ιδίως του ιατρονοσηλευτικού προσωπικού. Επίσης, σημαντική είναι η τήρηση των κανόνων υγιεινής εντός νοσοκομείου, όσον αφορά τους χώρους και τους χειρισμούς κατά τη νοσηλεία, ιδίως των ανοσοκατεσταλμένων ασθενών (αποστείρωση, απολύμανση, αντισηψία, απομόνωση ασθενών με στελέχη ανθεκτικά στα αντιβιοτικά) (2).

2.6 Τρόπος Αντιμετώπισης

Είναι αδύνατον να αναφέρουμε με βεβαιότητα ένα συνδυασμό αντιβιοτικών φαρμάκων για την αντιμετώπιση του βακτηρίου *K. pneumoniae* σε ασθενείς και δεν αποτελεί το ζητούμενο στην παρούσα εργασία. Όσον αφορά τα τρόφιμα, η καταστροφή του βακτηρίου επιτυγχάνεται με την υψηλή θερμοκρασία (100°C για 10 min), όπως συμβαίνει στο μαγείρεμα. Η καταστροφή του όταν αυτό βρίσκεται σε οικιακές και νοσοκομειακές επιφάνειες μπορεί να επιτευχθεί από τα συνήθη απολυμαντικά (διάλυμα οικιακής χλωρίνης 10%) και αντισηπτικά (οινόπνευμα 70%).

3. NG-Test CARBA-5

Το Test CARBA-5 βασίζεται στην ανοσοχρωματογραφική ανίχνευση των πέντε κοινών οικογενειών καρβαπενεμασών (KPC, OXA-48-like, VIM, IMP και NDM) απευθείας από βακτηριακές αποικίες. Τα τεστ αντιμικροβιακής αντοχής επιτρέπουν την ταχεία ανίχνευση μικροβιακής αντοχής (AMR) σε μόλις 15 λεπτά με αξιόπιστα αποτελέσματα. Το NG-Test AMR είναι μια πολλαπλή ανοσοχρωματογραφική δοκιμασία πλευρικής ροής, η οποία αναπτύχθηκε με τη χρήση πατενταρισμένης τεχνολογίας. Κάθε κασέτα μίας χρήσης προσφέρει ταχεία, ποιοτική ανίχνευση και διαφοροποίηση διαφορετικών μηχανισμών μικροβιακής αντοχής μεταξύ μη ευαίσθητων αποικιών αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (3).

3.1 Αξιολόγηση και ερμηνεία αποτελεσμάτων NG-Test CARBA

Το αποτέλεσμα του NG-Test CARBA ερμηνεύεται ως θετικό, αρνητικό ή άκυρο. **Θετικό αποτέλεσμα:** μια κόκκινη γραμμή εμφανίζεται στην περιοχή ελέγχου (C) και μία ή περισσότερες γραμμές εμφανίζονται στις περιοχές δοκιμής και υποδηλώνουν ότι το βακτηριακό εναιώρημα περιέχει το συγκεκριμένο αντιμικροβιακό ένζυμο αποικοδόμησης που εξετάζεται. **Αρνητικό αποτέλεσμα:** εμφανίζεται κόκκινη γραμμή στην περιοχή ελέγχου (C) χωρίς καμία γραμμή στις περιοχές δοκιμής. Αυτό υποδεικνύει ότι το βακτηριακό εναιώρημα δεν περιέχει το υπό εξέταση αντιμικροβιακό ένζυμο αποικοδόμησης. Εάν δεν εμφανιστεί η γραμμή ελέγχου, το αποτέλεσμα της δοκιμής είναι **άκυρο** (Volland et al. 2019).

4. Μέθοδος PCR (Polymerase Chain Reaction)

Η μέθοδος PCR (Polymerase Chain Reaction) ή αλλιώς τεχνική αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης είναι μία βιοχημική μέθοδος, η οποία αποσκοπεί στην εκθετική ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA. Η μέθοδος αναπτύχθηκε το 1983 από τον Kary Mullis και είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική, με μεγάλο φάσμα εφαρμογών απομόνωσης και πολλαπλασιασμού ενός τμήματος DNA. Πολλαπλοί κύκλοι πολλαπλασιασμού in vitro παράγουν δισεκατομ-

μύρια αντίγραφα της επιθυμητής αλληλουχίας νουκλεοτιδίων από ένα μόνο κύτταρο. Η μέθοδος βασίζεται στην ταχεία και ακριβή διακύμανση της θερμοκρασίας από την εκάστοτε συσκευή που χρησιμοποιείται. Χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση στην ανίχνευση, ενώ τα κύρια πλεονεκτήματά της είναι η απλότητα και η ταχύτητα της εφαρμογής της (Rahman et al. 2013).

Η διαδικασία πραγματοποιείται σε τρία στάδια: Το πρώτο στάδιο ονομάζεται αποδιάταξη όπου πραγματοποιείται το άνοιγμα των DNA κλώνων σε δυο συμπληρωματικές αλυσίδες, με το σπάσιμο των δεσμών υδρογόνου, οι οποίοι συγκρατούν τις δύο αλυσίδες. Έτσι το μόριο παύει πλέον να είναι δίκλωνο και έχουμε δύο μονόκλωνες αλυσίδες. Ακολουθεί το δεύτερο στάδιο ή στάδιο υβριδισμού των εκκινητών με τους συμπληρωματικούς κλώνους ή συμπληρωματικών DNA-RNA. Τέλος, στο τρίτο στάδιο παίρνει μέρος η διαδικασία της επιμήκυνσης των κλώνων, όπου η πολυμεράση χρησιμοποιεί τους εκκινητές για την αντιγραφή των συμπληρωματικών αλυσίδων. Συνεπώς, σε κάθε κύκλο της αντίδρασης οι υπάρχοντες κλώνοι του DNA διπλασιάζονται, γι' αυτό και η τεχνική χαρακτηρίζεται ως εκθετική (Innis et al. 2012).

5. Ηλεκτροφόρηση

Ο Arne Tiselius (1902-1971), Σουηδός βιοχημικός, ανέπτυξε τις μεθόδους της ηλεκτροφόρησης και της προσρόφησης όπου τις εφάρμοσε στη μελέτη των πρωτεϊνών και άλλων βιομορίων. Το 1930 ξεκίνησε να αναπτύσσει τεχνικές για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση την μετανάστευση τους σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, όπου το 1948 του απονεμήθηκε το Νόμπελ Χημείας (Anon 1974).

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια αναλυτική μέθοδος, η οποία στηρίζεται στη μετακίνηση φορτισμένων μορίων κάτω από την επίδραση ενός εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου. Η μέθοδος χρησιμοποιείται σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών. Οι πιο σημαντικές είναι, ο προσδιορισμός της καθαρότητας ενός δείγματος, ο ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος κάποιου αγνώστου δείγματος, και ο προσδιορισμός μοριακού βάρους, με σκοπό την ταυτοποίηση της ουσίας. Το χρησιμοποιούμενο δείγμα μπορεί να είναι οτιδήποτε μπορεί να κουβαλάει φορτίο (Voymas 2001).

Η βασική αρχή της ηλεκτροφόρησης στηρίζεται στο φαινόμενο όπου όταν τα φορτισμένα μόρια και σωματίδια συνυπάρχουν μέσα σε υδατικά διαλύματα και όταν βρίσκονται κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, αρχίζουν να κινούνται προς την κατεύθυνση του ηλεκτροδίου με το αντίθετο φορτίο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το φαινόμενο το οποίο ονομάζεται κινητικότητα, έτσι τα διάφορα μόρια διαφορετικών φορτίων και μαζών, θα κινηθούν με διαφορετικές ταχύτητες. Μεγάλα βιομόρια περιέχουν ομάδες που δεν είναι εύκολο να ιονισθούν, έτσι διασπώνται σε υδατικά διαλύματα και εντοπίζονται σαν κατιόντα ή ανιόντα ανάλογα με το φορτίο που διαθέτουν. Η ηλεκτροφόρηση εδραιώνει έναν αναλυτικό τρόπο για το διαχωρισμό μακρομορίων. Επομένως, όταν τα μόρια βρεθούν σε ηλεκτρικό πεδίο τότε θα μετακινηθούν, τα ανιόντα θα μετακινηθούν προς το θετικό πόλο, ενώ τα κατιόντα προς τον αρνητικό πόλο. Η κινητικότητα αυτή των μορίων εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως είναι η σταθερά pK και το μοριακό βάρος του φορτισμένου σωματιδίου. Επιπρόσθετοι παράγοντες που ενδέχεται να επηρεάσουν την κινητικότητα είναι το pH , η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος (buffer), η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, η θερμοκρασία καθώς και η φύση του υλικού μέσα στο οποίο γίνεται η ηλεκτροφόρηση (Westermeyer 2016).

Η ηλεκτροφόρηση έχει μεγάλο εύρος εφαρμογών. Ειδικότερα χρησιμοποιείται στο διαχωρισμό μακρομορίων όπως πρωτεϊνών, DNA, RNA, στον έλεγχο της καθαρότητας του δείγματος, στον ποσοτικό και ποιοτικό έλεγχο και τέλος το βασικότερο στον προσδιορισμό μοριακού βάρους. Υπάρχουν αρκετοί και καινοτόμοι τύποι ηλεκτροφόρησης, οι δύο πιο κοινές είναι ηλεκτροφόρηση σε διάλυμα (Free-flow electrophoresis), όπου η τεχνική διαχωρισμού πραγματοποιείται χωρίς την παρουσία μιας στακτής φάσης (gel) και η ηλεκτροφόρηση σε ζώνες (zone electrophoresis) όπου η ηλεκτροφόρηση εξελίσσεται σε υδατικό διάλυμα μέσα σε ένα στερεό (gel) το οποίο διασφαλίζει τα όρια των ζωνών μετακίνησης (Stellwagen 2009, Turgeon and Bowser 2009).

5.1 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Η πιο συχνή και ευρέως διαδεδομένη μορφή είναι η ηλεκτροφόρηση μορίων DNA σε πηκτή αγαρόζης. Το μείγμα των κλασμάτων DNA τοποθετείτε στο ένα άκρο μιας πλάκας πηκτής αγαρόζης, όπου στο εσωτερικό της σχηματίζει ένα πλέγμα μικρών πόρων. Στη συνέχεια μέσω της πηκτής εφαρμόζεται ένα ηλεκτρικό πεδίο και αρχίζει ο διαχωρισμός. Γνωρίζοντας ότι το DNA έχει αρνητικό φορτίο, τα κλάσματα διαπερνούν το πλέγμα και μεταναστεύουν προς το

θετικό πόλο, ως αποτέλεσμα τα μεγαλύτερα κλάσματα μετακινούνται βραδύτερα. Σε μικρό χρονικό διάστημα τα κλάσματα DNA έχουν μετακινηθεί μέσα στην πηκτή ανάλογα με το μέγεθος τους, σχηματίζοντας διακριτές ζώνες. Οι ζώνες αυτές δεν είναι ορατές, γι' αυτό τοποθετείται ειδική χρωστική ώστε να φθορίζει όταν εκτίθεται σε υπεριώδες φως. Η παρούσα μέθοδος είναι απλή, αποτελεσματική, και μη δαπανηρή. Χρησιμοποιείται σε διάφορες επιστήμες όπως στις βιολογικές επιστήμες, στην ιατρική και σε ερευνητικό κομμάτι. Η αγαρόζη είναι πολυσακχαρίτης, ένα γραμμικό πολυμερές (D-galactose και 3,6 anhydrogalactose) (Duckworth and Yathe 1971). Απομονώνεται από τα γένη των φυκιών *Gelidium* και *Gracilaria* (Sukhoverkhov, Kadnikova, and Podkorytova 2000). Χρησιμοποιείται ως καλλιεργητικό μέσο, όπως και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Robert Koch, το 1882, σε βακτήρια της φυματίωσης (Rietschel and Cavillon 2002). Επίσης, λαμβάνει μέρος στην παρασκευή πηκτωμάτων ηλεκτροφόρησης και συχνά αξιοποιείται στη ζαχαροπλαστική.

5.2 Διαδικασία λήψης φωτογραφιών

Η λήψη των φωτογραφιών έγινε με τη συσκευή MiniBis transilluminator της εταιρίας Bio Imaging Systems. Στο εσωτερικό της υπάρχει ένας σκοτεινός θάλαμος, στον οποίο τοποθετείται το πήκτωμα αγαρόζης για να διακρίνουμε τις μπάντες για κάθε γονίδιο ξεχωριστά, συγκριτικά με την κλίμακα του ladder. Η βάση του θαλάμου είναι η συσκευή εκπομπής UV. Η συσκευή είναι συνδεδεμένη με ηλεκτρονικό υπολογιστή και παρέχει ευδιάκριτες εικόνες με ελάχιστες παραμορφώσεις (4).

6. Βιβλιογραφική ανασκόπηση ανίχνευσης γονιδίων *Klebsiella pneumoniae*

Νοσοκομεία από έξι ελληνικές πόλεις συμμετείχαν σε μελέτη η οποία έλαβε μέρος από τον Νοέμβριο 2014 μέχρι τον Απρίλιο του 2016 (Galani et al. 2018). Κατά τη διάρκεια της μελέτης αυτής, συλλέχθηκαν συνολικά 394 απομονώσεις *K. pneumoniae*. Τα κλινικά δείγματα αποτελούνταν από: ούρα (n = 168), αίμα (n = 86), εκκρίσεις κατώτερων αναπνευστικών οδών (n = 60), πύον (n = 55), εγκεφαλονωτιαίο υγρό (n = 3) και άγνωστο (n = 22). Τα αποτελέσματα αυτής, έδειξαν ότι 389 στελέχη *K. pneumoniae* βγήκαν ανθεκτικά στις καρβαπενέμες σε ποσοστά επί του συνόλου των δειγμάτων BlaKPC 66,5% (σε 262 δείγματα) , BlaNDM 13,7% (σε 54 δείγματα), BlaVIM 8,6% (σε 34 δείγματα) και BlaOXA-48 3,6% (σε 14 δείγματα). Επιπροσθέτως, 25 (6,3%) από τα στελέχη είχαν δύο γονίδια καρβαπενεμάσης, 22 (5,6%) είχαν BlaKPC και BlaVIM, 2 (0,5%) είχαν BlaNDM και BlaOXA-48 και 1 (0,3%) είχε BlaKPC και BlaOXA-48. Η KPC παραμένει η πιο διαδεδομένη καρβαπενεμάση (66,5%), ακολουθούμενη από την NDM (13,7%). Η VIM βρέθηκε σε ποσοστό 8,4% το 2016 και παύει πλέον να είναι η μόνη καρβαπενεμάση που ανιχνεύεται στην Ελλάδα. Ακολουθείται από την OXA-48 (3,6%). Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με εκείνα από το πρόγραμμα European Survey on Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE), που διεξήχθη από τον Νοεμβρίου του 2013 και τον Απρίλιο του 2014, στο οποίο οι Grundmann et al. ανέφεραν για πρώτη φορά ότι η NDM ήταν η δεύτερη κατά σειρά καρβαπενεμάση στην Ελλάδα. Σε μια προηγούμενη δημοσιευμένη μελέτη πανελλαδικής επιτήρησης από τον Ιανουάριο του 2011 έως τον Ιούνιο του 2012, μεταξύ 119 ελληνικών νοσοκομείων, ο επικρατέστερος μηχανισμός αντοχής στις καρβαπενέμες σε απομονώσεις *K. pneumoniae* ήταν η KPC (82,6%), ακολουθούμενη από την VIM (9,7%), ενώ η ταυτόχρονη παραγωγή KPC και VIM παρατηρήθηκε στο 7,7% των απομονώσεων.

Σε άλλες χώρες, σε έρευνα που έγινε στο Ιατρικό Κέντρο Flagstaff από το 2011-2012, το βακτήριο *Klebsiella pneumoniae* απομονώθηκε από κρέατα λιανικής πώλησης και από δείγματα ούρων και αίματος (Davis et al. 2015). Οι απομονώσεις υποβλήθηκαν σε αντιβιοτική ευαισθησία και αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος. Η εξωεντερική ιογένεια διαφόρων

απομονωμένων ατόμων που προέρχονται από το κρέας και τα ούρα αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο σήψης ποντικού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι 174 από τα 1728 (10%) δείγματα ανθρωπίνων κλινικών απομονώσεων είχαν *K. pneumoniae* ενώ στα τοπικά δείγματα κρεάτων το *K. pneumoniae* βρέθηκε σε 241 από τα 508 (47%) δείγματα. Η συχνότητα εύρεσης του μικροβίου διέφερε ανάλογα τον τύπο κρέατος, με 58% (65/112) για το χοιρινό κρέας, 47% (128/272) για το κοτόπουλο και 38% (48/128) για τη γαλοπούλα. Η ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά εντοπίστηκε στο 22% των απομονώσεων, συμπεριλαμβανομένου του 32% των προϊόντων απομόνωσης από κρέας, μακράν πιο ανθεκτικά στα αντιβιοτικά τετρακυκλίνη και γενταμυκίνη από ότι το 8% που αφορά τις κλινικές απομονώσεις.

