ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ-ΤΟΜΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΗΑΣΤΗΡΙΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL LABORATORY SCIENCES
SCHOOL OF HEALTH AND CARE SCIENCES

Πτυχιακή Εργασία

Μελέτη παρουσίας γονιδίων αντοχής σε στελέχη *E.coli* που απομονώθηκαν από βουστάσια

Συγγραφέας

Φίλιππος Βασκούδης (ΑΜ: 15088)

Επιβλέπων καθηγητής: Απόστολος Μπελούκας

Αθήνα, Μήνας Έτος

Ευχαριστίες – Αφιερώσεις

Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την υποψήφια διδάκτορα του τμήματος Βιοϊατρικών επιστημών του τομέα ιατρικών εργαστηρίων Χρυσούλα Διολή, για την συνεχή επιστημονική καθοδήγηση και τον αμέριστο χρόνο της καθ' όλη την διάρκεια της εργασίας αυτής, καθώς και τον επιβλέποντά μου καθηγητή Μπελούκα Απόστολο για την ευκαιρία που μου έδωσε να ενταχθώ στην επιστημονική ερευνητική ομάδα του, κατά την διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας. Τέλος την εργασία αυτήν την αφιερώνω στην μαμά μου Βαρβάρα και στον μπαμπά μου Τρύφωνα καθώς και στα αδέρφια μου Κωσταντίνο και Θωμά για την αγάπη και την βοήθεια που μου προσφέρουν όλα αυτά τα χρόνια.

Ημερομηνία

Συγγραφέας

Περίληψη

Σύμφωνα με την Ενιαία Υγεία, η υγεία του ανθρώπου συνδέεται άρρηκτα με την υγεία των ζώων και του περιβάλλοντος. Τα μερικώς επεξεργασμένα επιφανειακά ύδατα των βουστασίων συχνά επιμολύνονται από πλήθος βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων των ανθεκτικών στελεχών *E.coli*, και αποτελούν πηγή μετάδοσης ανθεκτικών γονιδίων από το περιβάλλον στον άνθρωπο και αντιστρόφως. Σκοπός της διπλωματικής ήταν η μελέτη της ποικιλομορφίας της μικροβιακής ευαισθησίας σε στελέχη *E.coli* που απομονώθηκαν από βουστάσια. Τριάντα έξι στελέχη *E.coli* συλλέχθηκαν από δείγματα λύματος και νερού (ποτίστρες) από βουστάσιο της Λειβαδιάς, την περίοδο Μαρτίου-Απριλίου, 2014. Αφού απομονώθηκαν, ταυτοποιήθηκαν και φυλάχθηκαν σε κατάλληλες συνθήκες στο αρχείο βιολογικών δειγμάτων του Εργαστήριου Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, υποβλήθηκαν σε έλεγχο μικροβιακής ευαισθησίας σε 21 ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά και παρουσίας των γονιδίων αντοχής, mcr (1,2,3,4,5), blaTEM και blaOXA-48. Τέλος τυποποιήθηκαν σε φυλογενετικές ομάδες, σύμφωνα με δημοσιευμένα πρωτόκολλα. Σύμφωνα με τα επιδημιολογικά όρια (EUCAST/ECOFF) κανένα από τα στελέχη δεν χαρακτηρίστηκε ως άγριου τύπου (77,8% R, 19,4% MDR, 2,8% XDR), όλα ήταν αρνητικά για τα γονίδια *mcr* και blaOXA-48, ενώ εντοπίστηκαν τρία blaTEM θετικά (8,1 %). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της τυποποιητικής μεθόδου, η πλειοψηφία των στελεχών κατατάχθηκε στην ομάδα B1(72,2%) και ακολούθησαν οι ομάδες A και D με ποσοστό 16,7% και 11,1%, αντίστοιχα. Η ανίχνευση ανθεκτικών και πολυανθεκτικών στελεχών *E.coli* στα υπό εξέταση περιβάλλοντα κρούει το σήμα κινδύνου για τη Δημόσια Υγεία. Η παρούσα μελέτη μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με μελλοντικές για την αξιολόγηση της εξέλιξης του φαινομένου της αντιμικροβιακής αντοχής σε σύνθετα υδάτινα περιβάλλοντα.

Λέξεις Κλειδιά: Ενιαία Υγεία, Escherichia coli , μικροβιακή αντοχή , αντιβιοτικά, γονίδια αντοχής.

Abstract

One Health recognizes that the health of people is connected to the health of animals and the environment. Semi treated surface water from dairy farms are often contaminated with multiple drug resistant bacteria including *E.coli* and therefore becoming a reservoir of antimicrobial resistance genes leading to the dissemination of them to humans, livestock animals and vice versa. This thesis investigates the antimicrobial susceptibility of *E.coli* bacteria isolated from dairy farms. Thirty six in total bacterial *E.coli* isolates where collected from water samples from drinking troughs and waste water from a dairy farm located in Livadeia, Greece the period March to April in 2014. After proper isolation and identification of the *E.coli* bacteria they where kept upon the appropriate conditions in the biological samples collection of the Molecular Microbiology and Immunology Laboratory in the University of West Attica, following antimicrobial susceptibility testing in 21 known antibiotics performing the disc diffusion assay (Kirby-Bauer method). Implementing the polymerase chain reaction the isolates where examined for the presence of seven resistance genes including mcr (1,2,3,4,5), blaOXA-48 and the blaTEM genes and the phylogroup which every isolate belongs to. According to the epidemiological cut-off values (EUCAST/ECOFF) none of the isolates where Wild Type (77,8% R, 19,4% MDR, 2,8% XDR) and 3 isolates where found to carry the blaTEM gene (8,1%). No other resistance genes where found. Based on the phylotyping scheme most of the isolates where classified in the B1 phylogroup (72,2%) followed by phylogroups A (16,7%) and D (11,1%). The fact that so many resistant and multidrug resistant *E.coli* bacteria where found in our water samples indicates a great danger towards public health. This study is very important as it can be used in addition with future studies for a constant reevaluation of the antimicrobial resistance phenomenon in complex water-like habitats.

Key words: One Health, Escherichia coli, Antimicrobial resistance, antibiotics, resistance genes.

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ – ΑΦΙΕΡΩΣΕΙΣ III

ΠΕΡΙΛΗΨΗ IV

ABSTRACT V

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ VI

ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ VIII

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΙΝΑΚΩΝ X

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 1

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ 1

1.2 ESCHERICHIA COLI 2

1.3 ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ 3

1.3.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ Β-ΛΑΚΤΑΜΙΚΩΝ 4

1.3.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΚΟΛΙΣΤΙΝΗΣ 7

1.4 ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ 8

1.4.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗΝ ΚΟΛΙΣΤΙΝΗ 10

1.4.2 ΓΟΝΙΔΙΑ mcr 11

1.4.3 ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΑ Β-ΛΑΚΤΑΜΙΚΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ 16

1.4.4 Β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΕΣ ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΣ 17

1.4.5 ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ ΤΑΞΗΣ D- OXA-48 18

1.5 ΣΚΟΠΟΣ 20

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 22

2.1 ΈΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ 22

2.2 ΈΛΕΓΧΟΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ PCR 24

2.3 ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ (PHYLOTYPING) ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ 27

2.4 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 28

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 29

3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ 29

3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ-PHYLOTYPING 32

3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ 34

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 36

4.1 ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ 36

4.2 ΣΥΖΗΤΗΣΗ/ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 37

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 40

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1 46

Πίνακας Εικόνων

Εικόνα 1 Φυλογενετική ταξινόμηση και πληροφορίες του βακτηρίου Escherichia coli 2
Εικόνα 2 Στόχοι αντιβιοτικών ουσιών (εικόνα από την ιστοσελίδα Conflict With the Resistance: The antimicrobial resistance) 4
Εικόνα 3 Μηχανισμός β-λακταμικών (εικόνα από Tusom.Pharmawiki) 4
Εικόνα 4 Οι χημικοί ομοιότητα του β-λακταμικού δακτυλίου των διαφόρων β-λακταμικών (εικόνα από Tusom-Pharmawiki). 6
Εικόνα 5 Μηχανισμός δράσης της κολιστίνης (εικόνα απο τους Abed Zahedi Bialvaei, Hossein Samadi Kafil,2015) 7
Εικόνα 6 Μηχανισμοί αντοχής στα αντιβιοτικά (εικόνα από τυος Andersen, et al. 2015) 9
Εικόνα 7 Επίκτητοι και ενδογενείς μηχανισμοί αντοχής αρνητικών κατά Gram κυττάρων.(Zahra Aghapour et al,2019) 11
Εικόνα 8 Το πλασμίδιο pHNSHP45 (εικόνα από Liu ,et al., 2015) 12
Εικόνα 9 Το πλασμίδιο pKP37-BE του Escherichia coli ST10 (τροποποιημένη εικόνα από Xavier, et al., 2016). 13
Εικόνα 10 Το πλασμίδιο pWJ1 του Escherichia coli ST1642 (τροποποιημένη εικόνα από Yin, et al., 2017). 14
Εικόνα 11 Το πλασμίδιο pMCR (τροποποιημένη εικόνα από Carattoli, et al., 2017) 15
Εικόνα 12 Τα πλασμίδια που βρέθηκαν να περιέχουν το MCR-5 γονίδιο στα βακτήρια Escherichia coli : (a) Τα πλασμίδια pEC1066 και το pEC2380 (b) Το πλασμίδιο pEC0674 (εικόνα από Hammerl, et al., 2018). 15
Εικόνα 13 Μοριακή ταξινόμηση β-λακταμασών κατά Ambler και λειτουργική ταξινόμηση σε ομάδες κατά Bush-Jacoby-Medeiros (εικόνα από Munoz-Price, 2019). 17
Εικόνα 14 Το γενετικό περιβάλλον του blaTEM γονιδίου, τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση της μεταγραφής (εικόνα από τους Pérez-Etayo, Berzosa , Go, & Vitas , 2018). 18
Εικόνα 15 Το γονίδιο blaTEM-52 και η αλληλουχία ένθεσης IS26 (εικόνα από Kiiru, Butaye, Goddeeris , & Kariuki, 2013). 18
Εικόνα 16 Τα Tn1999 στοιχεία που έχουν συσχετιστεί με το γονίδιο blaOXA-48 σε διάφορα εντεροβακτηριοειδή. 20
Εικόνα 17 Η πιθανή προέλευση και το γενετικό περιβάλλον του τρανσποζονίου Tn6237 που περιέχει το blaOXA-48 στο χρωμόσωμα του *Escherichia coli.* 20

Εικόνα 18 Η ποσοστιαία κατανομή των τριών φαινοτύπων των στελεχών στα 21 αντιβιοτικά που εξετάσθηκαν: S→Susceptible/Ευαίσθητο, I→Intermediate/Μειωμένη ευαισθησία, R→Resistant/Ανθεκτικό. 31
Εικόνα 19 Τα ποσοστά επί τις εκατό των στελεχών που ανήκουν στους παραπάνω φαινότυπους. 31
Εικόνα 20 Φυλογενετική ταξινόμηση στις ομάδες A,B1 και D. 32
Εικόνα 21 Προέλευση των στελεχών E.coli σε συνδυασμό με τις φυλογενετικές ομάδες που ανήκουν. 32
Εικόνα 22 Η ποσοστιαία κατανομή των στελεχών στους φαινοτύπους R, MDR, XDR σε συνδυασμό με την φυλογενετική ομάδα και την προέλευση του δείγματος από όπου απομονώθηκαν. 33
Εικόνα 23 Αποτέλεσμα της PCR για την ανίχνευση του γονιδίου blaTEM. 34
Εικόνα 24 Αποτελέσματα της PCR για την ανίχνευση των γονιδίων mcr-2,-3,-4,-5. 34
Εικόνα 25 Αποτελέσματα της PCR για την ανίχνευση του γονιδίου blaOXA-48 35