Σε άλλη μελέτη που διεξήχθη τον Ιούλιο του 2010 στην Τουρκία προσδιορίστηκαν οι ιδιότητες ιογένεσης και η ανθεκτικότητα σε απομονώσεις *Klebsiella* που παράγουν β-λακταμάση εκτεταμένου φάσματος (ESBL) (Gundogan, Citak, and Yalcin 2011). Από τα 60 δείγματα κρέατος μοσχαριών και κοτόπουλων, που αγοράστηκαν από διάφορα σούπερ μάρκετ στην Άγκυρα, τα 45 βρέθηκαν με στελέχη *Klebsiella*. Από αυτά 24 δείγματα (53%) ταυτοποιήθηκαν με το βακτήριο *K. oxytoca* και τα 21 δείγματα (47%) ταυτοποιήθηκαν με το *K. pneumoniae*. Οι παράγοντες ιογένεσης βρέθηκαν σε ποσοστά: αιμολυτική δραστηριότητα (67%), παραγωγή σιδεροφόρων (44%) και αντοχή στον ορό (38%). Όλα τα απομονωμένα στελέχη ήταν ανθεκτικά σε δύο ή περισσότερους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Όλες οι απομονώσεις *Klebsiella* που παρήγαγαν ESBL ήταν ιδιαίτερα ανθεκτικές στις κεφαλοσπορίνες και τις μονοβακτάμες. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι τα κρεατοσκευάσματα αποτελούν δυνητικά επικίνδυνες πηγές πολυανθεκτικών και ιογόνων ειδών *Klebsiella*.

Σε μια άλλη μια μελέτη που έγινε στο Abakaliki, (Iroha, I. R et al. 2011) στην πολιτεία Ebonyi απομονώθηκαν τριακόσια δείγματα ακατέργαστου κρέατος. Τα είδη των κρεάτων ήταν: βόειο κρέας (n = 100), κοτόπουλο (n = 100), μίγμα από πρόβειο και κατσικίσιο (n = 100), τα οποία συλλέχθηκαν από το σφαγείο του Abakaliki και αναλύθηκαν για μικροβιολογική μόλυνση χρησιμοποιώντας τυποποιημένες μικροβιολογικές μεθόδους. Το βακτήριο *K. pneumoniae* βρέθηκε σε ποσοστό 5,3% και η ευαισθησία στα αντιβιοτικά έδειξε ένα ανησυχητικό επίπεδο αντίστασης, γεγονός που αντανάκλα την ύπαρξη πολυανθεκτικότητας. Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώνουν την κυκλοφορία ανθεκτικών στα αντιβιοτικά παθογόνων μικροοργα-

νισμών στο ωμό κρέας που πωλείται στην αγορά του Abakaliki, τα οποία θα μπορούσαν ενδεχομένως να διαδραματίσουν ρόλο στην εξάπλωση της μικροβιακής αντοχής μεταξύ των βακτηρίων που μεταδίδονται με τα τρόφιμα.

Μια ακόμα έρευνα, είναι αυτή που πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών και Τεχνών, του Πανεπιστημίου Gazi, Teknikokullar, στις 28 Ιουλίου του 2010 (Gundogan et al. 2011). Η μελέτη διεξήχθη για τον προσδιορισμό των ιδιοτήτων ιογένεσης και της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά σε απομονώσεις *Klebsiella* που παράγουν β-λακταμάση διευρυμένου φάσματος (ESBL). Αγοράστηκαν 60 δείγματα κρέατος μοσχαριών και κοτόπουλων από διάφορα σούπερ μάρκετ στην Άγκυρα της Τουρκίας. Από τα 45 απομονωμένα στελέχη *Klebsiella*, 24 δείγματα (53%) ταυτοποιήθηκαν ως *K. oxytoca* και 21 δείγματα (47%) ως *K. pneumoniae*. Μεγάλο ποσοστό των απομονώσεων *Klebsiella* είχε παράγοντες ιογένεσης, όπως αιμολυτική δραστηριότητα (67%), παραγωγή σιδηροφόρων (44%) και αντοχή στον ορό (38%). Για τον προσδιορισμό της παραγωγής ESBL χρησιμοποιήθηκε η δοκιμή συνέργειας διπλού δίσκου. Η παραγωγή ESBL ανιχνεύθηκε σε 13 (29%) από τα 45 απομονωμένα στελέχη *Klebsiella*. Η ανθεκτικότητα σε 14 αντιμικροβιακά φάρμακα ελέγχθηκε σε όλα τα απομονωμένα στελέχη της *Klebsiella* με τη μέθοδο διάχυσης δίσκου. Όλα τα απομονωμένα στελέχη ήταν ανθεκτικά σε δύο ή περισσότερους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Όλες οι απομονώσεις *Klebsiella* που παρήγαγαν ESBL ήταν ιδιαίτερα ανθεκτικές στις κεφαλοσπορίνες και τις μονοβακτάμες.

Έρευνα η οποία πραγματοποιήθηκε τον Οκτώβριο του 2019 έδειξε ότι το *K. pneumoniae* ανιχνεύθηκε στο 21% (147 από 698) των δειγμάτων ακατέργαστων και έτοιμα προς κατανάλωση τροφίμων που συλλέχθηκαν από Σιγκαπούρη (Hartantyo et al. 2020). Το υψηλότερο ποσοστό θετικότητας του *K. pneumoniae* παρατηρήθηκε σε ακατέργαστα τρόφιμα (45%, 66 από 146), ενώ σε έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα το ποσοστό εμφάνισης του βακτηρίου ήταν 15%, (81 από 552). Το *K. pneumoniae* βρέθηκε σε 27% (16 από τα 60 δείγματα) ωμού κοτόπουλου και χοιρινού συκωτιού. Στα τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση, το *K. pneumoniae* ανιχνεύθηκε σε πιάτα πουλερικών σε ποσοστό 27%. Από τις 97 τροφιμογενείς *K. pneumoniae* που ελέγχθηκαν για αντοχή στα αντιβιοτικά, το 10% είχε ανθεκτικότητα σε τουλάχιστον τρεις

κατηγορίες αντιβιοτικών. Οι μισοί (50%, 5 από τους 10) από αυτούς απομονώθηκαν από ακατέργαστο συκώτι κοτόπουλου, στο χοιρινό συκώτι και στο μαγειρεμένο πουλερικό βρέθηκε ένα μικρό ποσοστό (1 από 10). Επιπλέον, στις απομονώσεις εμφανίστηκαν 3 από τα 10 πολυανθεκτικά γονίδια του *K. pneumoniae* τα οποία χαρακτηρίζονται ως παράγοντες ιογένεσης.

7. Σκοπός

Ο κύριος σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης είναι, η διερεύνηση της συχνότητας των γονιδίων *MrkA*, *BlaIMP-1*, *BlaOXA-48*, *EcpA* και *FimH* του μικροοργανισμού *Klebsiella pneumoniae* σε ελληνικά δείγματα κρέατος, από διαφορετικές τοπικές αγορές και η αξιολόγηση των διάφορων φαινοτύπων και γονοτύπων. Επίσης, διεξήχθη βιβλιογραφική έρευνα σχετικά με την συσχέτιση των πειραματικών αποτελεσμάτων μας συγκριτικά με άλλες πειραματικές μετρήσεις του ίδιου θέματος. Ελπίζουμε στην καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών αντοχής του *Klebsiella* στα αντιβιοτικά και μετέπειτα στην συμβολή της αναζήτησης αποτελεσματικών θεραπειών για την εξάλειψη του βακτηρίου.

8. Υλικά και μέθοδοι

8.1 ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- Αναλυτικός ζυγός
- Επωαστικός κλίβανος
- Θερμοκυκλοποιητής (Applied Biosystems) Veriti 96-well Thermal Cycler
- Θερμομπλόκ
- Ρυθμιζόμενες μικροπιπέτες PIPETMAN GILSON Classic (20μL,200μL,1000μL)
- Συσκευή ανάδευσης Vortex
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Συσκευή με λάμπα UV MiniBis transilluminator
- Τροφοδοτικό ηλεκτροφόρησης
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Φυγόκεντρος

8.2 Υλικά

- Buffered Peptone Water (BPW)
- GoTaq Hot Start Master Mix (Promega GmbH, Mannheim, 68199, Γερμανία)
- Loading buffer (10×)

- PCR plates
- PCR tubes
- Stock Solution
- Ultra Mix Red (PCR BIO, London, UK)
- Αγαρόζη
- Απιονισμένο νερό
- Γάντια μιας χρήσης
- Δείγματα DNA
- Δείγματα κρεάτων
- Εκκινητές
- Κιτ απομόνωσης Monarch[®] Genomic DNA Purification Kit (BioLabs, New England)
- Κρίκοι επίστρωσης
- Κωνική φιάλη των 250 mL
- Μάρτυρας μοριακών μεγεθών (ladder DNA 100 bp)
- Ογκομετρική φιάλη 100 mL
- Πλαστικά erpendorf των 1,5 mL
- Πλαστικά tips
- Πρότυπα στελέχη *Klebsiella Pneumoniae* (Αττικό Νοσοκομείο Αθηνών)
- Τρυβλία CHROMagar ORIENTATION

8.3 Διαλύματα

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



Εικόνα 6: Αναλυτικός ζυγός

Μοντέλο	Precisa-202A
----------------	--------------

Εταιρία	Precisa
----------------	---------

Χώρα Προέλευσης	Γερμανία
----------------------------	----------

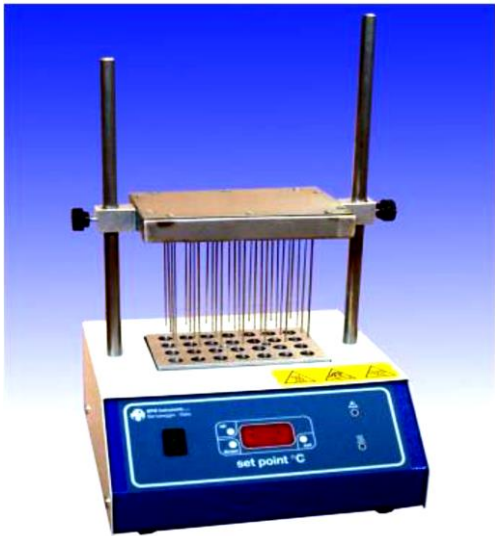


Εικόνα 7: Φυγόκεντρος

Μοντέλο	SL 16 Centrifuge
----------------	------------------

Εταιρία	Thermo Scientific TM
----------------	-------------------------

Χώρα Προέλευσης	Ελλάδα
----------------------------	--------



Εικόνα 8: Θερμομπλόκ

Μοντέλο	M503-HBD
----------------	----------

Εταιρία	Artiglass
----------------	-----------

Χώρα Προέλευσης	Ιταλία
----------------------------	--------



Εικόνα 9: Θερμοκυκλοποιητής

Μοντέλο	Veriti Dx Thermal Cycler
----------------	--------------------------

Εταιρία	Thermo Fisher Scientific
----------------	--------------------------

Χώρα Προέλευσης	Αυστρία
----------------------------	---------

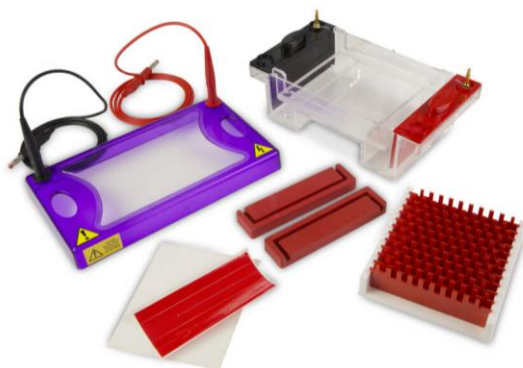


Εικόνα 10: Vortex

Μοντέλο	Vortex V-1 plus
----------------	-----------------

Εταιρία	Biosan
----------------	--------

Χώρα Προέλευσης	Λετονία
----------------------------	---------



Εικόνα 11: Συσκευή ηλεκτροφόρησης

Μοντέλο	MultiSUB Midi-96
----------------	------------------

Εταιρία	Cleaver Scientific
----------------	--------------------

Χώρα Προέλευσης	Ηνωμένο Βασίλειο
----------------------------	------------------



Εικόνα 12: Τροφοδοτικό ηλεκτροφόρησης

Μοντέλο	Lively 300V Power supply, MP-310
----------------	--

Εταιρία	Major science
----------------	---------------

Χώρα Προέλευσης	Η.Π.Α.
----------------------------	--------



Εικόνα 13: Επωαστικός κλίβανος

Μοντέλο	S/N 79051
Εταιρία	Memmert
Χώρα Προέλευσης	Δυτική Γερμανία



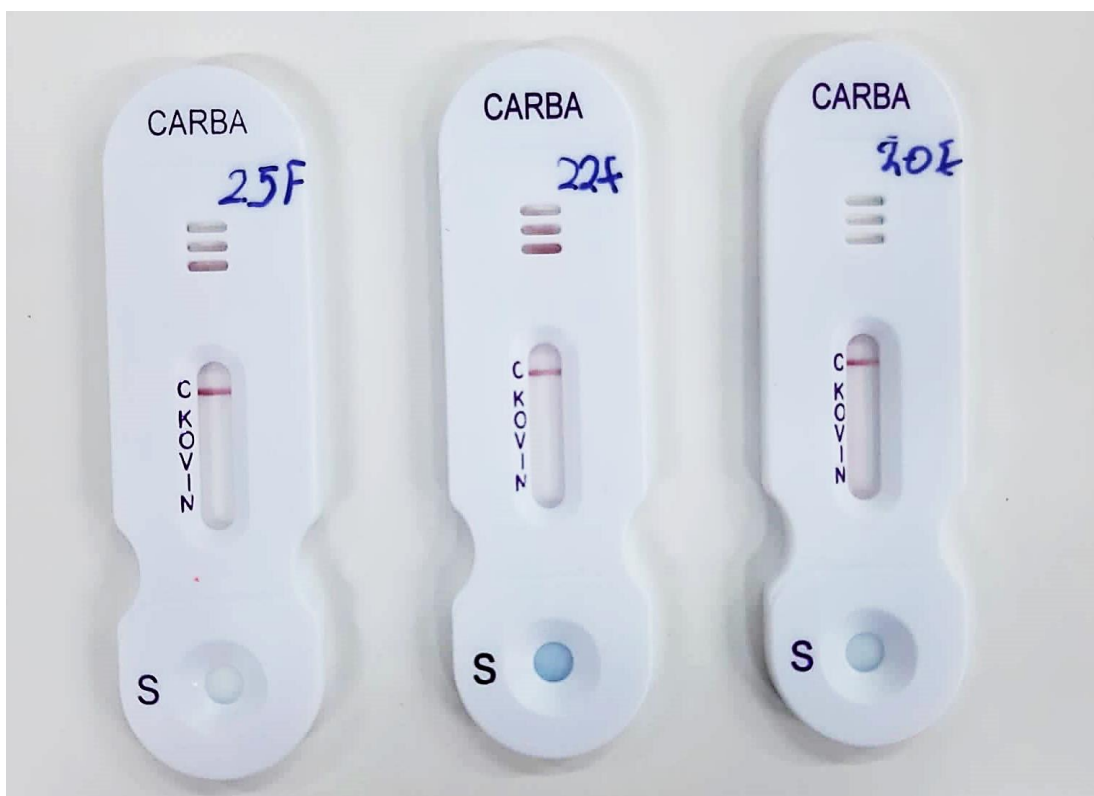
Εικόνα 14: Συσκευή με λάμπα UV

Μοντέλο	MiniBis Pro
Εταιρία	Bio Imaging Systems
Χώρα Προέλευσης	Ισραήλ

8.4 Φαινοτυπική ανάλυση με NG-Test CARBA-5

8.4.1 Αναλυτικά η διαδικασία του NG-Test

- 1) Τοποθετήθηκαν 5 σταγόνες buffer σε πλαστικό erpendorf.
- 2) Περισυλλέχθηκε μια αποικία με τον κρίκο.
- 3) Μεταφέρθηκε μέσα σε πλαστικό erpendorf την αποικία και περιστρέφουμε.
- 4) Απομακρύνθηκαν 100 μ L από το εναιώρημα με τους μικροοργανισμούς.
- 5) Τοποθετήθηκαν τα 100 μ L στην ειδική θέση S του test.
- 6) Αναμονή 15 min για το αποτέλεσμα.