Πίνακας Πινάκων

Πίνακας 1 Τα γονίδια mcr 16
Πίνακας 2 Δίσκοι αντιβιοτικών και οι περιεκτικότητες τους. 23
Πίνακας 3 Πρωτόκολλο Multiplex PCR για μία αντίδραση. 25
Πίνακας 4 Πίνακας 2.2.2 Συνθήκες αντίδρασης Multiplex PCR. 25
Πίνακας 5 Πίνακας 2.2.3 Πρωτόκολλο συμβατικής PCR για μία αντίδραση (TEM,OXA-48). 26
Πίνακας 6 Συνθήκες αντίδρασης συμβατικής PCR. 26
Πίνακας 7 Πρωτόκολλο TRIPLEX PCR για μία αντίδραση. 27
Πίνακας 8 Συνθήκες αντίδρασης 28
Πίνακας 9 Αποτελέσματα μοριακών και φαινοτυπικών μεθόδων. 29
Πίνακας 10 Το συνολικό ποσοστό των φαινοτύπων σε κάθε αντιβιοτικό. 30

Κεφάλαιο 1. Θεωρητικό μέρος

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η υγεία του ανθρώπου συνδέεται άρρηκτα με την υγεία των ζώων και του περιβάλλοντος, επομένως καθίσταται αναγκαία η διαχείριση της Δημόσιας Υγείας με την ολιστική θεώρηση της Ενιαίας Υγείας. Η ενιαία υγεία αποτελεί παγκόσμια στρατηγική που στηρίζεται στην άμεση συνεργασία των ειδικών από διάφορους επιστημονικούς κλάδους (FAO-OIE-WHO, 2010). Ένας από τους πιο βασικούς λόγους για την ανάπτυξη αυτής της στρατηγικής αποτέλεσε το παγκόσμιο πρόβλημα της αντιμικροβιακής αντοχής σε σχεδόν όλα τα διαθέσιμα αντιβιοτικά και η ταχεία εξάπλωση των γονιδίων αντοχής. Σε κλινικό επίπεδο το φαινόμενο αυτό έχει μελετηθεί εκτενώς. Ωστόσο, είναι γνωστό πως δεν περιορίζεται μόνο στο περιβάλλον των νοσοκομείων. Πλέον, έχει αποδειχθεί πως τα υδάτινα οικοσυστήματα (όπως λύματα) και τα ζώα αποτελούν σημαντικές δεξαμενές ανθεκτικών βακτηρίων, τα οποία δύναται να μεταφερθούν στον άνθρωπο μέσω ποικίλων οδών (Mulvey & Simor, 2009). Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το βακτήριο *E.coli* που φέρει το γονίδιο mcr. Τα γονίδια *mcr* εδράζονται σε πλασμίδια και προσδίδουν αντοχή στο αντιβιοτικό κολιστίνη, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στην κτηνοτροφία. Μέχρι στιγμής έχουν περιγραφή αρκετά *mcr* γονίδια, τα οποία έχουν ανιχνεύθει κυρίως σε Εντεροβακτηριακά. Τα γονίδια καθότι εντοπίζονται σε πλασμίδια με υψηλή συχνότητα μεταβίβασης που μπορεί να φέρουν και επιπλέον μηχανισμούς αντοχής, αποτελούν νέα απειλή για την Δημόσια Υγεία. Τα δεδομένα που αφορούν την αντοχή των κλινικών στελεχών του *E.coli* είναι πλήρη. Εντούτοις, η αντίστοιχη πληροφορία για τα περιβαλλοντικά στελέχη είναι περιορισμένη. Επομένως, ο έλεγχος των επιπέδων αντοχής και η μελέτη των μηχανισμών αντοχής των περιβαλλοντικών στελεχών *E.coli* κατέχουν σημαντική θέση στον χώρο της Δημόσιας και της Ενιαίας Υγείας, δεδομένου ότι αυτό το βακτήριο συγκαταλέγεται στα πιο κοινά παθογόνα του ανθρώπου (Poirel , et al., 2018).

1.2 Escherichia coli

Επικράτεια: Βακτήρια (Bacteria)
Βασίλειο: Eubacteria
Φύλο: Πρωτεοβακτήρια (Proteobacteria)
Ομοταξία: Gammaproteobacteria
Τάξη: Εντεροβακτηριώδη (Enterobacteriales)
Οικογένεια: Εντεροβακτηριοειδή (Enterobacteriaceae)
Γένος: Escherichia
Είδος: E. coli
Μέγεθος: ~0,5μm x 2μm

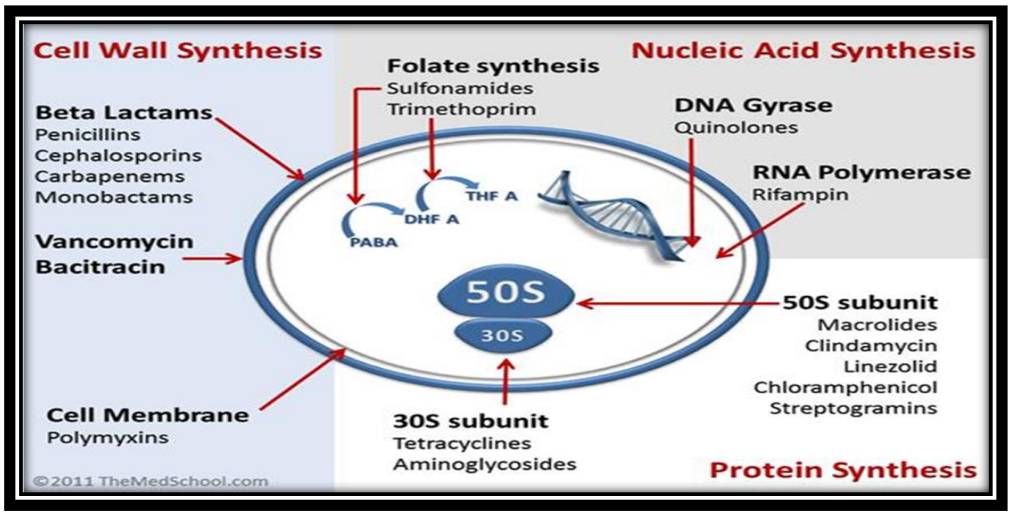
Εικόνα 1 Φυλογενετική ταξινόμηση και πληροφορίες του βακτηρίου Escherichia coli

Το βακτήριο *Escherichia coli* είναι ραμβδοειδές Gram-αρνητικό βακτήριο και ανήκει στην οικογένεια των *Enterobactericeae.* Απαντάται ελεύθερο στο περιβάλλον (έδαφος, υδάτινα ενδιαιτήματα) και αποτελεί καθιερωμένο δείκτη κοπρανώδους μόλυνσης των νερών. Επίσης είναι μέλος της φυσιολογικής εντερικής μικροχλωρίδας του ανθρώπου και των θερμόαιμων ζώων. Είναι ένας ευκαιριακά παθογόνος μικροοργανισμός διαθέτοντας ένα ευρύ φάσμα λοιμογόνων παραγόντων και ευθύνεται για πολλές λοιμώξεις του ουροποιητικού και του γαστρεντερικού καθώς και για βακτηριαιμίες (σήψη). Αποτελεί το συχνότερο Gram-αρνητικό βακτήριο που απομονώνεται σε περιστατικά βακτηριαιμίας και είναι υπεύθυνο για το 80% των ουρολοιμώξεων της κοινότητας, για πολλές ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις ενώ παράλληλα αναφέρεται ως η κύρια αιτία γαστρεντερίτιδας στις αναπτυσσόμενες χώρες. Το βακτήριο *E.coli* δεν έχει κανένα εγγενή μηχανισμό αντοχής, επομένως η εμφάνιση οποιασδήποτε αντοχής οφείλεται στην απόκτηση γονιδίων αντοχής μέσω οριζόντιας μεταφοράς. Εντοπίζεται συχνά σε διαφορετικά υδάτινα ενδιαιτήματα και εμφανίζει ποικίλους μηχανισμούς αντοχής, με πιο πρόσφατη την παρουσία του πλασμιδιακού γονιδίου, το *mcr-1,* που προσδίδει αντοχή στην κολιστίνη.

1.3 ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

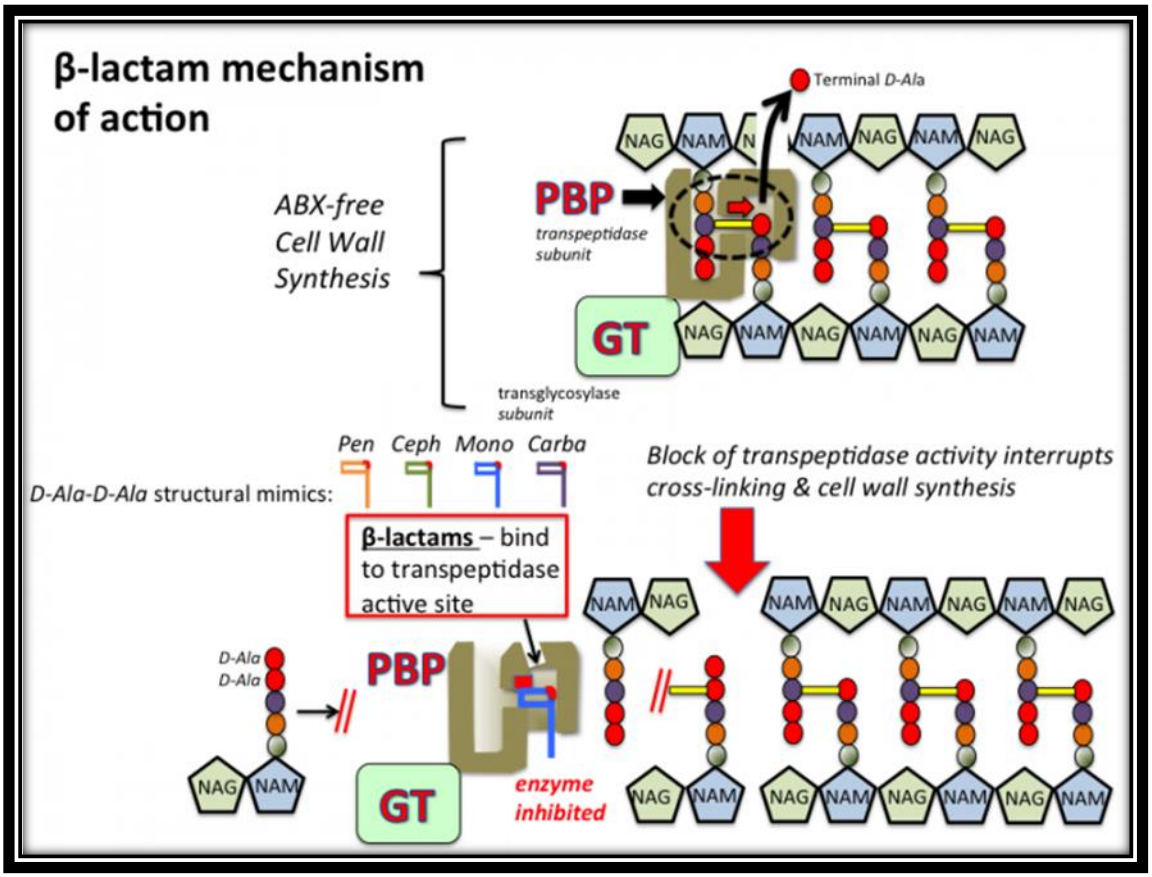
Τα αντιβιοτικά είναι ουσίες, φυσικές ή συνθετικές, που είναι ικανές είτε να καταστείλουν τη βακτηριακή ανάπτυξη (βακτηριοστατική δράση) ή να καταστρέψουν τα βακτήρια (βακτηριοκτόνο δράση). Χρησιμοποιούνται ευρέως για την πρόληψη και τη θεραπεία ασθενειών, τόσο στην ιατρική όσο και την κτηνιατρική. Η δράση των αντιβιοτικών είναι επιλεκτική, δηλαδή καταστρέφουν τον μικροοργανισμό χωρίς να επηρεάζουν τα κύτταρα του ξενιστή (MURRAY, RESENTHAL, & PFALLER, 2016). Τα αντιβιοτικά αποτελούν μια από τις σημαντικότερες ανακαλύψεις, εάν σκεφτεί κανείς πως την εποχή προ αντιβιοτικών η αντιμετώπιση των λοιμώξεων ήταν πολύ δύσκολη έως και αδύνατη. Τα αντιβιοτικά που είναι διαθέσιμα είναι πάρα πολλά. Ωστόσο το κάθε ένα είναι αποτελεσματικό στην αντιμετώπιση συγκεκριμένου εύρους μικροοργανισμών. Το σύνολο των βακτηρίων που εμφανίζουν ευαισθησία σε συγκεκριμένο αντιβιοτικό αναφέρεται ως «αντιμικροβιακό φάσμα του αντιβιοτικού». Βάσει αυτού, τα αντιβιοτικά διακρίνονται σε εκτεταμένου και περιορισμένου (ή στενού) φάσματος. Επίσης το κάθε αντιβιοτικό έχει και συγκεκριμένο στόχο δράσης μέσα στο κύτταρο του μικροβίου. Οι πιθανοί στόχοι δράσης των αντιβιοτικών είναι οι παρακάτω (Greenwood, Slack, Peutherer, & Barer, 2016):