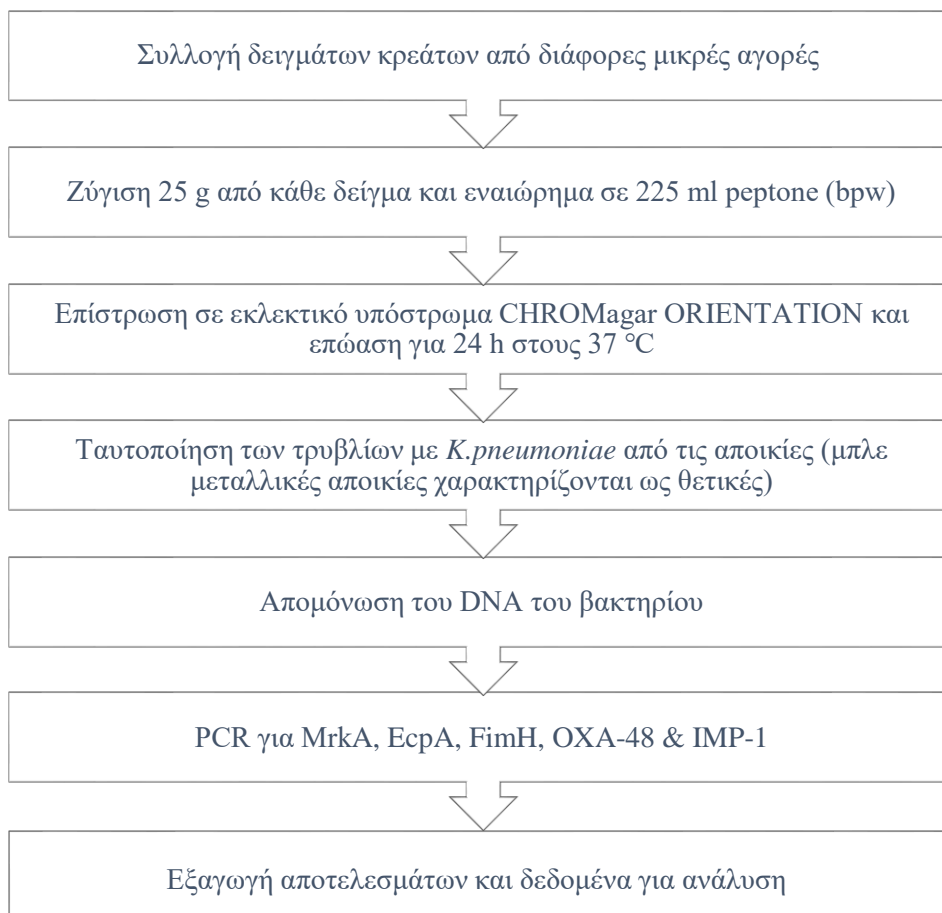


Εικόνα 15: Αποτελέσματα ανάλυσης NG-Test CARBA-5 στα δείγματα 20, 22, 25. Αρνητικό αποτέλεσμα.

8.5 Αναλυτικά η διαδικασία του πειράματος

1. Αρχικά τα κατεψυγμένα δείγματα κρέατος παρέμειναν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μέχρις ότου αποψυχθούν εξ ολοκλήρου.
2. Στη συνέχεια τεμαχίστηκαν σε μικρά κομμάτια, ζυγίστηκαν και απομονώθηκαν 2 γραμμάρια από κάθε δείγμα κρέατος. Έπειτα μετατέθηκαν σε ζωμό ρυθμισμένου ισότονου νερού πεπτόνης BPW, όπου βοηθάει στην ανάκαμψη του μικροοργανισμού αυτού.
3. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες διανεμήθηκαν στον επωαστικό θάλαμο για 24 h στους 37 °C.
4. Ποσότητα 100μL καλλιέργειας προεμπλουτισμού επιστρώθηκε απευθείας σε επιλεκτικό CHROMagar ORIENTATION (Biorprepare Microbiology, Αθήνα, Ελλάδα), τα οποία με τη σειρά τους τοποθετήθηκαν στον επωαστικό θάλαμο για 24 ώρες στους 37 °C.
5. Περισυλλέχθηκαν με τον κρίκο οι αποικίες με μπλε μεταλλικό χρώμα από το CHROMagar ORIENTATION καθώς σύμφωνα με τους κατασκευαστές τα χρώματα αυτά ταυτοποιούν την ύπαρξη *Klebsiella*.
6. Απομονώθηκε το DNA από όλες τις αποικίες
7. Πραγματοποίηση PCR για τα γονίδια αντοχής του *Klebsiella pneumoniae*
8. Ηλεκτροφόρηση.
9. Αποτελέσματα και δεδομένα διαθέσιμα για ανάλυση

8.6 Διάγραμμα ροής Πειραματικής Διαδικασίας



8.7 Συλλογή δειγμάτων

Συνολικά συλλέχθηκαν 17 δείγματα κρέατος από διάφορες τοπικές αγορές που διανεμήθηκαν σε όλη την πόλη της Αθήνας. Αυτά τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση στελεχών *K. pneumoniae*. Τα δείγματα περιλάμβαναν 9 (53%) από βοοειδή, 4 (23 %) από χοιρινό, 3 (18%) από κοτόπουλο και 1 (6%) από αρνί. Χρησιμοποιήθηκε επίσης ως θετικός μάρτυρας το γονιδιωματικό DNA ενός κλινικού στελέχους *Klebsiella pneumoniae* (ευαίσθητο), κλινικά στελέχη που χαρακτηρίζονται ως *Klebsiella pneumoniae* OXA-48, IMP-1 χαρακτηρίστηκαν ως θετικοί μάρτυρες για την ταυτοποίηση των γονιδίων αντίστασης.

8.8 Απομόνωση DNA

Αρχικά, για τον εντοπισμό των γονιδίων *FimH*, *mrkA*, *EcpA*, *OXA-48*, *IMP-1* του *Klebsiella pneumoniae* έγινε απομόνωση DNA από δείγματα κρεατοσκευασμάτων διαφόρων τύπων κρεάτων. Η απομόνωση του DNA οξέων από τις αποικίες των τρυβλίων έγινε χειροκίνητα με τη χρήση του εμπορικού κιτ απομόνωσης Monarch Genomic DNA Purification Kit (BioLabs, New England) σύμφωνα με τις οδηγίες κατασκευής.

8.8.1 Αναλυτικά η διαδικασία απομόνωσης με Monarch Genomic DNA Purification Kit

ΜΕΡΟΣ 1^ο: Λύση κυττάρου

8.8.1.1 Απομόνωση DNA από τα κύτταρα του μικροοργανισμού

Αρχικά, για την απομόνωση από τα κύτταρα του μικροοργανισμού, αφού φτιάχτηκε ένα εναιώρημα μικροοργανισμού συλλέχθηκαν από αυτό με την χρήση κρίκου οι αποικίες μπλε μεταλλικού χρώματος από το CHROMagar ORIENTATION καθώς αυτές ταυτοποιούν την ύπαρξη του *Klebsiella*. Στην συνέχεια, τοποθετήθηκαν τα κύτταρα από την κρικιά σε Eppendorf μαζί με 300 μL νερό χωρίς νουκλεάση και αναμίχθηκαν με vortex. Ακολούθησαν τα παρακάτω βήματα απομόνωσης:

- A. Φυγοκέντριση εναιωρήματος στις 12000 στροφές για 10 min και απομάκρυνση του εναπομείναντος νερού, ώστε να παραμείνουν μόνο τα κύτταρα στον πυθμένα.
- B. Προσθήκη 200 μL Lyse Buffer (Cells) και απευθείας ανάμειξη με vortex.
- C. Προσθήκη 10 μL πρωτεϊνάσης K για διάλυση κυτταρικής μεμβράνης και ανάμειξη με vortex για να διασφαλιστεί ότι τα ένζυμα διασπείρονται αποτελεσματικά.
- D. Επώαση στο Thermoblock για 30 min σε θερμοκρασία 56 °C.

8.8.1.2 Απομόνωση DNA από τον ιστό (κρέας)

- A. Τα κατεψυγμένα δείγματα αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου μέχρις ότου να αποψυχθούν πλήρως.
- B. Μικρή ποσότητα δειγμάτων μεταφέρθηκαν σε Eppendorf microtubes των 2 ml. Σε αυτά έγινε προσθήκη 200 μ L Lyse Buffer (Cells) και απευθείας ανάμειξη με vortex.
- C. Προσθήκη 10 μ L πρωτεϊνάσης K η οποία βοηθάει στην αποικοδόμηση των πρωτεϊνών διασπώντας τους πεπτιδικούς δεσμούς. Έπειτα ακολουθεί ανάμειξη με vortex .
- D. Επώαση στο Thermoblock overnight σε θερμοκρασία 56°C.

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

8.8.1.3 Δέσμευση και εκχύλιση γονιδιωματικού DNA από τα κύτταρα του μικροοργανισμού

- A. Προσθήκη 400 μ L gDNA Binding Buffer στο δείγμα και ανάμειξη με vortex για 5-10 sec.
- B. Μεταφορά 610 μ L του προϊόντος λύσης σε μία στήλη καθαρισμού gDNA (gDNA Purification Column), η οποία έχει προεισαχθεί σε σωλήνα συλλογής, χωρίς να ακουμπήσουμε την πάνω περιοχή της στήλης. Οδηγούμαστε κατευθείαν στο βήμα C. Αποφεύγουμε τη μεταφορά αφρού που μπορεί να έχει δημιουργηθεί κατά την λύση.
- C. Φυγοκέντριση πρώτα για 3 min στις 1000 στροφές για δέσμευση του gDNA και έπειτα για 1 min στη μέγιστη ταχύτητα (περίπου >12000 στροφών) για να καθαριστεί η μεμβράνη. Απόχυση και απόρριψη του σωλήνα συλλογής.
- D. Μεταφορά της στήλης σε νέο σωλήνα συλλογής και προσθήκη 400 μ L gDNA Wash Ethanol Added Buffer. Κλείσιμο και αναστροφή μερικές φορές με σκοπό το Wash Buffer να φτάσει μέχρι και το καπάκι (δεν χρησιμοποιούμε vortex). Απευθείας φυγοκέντριση για 2 min στη μέγιστη ταχύτητα και απόχυση ανεπιθύμητου υγρού.
- E. Μεταφορά της στήλης σε νέο σωλήνα συλλογής και ξανά προσθήκη 400 μ L gDNA Wash Ethanol Added Buffer. Κλείσιμο και αναστροφή μερικές φορές με σκοπό το Wash Buffer να

φτάσει μέχρι και το καπάκι (δεν χρησιμοποιούμε vortex). Απευθείας φυγοκέντριση για 2 min στη μέγιστη ταχύτητα και απόχυση ανεπιθύμητου υγρού.

F. Τοποθέτηση καθαρού σωλήνα συλλογής. Προσθήκη 100μL gDNA Elution Buffer προθερμασμένο στους 60°C. Επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου.

G. Φυγοκέντριση για 1 min στη μέγιστη ταχύτητα για την εκχύλιση του γονιδιωματικού DNA.

H. Τοποθέτηση των 100μL DNA από τον σωλήνα συλλογής σε Eppendorf και συντήρηση DNA στους -20°C.

8.8.1.4 Δέσμευση και εκχύλιση γονιδιωματικού DNA από τον ιστό (κρέας)

A. Ανάμειξη του δείγματος με vortex και φυγοκέντριση για 3 min στη μέγιστη ταχύτητα .

B. Μεταφορά 400 μL από το δείγμα (μόνο το υγρό) σε Eppendorf.

C. Προσθήκη 600μL gDNA Binding Buffer στο δείγμα και ανάμειξη με vortex για 5-10 sec.

D. Μεταφορά 610μL του προϊόντος λύσης/δέσμευσης σε μία στήλη καθαρισμού gDNA (gDNA Purification Column), η οποία έχει προεισαχθεί σε σωλήνα συλλογής, χωρίς να ακουμπήσουμε την πάνω περιοχή της στήλης. Οδηγούμαστε κατευθείαν στο βήμα C. Αποφεύγουμε τη μεταφορά αφρού που μπορεί να έχει δημιουργηθεί κατά την λύση.

E. Φυγοκέντριση πρώτα για 3 min στις 1000 στροφές για δέσμευση του gDNA και έπειτα για 1 min στη μέγιστη ταχύτητα (περίπου >12000 στροφών) για να καθαριστεί η μεμβράνη. Απόχυση και απόρριψη του σωλήνα συλλογής.

F. Μεταφορά της στήλης σε νέο σωλήνα συλλογής και προσθήκη 400μL gDNA Wash Ethanol Added Buffer. Κλείσιμο και αναστροφή μερικές φορές με σκοπό το Wash Buffer να φτάσει μέχρι και το καπάκι (δεν χρησιμοποιούμε vortex). Απευθείας φυγοκέντριση για 2 min στη μέγιστη ταχύτητα και απόχυση ανεπιθύμητου υγρού.

G. Μεταφορά της στήλης σε νέο σωλήνα συλλογής και ξανά προσθήκη 400μL gDNA Wash Ethanol Added Buffer. Κλείσιμο και αναστροφή μερικές φορές με σκοπό το Wash Buffer να φτάσει μέχρι και το καπάκι (δεν χρησιμοποιούμε vortex). Απευθείας φυγοκέντριση για 2 min στη μέγιστη ταχύτητα και απόχυση ανεπιθύμητου υγρού.

H. Τοποθέτηση καθαρού σωλήνα συλλογής. Προσθήκη 100μL gDNA Elution Buffer προθερμασμένο στους 60°C. Επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου.

- I. Φυγοκέντρωση για 1 min στη μέγιστη ταχύτητα για την εκχύλιση του γονιδιωματικού DNA.
- J. Τοποθέτηση των 100μL DNA από τον σωλήνα συλλογής σε Eppendorf και συντήρηση DNA στους -20°C.

9. Ενίσχυση τμήματος DNA σύμφωνα με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους ενίσχυσης επιλεγμένων αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων. Για την πραγματοποίησή της, απαιτείται η παρουσία ενός ζεύγους συνθετικών ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (primers) που θα αποτελέσουν τα πρωταρχικά τμήματα για το σχηματισμό συμπληρωματικών τμημάτων DNA.

Οι αντιδράσεις PCR διεξήχθησαν σε θερμικό κυκλοποιητή (Applied Biosystems). Όλα τα γονίδια ανιχνεύθηκαν με βάση το δημοσιευμένο άρθρο (Theocharidi et al. 2022). Η ανίχνευση των γονιδίων αντοχής BlaIMP-1 και BlaOXA-48 έγινε ταυτόχρονα.

9.1 Τα στάδια που επαναλαμβάνονται σε κάθε κύκλο της μεθόδου:

- 1) **Στάδιο Αποδιάταξης:** Θέρμανση στους 95°C για 5 min, αποδιάταξη δίκλωνων μορίων του DNA-στόχου.
- 2) **Στάδιο Υβριδισμού:** Η θερμοκρασία μειώνεται στους 58°C, ώστε οι εκκινητές να υβριδοποιηθούν με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο μόριο-στόχο.
- 3) **Στάδιο Επιμήκυνσης:** Η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C, ώστε να επιμηκύνει η Taq DNA πολυμεράση, τις αλληλουχίες των υβριδισμένων εκκινητών με κατεύθυνση 5'–3' χρησιμοποιώντας ως μήτρα τον DNA στόχο.

9.2 Προετοιμασία δειγμάτων PCR:

Οι εκκινητές και το το mix της PCR είναι αποθηκευμένοι στην κατάψυξη σε θερμοκρασία -20°C . Για να τα χρησιμοποιήσουμε είναι σημαντικό τα μίγματα να ξεπαγώσουν εξολοκλήρου αφήνοντας τα σε θερμοκρασία δωματίου.

Βήματα μεθόδου για την PCR

- Οι εκκινητές βρίσκονται σε συγκέντρωση $100\text{ pmol}/\mu\text{l}$. Ένα μέρος των εκκινητών αραιώθηκε σε τελική συγκέντρωση $10\text{ pmol}/\mu\text{l}$ για να χρησιμοποιηθεί. Συγκεκριμένα, σε σωληνάρια τύπου erpendorf 1.5 mL , προστέθηκαν $10\text{ }\mu\text{l}$ του αντίστοιχου εκκινητή και $90\text{ }\mu\text{l H}_2\text{O}$.
- Προσθέτουμε σε καινούργιο erpendorf, $25\text{ }\mu\text{L}$ από το PCR mix, για κάθε δείγμα, το οποίο περιέχει τα απαραίτητα συστατικά, για την πραγματοποίηση της PCR, όπως την Taq DNA πολυμεράση, reaction buffer, MgCl_2 , dNTP και νερό χωρίς νουκλεάση.
- Προσθέτουμε, στο tube με το HRMmix, $1\text{ }\mu\text{L}$ από κάθε εκκινητή, για κάθε δείγμα και αναδεύουμε με την πιπέτα. Υπολογίζουμε πόσο ddH₂O θα χρειαστεί ώστε έπειτα να μπορούμε να φτάσουμε τον όγκο των $40\text{ }\mu\text{L}$ για κάθε δείγμα DNA.
- Αριθμούμε τα PCR tubes αντίστοιχα με τα δείγματα και ισοκατανέμουμε $40\text{ }\mu\text{L}$ από το μίγμα στα ειδικά tubes.
- Προσθέτουμε $10\text{ }\mu\text{L}$ DNA σε κάθε PCR tube με τη σειρά και κάνουμε ανάδευση με την πιπέτα, ώστε ο συνολικός όγκος της σύστασης μίγματος της αντίδρασης PCR να είναι $50\text{ }\mu\text{l}$ (Πίνακας 11.2).
- Τα PCR tubes τοποθετούνται σε ειδική πλάκα και αυτή τοποθετείται στον θερμικό κυκλοποιητή. Προγραμματίζουμε τον θερμικό κυκλοποιητή ανάλογα με τη θερμοκρασία και τους κύκλους που θέλουμε να επιδιώξουμε.

Οι συνθήκες ενίσχυσης του τμήματος των γονιδίων που πραγματοποιήσε η PCR:

Συνθήκες ενίσχυσης	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη των κλώνων	95	5 min	} 35 κύκλοι
Αποδιάταξη	94	35 sec	
Υβριδισμός	58	1 min	
Επιμήκυνση	72	1 min	
Τελική επιμήκυνση	72	30 min	

Το αρχικό στάδιο είναι το στάδιο της μετουσίωσης για 5 min στους 95°C, ακολουθούμενο από 35 κύκλους μετουσίωσης για 35 sec στους 94°C, έπειτα γίνεται αναδιάταξη για 1 min στους 58°C και επέκταση για 1 min στους 72°C με το τελικό στάδιο επέκτασης στους 72°C για 30 min. Τα προϊόντα PCR διαμοιράστηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 3,3%, χρωματισμένο με βρωμιούχο αιθίδιο και προχώρησαν στη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης. Το γονιδιωματικό DNA των ανθεκτικών κλινικών στελεχών *Klebsiella pneumoniae* χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες.

Πίνακας 3: Αλληλουχίες εκκινητών ενίσχυσης τμήματος για τα γονίδια

Γονίδια-στόχοι	Αλληλουχία εκκινητών	Μέγεθος αμφίλουκου (bp)
BlaIMP-1	F: 5'-TGA GCA AGT TAT CTG TAT TC-3' R: 5'-TTA GTT GCT TGG TTT TGA TG-3	139
BlaOXA-48	F: 5'-TTG GTG GCA TCG ATT ATC GG-3' R: 5'-GAG CAC TTC TTT TGT GAT GGC- 3'	281
fimH	F: 5'-CGC CTG GTC CTT TGC CTG CA-3' R: 5'-CTG CAC GTT GCC GGC GGT AA-3'	817
ecpA	F: 5'-AAT GGT TCA CCG GGA CAT CAT GTC C-3' R: 5'-AAG GAT GAA ATA TCG CCG ACA TCC-3	759
mrkA	F: 5'-GTT AAC GGC GGC CAG GGC AGC GA-3' R: 5'- AGG TGA AAC GCG CGC CAT CA- 3'	382
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	F: 5'- ATT TGA AGA GGT TGC AAA CGA T-3' R: 5'- TTC ACT CTG AAG TTT TCT TGT GTT C-3'	130

Πίνακας 4: Σύσταση μίγματος αντίδρασης PCR

Αντιδραστήρια	Ποσότητα (μl)
Primer Fw	1
Primer Rw	1
Ultra Mix Red	25
ddH ₂ O	13
DNA	10

9.3 Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης

1. Ζυγίζονται 2,2 g αγαρόζης (για μονό δισκίο) ή 3,3 g (για διπλό), έπειτα τοποθετούνται σε κωνική φιάλη των 500 mL και προστίθενται 10 mL TBE και 90 mL απεσταγμένο ή 15mL και 135 mL αντίστοιχα.
2. Η κωνική φιάλη τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 3 min μέχρις ότου το διάλυμα γίνει ομοιογενές και διαφανές.
3. Το διάλυμα έρχεται σε θερμοκρασία δωματίου για να κρυώσει μέχρι τους 60°C και προσθέτουμε 10 μl βρωμιούχο αιθίδιο ως χρωστική. Η χρήση του βρωμιούχου αιθιδίου απαιτεί μεγάλη προσοχή καθώς και την χρήση γαντιών κατά τη διάρκεια της διαδικασίας διότι είναι ισχυρό μεταλλαξογόνο και έχει μέτριο βαθμό τοξικότητας.
4. Αφού έχει τοποθετηθεί σωστά το χτενάκι στο καλούπι ώστε να σχηματισθούν πηγαδάκια, προστίθεται αμέσως το διάλυμα αγαρόζης με τέτοιο τρόπο ώστε να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες.

5. Το καλούπι με την αγαρόζη τοποθετείται στο ψυγείο σε επίπεδο ράφι έως ότου πήξει, περίπου 20 min. Στην συνέχεια η χτένα αφαιρείται και ο δίσκος (gel) τοποθετείται στη συσκευή της ηλεκτροφόρησης, χωρίς το καλούπι.
6. Προσθέτουμε υγρό ηλεκτροφόρησης μέχρι να καλυφθεί το gel.
7. Έχοντας πρώτα χρωματίσει τα δείγματα με 10x Loading Buffer, τοποθετούμε με μια πιπέτα 15 μL από κάθε δείγμα, κατά σειρά σε κάθε εγκοπή της πηκτής αγαρόζης. Στις εγκοπές μετά τα δείγματα τοποθετούμε το δείγμα με το νερό και στο τέλος 4 μL ladder.
8. Κλείνουμε το καπάκι της συσκευής, συνδέουμε τα καλώδια στους κατάλληλους πόλους και επιλέγουμε τη φορά του πεδίου, έτσι ώστε το DNA να μετακινείται προς την άνοδο (+). Η ηλεκτροφόρηση γίνεται υπό σταθερή τάση 160 Volt για 30 min.
9. Όταν τελειώσει η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης το τζελ μεταφέρεται με προσοχή στη συσκευή με τη λάμπα UV για εξέταση. Ακολουθεί η λήψη φωτογραφιών, μέσω ψηφιακής κάμερας συνδεδεμένη με τον υπολογιστή για την καταγραφή των αποτελεσμάτων.

Πίνακας 5: Παρασκευή πηκτής αγαρόζης 2.2% και 3.3%

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

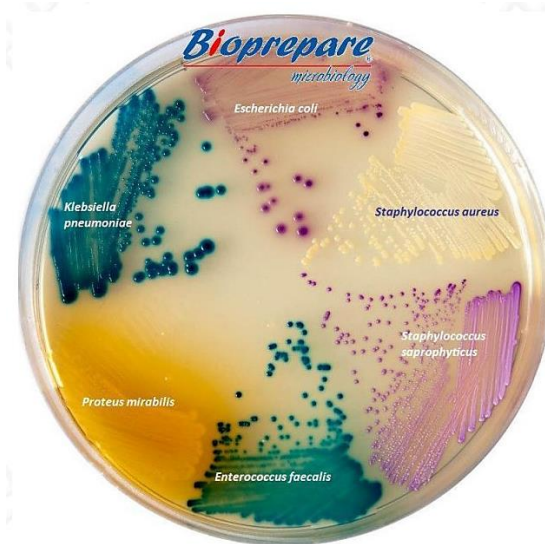
10. Αποτελέσματα μελέτης

10.1 NG-Test CARBA-5

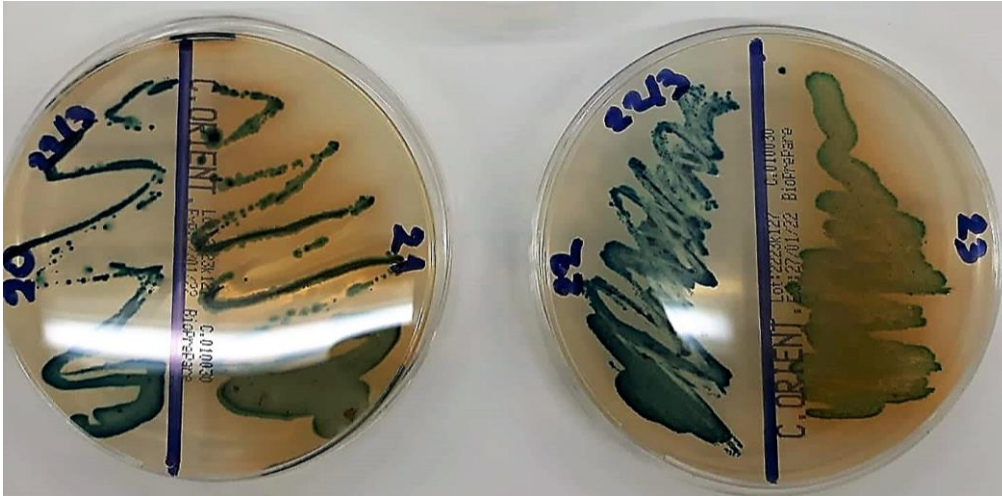
Με βάση την εικόνα μπορούμε να δούμε ότι και τα 3 τεστ έχουν αρνητικό αποτέλεσμα. Επαληθεύεται από την PCR, ότι το γονίδιο αντοχής IMP-1 δεν υπάρχει στα δείγματα 20, 22 και 25, όμως και τα 3 δείγματα έχουν εμφανίσει την ζώνη για το μοριακό βάρος του γονιδίου OXA-48 τα οποία όμως δεν εκφράζεται όπως βλέπουμε στο φαινοτυπικό τεστ.

10.2 Τρυβλία

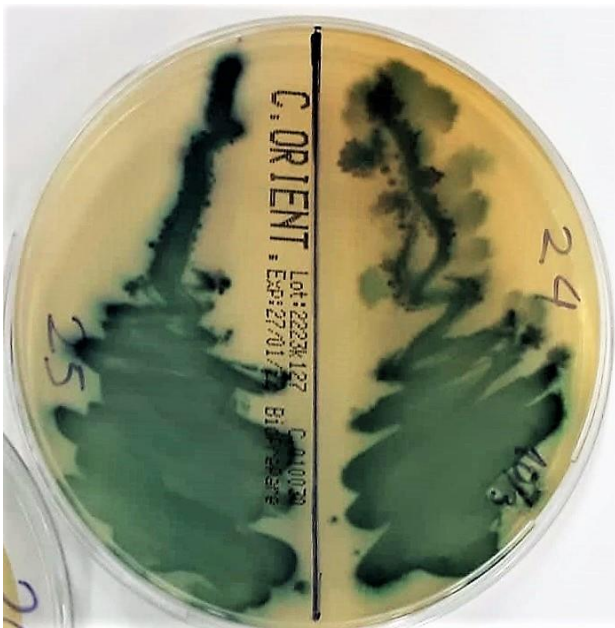
Τα τρυβλία που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα **CHROMagar ORIENTATION** της εταιρείας **BIOPREPARE** όπου οι μικροοργανισμοί ταυτοποιήθηκαν με βάση τις χρωματικές μεταβολές των αποικιών.



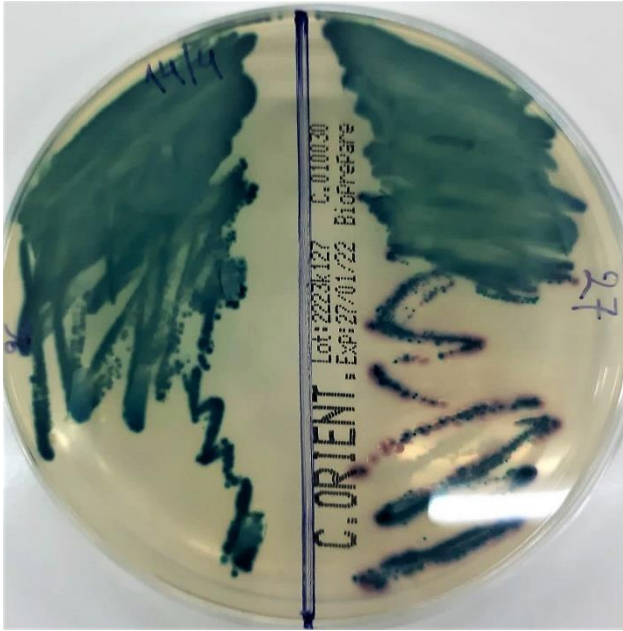
Εικόνα 16: Τρυβλίο CHROMagar ORIENTATION της εταιρείας BIOPREPARE



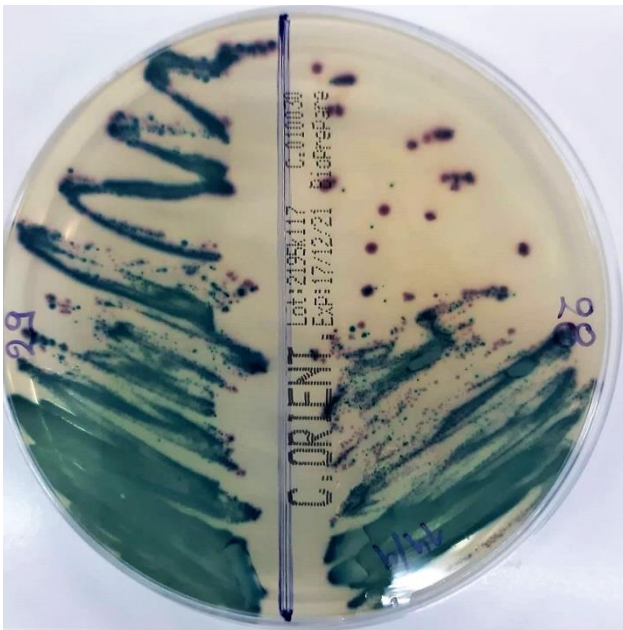
Εικόνα 17: Αποτελέσματα τρυβλίων C. Orient. για τα δείγματα 20-23. Όπως φαίνεται στην εικόνα οι μεταλλικές μπλε αποικίες υποδεικνύουν θετικό αποτέλεσμα σε *Klebsiella* όπως στα δείγματα 20 και 22, ενώ οι γαλαζοπράσινες αποικίες υποδεικνύουν θετικό αποτέλεσμα σε *Enterococcus* και το κίτρινο "φωτοστέφανο" δείχνει την ύπαρξη *Proteus* όπως φαίνεται στα δείγματα 21 και 23.



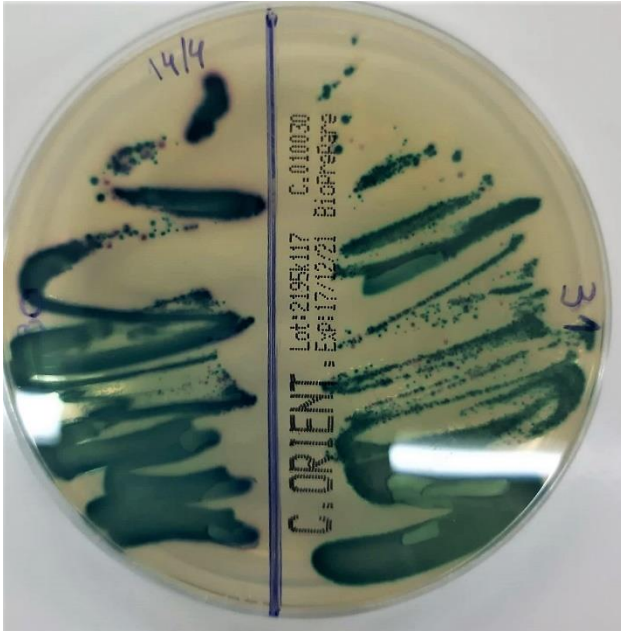
Εικόνα 18: Αποτελέσματα τρυβλίων C. Orient. για τα δείγματα 24 και 25. Όπως φαίνεται στην εικόνα οι μεταλλικές μπλε αποικίες υποδεικνύουν θετικό αποτέλεσμα σε *Klebsiella*. Το κίτρινο "φωτοστέφανο" δείχνει την ύπαρξη *Proteus* όπως φαίνεται στο δείγμα 24.



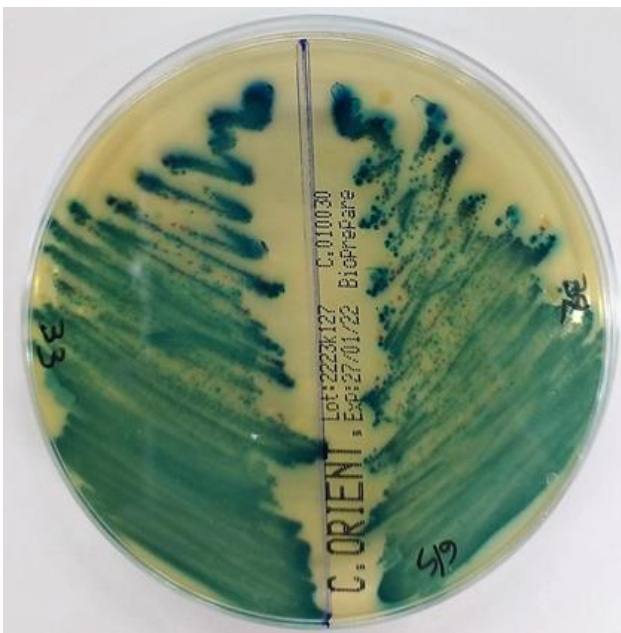
Εικόνα 19: Αποτελέσματα τρυβλίων C. Orient. για τα δείγματα 26 και 27. Όπως φαίνεται στην εικόνα οι μεταλλικές μπλε αποικίες υποδεικνύουν την ύπαρξη *Klebsiella*.



Εικόνα 20: Αποτελέσματα τρυβλίων C. Orient. για τα δείγματα 28 και 29. Όπως φαίνεται στην εικόνα οι μεταλλικές μπλε αποικίες υποδεικνύουν την ύπαρξη *Klebsiella*. Επίσης, παρατηρούνται κόκκινες αποικίες οι οποίες ταυτοποιούν την ύπαρξη *Escherichia coli*.



Εικόνα 21: Αποτελέσματα τρυβλίων C. Orient. για τα δείγματα 30 και 31. Όπως φαίνεται στην εικόνα οι μεταλλικές μπλε αποικίες δηλώνουν δείγμα θετικό σε *Klebsiella* για το δείγμα 30, ενώ οι γαλαζοπράσινες θετικό σε *Enterococcus* για το δείγμα 31.



Εικόνα 22: Αποτελέσματα τρυβλίων C. Orient. για τα δείγματα 32 και 33. Όπως φαίνεται στην εικόνα οι γαλαζοπράσινες αποικίες δηλώνουν δείγμα θετικό σε *Enterococcus*. Δεν παρατηρούνται μεταλλικές μπλε αποικίες, οπότε δεν φαίνεται η ανάπτυξη του *Klebsiella*.



Εικόνα 23: Αποτελέσματα τρυβλίων C. Orient. για τα δείγματα 34 και 35. Δεν παρατηρούνται μεταλλικές μπλε αποικίες, οπότε δεν φαίνεται η ανάπτυξη του *Klebsiella*. Οι γαλαζοπράσινες αποικίες υποδεικνύουν θετικό αποτέλεσμα σε *Enterococcus*.