1. Το κυτταρικό τοίχωμα
2. Η σύνθεση των πρωτεϊνών
3. Σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων
4. Η κυτταροπλασματική μεμβράνη
5. Η σύνθεση φυλικού οξέος



Εικόνα 2 Στόχοι αντιβιοτικών ουσιών (εικόνα από την ιστοσελίδα Conflict With the Resistance: The antimicrobial resistance)

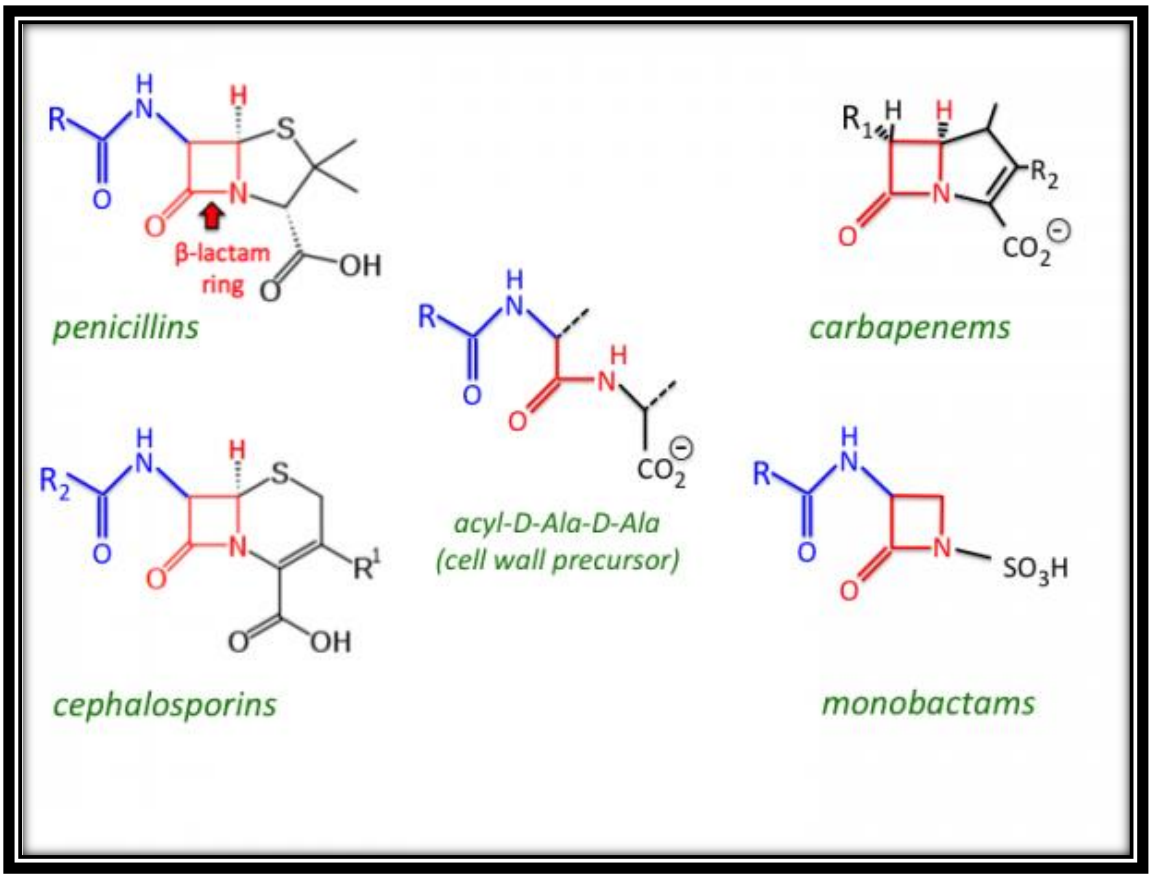
1.3.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ Β-ΛΑΚΤΑΜΙΚΩΝ



Εικόνα 3 Μηχανισμός β-λακταμικών (εικόνα από Tusom.Pharmawiki)

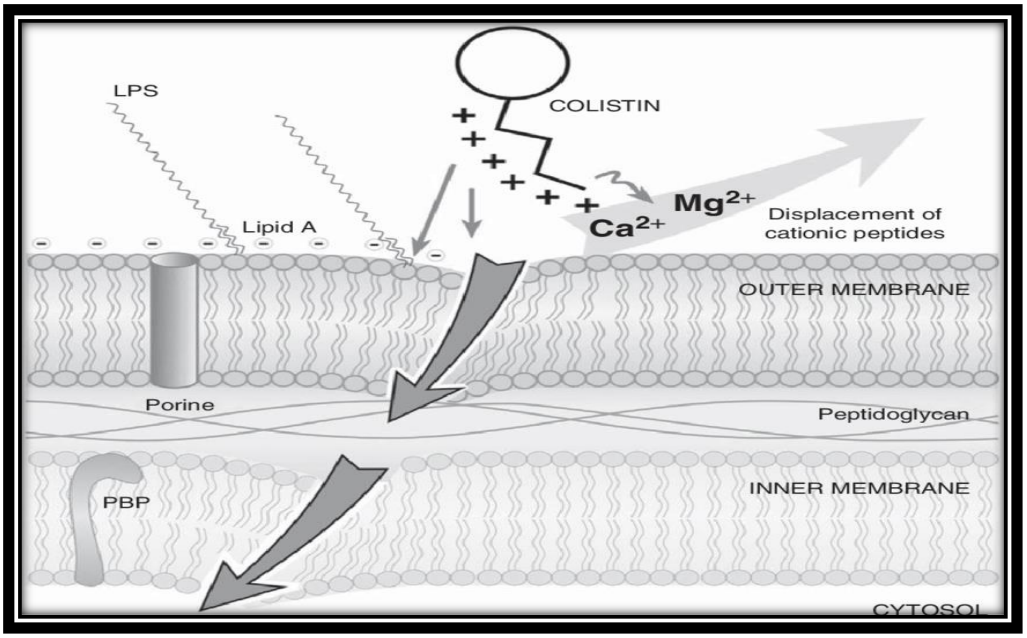
Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά (π.χ. πενικιλλίνες, κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες, μονοβακτάμες, αναστολείς β-λακταμασών) ονομάζονται έτσι επειδή διαθέτουν έναν κοινό β-

λακταμικό δακτύλιο. Τα αντιβιοτικά αυτής της ομάδας αναστέλλουν την σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης, η οποία είναι βασικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων. Η πεπτιδογλυκάνη αποτελείται από αλυσίδες δυο εναλλασσόμενων σακχάρων, την Ν-ακετυλογλυκοζαμίνη (NAG) και το Ν-ακετυλομουραμικού οξέος (NAM), και από μια μικρή ομάδα αμινοξέων, αποτελούμενη από L-αλαλίνη, D-αλαλίνη, D-γλουταμινικό οξύ και λυσίνη ή διαμινοπιμελικό οξύ. Τα συστατικά αυτά συνδέονται μεταξύ τους σχηματίζοντας μια επαναλαμβανόμενη δομή, τετραπεπτίδιο γλυκάνης. Οι αλυσίδες στη συνέχεια συνδέονται μεταξύ τους με πεπτιδικές γέφυρες, εξασφαλίζοντας έτσι τη μέγιστη ακαμψία του κυτταρικού τοιχώματος του βακτηρίου. Η δομή των αλυσίδων και των μεταξύ τους συνδέσεων καταλύεται από συγκεκριμένα ένζυμα (π.χ. τρανσαπεπτιδάσες), που ονομάζονται πενικιλλινο-συνδετικές πρωτεΐνες (PBPs), επειδή μπορούν να συνδεθούν και με τα β-λακταμικά αντιβιοτικά (Bradford & Bush , 2016). Όταν τα αναπτυσσόμενα βακτήρια εκτίθενται σε β-λακταμικά αντιβιοτικά, το αντιβιοτικό συνδέεται με συγκεκριμένες PBPs του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος και εμποδίζει τον σχηματισμό των συνδέσεων ανάμεσα στις αλυσίδες της πεπτιδογλυκάνης. Αυτό με τη σειρά του ενεργοποιεί τις αυτολυσίνες που αποικοδομούν το κυτταρικό τοίχωμα, οδηγώντας τελικά στον βακτηριακό θάνατο. Επομένως, τα β-λακταμικά αντιβιοτικά δρουν ως βακτηριοκτόνοι παράγοντες (TUSOM-PHARMAWIKI, n.d.).



Εικόνα 4 Οι χημικοί ομοιότητα του β-λακταμικού δακτυλίου των διαφόρων β-λακταμικών (εικόνα από Tusom-Pharmawiki).