Εικόνα 24: Αποτελέσματα τρυβλίων C. Orient. για το δείγμα 36. Δεν παρατηρούνται μεταλλικές μπλε αποικίες, οπότε δεν φαίνεται η ανάπτυξη του *Klebsiella*. Οι γαλαζοπράσινες αποικίες υποδεικνύουν θετικό αποτέλεσμα σε *Enterococcus*. Επίσης, παρατηρούνται κόκκινες αποικίες οι οποίες ταυτοποιούν την ύπαρξη *Escherichia coli*. Και το κίτρινο "φωτοστέφανο" δηλώνει την ύπαρξη *Proteus*.

10.3 PCR

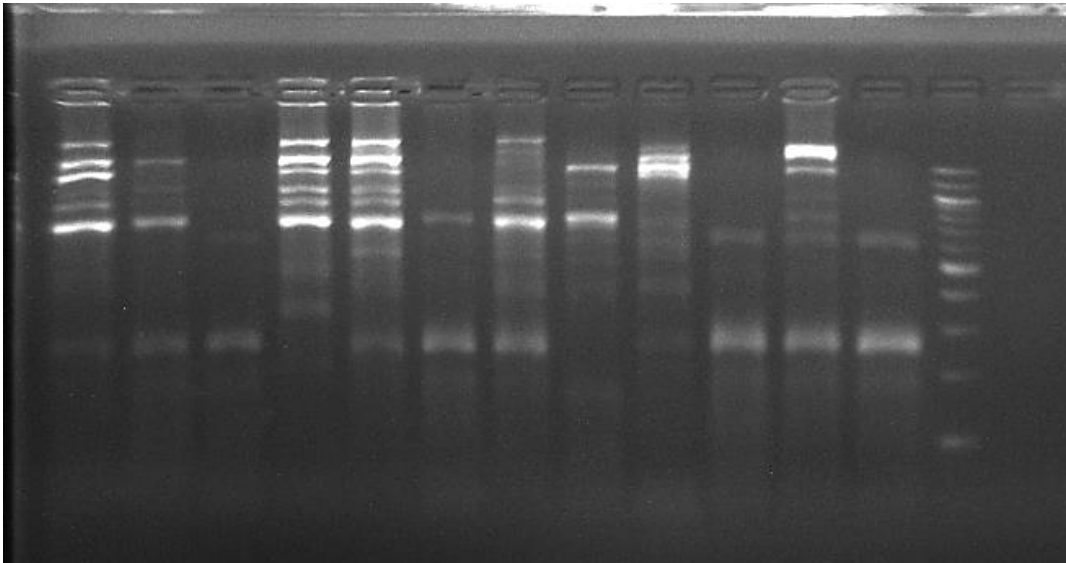
Συνολικά τα γονίδια αντοχής του *Klebsiella pneumoniae* εντοπίστηκαν σε 10 από τα 17 δείγματα (58,8%).

Μέσω της PCR λαμβάνουμε τις παρακάτω πληροφορίες για τα ευρήματα:

- Το **41,2%** (7/17) εμφάνισαν ζώνη στη θέση 759 bp, στην ηλεκτροφόρηση, που αντιστοιχεί στο μοριακό βάρος του γονιδίου **EcpA**.
- Το **47,1%** (8/17) και **17,6%** (3/17) για τα γονίδια **FimH** και **MrkA**, αντίστοιχα τα οποία κωδικοποιούν fimbrial adhesins τύπου 1 και τύπου 3 στις θέσεις 817 bp και 382 bp αντίστοιχα.
- Το **23,5%** (4/17) εμφάνισαν ζώνη στη θέση 281 bp που αντιστοιχεί το μοριακό βάρος του γονιδίου **BlaOXA-48**
- Το **5,9%** (1/17) εμφάνισε ζώνη στη θέση 139 bp που αντιστοιχεί το μοριακό βάρος του γονιδίου **BlaIMP-1**

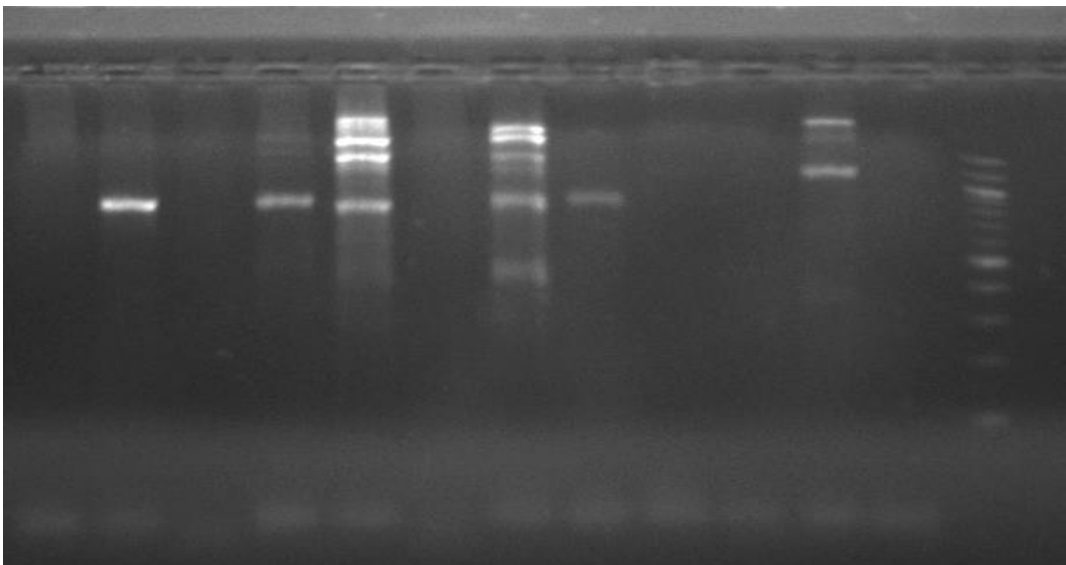
Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι το **11,8%** (2/17) των στελεχών είχε τον γονότυπο **EcpA+/ FimH+/ MrkA+**, το **17,6%** (3/17) είχε τον γονότυπο **EcpA+/ FimH+/ MrkA-** και το **5,9%** (1/17) είχε τον γονότυπο **EcpA+/ FimH- / MrkA+**, ενώ δεν βρέθηκε δείγμα που να έχει ταυτόχρονα δύο γονίδια αντίστασης (BlaOXA-48 και BlaIMP-1).

26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 H₂O Ladder



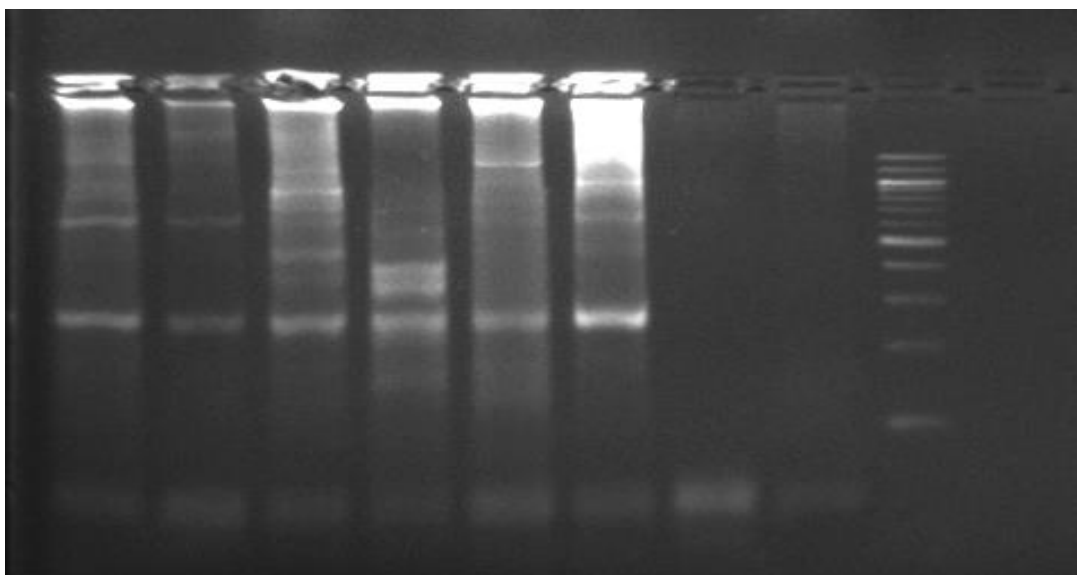
Εικόνα 25: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης για το γονίδιο FimH για δείγματα σε πηκτή αгарόζης 2,2% w/v με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου. Στην ηλεκτροφόρηση παρατηρούμε δεξιά τις ζώνες των μοριακών μεγεθών και συγκεκριμένα στη θέση 817 bp που αντιστοιχεί στο γονίδιο FimH. Όπως φαίνεται τα δείγματα 26, 27, 29, 30 και 32 εμφανίζουν ζώνη στη μπάντα 817 bp, συνεπώς έχουν το γονίδιο FimH.

26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 H₂O Ladder



Εικόνα 26: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης για το γονίδιο EcpA για δείγματα σε πηκτή αгарόζης 2,2% w/v με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου. Στην ηλεκτροφόρηση παρατηρούμε δεξιά τις ζώνες των μοριακών μεγεθών και συγκεκριμένα στη θέση 759 bp που αντιστοιχεί στο γονίδιο EcpA. Όπως φαίνεται τα δείγματα 27, 29, 30, 32 και 33 εμφανίζουν ζώνη στη μπάντα 759 bp, συνεπώς έχουν το γονίδιο EcpA.

20 21 22 23 24 25 26 H₂O Ladder



Εικόνα 27: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης για το γονίδιο FimH για δείγματα σε πηκτή αгарόζης 2,2% w/v με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου. Στην ηλεκτροφόρηση παρατηρούμε δεξιά τις ζώνες των μοριακών μεγεθών και συγκεκριμένα στη θέση 817 bp που αντιστοιχεί στο γονίδιο FimH. Όπως φαίνεται τα δείγματα 20, 24 και 25 εμφανίζουν ζώνη στη μπάνα 817 bp, συνεπώς έχουν το γονίδιο FimH.

10.4 Φαινοτυπική Ανάλυση

Πίνακας 6: Ανίχνευση του *Klebsiella pneumoniae* με ανάλυση PCR και τρυβλίο C. ORIENT.

Δείγμα	PCR	C. ORIENT
20	+	+
21	-	-
22	+	+
23	-	-
24	+	+
25	+	+
26	+	+
27	+	+
28	-	+
29	+	+
30	+	+
31	-	-
32	+	-
33	+	-
34	-	-
35	-	-
36	-	-

Όπως βλέπουμε από τον παραπάνω πίνακα, το 82,4% (14/17) των δειγμάτων ταυτοποιεί την ύπαρξη του *Klebsiella pneumoniae* με μοριακή τεχνική (PCR) και μικροβιολογική ανάλυση (τρυβλίο C. ORIENT.). Υπάρχουν όμως 3 δείγματα (28, 32, 33) στα οποία ενώ με την μοριακή τεχνική ανιχνεύθηκαν γονίδια του *K. pneumoniae*, στην μικροβιολογική ανάλυση δεν εμφανίστηκαν οι μπλε μεταλλικές αποικίες που ταυτοποιούν την ύπαρξη του βακτηρίου *K. pneumoniae*. Αυτό μπορεί να συμβαίνει επειδή ο μικροοργανισμός που αναπτύχθηκε στο τρυβλίο κυριαρχούσε με αποτέλεσμα να επικάλυψε το *K. pneumoniae*, χωρίς αυτό να σημαίνει απουσία του βακτηρίου.

Πίνακας 7: Στελέχη *Klebsiella pneumoniae* που φέρουν τα γονίδια *EcpA*, *FimH* και *MrkA*.

Είδη κρεάτων	EcpA (n=7)	FimH (n=8)	MrkA (n=3)
Κοτόπουλο	2 (28.6)	1 (12.5)	0 (0.0)
Βοοειδή	3 (42.9)	4 (50.0)	1 (33.3)
Χοιρινό	1 (14.3)	2 (25.0)	1 (33.3)
Αρνί	1 (14.3)	1 (12.5)	1 (33.3)

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως απόλυτες τιμές (ποσοστά).

10.5 Γονίδια ιογένεσης και ανθεκτικότητας

Όσον αφορά τα γονίδια ιογένεσης, 7 (41,2%) απομονώσεις *K. pneumoniae* εμφάνισαν ζώνη στη θέση 759 bp που αντιστοιχεί στο μοριακό βάρος του γονιδίου *EcpA*. Το γονίδιο *EcpA* ανιχνεύθηκε σε στελέχη *K. pneumoniae* από 2 (28,6%) δείγματα κοτόπουλου, 3 (42,9%) δείγματα βοοειδών, 1 (14,3%) δείγματα χοιρινών και 1 (14,3%) δείγματα από αρνί. Επιπλέον, τα γονίδια *FimH* και *MrkA*, τα οποία κωδικοποιούν τις φιμπρίες συγκολλητινές τύπου 1 και τύπου 3, ήταν παρόντα σε 8 (47,1%) και 3 (17,6%) απομονώσεις, αντίστοιχα. Μεταξύ των 8 δειγμάτων, το γονίδιο *FimH* βρέθηκε στο κοτόπουλο σε ποσοστό 12,5%, στο χοιρινό σε ποσοστό 25,0%, 50,0% στα βοοειδή και 12,5% στο αρνίσιο, όπως φαίνεται στον Πίνακα 7. Μεταξύ των 8 απομονωμένων στελεχών, το γονίδιο *FimH* βρέθηκε σε 1 δείγμα κοτόπουλου, σε 4 δείγματα βοοειδή, σε 2 από τα δείγματα χοιρινού κρέατος και σε 1 αρνίσιο. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι το **11,8%** (2/17) των στελεχών είχε τον γονότυπο **EcpA+/ FimH+/ MrkA+**, το **17,6%** (3/17) είχε τον γονότυπο **EcpA+/ FimH+/ MrkA-** και το **5,9%** (1/17) είχε τον γονότυπο **EcpA+/ FimH-/ MrkA+**.

Όσον αφορά τα γονίδια αντοχής, 5 (29,4%) απομονωμένα στελέχη *K. pneumoniae* βρέθηκαν να φέρουν ένα γονίδιο αντοχής. Από αυτά, το *BlaOXA-48* ήταν το επικρατέστερο γονίδιο που εντοπίστηκε σε 4 (23,5%) απομονώσεις, ακολουθούμενο από το *BlaIMP-1* σε 1 (5,9%) απομονώσεις. Δεν βρέθηκε δείγμα που να έχει ταυτόχρονα δύο γονίδια αντίστασης (*BlaOXA-48* και *BlaIMP-1*).

11. Συζήτηση

Συνολικά τα γονίδια του *Klebsiella pneumoniae* εντοπίστηκαν σε ποσοστό 58,8% (10/17), σε ένα μικρό εύρος δειγμάτων. Αναζητώντας παρόμοιες έρευνες με την συγκεκριμένη, η μελέτη με τα περισσότερα κοινά χαρακτηριστικά που βρέθηκε ώστε να χρησιμοποιηθεί για την σύγκριση των αποτελεσμάτων, ήταν των φοιτητριών Θεοχαρίδη και Μπαλτά (Θεοχαρίδη and Μπαλτά 2022). Στην πτυχιακή τους, εξετάστηκαν 40 δείγματα κρεατοσκευασμάτων ως προς την παρουσία του βακτηρίου *K. pneumoniae* το οποίο εντοπίστηκε σε ποσοστό 82,5% (33/40 δείγματα). Το γονίδιο *EcpA* βρέθηκε σε ποσοστό 30,0% (σε 12 από τα 40 δείγματα), σε αντίθεση με την παρούσα μελέτη όπου βρέθηκε σε ποσοστό 41,2% (σε 7 από τα 17 δείγματα). Τα λοιμογόνα γονίδια *FimH* και *MrkA* βρέθηκαν σε ποσοστό 15,0% (6/40) και 60,0% (24/40) αντίστοιχα, ενώ στην εργασία μας το *FimH* σε ποσοστό 47,1% (8/17) και το *MrkA* σε ποσοστό 17,6% (3/17). Ακόμη, ενδιαφέρουσα είναι η σύγκριση των γονιδίων αντοχής *BlaOXA-48* και *BlaIMP-1*, τα οποία στην μελέτη (Θεοχαρίδη and Μπαλτά 2022) βρέθηκαν σε ποσοστά 22,5% (9/40) και 5,0% (2/40), αριθμοί που είναι πολύ κοντά στα αποτελέσματα μας, 23,5% (4/17) για *BlaOXA-48* και 5,9% (1/17) για *BlaIMP-1*.