1.3.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΚΟΛΙΣΤΙΝΗΣ



Εικόνα 5 Μηχανισμός δράσης της κολιστίνης (εικόνα απο τους Abed Zahedi Bialvaei, Hossein Samadi Kafil,2015)

Οι λοιμώξεις που οφείλονται σε πολυανθεκτικά βακτήρια, αποτελούν σημαντικό πρόβλημα για τη δημόσια υγεία. Σοβαρές νοσοκομειακές λοιμώξεις που οφείλονται σε πολυανθεκτικά Gram-αρνητικά βακτήρια ευθύνονται πλέον για υψηλά ποσοστά νοσηρότητας και θνησιμότητας. Η έλλειψη νέων αποτελεσματικών αντιβιοτικών ώθησαν την ιατρική κοινότητα στην επαναχρησιμοποίηση παλαιότερων αντιβιοτικών και συγκεκριμένα της κολιστίνης (πολυμυξίνη Ε), η οποία αποτελεί σήμερα την έσχατη λύση για την θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από τα πολυανθεκτικά βακτήρια (MDR), όπως *Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii και Enterobacteriaceae (Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae).* Η κολιστίνη απομονώθηκε πρώτη φορά το 1949 από καλλιέργειες του βακτηρίου *Bacillus polymyxa.* Η κολιστίνη (γνωστή και ως πολυμιξίνη Ε), ανήκει στις πολυμυξίνες, μια ομάδα πολυπεπτιδικών αντιβιοτικών με βακτηριοκτόνο δράση και είναι αποτελεσματικές στην αντιμετώπιση μόνο των Gram-αρνητικών βακτηρίων. Οι πολυμυξίνες διακρίνονται σε πέντε διαφορετικές ομάδες (πολυμυξίνες A,B,C,D και Ε). Γενικά, είναι πολύ τοξικές για τον άνθρωπο, εκτός από την πολυμυξίνη Β και Ε που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά την κλινική πράξη. Η κολιστίνη είναι ένα κατιονικό λιποπεπτίδιο, μοριακού βάρους 1750 Da, το οποίο αποτελείται από ένα κυκλικό επταπεπτίδιο με μια τριπεπτιδική πλευρική αλυσίδα ακυλιωμένη στο Ν-τελικό άκρο από λιπαρά οξέα. Τα δύο κύρια συστατικά της κολιστίνης είναι η κολιστίνη Α (πολυμυξίνη E_1) και κολιστίνη Β (πολυμυξίνη E_2). Ο μηχανισμός δράσης

της κολιστίνης στηρίζεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ του κατιονικού της άκρου και του λιποπολυσακχαρήτη (LPS). Συγκεκριμένα, η κολιστίνη ανταγωνίζεται τα δισθενή κατιόντα μαγνησίου (Mg^{+2}) και ασβεστίου (Ca^{+2}) τα οποία βρίσκονται στο αρνητικά φορτισμένο φωσφορικό άκρο του λιπιδίου Α του λιποπολυσακχαρήτη (LPS). Αυτά τα δυο κατιόντα είναι σημαντικά για τη σταθεροποίηση του LPS και η απομάκρυνση τους έχει σαν αποτέλεσμα την καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης του βακτηρίου. Έτσι, η κυτταρική μεμβράνη του βακτηρίου αποκτά αυξημένη διαπερατότητα που οδηγεί στην λύση και στον κυτταρικό θάνατο (WHO, 2018).

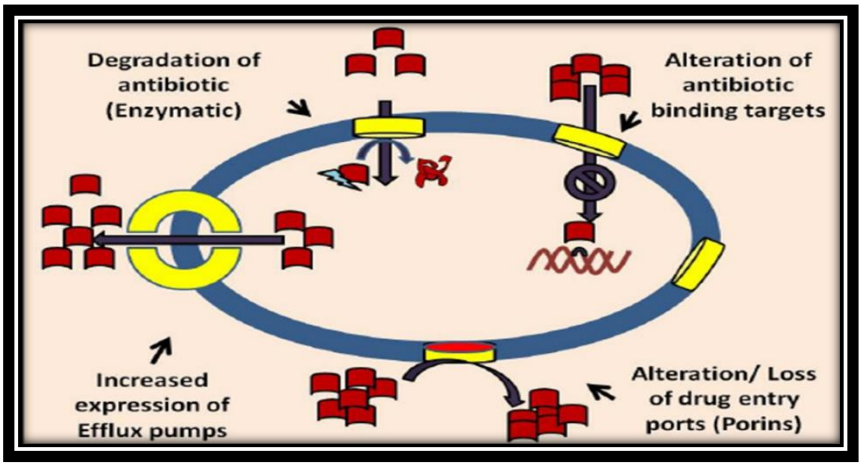
1.4 ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Η αντιμικροβιακή χημειοθεραπεία αποτελεί θεμελιώδη λίθο για την αντιμετώπιση των μικροβιακών λοιμώξεων. Εντούτοις η ευεργετική δράση των αντιβιοτικών απειλείται πλέον σε σημαντικό βαθμό από την ανάπτυξη της μικροβιακής αντοχής, η οποία, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, αποτελεί μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις του 21^{ου} αιώνα.

Γενικά, ο όρος μικροβιακή αντοχή στα αντιβιοτικά λέγεται η κατάσταση όπου ένας μικροοργανισμός εμφανίζεται ανθεκτικός σε ένα ή και περισσότερους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Κάποια μικροβιακά είδη έχουν ενδογενή (intrinsic) αντοχή σε κάποιες ομάδες αντιβιοτικών, ωστόσο ως «μικροβιακή αντοχή στα αντιβιοτικά» εννοούμε όχι την εγγενή αντοχή, αλλά την επίκτητη και στην επίκτητη (acquired). Η μικροβιακή αντοχή είναι ένα φυσικό φαινόμενο που οφείλεται σε αλλαγές στο γενετικό υλικό του μικροοργανισμού ενώ η «μηχανή» που την τροφοδοτεί είναι η πίεση της επιλογής που ασκείται από την αλόγιστη χρήση των αντιβιοτικών, όχι μόνο κατά την κλινική πράξη αλλά και στην κοινότητα, στην κτηνοτροφία και στη γεωργία. Οι αλλαγές στο γενετικό υλικό του βακτηρίου σχετίζονται είτε με μεταλλαγές των βακτηριακών γονίδιων είτε με την απόκτηση εξωγενών γενετικών στοιχείων που εμπεριέχουν γονίδια αντοχής (π.χ. πλασμίδια). Αυτά τα εξωγενή γενετικά στοιχεία μεταδίδονται μεταξύ των διαφορετικών βακτηρίων, μέσω σύζευξης (conjugation), μεταγωγής με την μεσολάβηση βακτηριοφάγων (transduction) ή μετασχηματισμού (transformation). Οι επιπτώσεις του φαινομένου είναι πολλαπλές. Η μείωση της θεραπευτικής αποτελεσματικότητας των αντιμικροβιακών φαρμάκων και η ανεπάρκεια θεραπευτικών επιλογών συνεπάγονται με την αύξηση της θνητότητας, της νοσηρότητας και του χρόνου νοσηλείας του ασθενούς, ενώ το κόστος στις υπηρεσίες υγείας πολλαπλασιάζεται. Τα ανθεκτικά βακτήρια, όπως προαναφέρθηκε δεν περιορίζονται μόνο στο περιβάλλον του νοσοκομείου αλλά και στην κοινότητα. Η αντοχή στα αντιβιοτικά που

παρατηρείται σε ζώα παραγωγής μπορεί να μεταδοθεί στους ανθρώπους μέσω της τροφής, του νερού ή μέσω της άμεσης επαφής με τα ζώα. Επιπλέον, η συνεχής μετανάστευση και η ανταλλαγή πληθυσμών μεταξύ των χωρών, καθώς και ο τουρισμός και τα επαγγελματικά ταξίδια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην απόκτηση και διάδοση των πολυανθεκτικών στελεχών. Επομένως η ανάπτυξη στρατηγικών αντιμετώπισης αυτής της παγκόσμιας απειλής αποτελεί προτεραιότητα της επιστημονικής κοινότητας και των αρμόδιων φορέων (FORD, 2019). Οι μηχανισμοί αντοχής στα αντιμικροβιακά φάρμακα ποικίλουν. Στους μηχανισμούς αυτούς περιλαμβάνονται:

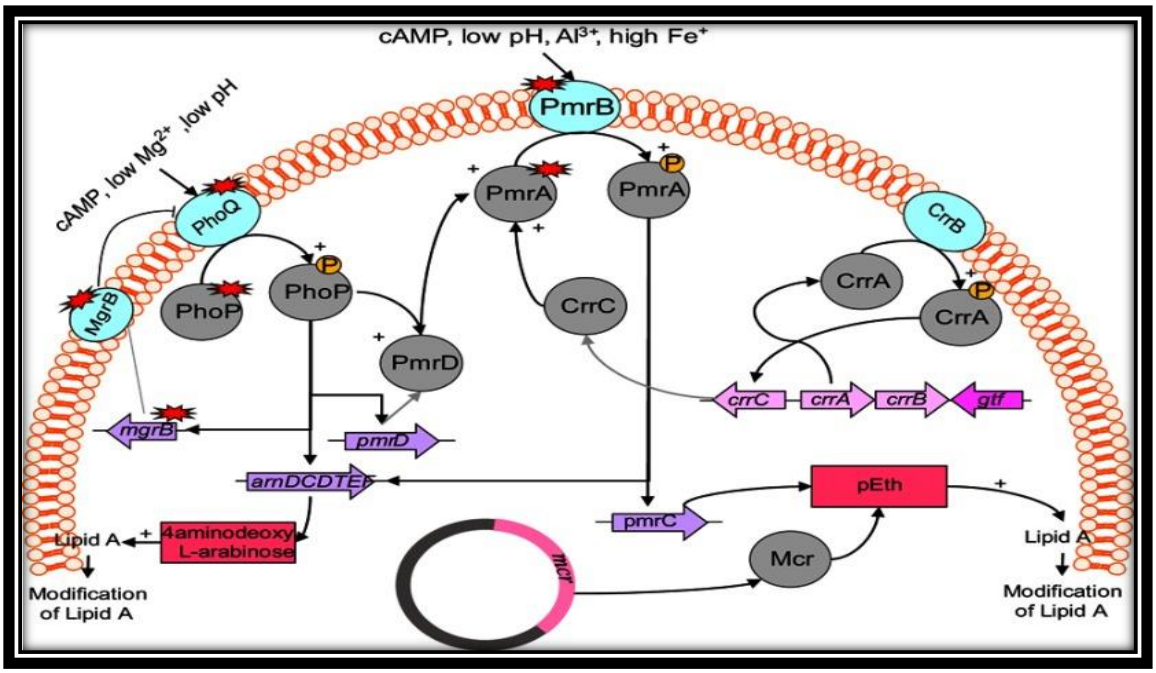
- Ενζυμική αποδόμηση του αντιβιοτικού (π.χ υδρόλυση των β-λακταμικών από τις β-λακταμάσες).
- Υπερέκφραση αντλιών εκροής (efflux pumps) που συμβάλει στην ταχεία απομάκρυνση του αντιμικροβιακού παράγοντα από το κύτταρο, πριν προλάβει να δράσει.
- Τροποποίηση του στόχου του αντιβιοτικού. Οι μεταλλάξεις συχνά οδηγούν σε αλλαγές της στερεοδιαμόρφωσης του σημείου-στόχου, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η σύνδεση άρα και η αντιμικροβιακή δράση του αντιβιοτικού.
- Μειωμένη διαπερατότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, λόγω απώλειας πορινών. Έτσι καθίσταται αδύνατη η είσοδος του αντιβιοτικού στο εσωτερικό του (Andersen, et al., 2015).



Εικόνα 6 Μηχανισμοί αντοχής στα αντιβιοτικά (εικόνα από τυος Andersen, et al. 2015)

1.4.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗΝ ΚΟΛΙΣΤΙΝΗ

Η αντοχή στην κολιστίνη είναι αποτέλεσμα της τροποποίησης του βακτηριακού λιπιδίου Α, συστατικό του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) της κυτταρικής μεμβράνης. Συγκεκριμένα διάφορες μεταλλάξεις σε γονίδια του βασικού βακτηριακού χρωμοσώματος ευθύνονται για την αλλαγή του φορτίου των λιπολυσακχαριδικών αλυσίδων, από θετικά σε αρνητικά φορτισμένες. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην αδυναμία σύνδεσης της κολιστίνης. Τα γονίδια που ενέχονται σε αυτούς τους μηχανισμούς είναι αρκετά και οργανώνονται σε οπερόνια (Εικόνα 1.5) Ωστόσο, οι μεταλλάξεις αυτές δεν αποτελούν το μόνο μηχανισμό που προσδίδει αντοχή στην κολιστίνη. Συγκεκριμένα, τον Νοέμβριο του 2015 έγινε η πρώτη αναφορά αντοχής στη κολιστίνη που μεσολαβείται από πλασμιδιακό γονίδιο, το *mcr-1*. Τα γονίδια *mcr* (Mobile Colistin Resistance), καθώτι πλασμιαδιακά, έχουν δυνατότητα οριζόντιας μεταφοράς. Οι πρωτεΐνες MCR ανήκουν στην οικογένεια των τρανσφερασών φοσφωαιθανολαμίνης οι οποίες συμβάλλουν στην κατιονική προσθήκη μίας ομάδας φωσφοαιθανολαμίνης (PEtN) στο λιπίδιο Α των λιποπολυσακχαριτών της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των Gram-αρνητικών βακτηρίων. Η προσθήκη αυτή πραγματοποιείται μέσω μίας αλυσιδωτής αντίδρασης, η οποία οδηγεί σε αλλαγή του φορτιού των πολυσακχαριτών, με αποτέλεσμα την αδυναμία πρόσδεσης της κολιστίνης. Κατά αυτό τον τρόπο λοιπόν παρεμποδίζεται η δράση της κολιστίνης (Aghapour, et al., 2019).