Στα δείγματά μας βρέθηκαν παραπάνω από δυο γονίδια, ταυτόχρονα. Το 11,8% (2/17) των στελεχών είχε τον γονότυπο *EcpA+*/*FimH+*/*MrkA+*, ενώ το 17,6% (3/17) είχε τον γονότυπο *EcpA+*/*FimH+*/*MrkA-* και το 5,9% (1/17) είχε τον γονότυπο *EcpA+*/*FimH-*/*MrkA+*. Στην πτυχιακή των Θεοχαρίδη και Μπαλτά το 10,0% (4/40) των στελεχών είχε τον γονότυπο *EcpA+*/*FimH+*/*MrkA+*, ενώ το 0% (0/40) είχε τον γονότυπο *EcpA+*/*FimH+*/*MrkA-* και το 20,0% (8/40) είχε τον γονότυπο *EcpA+*/*FimH-*/*MrkA+* (Θεοχαρίδη and Μπαλτά 2022). Τέλος, σε καμία από τις δύο πτυχιακές εργασίες δεν βρέθηκε δείγμα που να έχει ταυτόχρονα δύο γονίδια αντίστασης (*BlaOXA-48* και *BlaIMP-1*). Όπως βλέπουμε ο συνδυασμός *EcpA+*/*FimH+*/*MrkA+* βρέθηκε σε περίπου ίδιο ποσοστό και στις δυο εργασίες, ενώ τα *EcpA* και *FimH*, χωρίς το *MrkA* παρόλο που στην δική μας εργασία βρίσκονται ταυτόχρονα στον μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων (3/17) δεν βρέθηκε σε κανένα δείγμα στην πτυχιακή που αναφέραμε. Τέλος, υπάρχει ποσοστιαία διαφορά στον συνδυασμό *EcpA+*/*FimH-*/*MrkA+* μεταξύ των δυο εργασιών, με την δική μας να έχει τον συγκεκριμένο συνδυασμό σε μικρότερο ποσοστό.

Στην παρούσα εργασία, τα γονίδια με την μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης κατά φθίνουσα σειρά ήταν, τα: FimH (47,1%), EcpA (41,2%), BlaOXA-48 (23,5%), MrkA (17,6%), BlaIMP-1 (6,0 %).

Στις Θεοχαρίδη και Μπαλά, τα γονίδια με την μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης κατά φθίνουσα σειρά ήταν τα: MrkA (60,0%), EcpA (30,0%), BlaOXA-48 (22,5%), FimH (15,0%), BlaIMP-1 (5,0%) (Θεοχαρίδη and Μπαλά 2022).

Τα ποσοστά ταυτοποίησης δειγμάτων με *Klebsiella pneumoniae* μεταξύ των δύο πτυχιακών εργασιών βλέπουμε ότι διαφέρουν σημαντικά (στην δική μας 58,8%, ενώ στην Θεοχαρίδη και Μπαλά 82,5%). Αυτή η διαφορά μπορεί να οφείλεται στον συγκριτικά μικρότερο αριθμό (17) των δειγμάτων που εξετάστηκε στην παρούσα πτυχιακή, σε σχέση με τον αριθμό των 40 δειγμάτων. Παρόλα αυτά, τα ποσοστά εύρεσης των γονιδίων του *Klebsiella pneumoniae* μεταξύ των δύο εργασιών δεν έχουν τεράστιες αποκλίσεις, στα BlaOXA-48, BlaIMP-1, EcpA. Όμως υπάρχουν κάποιες μεγαλύτερες αποκλίσεις στα λοιμογόνα γονίδια FimH και MrkA τα οποία βρέθηκαν να έχουν σημαντική ποσοστιαία διαφορά. Γενικότερα, υπάρχουν ορισμένες ομοιότητες στην επαναληψιμότητα και στην ποσοστιαία συγκέντρωση των δειγμάτων μεταξύ των δυο πτυχιακών εργασιών παρόλη την διαφορά του αριθμού των κρεάτων που αναλύθηκαν.

Οι περισσότερες μελέτες εστιάζουν σε πιο κοινά τροφιμογενή παθογόνα όπως είναι τα βακτήρια *Escherichia coli*, *Salmonella* και *Shigella*, ενώ το *K. pneumoniae* δεν έχει αναγνωριστεί ως κοινό τροφιμογενές παθογόνο, όπως αυτά τα κοινά παθογόνα. Δυστυχώς, δεν υπάρχουν αρκετές πληροφορίες σχετικά με το ποσοστό μόλυνσης των τροφίμων λιανικής πώλησης με στελέχη *K. pneumoniae*. Τα χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού όπως η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά και το προφίλ ιογένεσης, χρήζουν ιδιαίτερη προσοχή για την αξιολόγηση του κινδύνου τους στην δημόσια υγεία (Barus et al. 2013, Calhau et al. 2014, Cao et al. 2014). Συγκεκριμένα, στην Ελλάδα, δεν υπάρχουν αναφορές σχετικά με τη συχνότητα ή τη μολυσματικότητα του *K. pneumoniae* στα τρόφιμα. Μείζον θέμα αποτελεί τόσο η αξιολόγηση των γονοτυπικών και φαινοτυπικών χαρακτηριστικών αυτού του τροφιμογενούς παθογόνου όσο και η ανίχνευση της ανθεκτικότητάς του στα αντιβιοτικά. Αυτή μπορεί να προκαλέσει επιδημίες, οι οποίες φτάνουν σε βαθμό να συγκριθούν με τις επιδημίες που προκαλούνται από άλλα κοινά τροφιμογενή παθογόνα (Lin et al. 2010). Ειδικότερα σε χώρες όπου το μεγαλύτερο μέρος της τοπικής προμήθειας τροφίμων είναι εισαγόμενο, τα πρώτα στάδια της παραγωγής δεν μπορούν να παρακολουθούνται και να ελέγχονται για τη μόλυνση των τροφίμων. Η αξιολόγηση των

παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα που εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά δίνουν τη δυνατότητα στις αρχές δημόσιας υγείας να εφαρμόσουν αποτελεσματικές τακτικές για τη μείωση του ποσοστού μόλυνσης και τον περιορισμό των επιπτώσεων που προκύπτουν από αυτά τα παθογόνα και φέρνουν σε κίνδυνο τη δημόσια υγεία. Όσον αφορά τα δικά μας ευρήματα, το υψηλό ποσοστό μόλυνσης των ελληνικών προϊόντων κρέατος με *K. pneumoniae* (58.8%) μας προβληματίζει αρκετά. Επίσης αρκετά από τα απομονωμένα παθογόνα έφεραν τουλάχιστον ένα γονίδιο ανθεκτικό στις καρβαπενεμάσες (29,4%), γεγονός που υποδηλώνει την δυσκολία στην εκρίζωση αυτών των παθογόνων (Hartantyo et al. 2020).

Όμως τα παθογόνα αυτά αποτελούν μέρος της φυσιολογικής ανθρώπινης και ζωικής χλωρίδας και η απομόνωση στελεχών *K. pneumoniae* σε δείγματα τροφίμων δεν συνδέεται απαραίτητα με μολυσματική μετάδοση. Ωστόσο, η ανίχνευσή τους στην τροφική αλυσίδα μπορεί να είναι ενδεικτική για μη ορθές πρακτικές παρασκευής και χειρισμού των τροφίμων, ελλιπές μαγείρεμα και κακές συνθήκες αποθήκευσης, ιδίως σε περιπτώσεις τροφίμων έτοιμων προς κατανάλωση (Anon n.d.-b, Barus et al. 2013). Η συσχέτιση μεταξύ της τροφιμογενούς μεταδιδόμενης *K. pneumoniae* και της ανάπτυξης των λοιμώξεων δεν έχει διερευνηθεί πλήρως και υπάρχει μια ελλιπής αιτιολόγηση στις επιπτώσεις του *K. pneumoniae* ως παθογόνο. Ωστόσο, η μικροχλωρίδα του ανθρώπινου εντέρου συνδέεται στενά με το μικροβίωμα των τροφίμων που καταναλώνονται και σε πολλές περιπτώσεις ο αποικισμός του *K. pneumoniae* στο έντερο προηγείται των λοιμώξεων. Συνεπώς, το *K. pneumoniae* θα μπορούσε να αποτελέσει πιθανή πηγή για την ανάπτυξη λοιμώξεων στο γενικό πληθυσμό (Liu et al. 2008). Σύμφωνα με αυτό, οι Gorrie et al. διαπίστωσαν ότι οι μισοί ασθενείς με λοιμώξεις προερχόμενες από *K. pneumoniae* στη μονάδα εντατικής θεραπείας βρέθηκαν θετικοί για γαστρεντερική μεταφορά κατά την εισαγωγή, υποδεικνύοντας ότι ο αποικισμός του εντέρου αποτελεί πιθανή πηγή εισόδου για τις λοιμώξεις από *K. pneumoniae* (Liu et al. 2008).

Το πρώτο εύρημα που προκύπτει από την παρούσα μελέτη είναι η υψηλή παρουσία του *K. pneumoniae* που ανιχνεύθηκε στο κρέας. Η συχνότητα του *K. pneumoniae* που διαπιστώθηκε στη μελέτη μας είναι υψηλότερη από εκείνη που αναφέρεται σε άλλες μελέτες (Barus et al. 2013, Guo et al. 2016). Οι Guo et al. αξιολόγησαν τη συχνότητα εμφάνισης του *K. pneumoniae* σε δείγματα τροφίμων στην Ανατολική Κίνα και ανέφεραν μια μόλυνση σε ποσοστό 9,9% (99 θετικά από τα 998 δείγματα που εξετάστηκαν) (Guo et al. 2016). Σε μια άλλη μελέτη, οι

(Hartantyo et al. 2020) αξιολόγησαν τη συχνότητα της τροφιμογενώς μεταδιδόμενης *K. pneumoniae* στη Σιγκαπούρη, ελέγχοντας 698 δείγματα ωμών και έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων λιανικής πώλησης. Οι συγγραφείς ανίχνευσαν το *K. pneumoniae* στο 21% (147 από τα 698) των δειγμάτων που εξετάστηκαν, το οποίο ποσοστό είναι επίσης μικρότερο από το δικό μας ποσοστό μόλυνσης. Τα διαφορετικά ποσοστά μόλυνσης μεταξύ της μελέτης μας και των άλλων μελετών θα μπορούσαν να αποδοθούν στην ετερογένεια των πηγών τροφίμων, καθώς αναλύθηκαν πολλές διαφορετικές κατηγορίες δειγμάτων τροφίμων, όπως λαχανικά, θαλασσινά, κρέας, ωμά και έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα σε διαφορετικά σημεία του κόσμου.

Η ακριβής αιτία για την υψηλή συχνότητα του *K. pneumoniae* που παρατηρήθηκε στη μελέτη μας δεν είναι εύκολα προσδιορίσιμη. Αυτό συμβαίνει καθώς υπάρχουν πολλά στάδια από τα οποία περνάει το κρέας πριν φτάσει στο πιάτο του καταναλωτή, στα οποία θα μπορούσαν να υπάρξουν μολύνσεις. Συνεπώς, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να διευκρινιστεί αυτό. Ωστόσο, η μεγάλη συχνότητα ανίχνευσης των παθογόνων μικροοργανισμών, και ιδίως σε δείγματα ωμών τροφίμων, χρήζει ιδιαίτερη προσοχή, καθώς μπορούν να αποτελέσουν "φορέα" για την ανάπτυξη ενδοσποκομειακών λοιμώξεων. Γι' αυτό και η εύρεση της πηγή μόλυνσης των δειγμάτων κρέατος αποτελεί επιτακτική ανάγκη, ώστε να επέλθει η εφαρμογή άμεσων ή έμμεσων μεθόδων προστασίας και πρόληψης.

Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά είναι ένα πολύπλευρο παγκόσμιο πρόβλημα. Για την αντιμετώπισή του χρειάζεται η συμμετοχή διαφόρων φορέων υγείας, όπως φαρμακευτικές εταιρείες, ιατροί, εταιρείες διαγνωστικών και ερευνητικά ιδρύματα (Afhami et al. 2020). Η ανθεκτικότητα στα φάρμακα οφείλεται τόσο στην εξάπλωση των μεταδοτικών πλασμιδίων που φέρουν γονίδια ιογένεσης όσο και στην επιμονή των ιογενών μικροοργανισμών, η οποία μπορεί να συμβάλλει στην απόκτηση ανθεκτικών καθοριστικών παραγόντων. Η αντοχή στις καρβαπενέμες μέσω της παραγωγής καρβαπενεμάσης αποτελεί τεράστια απειλή για τη δημόσια υγεία με καταστροφικές κοινωνικές αλλά και οικονομικές επιπτώσεις παγκοσμίως.

Τα ευρήματά μας δείχνουν ότι τα γονίδια που είναι ανθεκτικά στις καρβαπενέμες είναι κοινά μεταξύ των στελεχών *K. pneumoniae* που μεταδίδονται μέσω των τροφίμων, στην Ελλάδα. Συγκεκριμένα, διαπιστώσαμε ότι το 29,4% των απομονωμένων *K. pneumoniae* έφεραν τουλάχιστον ένα γονίδιο αντοχής στην παραγωγή καρβαπενεμάσης. Από αυτά, το BlaOXA-48 ήταν το επικρατέστερο γονίδιο που εντοπίστηκε σε ποσοστό 23,5% ακολουθούμενο από το

BlaIMP-1 5,9%. Το ποσοστό και τα χαρακτηριστικά των γονιδίων ανθεκτικότητας στην καρβαπενεμάση δεν έχουν αξιολογηθεί σε παρόμοιες μελέτες, στο εξωτερικό. Αυτό, δεν μας βοηθάει να συμπεράνουμε σε τι οφείλεται το υψηλό ποσοστό ορισμένων γονιδίων αντίστασης στις καρβαπενέμες σε σύγκριση με κάποια άλλα γονίδια. Τέλος, δεν μπορούμε να συγκρίνουμε τα ποσοστά μας με τα αποτελέσματα άλλων μελετών του εξωτερικού.

Στην μελέτη του Guo et al. απομονώθηκαν 99 στελέχη του *K. pneumoniae* από διάφορα δείγματα τροφίμων και αξιολογήθηκε η ανθεκτικότητά τους στα αντιβιοτικά (Guo et al. 2016). Τα δείγματα ήταν από μαγειρεμένα τρόφιμα, κατεψυγμένα και φρέσκα ακατέργαστα τρόφιμα. Οι συγγραφείς διεξήγαγαν δοκιμές αντιμικροβιακής ευαισθησίας για διάφορα αντιβιοτικά, συμπεριλαμβανομένων των καρβαπενεμών, και πραγματοποίησαν ανάλυση PCR για την ανίχνευση διαφόρων γονιδίων αντοχής. Ωστόσο, δεν αξιολόγησαν τα γονίδια αντοχής στην καρβαπενεμάση. Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της μελέτης μας, παρόλο που πολλά από τα απομονωμένα στελέχη παρουσίασαν αντοχή σε άλλα αντιβιοτικά όπως η αμπικιλίνη, κανένα από αυτά δεν επέδειξε αντοχή στις καρβαπενέμες με βάση τη δοκιμή αντιμικροβιακής ευαισθησίας. Οι συγγραφείς ανέφεραν ότι η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά ήταν σημαντικά υψηλότερη σε απομονώσεις από δείγματα ωμού κρέατος και, επομένως, το υψηλότερο ποσοστό ανθεκτικότητας στις καρβαπενέμες στη μελέτη μας μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι όλα τα δείγματά μας ήταν προϊόντα ωμού κρέατος.

Σε άλλη μελέτη, οι Hartantyo et al. εντόπισαν 147 απομονώσεις του *K. pneumoniae* σε ωμά και έτοιμα προς κατανάλωση δείγματα τροφίμων λιανικής πώλησης και αξιολόγησαν την ευαισθησία τους σε αντιβιοτικά σε 97 από αυτά (Hartantyo et al. 2020). Παρόλο που η δοκιμασία ευαισθησίας στα αντιβιοτικά δεν πραγματοποιήθηκε για τις καρβαπενέμες, τα δείγματα ελέγχθηκαν για το γονίδιο Bla-KPC με ανάλυση PCR. Ωστόσο, οι συγγραφείς δεν ανέφεραν το ποσοστό των θετικών Bla-KPC απομονώσεων, στη μελέτη τους. Παρόμοια με τα ευρήματα των Guo et al, οι συγγραφείς της μελέτης δεν ανέφεραν επίσης κανένα θετικό απομονωμένο άτομο για το γονίδιο Bla-KPC που σχετίζεται με αντοχή στις καρβαπενέμες.

Ένα άλλο σημαντικό εύρημα της μελέτης μας είναι το υψηλό ποσοστό θετικών παθογόνων για το ορισμένα γονίδια ιογένεσης, όπως το γονίδιο EcpA (41,2%) το γονίδιο FimH (47,1%) και το MrkA (17,6%), γεγονός που υποδηλώνει υψηλό δυναμικό σχηματισμού βιοφίλμ. Τα γονίδια FimH και MrkA κωδικοποιούν φιμπρίες τύπου 1 και 3, ενώ το γονίδιο EcpA

κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη pilus η οποία είναι πιο κοινή μεταξύ των ειδών *E. coli*. Αυτές οι δομές φιμπριών αποτελούν έναν από τους κύριους μηχανισμούς προσκόλλησης στα κύτταρα του ξενιστή. Η πολυ-φιμπριακή φύση των απομονωμένων παθογόνων στη μελέτη μας υπογραμμίζει το υψηλό δυναμικό ιογένεσης των στελεχών, το οποίο σε συνδυασμό με την υψηλή συχνότητα των γονιδίων ανθεκτικότητας, δυσχεραίνει την εξάλειψη τους.