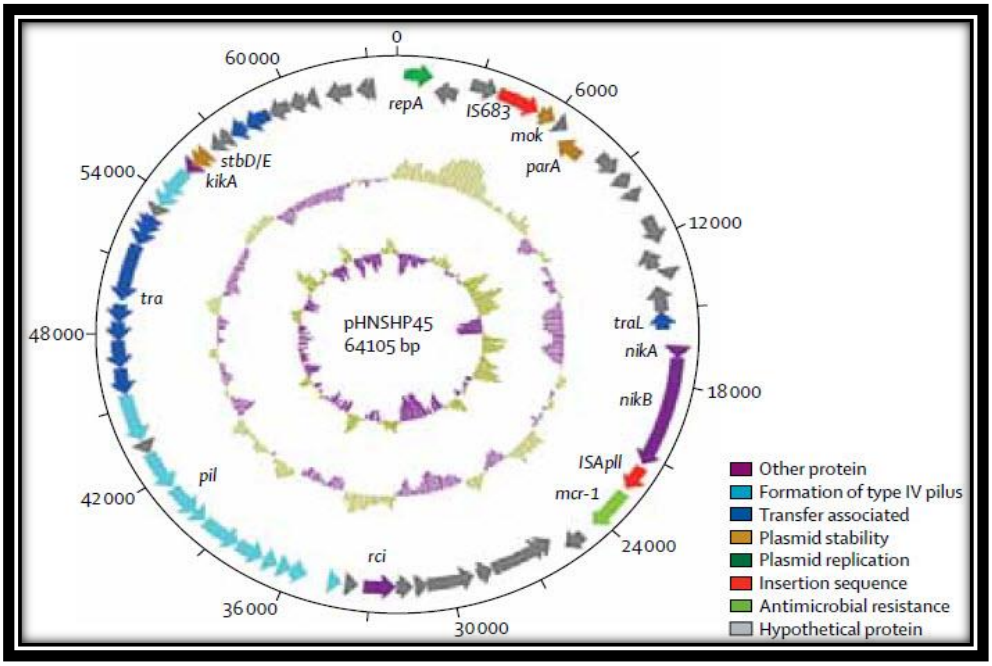
Εικόνα 7 Επίκτητοι και ενδογενείς μηχανισμοί αντοχής αρνητικών κατά Gram κυττάρων.(Zahra Aghapour et al,2019)

1.4.2 ΓΟΝΙΔΙΑ *mcr*

mcr-1

Στην Κίνα, τον Νοέμβρη του 2015, αναφέρθηκε για πρώτη φορά ένα πλασμιδιακό γονίδιο, το *mcr-1*, σε στελέχη *Escherichia coli* και *Klebsiella pneumoniae,* που απομονώθηκαν από δείγματα ζώων και ανθρώπων. Το πρώτο πλασμίδιο που έφερε το γονίδιο *mcr-1* ανήκε στην ομάδα IncI21. Η μετάδοση του *mcr-1* πραγματοποιείται μέσω της οριζόντιας μεταφοράς και κωδικοποιεί μια τρανσφεράση φωσφοαιθανολαμίνης (PEA), η οποία τροποποιεί το λιπίδιο Α της κυτταρικής μεμβράνης, μειώνοντας τη συγγένεια με τη κολιστίνη και προσδίδοντας αντοχή σε αυτή. Οι πιο συχνές ομάδες ασυμβατότητας των *mcr-1*- πλασμιδίων είναι οι IncI2, IncHI2 και IncX4, ενώ οι ομάδες IncF, IncN, IncP, IncQ και IncX είναι σπανιότερες. Έως σήμερα το γονίδιο *mcr-1* έχει εντοπιστεί σε χώρες της Ασίας, της Αφρικής, της Ευρώπης και της Αμερικής. Ενδιαφέρον έχει μια έρευνα που διεξήχθη το 2016 στην Κίνα, σε στελέχη *E.coli* που απομονώθηκαν από κοτόπουλο, το χρονικό διάστημα μεταξύ 1970 και 2014. Το γονίδιο *mcr-1* ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά σε τρία στελέχη *E.coli* που απομονώθηκαν στη δεκαετία του

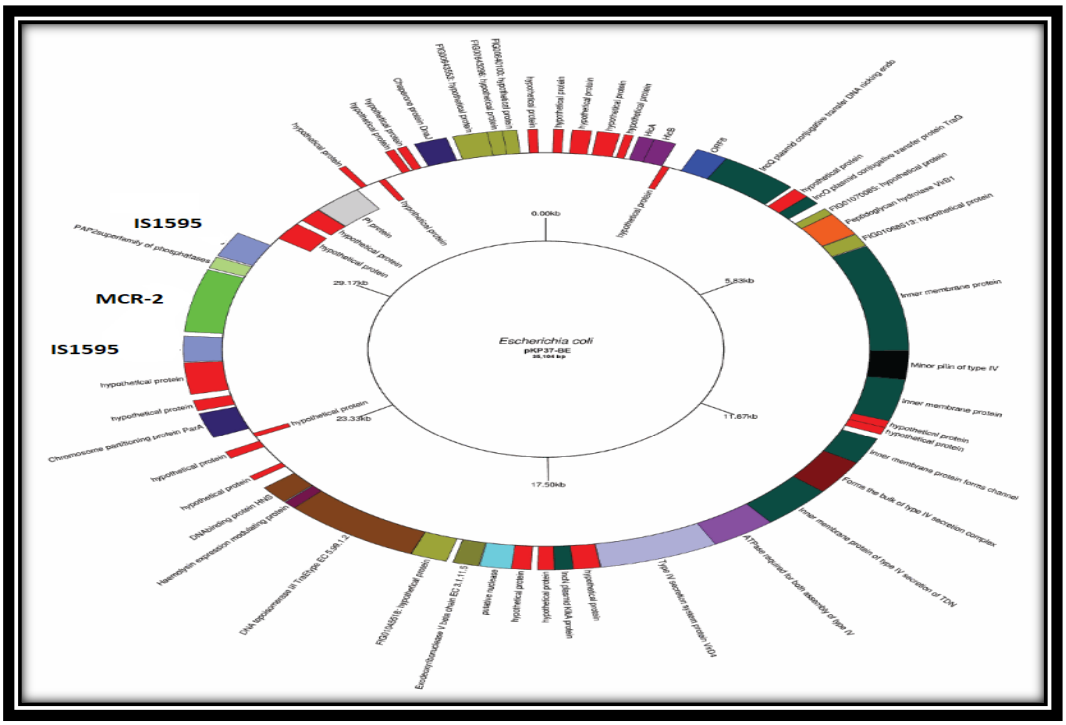
1980, τότε που άρχισε η χρήση της κολιστίνης στα ζώα παραγωγής. Το 2008 στο Βιετνάμ, έγινε η πρώτη αναφορά του *mcr-1*-θετικού στελέχους *Shigella sonnei* σε ανθρώπινο δείγμα.



Εικόνα 8 Το πλασμίδιο pHNSHP45 (εικόνα από Liu ,et al., 2015)

mcr-2

Το 2016 στο Βέλγιο, ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά το γονίδιο *mcr-2,* το οποίο είχε βρεθεί σε στελέχη *E.coli* που είχαν απομονωθεί από κόπρανα χοίρων. Το νέο αυτό γονίδιο όπως αποδείχτηκε είχε 76,7% ομολογία με το mcr-1. Το γονίδιο *mcr-2* εντοπίστηκε στο πλασμίδιο pKP37-BE και πλαισιωνόταν από δύο αλληλουχίες εισδοχής IS1595 (Xavier, et al., 2016).

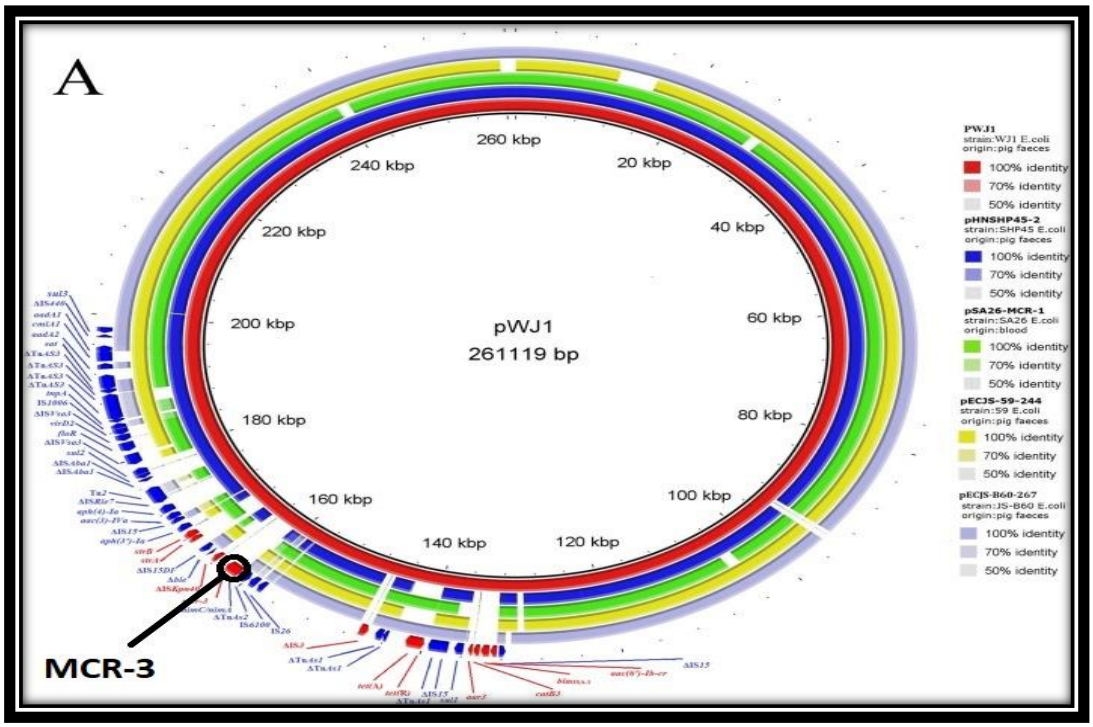


Εικόνα 9 Το πλασμίδιο pKP37-BE του Escherichia coli ST10 (τροποποιημένη εικόνα από Xavier, et al., 2016).

mcr-3

Το 2017 εντοπίστηκε στη Κίνα το γονίδιο *mcr-3*, σε στέλεχος *E.coli* που απομονώθηκε από κόπρανα υγιούς χοίρου, που συλλέχθηκαν το 2015. Το γονίδιο αυτό εδραζόταν σε πλασμίδιο μαζί με άλλα 18 γονίδια αντοχής. Το στέλεχος αυτό κατατάχθηκε στον τύπο ST1642. Το pWJ1 πλασμίδιο του mcr-3 άνηκε στην ομάδα ασυμβατότητας IncHI2 και είχε

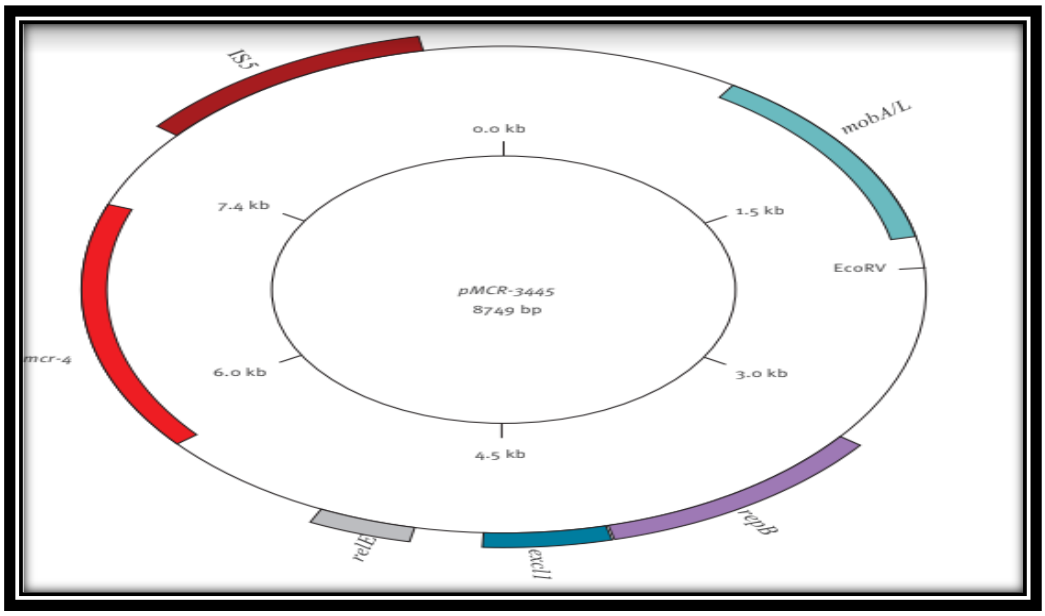
ομολογία, περίπου 85%, με το πλασμίδιο pHNSHP45 του *mcr-1*. Η αλληλουχία του *mcr-3* μήκους 1.626 bp είχε 45% και 47% ομοιότητα με τα γονίδια *mcr-1* και *mcr-2*, αντίστοιχα (Yin, et al., 2017). Σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία, το γονίδιο *mcr-3* έχει εντοπιστεί *σε Enterobacter, Citrobacter freundii, Salmonella enterica, Klebsiella pneumoniae, E.coli* και *Shigella*. Έως σήμερα, έχουν περιγραφεί είκοσι εννέα (29) υπότυποι του γονιδίου *mcr-3*.



Εικόνα 10 Το πλασμίδιο pWJ1 του Escherichia coli ST1642 (τροποποιημένη εικόνα από Yin, et al., 2017).

mcr-4

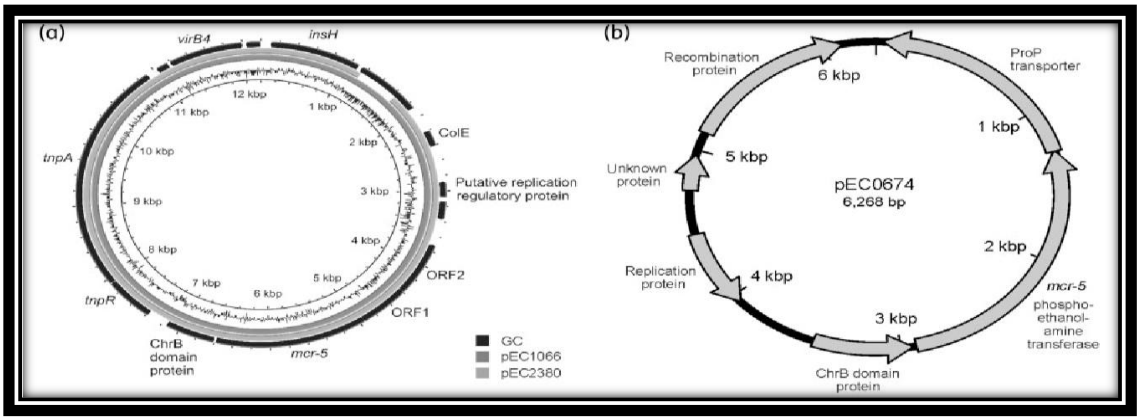
Το γονίδιο *mcr-4* εντοπίστηκε το 2013 στην Ιταλία, σε στελέχη *Salmonella enterica* που απομονώθηκε από χοίρο ενώ το 2015 και 2016 εντοπίστηκε στην Ισπανία και το Βέλγιο, σε στέλεχος *E.coli* που απομονώθηκε από κόπρανα χοίρου. Ύστερα από την αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος (Whole genome sequencing-WGS), βρέθηκε πως το πλασμίδιο που έφερε το *mcr-4* άνηκε στην ομάδα ασυμβατότητας ColE10. Το πλασμίδιο αυτό δεν είναι αυτό-συζευκτικό, δηλαδή για να μπορέσει να μεταδοθεί, χρειάζεται την παρουσία άλλων βοηθητικών πλασμιδίων. Σε ένα στέλεχος *Escherichia coli,* το πλασμίδιο pMCR βρέθηκε ενσωματωμένο στο βασικό χρωμόσωμα και πλαισιωνόταν από δύο αλληλουχίες εισδοχής IS5. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως κάποιο συμβάν μετάθεσης οδήγησε στην ενσωμάτωση του πλασμιδίου στο βασικό χρωμόσωμα (Carattoli , et al., 2017).



Εικόνα 11 Το πλασμίδιο pMCR (τροποποιημένη εικόνα από Carattoli, et al., 2017)

mcr-5

Το 2011-2016 στην Γερμανία, ταυτοποιήθηκε το γονίδιο *mcr-5* από στελέχη *Salmonella Paratyphi BdTa+,* που είχαν απομονωθεί από πουλερικά (Borowiak, et al., 2017). Το mcr-5 έχει βρεθεί και και σε άλλα βακτηριακά είδη. Στα πλαίσια, μικροβιολογικού ελέγχου των ζώων εκτροφής στην Γερμανία εντοπίστηκαν τρία *mcr-5* θετικά στελέχη *Escherichia coli* (Borowiak, et al., 2017). Σύμφωνα με τα δεδομένα της ανάλυσης, το mcr-5 δεν πλαισιωνόταν από τρανσποζόνια (Hammerl, et al., 2018).



Εικόνα 12 Τα πλασμίδια που βρέθηκαν να περιέχουν το MCR-5 γονίδιο στα βακτήρια Escherichia coli : (a) Τα πλασμίδια pEC1066 και το pEC2380 (b) Το πλασμίδιο pEC0674 (εικόνα από Hammerl, et al., 2018).

Πίνακας 1 Τα γονίδια mcr

Πλασμιδιακό *mcr* γονίδιο	Στέλεχος	Δείγμα	Χώρα Αναφοράς
mcr-1	*E.coli*	Κρέας από χοίρο	Κίνα
mcr-2	*E.coli*	Χοίροι και μοσχάρια	Βέλγιο
mcr-3	*E.coli*	Χοίροι	Κίνα
mcr-4	*Salmonella enterica* οροτύπου *Typhimurium* και *Escherichia coli*	Χοίροι	Ιταλία, Ισπανία, Βέλγιο
mcr-5	*Salmonella paratyphi*	Πουλερικά	Γερμανία

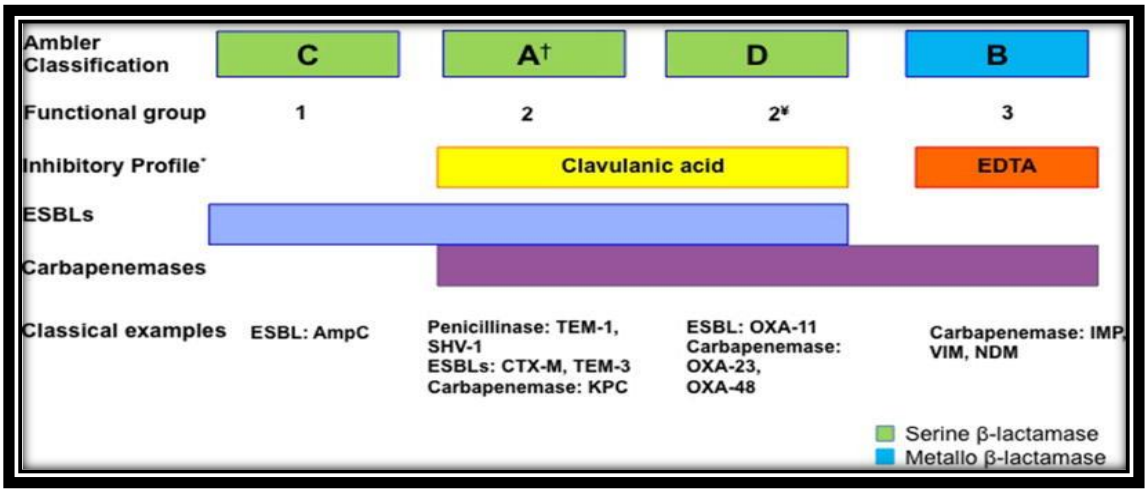
1.4.3 ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΑ Β-ΛΑΚΤΑΜΙΚΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Η αντοχή των Gram-αρνητικών βακτηρίων στα β-λακταμικά οφείλεται κυρίως στην έκφραση β-λακταμασών, γεγονός που μειώνει την αποτελεσματικότητα των θεραπευτικών αγωγών για την καταπολέμηση των παθογόνων (Babic , Hujer , & Bonomo , 2006) . Οι β-λακταμάσες αδρανοποιούν τα β-λακταμικά υδρολύοντας τον αμιδικό δεσμό -O=C-N- του β-λακταμικού δακτυλίου (Λεμπέση, 2013). Υπάρχουν δύο συστήματα ταξινόμησης των β-λακταμασών. Το ένα από αυτά είναι η λειτουργική ταξινόμηση κατά Bush-Jacoby-Medeiros, σύμφωνα με το οποίο τα ένζυμα κατατάσσονται σε τρεις βασικές ομάδες και υπο-ομάδες, με βάση το υπόστρωμα τους αλλά και την ευαισθησία που παρουσιάζουν στους διάφορους αναστολείς. Οι ομάδες είναι οι εξής (Bush, 1995):

Ομάδα 1: Κεφαλοσπορινάσες που δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ.

Ομάδα 2: πενικιλλινάσες, κεφαλοσπορινάσες και β-λακταμάσες ευρέως φάσματος (broad spectrum b-lactamases) που αναστέλλονται από τους αναστολείς β-λακταμασών.

Ομάδα 3: μέταλλο-β-λακταμάσες που υδρολύουν πενικιλλίνες, κεφαλοσπορίνες και καρβαπενέμες, οι οποίες εμφανίζουν μειωμένη ευαισθησία σε όλους τους κλασικούς αναστολείς β-λακταμασών. Εντούτοις, η δράση τους αναστέλλεται από το EDTA. Το δεύτερο σχήμα ταξινόμησης είναι η μοριακή ταξινόμηση κατά Ambler, σύμφωνα με το οποίο τα ένζυμα διαχωρίζονται σε τέσσερεις τάξεις, με βάση το ποσοστό ομοιότητας της αλληλουχίας τους. Συγκεκριμένα, οι β-λακταμάσες διακρίνονται σε β-λακταμάσες σερίνης (τάξεις A, C και D) και σε μεταλλο-β-λακταμάσες (τάξη B).