Η μελέτη μας κρίνει ορισμένους περιορισμούς που πρέπει να αντιμετωπιστούν. Αρχικά, ο αριθμός των προς ανάλυση δειγμάτων είναι πολύ μικρός για την εξαγωγή στατιστικών συμπερασμάτων σχετικά με την αντιμικροβιακή αντοχή του *K. pneumoniae* στα προϊόντα κρέατος και, ως εκ τούτου, απαιτούνται μελέτες με μεγαλύτερο εύρος δειγμάτων για την επικύρωση των αποτελεσμάτων. Επιπλέον, η αξιολόγηση του γονότυπου ήταν περιορισμένη, περιλαμβάνοντας μόνο την τεχνική της PCR για συγκεκριμένα γονίδια, ενώ πιο προηγμένες μοριακές τεχνικές, όπως η μέθοδος αλληλούχισης ολόκληρου του γονιδιώματος ή η τυποποίηση αλληλουχίας πολλαπλών εστιών (MLST) για την αποκρυπτογράφηση της κλωνικής σχέσης μεταξύ των απομονώσεων των τροφίμων με άλλες δημοσιευμένες απομονώσεις δεν πραγματοποιήθηκαν. Επιπροσθέτως, δεν έγινε συσχέτιση μεταξύ του θετικού αποτελέσματος για την παραγωγή καρβαπενεμάσης με βάση το NG-Test Carba-5 και του θετικού αποτελέσματος για γονίδια αντοχής στην καρβαπενεμάση με την τεχνική ανάλυσης PCR, οπότε δεν είναι εφικτή η αξιολόγηση της συμφωνίας μεταξύ των δύο μεθόδων. Τέλος, ο φαινότυπος αξιολογήθηκε μόνο με τον ανοσολογικό έλεγχο για την ανίχνευση και τη διαφοροποίηση των κοινών ενζύμων καρβαπενεμάσης, ενώ ο περαιτέρω φαινοτυπικός χαρακτηρισμός συμπεριλαμβανομένου του ελέγχου αντιμικροβιακής ευαισθησίας και της δοκιμασίας σύζευξης θα ήταν πολύτιμος.

12. Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη βρέθηκε υψηλή συχνότητα των γονιδίων του *Klebsiella pneumoniae* σε ένα μικρό εύρος δειγμάτων, που συλλέχθηκαν από ελληνικά προϊόντα κρεάτων. Αυτό υποδηλώνει, την έλλειψη υγιεινής στη διαδικασία παραγωγής αλλά και πώλησης κρεατοσκευασμάτων. Επίσης, στα περισσότερα από τα απομονωμένα στελέχη βρέθηκαν γονίδια αντίστασης στις καρβαπενέμες αλλά και λοιμογόνα γονίδια, υποδεικνύοντας υψηλή παθογονικότητα και κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία. Παρατηρήθηκε επίσης, ότι ο τύπος κρέατος με το υψηλότερο ποσοστό γονιδίων ήταν το βοδινό ενώ με το χαμηλότερο ήταν το αρνίσιο. Όμως, με την παρατήρηση αυτή δεν πηγάζει το συμπέρασμα για τον τύπο κρέατος που θεωρείται ασφαλέστερο για κατανάλωση καθώς το συμπέρασμα αυτό δεν μπορεί να βασιστεί αποκλειστικά στην παρούσα εργασία αλλά εξαρτάται από πολλούς παράγοντες και χρειάζεται περισσότερη έρευνα.

Ενδιαφέρον αποτελεί το χαρακτηριστικό της πολυανθεκτικότητας του βακτηρίου. Η πολυανθεκτικότητα αυτή δυσχεραίνει την θεραπεία και αντιμετώπιση των λοιμώξεων που προκαλούνται από το *K. pneumoniae*. Το βακτήριο *K. pneumoniae* στα τρόφιμα προσβάλλει παγκόσμια τη δημόσια υγεία. Με άμεσο τρόπο, εξαιτίας της παθογονικότητάς της αλλά και έμμεσα με μηχανισμούς που της επιτρέπουν να προσλαμβάνει πλασμίδια αντοχής από το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται, να επιβιώνει για μεγάλες περιόδους με αυτά και να τα μεταφέρει τόσο στη μικροχλωρίδα των τροφίμων και του ανθρώπινου εντέρου όσο και σε άλλα αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Θα μπορούσε να χαρακτηριστεί έτσι, ως δεξαμενή γονιδίων αντοχής σε αντιβιοτικά. Συνεπώς, η μελέτη αυτής της μεταφοράς γονιδίων αντοχής μπορεί να αποτελεί τη θεμέλια βάση για την μετρίαση της εξάπλωσης της μικροβιακής αντοχής αλλά και της μεγάλης ανθεκτικότητας στα διάφορα αντιβιοτικά.

Δεδομένης της ανθεκτικότητας και της ταχείας εξέλιξης του *K. pneumoniae* σε αντιβιοτικά χρειάζεται να εφαρμοστεί έλεγχος για την άσκοπη χρήση αλλά και την χρήση αλόγιστης ποσότητας αντιβιοτικών που χορηγείται σε ζώα βιομηχανικής εκτροφής. Ακόμη, χρίζεται η ανακάλυψη νέας μεθόδου θεραπείας κατά των λοιμώξεων που προκαλεί αυτός ο μικροοργανισμός η οποία να μην περιλαμβάνει την χρήση αντιβιοτικών. Τα δεδομένα που αναφέρονται στην παρούσα μελέτη θα βοηθήσουν στην κατανόηση του κινδύνου του *K. pneumoniae* στην

υγιεινή και ασφάλεια των τροφίμων, στο λιανικό εμπόριο και εκτενέστερα στην δημόσια υγεία στην Ελλάδα. Ωστόσο, απαιτείται εκτενέστερη και περαιτέρω έρευνα προκειμένου να χαρακτηριστεί η συχνότητα και η ανθεκτικότητα των στελεχών του *K. pneumoniae* που μεταδίδονται μέσω των τροφίμων, καθώς το βακτήριο ευθύνεται για την εξάπλωση των νοσοκομειακών λοιμώξεων.

Βιβλιογραφία

- Afhami, Shirin, Mohammad Ali Borumand, Negin Esmailpour Bazzaz, Hiva Saffar, Azar Hadadi, Mahdi Jafary Nezhad, and Nahid Mirzaei Tirabadi. 2020. “Antimicrobial Resistance Pattern of *Acinetobacter* ; a Multicenter Study, Comparing European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); Evaluation of Susceptibility Testing Methods for Polymyxin.” *Immunopathologia Persa* 7(1):e04–e04. doi: 10.34172/ipp.2021.04.
- Anon. 1974. “Arne Tiselius, 1902 - 1971.” *Biographical Memoirs of Fellows of the Royal Society* 20:401–28. doi: 10.1098/rsbm.1974.0018.
- Anon. n.d.-a. “Binding of Mannose-Binding Protein to Klebsiella O3 Lipopolysaccharide Possessing the Mannose Homopolysaccharide as the O-Specific Polysaccharide and Its Relation to Complement Activation | Infection and Immunity.” Retrieved November 21, 2022 (<https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/iai.63.7.2537-2540.1995>).
- Anon. n.d.-b. “Detection of Klebsiella Pneumoniae in Raw Vegetables Using Most Probable Number-Polymerase Chain Reaction (MPN-PCR) - ProQuest.” Retrieved January 5, 2023 (<https://www.proquest.com/open-view/bb2db06a0cd1d7c8d6a62192588ed109/1?pq-origsite=gscholar&cbl=816390>).
- Anon. n.d.-c. “Klebsiella Spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors.” Retrieved September 5, 2022 (<https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/CMR.11.4.589>).
- Aryal, Sagar. 2015. “Biochemical Test and Identification of Klebsiella Pneumoniae.” *Microbiology Info.Com*. Retrieved November 21, 2022 (<https://microbiologyinfo.com/biochemical-test-and-identification-of-klebsiella-pneumoniae/>).
- Barus, Tati, Ivan Hanjaya, Joanita Sadeli, Bibiana Widiyati Lay, Antonius Suwanto, and Adi Yulandi. 2013. “Genetic Diversity of Klebsiella Spp. Isolated from Tempe Based on Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR).” *HAYATI Journal of Biosciences* 20(4):171–76. doi: 10.4308/hjb.20.4.171.
- Brenner, Don J., and J. J. Farmer. 2015. “*Enterobacteriaceae*.” Pp. 1–24 in *Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, edited by W. B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. DeVos, B. Hedlund, and S. Dedysh. Wiley.
- Bullen, J. J., Henry J. Rogers, and E. Griffiths. 1978. “Role of Iron in Bacterial Infection.” Pp. 1–35 in *Current Topics in Microbiology and Immunology: Volume 80, Current Topics in Microbiology and Immunology*, edited by W. Arber, W. Henle, P. H. Hofschneider, J. H. Humphrey, J. Klein, P. Koldovský, H. Koprowski, O. Maaløe, F. Melchers, R. Rott, H. G. Schweiger, L. Syruček, and P. K. Vogt. Berlin, Heidelberg: Springer.

- Cai, Shanshan, Sanjay Batra, Li Shen, Nobuko Wakamatsu, and Samithamby Jeyaseelan. 2009. "Both TRIF- and MyD88-Dependent Signaling Contribute to Host Defense against Pulmonary *Klebsiella* Infection." *The Journal of Immunology* 183(10):6629–38. doi: 10.4049/jimmunol.0901033.
- Calbo, E., N. Freixas, M. Xercavins, M. Riera, C. Nicolas, O. Monistrol, M. d. m. Sole, M. R. Sala, J. Vila, and J. Garau. 2011. "Foodborne Nosocomial Outbreak of SHV1 and CTX-M-15-Producing *Klebsiella Pneumoniae*: Epidemiology and Control." *Clinical Infectious Diseases* 52(6):743–49. doi: 10.1093/cid/ciq238.
- Calhau, Vera, Luísa Boaventura, Graça Ribeiro, Nuno Mendonça, and Gabriela J. da Silva. 2014. "Molecular Characterization of *Klebsiella Pneumoniae* Isolated from Renal Transplanted Patients: Virulence Markers, Extended-Spectrum β -Lactamases, and Genetic Relatedness." *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 79(3):393–95. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.08.031.
- Cao, Xiaoli, Xuejing Xu, Zhifeng Zhang, Han Shen, Junhao Chen, and Kui Zhang. 2014. "Molecular Characterization of Clinical Multidrug-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Isolates." *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 13(1):16. doi: 10.1186/1476-0711-13-16.
- Carrère, Amélie, Laurent Poirel, Mesut Yilmaz, Özay Arikian Akan, Cilli Feriha, Gaëlle Cuzon, Ghassan Matar, Patrick Honderlick, and Patrice Nordmann. 2010. "Spread of OXA-48-Encoding Plasmid in Turkey and Beyond." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(3):1369–73. doi: 10.1128/AAC.01312-09.
- Clegg, S., and G. F. Gerlach. 1987. "Enterobacterial Fimbriae." *Journal of Bacteriology* 169(3):934–38. doi: 10.1128/jb.169.3.934-938.1987.
- Clements, Abigail, Dedreia Tull, Adam W. Jenney, Jacinta L. Farn, Sang-Hyun Kim, Russell E. Bishop, Joseph B. McPhee, Robert E. W. Hancock, Elizabeth L. Hartland, Martin J. Pearse, Odilia L. C. Wijburg, David C. Jackson, Malcolm J. McConville, and Richard A. Strugnell. 2007. "Secondary Acylation of *Klebsiella Pneumoniae* Lipopolysaccharide Contributes to Sensitivity to Antibacterial Peptides *." *Journal of Biological Chemistry* 282(21):15569–77. doi: 10.1074/jbc.M701454200.
- Davis, Gregg S., and Lance B. Price. 2016. "Recent Research Examining Links Among *Klebsiella Pneumoniae* from Food, Food Animals, and Human Extraintestinal Infections." *Current Environmental Health Reports* 3(2):128–35. doi: 10.1007/s40572-016-0089-9.
- Davis, Gregg S., Kara Waits, Lora Nordstrom, Brett Weaver, Maliha Aziz, Lori Gauld, Heidi Grande, Rick Bigler, Joseph Horwinski, Stephen Porter, Marc Stegger, James R. Johnson, Cindy M. Liu, and Lance B. Price. 2015. "Intermingled *Klebsiella Pneumoniae* Populations Between Retail Meats and Human Urinary Tract Infections." *Clinical Infectious Diseases* 61(6):892–99. doi: 10.1093/cid/civ428.

- Duckworth, M., and W. Yaphe. 1971. "The Structure of Agar: Part I. Fractionation of a Complex Mixture of Polysaccharides." *Carbohydrate Research* 16(1):189–97. doi: 10.1016/S0008-6215(00)86113-3.
- Falomir, María Pilar, Hortensia Rico, and Daniel Gozalbo. 2013. "Enterobacter and Klebsiella Species Isolated from Fresh Vegetables Marketed in Valencia (Spain) and Their Clinically Relevant Resistances to Chemotherapeutic Agents." *Foodborne Pathogens and Disease* 10(12):1002–7. doi: 10.1089/fpd.2013.1552.
- Follador, Rainer, Eva Heinz, Kelly L. Wyres, Matthew J. Ellington, Michael Kowarik, Kathryn E. Holt, and Nicholas R. Thomson. 2016. "The Diversity of Klebsiella Pneumoniae Surface Polysaccharides." *Microbial Genomics* 2(8). doi: 10.1099/mgen.0.000073.
- Friedlaender, C. 1882. "Ueber die Schizomyceten bei der acuten fibrösen Pneumonie." *Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medizin* 87(2):319–24. doi: 10.1007/BF01880516.
- Galani, Irene, Ilias Karaiskos, Irene Karantani, Vassiliki Papoutsaki, Sofia Maraki, Vassiliki Papaioannou, Polyzo Kazila, Helen Tsorlini, Nikoletta Charalampaki, Marina Toutouza, Helen Vagiakou, Konstantinos Pappas, Anna Kyratsa, Konstantina Kontopoulou, Olga Legga, Efthymia Petinaki, Helen Papadogeorgaki, Efrosini Chinou, Maria Souli, Helen Giamarellou, and On Behalf of the Study Collaborators. 2018. "Epidemiology and Resistance Phenotypes of Carbapenemase-Producing Klebsiella Pneumoniae in Greece, 2014 to 2016." *Eurosurveillance* 23(31):1700775. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.30.1700775.
- Garnett, James A., Verónica I. Martínez-Santos, Zeus Saldaña, Tillmann Pape, William Hawthorne, Jennifer Chan, Peter J. Simpson, Ernesto Cota, José L. Puente, Jorge A. Girón, and Steve Matthews. 2012. "Structural Insights into the Biogenesis and Biofilm Formation by the Escherichia Coli Common Pilus." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(10):3950–55. doi: 10.1073/pnas.1106733109.
- Ghenghesh, Khalifa Sifaw, Khalifa Belhaj, Widad B. El-Amin, Saleha E. El-Nefathi, and Ali Zalmum. 2005. "Microbiological Quality of Fruit Juices Sold in Tripoli–Libya." *Food Control* 16(10):855–58. doi: 10.1016/j.foodcont.2004.06.028.
- Giakkoupi, P., H. Maltezou, M. Polemis, O. Pappa, G. Saroglou, A. Vatopoulos, and Collective the Greek System for the Surveillan. 2009. "KPC-2-Producing Klebsiella Pneumoniae Infections in Greek Hospitals Are Mainly Due to a Hyperepidemic Clone." *Eurosurveillance* 14(21). doi: 10.2807/ese.14.21.19218-en.
- Gundogan, Neslihan, Sumru Citak, and Emel Yalcin. 2011. "Virulence Properties of Extended Spectrum β -Lactamase–Producing Klebsiella Species in Meat Samples." *Journal of Food Protection* 74(4):559–64. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-10-315.
- Guo, Yumei, Haijian Zhou, Liyun Qin, Zhizhao Pang, Tian Qin, Hongyu Ren, Zhuo Pan, and Jikun Zhou. 2016. "Frequency, Antimicrobial Resistance and Genetic Diversity of

Klebsiella Pneumoniae in Food Samples” edited by M. Galdiero. *PLOS ONE* 11(4):e0153561. doi: 10.1371/journal.pone.0153561.