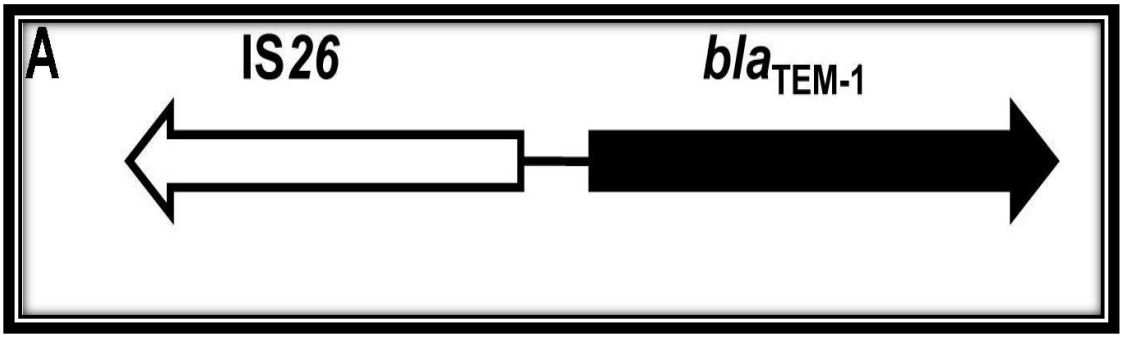


Εικόνα 13 Μοριακή ταξινόμηση β-λακταμασών κατά Ambler και λειτουργική ταξινόμηση σε ομάδες κατά Bush-Jacoby-Medeiros (εικόνα από Munoz-Price, 2019).

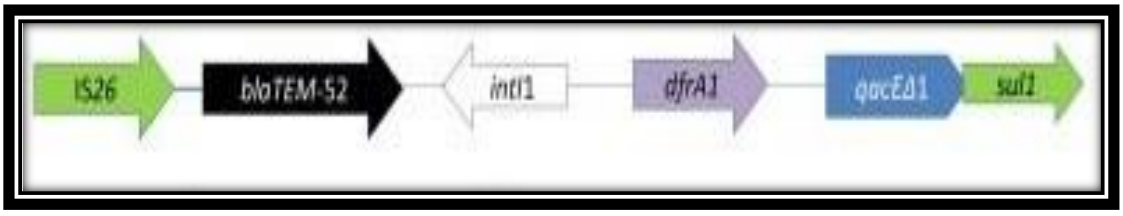
1.4.4 Β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΕΣ ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΣ

Οι εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (extended spectrum beta-lactamases, ESBLs) είναι μια ομάδα β-λακταμασών τάξης A και έχουν την ικανότητα να υδρολύουν εκτεταμένου φάσματος κεφαλοσπορίνες (όπως κεφοταξίμη, κεφτριαξόνη, κεφταζιδίμη) και μονοβακτάμες (αζτρεονάμη). Οι καρβαπενέμες και η κεφαμυκίνη είναι αποτελεσματικές στην αντιμετώπιση των βακτηριακών στελεχών που παράγουν ESBLs. Οι ESBL προήλθαν από μεταλλάξεις γονιδίων β-λακταμασών περιορισμένου φάσματος, όπως TEM-1, TEM-2 ή SHV-1, οι οποίες οδήγησαν σε αλλαγές της στερεοδιαμόρφωσης άρα και της ενζυμικής δραστικότητας. Κατά αυτό τον τρόπο, σε αντίθεση με τους πρόγονούς τους, τα ESBLs. Ωστόσο δεν υδρολύουν καρβαπενέμες και κεφαμυκίνες και αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ και τη ταζομπακτάμη (Bradford P. , 2001). Τα γονίδια που κωδικοποιούν για ESBLs εδράζονται

είτε στο χρωμοσωμικό-κύριο γενετικό υλικό των μικροοργανισμών είτε σε πλασμίδια. Τα πλασμίδια αυτά είναι μεγάλα και συχνά φέρουν και άλλα γονίδια αντοχής. Τα gram-αρνητικά βακτήρια που παράγουν ESBLs ήταν και είναι κλινικής σημασίας και απομονώνονται συνήθως από νοσηλευόμενους ασθενείς. Ωστόσο, η διασπορά τους στο περιβάλλον, ειδικά στα υδάτινα οικοσυστήματα προκαλεί ιδιαίτερη ανησυχία. Επίσης, λόγω του ότι τα γονίδια των ESBLs βρίσκονται σε κινητά γενετικά στοιχεία, όπως πλασμίδια (blaCTX-M, blaSHV) και τρανσποζόνια (blaTEM), η διασπορά της αντοχής μπορεί να πραγματοποιηθεί πολύ εύκολα (Smet, et al., 2010). Πολλές είναι οι αναφορές για μεταθετά γενετικά στοιχεία που έχουν ανιχνευτεί έως τώρα να φέρουν διάφορα γονίδια blaTEM, με κυρίαρχη την αλληλουχία εισδοχής IS26, τόσο για τα κλινικής προέλευσης *E.coli* στελέχη όσο και για αυτά που έχουν απομονωθεί από υδάτινα ενδιαιτήματα σε διάφορες χώρες παγκοσμίως (Pérez-Etayo, Berzosa , Go, & Vitas , 2018), (Kiiru , Butaye, Goddeeris , & Kariuki, 2013).



Εικόνα 14 Το γενετικό περιβάλλον του blaTEM γονιδίου, τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση της μεταγραφής (εικόνα από τους Pérez-Etayo, Berzosa , Go, & Vitas , 2018).

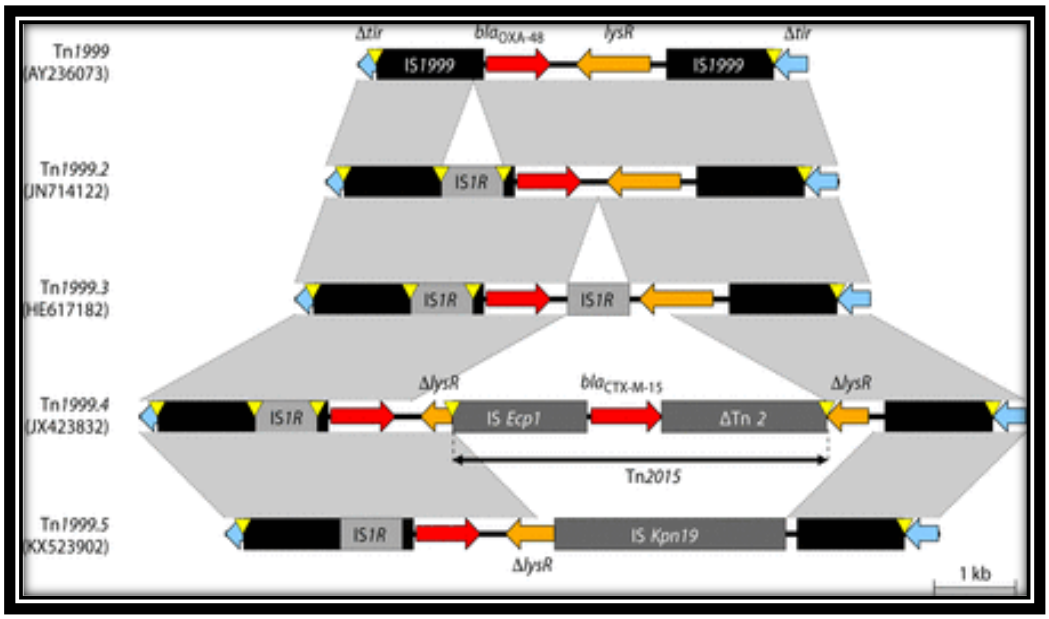


Εικόνα 15 Το γονίδιο blaTEM-52 και η αλληλουχία ένθεσης IS26 (εικόνα από Kiiru, Butaye, Goddeeris , & Kariuki, 2013).

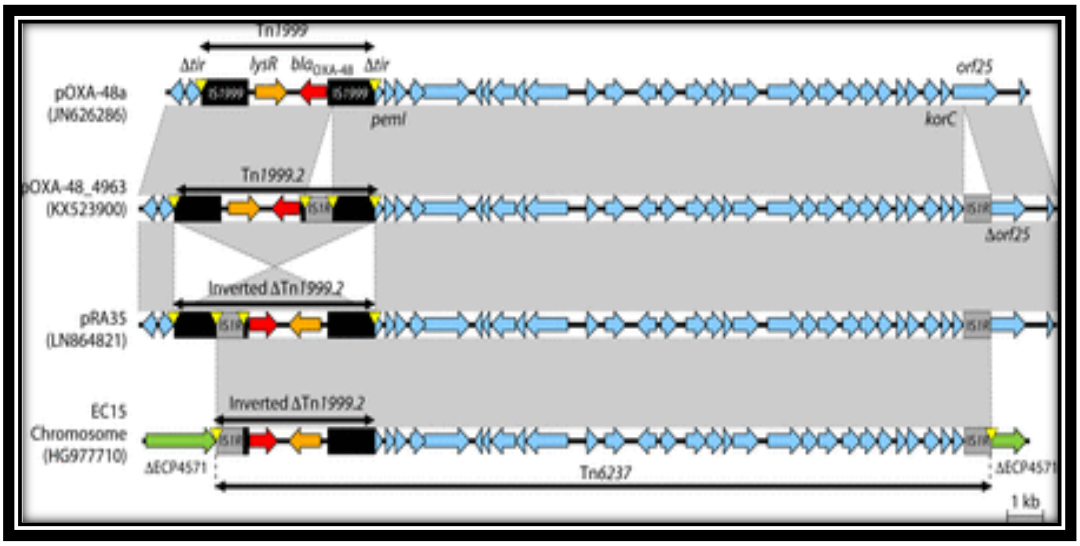
1.4.5 ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ ΤΑΞΗΣ D- OXA-48

Γενικά, οι καρβαπενεμάσες τάξης D (Class D carbapenem-hydrolyzing β-lactamase, CHDLs) δεν αναστέλλονται από κλαβουλανικό οξύ, ταζομπακτάμη και σουλμπακτάμη (εκτός από ελάχιστες εξαιρέσεις), δεν υδρολύουν της εκτεταμένου-φάσματος κεφαλοσπορίνες και εμφανίζουν ήπια υδρολυτική δράση κατά των καρβαπενέμων (Antunes, et al., 2014). Ωστόσο, η OXA-48 εμφανίζει αποτελεσματικότερη δράση έναντι της ιμιπενέμης και υδρολύει τις