- Hansen, Dennis S., Francesca Mestre, Sebastián Albertí, Santiago Hernández-Allés, Dolores Álvarez, Antonio Doménech-Sánchez, José Gil, Susana Merino, Juan M. Tomás, and Vicente J. Benedí. 1999. “*Klebsiella Pneumoniae* Lipopolysaccharide O Typing: Revision of Prototype Strains and O-Group Distribution among Clinical Isolates from Different Sources and Countries.” *Journal of Clinical Microbiology* 37(1):56–62. doi: 10.1128/JCM.37.1.56-62.1999.
- Hartantyo, Sri Harinda Pahm, Man Ling Chau, Tse Hsien Koh, Min Yap, Tseng Yi, Delphine Yan Hong Cao, Ramona Alikiteaga Gutiérrez, and Lee Ching Ng. 2020. “Food-borne *Klebsiella Pneumoniae*: Virulence Potential, Antibiotic Resistance, and Risks to Food Safety.” *Journal of Food Protection* 83(7):1096–1103. doi: 10.4315/JFP-19-520.
- Haruta, Shin, Hitomi Yamaguchi, Elise Tie Yamamoto, Yoshiro Eriguchi, Michiyoshi Nukaga, Koji O’Hara, and Tetsuo Sawai. 2000. “Functional Analysis of the Active Site of a Metallo- β -Lactamase Proliferating in Japan.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44(9):2304–9. doi: 10.1128/AAC.44.9.2304-2309.2000.
- Haryani, Y., A. S. Noorzaleha, A. B. Fatimah, B. A. Noorjahan, G. B. Patrick, A. T. Shamsinar, R. A. S. Laila, and R. Son. 2007. “Incidence of *Klebsiella Pneumoniae* in Street Foods Sold in Malaysia and Their Characterization by Antibiotic Resistance, Plasmid Profiling, and RAPD–PCR Analysis.” *Food Control* 18(7):847–53. doi: 10.1016/j.foodcont.2006.04.009.
- Highsmith, Anita K., and William R. Jarvis. 1985. “*Klebsiella Pneumoniae*: Selected Virulence Factors That Contribute to Pathogenicity.” *Infection Control & Hospital Epidemiology* 6(2):75–77. doi: 10.1017/S0195941700062640.
- Hirche, Tim O., Joseph P. Gaut, Jay W. Heinecke, and Azzaq Belaaouaj. 2005. “Myeloperoxidase Plays Critical Roles in Killing *Klebsiella Pneumoniae* and Inactivating Neutrophil Elastase: Effects on Host Defense.” *The Journal of Immunology* 174(3):1557–65. doi: 10.4049/jimmunol.174.3.1557.
- Hou, Xiang-hua, Xiu-yu Song, Xiao-bo Ma, Shi-yang Zhang, and Jia-qin Zhang. 2015. “Molecular Characterization of Multidrug-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Isolates.” *Brazilian Journal of Microbiology* 46:759–68. doi: 10.1590/S1517-838246320140138.
- Innis, Michael A., David H. Gelfand, John J. Sninsky, and Thomas J. White. 2012. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press.
- Iroha, I. R, Ugbo E. C., Ilang, D. C, Oji, A. E., and Ayogu, T. E. 2011. “Bacteria Contamination of Raw Meat Sold in Abakaliki, Ebonyi State Nigeria.” *Journal of Public Health and Epidemiology Vol. 3(2)* 49–53.
- Khodadadian, Rohollah, Hossein Ali Rahdar, Ali Javadi, Mahmood Safari, and Ahmad Khorshidi. 2018. “Detection of VIM-1 and IMP-1 Genes in *Klebsiella Pneumoniae*

- and Relationship with Biofilm Formation.” *Microbial Pathogenesis* 115:25–30. doi: 10.1016/j.micpath.2017.12.036.
- Kline, Kimberly A., Karen W. Dodson, Michael G. Caparon, and Scott J. Hultgren. 2010. “A Tale of Two Pili: Assembly and Function of Pili in Bacteria.” *Trends in Microbiology* 18(5):224–32. doi: 10.1016/j.tim.2010.03.002.
- Koczura, Ryszard, and Adam YR 2003 Kaznowski. n.d. “The Yersinia High-Pathogenicity Island and Iron-Uptake Systems in Clinical Isolates of Escherichia Coli.” *Journal of Medical Microbiology* 52(8):637–42. doi: 10.1099/jmm.0.05219-0.
- Lee, Pei Yun, John Costumbrado, Chih-Yuan Hsu, and Yong Hoon Kim. 2012. “Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments.” *Journal of Visualized Experiments* (62):3923. doi: 10.3791/3923.
- Li, Bei, Yuling Zhao, Changting Liu, Zhenhong Chen, and Dongsheng Zhou. 2014. “Molecular Pathogenesis of *Klebsiella Pneumoniae*.” *Future Microbiology* 9(9):1071–81. doi: 10.2217/fmb.14.48.
- Lin, Yi-Tsung, Yuan-Yu Jeng, Te-Li Chen, and Chang-Phone Fung. 2010. “Bacteremic Community-Acquired Pneumonia Due to *Klebsiella Pneumoniae*: Clinical and Microbiological Characteristics in Taiwan, 2001-2008.” *BMC Infectious Diseases* 10(1):307. doi: 10.1186/1471-2334-10-307.
- Liu, Yin, Chao Liu, Wenjie Zheng, Xia Zhang, Jia Yu, Qili Gao, Yanmei Hou, and Xitai Huang. 2008. “PCR Detection of *Klebsiella Pneumoniae* in Infant Formula Based on 16S–23S Internal Transcribed Spacer.” *International Journal of Food Microbiology* 125(3):230–35. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.005.
- Mączyńska, Beata, Justyna Paleczny, Monika Oleksy-Wawrzyniak, Irena Choroszy-Król, and Marzenna Bartoszewicz. 2021. “In Vitro Susceptibility of Multi-Drug Resistant *Klebsiellapneumoniae* Strains Causing Nosocomial Infections to Fosfomycin. A Comparison of Determination Methods.” *Pathogens* 10(5):512. doi: 10.3390/pathogens10050512.
- Magill, Shelley S., Jonathan R. Edwards, Wendy Bamberg, Zintars G. Beldavs, Ghinwa Dumyati, Marion A. Kainer, Ruth Lynfield, Meghan Maloney, Laura McAllister-Hollod, Joelle Nadle, Susan M. Ray, Deborah L. Thompson, Lucy E. Wilson, and Scott K. Fridkin. 2014. “Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care–Associated Infections.” *New England Journal of Medicine* 370(13):1198–1208. doi: 10.1056/NEJMoA1306801.
- Murphy, Caitlin N., Martin S. Mortensen, Karen A. Krogfelt, and Steven Clegg. 2013. “Role of *Klebsiella Pneumoniae* Type 1 and Type 3 Fimbriae in Colonizing Silicone Tubes Implanted into the Bladders of Mice as a Model of Catheter-Associated Urinary Tract Infections” edited by S. M. Payne. *Infection and Immunity* 81(8):3009–17. doi: 10.1128/IAI.00348-13.

- Nakano, Akiyo, Ryuichi Nakano, Yuki Suzuki, Kyoichi Saito, Kei Kasahara, Shiro Endo, and Hisakazu Yano. 2018. "Rapid Identification of *Bla*_{IMP-1} and *Bla*_{IMP-6} by Multiplex Amplification Refractory Mutation System PCR." *Annals of Laboratory Medicine* 38(4):378–80. doi: 10.3343/alm.2018.38.4.378.
- Oplustil, Carmen Paz, Rogério Nunes, and Caio Mendes. 2001. "Multicenter Evaluation of Resistance Patterns of *Klebsiella Pneumoniae*, *Escherichia Coli*, *Salmonella Spp* and *Shigella Spp* Isolated from Clinical Specimens in Brazil: RESISTNET Surveillance Program." *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 5(1):8–12. doi: 10.1590/S1413-86702001000100002.
- Paczosa, Michelle K., and Joan Meccas. 2016. "Klebsiella Pneumoniae: Going on the Offense with a Strong Defense." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 80(3):629–61. doi: 10.1128/MMBR.00078-15.
- Pan, Yi-Jiun, Tzu-Lung Lin, Chun-Tang Chen, Yi-Yin Chen, Pei-Fang Hsieh, Chun-Ru Hsu, Meng-Chuan Wu, and Jin-Town Wang. 2015. "Genetic Analysis of Capsular Polysaccharide Synthesis Gene Clusters in 79 Capsular Types of *Klebsiella Spp*." *Scientific Reports* 5(1):15573. doi: 10.1038/srep15573.
- Podschun, R., and U. Ullmann. 1992. "Isolation Of *Klebsiella Terrigena* from Clinical Specimens." *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 11(4):349–52. doi: 10.1007/BF01962076.
- Poirel, L., A. Potron, and P. Nordmann. 2012. "OXA-48-like Carbapenemases: The Phantom Menace." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67(7):1597–1606. doi: 10.1093/jac/dks121.
- Pollack, J. R., and J. B. Neilands. 1970. "Enterobactin, an Iron Transport Compound from *Salmonella Typhimurium*." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 38(5):989–92. doi: 10.1016/0006-291X(70)90819-3.
- Pongsilp, Neelawan, and Pongrawee Nimnoi. 2018. "Diversity and Antibiotic Resistance Patterns of Enterobacteria Isolated from Seafood in Thailand." *CyTA - Journal of Food* 16(1):793–800. doi: 10.1080/19476337.2018.1479453.
- Pournaras, S. 2003. "Hospital Outbreak of Multiple Clones of *Pseudomonas Aeruginosa* Carrying the Unrelated Metallo-Beta-Lactamase Gene Variants *Bla*VIM-2 and *Bla*VIM-4." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51(6):1409–14. doi: 10.1093/jac/dkg239.
- Publishers, Bentham Science. 1999. *Current Pharmaceutical Design*. Bentham Science Publishers.
- Rahman, Md Tahminur, Muhammed Salah Uddin, Razia Sultana, Arumina Moue, and Muntahina Setu. 2013. "Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review." *Anwer Khan Modern Medical College Journal* 4(1):30–36. doi: 10.3329/akmmcj.v4i1.13682.

- Reeves, Peter R., Matthew Hobbs, Miguel A. Valvano, Mikael Skurnik, Chris Whitfield, David Coplin, Nobuo Kido, John Klena, Duncan Maskell, Christian R. H. Raetz, and Paul D. Rick. 1996. "Bacterial Polysaccharide Synthesis and Gene Nomenclature." *Trends in Microbiology* 4(12):495–503. doi: 10.1016/S0966-842X(97)82912-5.
- Rendón, María A., Zeus Saldaña, Ayşen L. Erdem, Valério Monteiro-Neto, Alejandra Vázquez, James B. Kaper, José L. Puente, and Jorge A. Girón. 2007. "Commensal and Pathogenic *Escherichia Coli* Use a Common Pilus Adherence Factor for Epithelial Cell Colonization." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(25):10637–42. doi: 10.1073/pnas.0704104104.
- Riccio, Maria Letizia, Nicola Franceschini, Letizia Boschi, Berardo Caravelli, Giuseppe Cornaglia, Roberta Fontana, Gianfranco Amicosante, and Gian Maria Rossolini. 2000. "Characterization of the Metallo- β -Lactamase Determinant of *Acinetobacter Baumannii* AC-54/97 Reveals the Existence of *Bla*_{IMP} Allelic Variants Carried by Gene Cassettes of Different Phylogeny." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44(5):1229–35. doi: 10.1128/AAC.44.5.1229-1235.2000.
- Rietschel, Ernst Th., and Jean-Marc Cavaillon. 2002. "Endotoxin and Anti-Endotoxin The Contribution of the Schools of Koch and Pasteur: Life, Milestone-Experiments and Concepts of Richard Pfeiffer (Berlin) and Alexandre Besredka (Paris)." *Journal of Endotoxin Research* 8(1):3–16. doi: 10.1177/09680519020080010101.
- Rosen, David A., Jerome S. Pinkner, Jennifer N. Walker, Jennifer Stine Elam, Jennifer M. Jones, and Scott J. Hultgren. 2008. "Molecular Variations in *Klebsiella Pneumoniae* and *Escherichia Coli* FimH Affect Function and Pathogenesis in the Urinary Tract." *Infection and Immunity* 76(7):3346–56. doi: 10.1128/IAI.00340-08.
- Sabota, Julia M., William L. Hoppes, J. Richard Ziegler, Herbert DuPont, John Mathewson, and Gregory W. Rutecki. 1998. "A New Variant of Food Poisoning: Enteroinvasive *Klebsiella Pneumoniae* and *Escherichia Coli* Sepsis from a Contaminated Hamburger." *The American Journal of Gastroenterology* 93(1):118–19. doi: 10.1016/S0002-9270(97)00036-1.
- Schwaber, Mitchell J., and Yehuda Carmeli. 2008. "Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: A Potential Threat." *JAMA* 300(24):2911–13. doi: 10.1001/jama.2008.896.
- Shen, Lifei, Jiaxue Zhang, Jian Xue, Ling Du, Lingyue Yuan, Hao Nie, Sue Dai, Qian Yu, and Yingli Li. 2022. "Regulation of ECP Fimbriae-related Genes by the Transcriptional Regulator RcsAB in *Klebsiella Pneumoniae* NTUH-K2044." *Journal of Basic Microbiology* 62(5):593–603. doi: 10.1002/jobm.202100595.
- Stellwagen, Nancy C. 2009. "Electrophoresis of DNA in Agarose Gels, Polyacrylamide Gels and in Free Solution." *ELECTROPHORESIS* 30(S1):S188–95. doi: 10.1002/elps.200900052.
- Stürchler, Dieter. 2016. "Klebsiella and Klebs the Person behind the Name." *Travel Medicine and Infectious Disease* 14(6):654. doi: 10.1016/j.tmaid.2016.11.003.

- Sukhoverkhov, S. V., I. A. Kadnikova, and A. V. Podkorytova. 2000. "Production of Agar and Agarose from the Red Alga *Ahnfeltia Tobuchiensis*." *Applied Biochemistry and Microbiology* 36(2):201–3. doi: 10.1007/BF02737922.
- Theocharidi, Nikoletta Argyro, Iliana Balta, Dimitra Houhoula, Andreas G. Tsantes, George P. Lalliotis, Angeliki C. Polydera, Haralambos Stamatis, and Panagiotis Halvatsiotis. 2022. "High Prevalence of *Klebsiella Pneumoniae* in Greek Meat Products: Detection of Virulence and Antimicrobial Resistance Genes by Molecular Techniques." *Foods* 11(5):708. doi: 10.3390/foods11050708.
- Thomas, Stephen R., and Joseph S. Elkinton. 2004. "Pathogenicity and Virulence." *Journal of Invertebrate Pathology* 85(3):146–51. doi: 10.1016/j.jip.2004.01.006.
- Turgeon, Ryan T., and Michael T. Bowser. 2009. "Micro Free-Flow Electrophoresis: Theory and Applications." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 394(1):187–98. doi: 10.1007/s00216-009-2656-5.
- UKHSA. 2022. "UK SMI B 60: Detection of Bacteria with Carbapenem-Hydrolysing β -Lactamases (Carbapenemases)."
- Versalovic, James. 2011. *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology Press.
- Volland, Hervé, Delphine Girlich, Marine Laguide, Camille Gonzalez, Virginie Paris, Maxime Laroche, Saoussen Oueslati, Laurent Dortet, Stéphanie Simon, and Thierry Naas. 2019. "Improvement of the Immunochromatographic NG-Test Carba 5 Assay for the Detection of IMP Variants Previously Undetected." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 64(1):e01940-19. doi: 10.1128/AAC.01940-19.
- Voytas, Daniel. 2001. "Agarose Gel Electrophoresis." P. mb0205as51 in *Current Protocols in Molecular Biology*, edited by F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Westermeier, Reiner. 2016. *Electrophoresis in Practice: A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations*. John Wiley & Sons.
- Won, S. Y., L. S. Munoz-Price, K. Lolans, B. Hota, R. A. Weinstein, M. K. Hayden, and for the Centers for Disease Control and Prevention Epicenter Program. 2011. "Emergence and Rapid Regional Spread of *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae." *Clinical Infectious Diseases* 53(6):532–40. doi: 10.1093/cid/cir482.
- World Health Organization. 2015. *Global Action Plan on Antimicrobial Resistance: Institutional Repository for Information Sharing*. World Health Organization.
- Wu, H., B. G. Liu, J. H. Liu, Y. S. Pan, L. Yuan, and G. Z. Hu. 2012. "Phenotypic and Molecular Characterization of CTX-M-14 Extended-Spectrum β -Lactamase and Plasmid-Mediated ACT-like AmpC β -Lactamase Produced by *Klebsiella Pneumoniae* Isolates

from Chickens in Henan Province, China.” *Genetics and Molecular Research* 11(3):3357–64. doi: 10.4238/2012.September.24.1.

XRISTAKIS B., GEORGIOS, and NIKOLAOS LEGAKIS I. 2002. *ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ & ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ*. ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ Α.Ε.

Δημητρακόπουλος, Γεώργιος Ο. 1987. *ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΑ*. Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδη.

ΕΦΕΤ. 2014. “Εθνικά Προγράμματα Επισήμου Ελέγχου Ασφάλειας & Ποιότητας Τροφίμων Έτους 2013/Εργαστηριακοί Έλεγχοι.”

Θεοχαρίδη, Νικολέττα-Αργυρώ, and Ηλιάνα Μπαλά. 2022. “Ανίχνευση-ταυτοποίηση γονιδίων αντοχής *Klebsiella pneumoniae* σε τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης με μεθόδους μοριακής βιολογίας.” doi: 10.26265/polynoe-1670.

Κοντοπούλου, Κωνσταντίνα Ε. 2019. “Κλινική σημασία του αποικισμού του εντέρου με στελέχη *Klebsiella pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάσες σε ασθενείς της Μονάδας Εντατικής Θεραπείας.” doi: 10.26262/HEAL.AUTH.IR.304949.

Κουρτίδου, Ευθυμία. 2021. “Αντιβιοαντοχή Σε Κλινικά Στελέχη *Klebsiella Spp.*” doi: 10.26257/heal.duth.11405.

Κουτζεκίδου-Ρούκα Π. 2016. *Μικροβιολογία-Μικροβιολογική Ανάλυση Τροφίμων*. Γιαχούδη.

Σύνδεσμοι

1. <https://athenslab.gr/diagnostikes-exetaseis/klempsiella-klebsiella-pneumoniae-moriaki-anixneusi-1033>
2. <https://www.healthyliving.gr/2017/11/15/klebsiella-pneumoniae-oxytoca-ozenae/>
3. <https://unahealth.co.uk/product/ng-biotech-carba-5/>
4. <https://dnr-is.com/products/minibis/>