στενού φάσματος β-λακτάμες όπως πενικιλλίνες. Ιδιαίτερα σημαντικό είναι το γεγονός πως ενώ CHDLs παρουσιάζουν ασθενή δραστικότητα καρβαπενεμάσης, όταν συνυπάρξουν με άλλους παράγοντες όπως η μειωμένη διαπερατότητα ή με ESBLs εξασφαλίζουν ικανοποιητικά επίπεδα αντοχής στις καρβαπενέμες αλλά και σε κεφαλοσπορίνες. Η πλειοψηφία αυτών των CHDLs (εκτός από το OXA-48) έχει ταυτοποιηθεί σε στελέχη *Acinetobacter* και κυρίως σε *Acinetobacter baumanni*. Ωστόσο, η OXA-48 εντοπίζεται κυρίως σε *Klebsiella pneumoniae* και *Escherichia coli.* Σύμφωνα με μελέτες, το γονίδιο blaOXA-48 εδράζεται σε ένα εξαιρετικά μεταβιβάσιμο αυτο-συζευκτικό πλασμίδιο ομάδας ασυμβατότητας IncL (pOXA-48a) μεγέθους 62 kb (Poirel, Héritier, & Tolün, 2004). Συχνά, το πλασμιδιακό γονίδιο blaOXA-48 πλαισιώνεται από αλληλουχίες IS1999, ένα στοιχείο της οικογένειας IS4 το οποίο εμπλέκεται περαιτέρω για τη μεταφορά του blaOXA-48 σε άλλες γενετικές μονάδες. Η διασπορά του OXA-48 έχει λάβει παγκόσμιες διαστάσεις και εντοπίζεται τόσο στους χώρους υγειονομικής περίθαλψης όσο και στο οικοσύστημα. Η διασπορά του γονιδίου αυτού πιθανότατα οφείλεται στο «επιτυχημένο» αυτό πλασμίδιο (Nordmann & Poirel 2011, Zurfluh et al. 2015, Bouaziz et al. 2017, Oteo et al. 2018, Pulss et al. 2018, Albiger et al 2015, Voulgari et al. 2013). Η επιτυχία αυτή έγκειται στο γεγονός ότι στο συγκεκριμένο πλασμίδιο παρ'όλο που υπήρχε το γονίδιο tyr που κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη αναστολέα μηχανισμών μεταφοράς γενετικού υλικού, διάφορες μεταθέσεις οδήγησαν στην απενεργοποίηση του γονιδίου αυτού. Με αυτόν τον τρόπο το πλασμίδιο αυτό απέκτησε τεράστια κινητικότητα. Έχουν βρεθεί και στελέχη *E.coli* με το γονίδιο blaOXA-48 στο βασικό τους χρωμόσωμα απουσία πλασμιδίων αλλά αποκλειστικά κλινικής προέλευσης λόγω συμβάντων μετάθεσης σε προγονικά στελέχη που φέραν το πλασμίδιο pOXA-48a αλλά και το pR35 με τα ίδια με το παραπάνω μεταθετά στοιχεία (Pitout, Peirano, Kock, Strydom, & Matsumura, 2019).



Εικόνα 16 Τα Tn1999 στοιχεία που έχουν συσχετιστεί με το γονίδιο blaOXA-48 σε διάφορα εντεροβακτηριοειδή.



Εικόνα 17 Η πιθανή προέλευση και το γενετικό περιβάλλον του τρανσποζονίου Tn6237 που περιέχει το blaOXA-48 στο χρωμόσωμα του Escherichia coli.

1.5 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής ήταν η μελέτη των προφίλ αντοχής με τη μέθοδο διάχυσης δίσκων και ο μοριακός έλεγχος στελεχών *E.coli* για την παρουσία των γονιδίων *mcr-1,-2,-3, -4* και *-5*, blaOXA-48 και blaTEM με τη μέθοδο της PCR. Συνολικά ελέγχθηκαν n=36 στελέχη

E.coli. Τα στελέχη αυτά είχαν απομονωθεί από δείγματα λύματος και ποτίστρων, προερχόμενα από ένα βουστάσιο της Λιβαδειάς, το 2014. Αφού απομονώθηκαν στη συνέχεια ταυτοποιήθηκαν και φυλάχθηκαν σε κατάλληλες συνθήκες στη βιοτράπεζα του Εργαστηρίου Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής.

Κεφάλαιο 2. Πειραματικό μέρος

2.1 Έλεγχος επιπέδων ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

Για τον έλεγχο της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά εφαρμόστηκε η μέθοδος διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών σε αγαρ (μέθοδος Kirby Bauer).

Υλικά

Nutrient agar (LAB008, LAB M^{TM}) για της καλλιέργειες

Mueller-Hinton agar για το αντιβιόγραμμα

Ορός NaCl 0,9 M για την παρασκευή βακτηριακού εναιωρήματος

Δίσκοι αντιβιοτικών

Διαδικασία

Μετά τη παρασκευή εναιωρήματος, με απευθείας αιώρηση σε φυσιολογικό ορό (5ml 0,9% NaCl) μεμονωμένων αποικιών από φρέσκο καλλιέργημα σε μη εκλεκτικό υλικό (Nutrient agar), ακολούθησε επίστρωση σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου και η τοποθέτηση των δίσκων αντιβιοτικού.

Για την ανίχνευση των ESBLs πραγματοποιήθηκε το φαινοτυπικό τεστ DDST (Double-Disc Synergy Test), όπου δίσκοι κεφαλοσπορίνης (κεφοταξίμη ή κεφτριαξόνη, κεφταζιδίμη, κεφεπίμη και αζτρεονάμης) εφαρμόζονται δίπλα σε δίσκο που περιέχει κλαβουλανικό οξύ (αμοξικιλλίνης/κλαβουλανικό οξύ, AMC). Το θετικό αποτέλεσμα υποδεικνύεται όταν οι ζώνες αναστολής γύρω από οποιονδήποτε δίσκο κεφαλοσπορίνης αυξάνεται προς την κατεύθυνση του δίσκου που περιέχει κλαβουλανικό οξύ. Ωστόσο, για τις καρβαπενεμάσες OXA-48 δεν υπάρχει διαθέσιμος ειδικός αναστολέας, οπότε η ανίχνευσή της πραγματοποιείται με την μοριακή μέθοδο της PCR.

Πίνακας 2 Δίσκοι αντιβιοτικών και οι περιεκτικότητες τους.

Αντιβιοτικά δισκία	Περιεκτικότητα ανά δισκίο
Αμπικιλλίνη-AMP	10μg
Πιπερακιλλίνη+Ταζομπακτάμη-TZP	36μg
Αμοξυκιλλίνη+Κλαβουλανικό οξύ-AMC	30μg
Κεφαλοθίνη-CEF	30μg
Κεφουροξίμη-CXM	30μg
Κεφταζιδίμη-CAZ	30μg
Κεφοταξίμη-CTX	30μg
Κεφοξιτίνη-FOX	30μg
Κεφεπίμη-FEP	30μg
Κεφτριαξόνη-CRO	30μg
Μεροπενέμη-MEM	10μg
Ερταπενέμη-ERT	10μg
Ιμιπενέμη-IPM	10μg
Αζτρεονάμη-ATM	30μg
Στρεπτομυκίνη-S	10μg
Γενταμυκίνη-GM	10μg
Αμικασίνη-AN	30μg
Σουλφαμεθοξαζόλη+Τριμεθοπρίμη-SXT	25μg
Τικαρκιλλίνη+Κλαβουλανικό οξύ-TCC	85μg
Σιπροφλοξασίνη-CIP	5μg
Ναλιδιξικό οξύ-NAL	30μg

2.2 Έλεγχος παρουσίας γονιδίων αντοχής με την μέθοδο της PCR

Τα 36 περιβαλλλοντικά στελέχη E.coli ελέγχθηκαν για την παρουσία των γονιδίων mcr-1,-2,-3, -4 και -5 με τη μέθοδο της multiplex PCR (Rebelo , et al., 2018). Επιπλέον, τα στελέχη, που με βάση τα αντιβιογράμματα, εμφάνισαν μειωμένη ευαισθησία στις καρβαπενέμες ελέγχθηκαν για την παρουσία του γονιδίου OXA-48 ενώ αυτά που βρέθηκαν θετικά στο DDST ελέγχθηκαν για το γονίδιο TEM με την μέθοδο της συμβατικής PCR (Paterson, et al., 2003). Οι συνθήκες κάθε αντίδρασης καθώς και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στους Πίνακες 2.2.1, 2.2.2, 2.2.3, 2.2.4. Για την PCR χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια και συσκευές:

Αντιδραστήρια

•Water for injection

•DreamTaq DNA polymerase 5 U/μL (Invitrogen-Thermofischer scientific).

•DreamTaq Buffer με MgCl2 (Invitrogen-Thermofischer scientific).

•Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινιτές και στελέχη αναφοράς (**βλ. Π1**).

•dNTPs (Invitrogen-Thermofischer scientific).

Συσκευές

•Θερμικός κυκλοποιητής (PEQLAB primus 25 advanced)

Διαδικασία

Αρχικά, τα στελέχη E.coli καλλιεργήθηκαν σε Nutrient Agar. Για την απομόνωση του ολικού βακτηριακού DNA εφαρμόστηκε η μέθοδος του βρασμού.

Τα βήματα είναι τα εξής:

I. Παρασκευή βακτηριακού εναιωρήματος σε 200 μl αποστειρωμένου νερού (water for injection) και βρασμός για 30 λεπτά στους 100oC.
II. Τοποθέτηση των δειγμάτων στους -20 oC για 5 λεπτά
III. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 11.000 rpm.
IV. Συλλογή του DNA από το υπερκείμενο

Πίνακας 3 Πρωτόκολλο Multiplex PCR για μία αντίδραση.

DreamTaq Buffer 10X (με $MgCl_2$)	2.5μL
dNTPs (10mM)	0.5μL
Primer Forward (10pmol)	1μL (έκαστος)
Primer Reverse (10pmol)	1μL (έκαστος)
Taq DNA polymerase (5U/μL)	0.2μL
Water	8.8μL
DNA	3μL
Τελικός όγκος αντίδρασης	25μL

Πίνακας 4 Πίνακας 2.2.2 Συνθήκες αντίδρασης Multiplex PCR.

Αρχική αποδιάταξη	Στους 94° C για 15’ à 1 κύκλος	
Αποδιάταξη	Στους 94° C για 30’’	25 κύκλοι
Υβριδισμός	Στους 58° C για 90’’	
Επιμήκυνση	Στους 72° C για 60’’	
Τελική επιμήκυνση	Στους 72° C για 10’ à 1 κύκλος	

Πίνακας 5 Πίνακας 2.2.3 Πρωτόκολλο συμβατικής PCR για μία αντίδραση (TEM,OXA-48).

DreamTaq Buffer 10X (με $MgCl_2$)	2.5μL
dNTPs (10mM)	0.5μL
Primer Forward (10pmol)	1μL
Primer Reverse (10pmol)	1μL
Taq DNA polymerase (5U/μL)	0.2μL
Water	16.8μL
DNA	3μL
Τελικός όγκος αντίδρασης	25μL

Πίνακας 6 Συνθήκες αντίδρασης συμβατικής PCR.

Αρχική αποδιάταξη	Στους 94° C για 5’ à 1 κύκλος	
Αποδιάταξη	Στους 94° C για 30’’	35 κύκλοι
Υβριδισμός	Στους 45° C για 90’’	
Επιμήκυνση	Στους 72° C για 60’’	
Τελική επιμήκυνση	Στους 72° C για 10’ à 1 κύκλος	

2.3 Φυλογενετική τυποποίηση (Phylotyping) των στελεχών

Η μέθοδος του Phylotyping, που βασίζεται στην triplex PCR (PCR-based method), αποτελεί έναν εύκολο και γρήγορο τρόπο κατάταξης των στελεχών *E.coli* σε φυλογενετικές ομάδες. Συγκεκριμένα, η κατάταξη των στελεχών στηρίζεται στην ανίχνευση τριών γενετικών στοιχείων (markers), τα οποία είναι: το γονίδιο *chuA,* το γονίδιο *yjaA* και ένας γενετικός τόπος άγνωστης λειτουργίας ο TSPE4.C2 και ταξινομούνται σε τέσσερεις φυλογενετικές ομάδες: A, B1, B2 και D (**βλ. Π1**). Το γονίδιο *chuA* κωδικοποιεί μία βασική πρωτεΐνη της κυτταρικής μεμβράνης του E.coli και λειτουργεί ως υποδοχέας μορίων αίμης (Clermont, Bonacorsi, & Bingen, 2000). Η δομική πρωτεΐνη που κωδικοποιεί το γονίδιο *yjaA* δεν έχει χαρακτηριστεί πλήρως άλλα έχει βρεθεί ότι συμμετέχει σε λειτουργίες του κυττάρου όπως ο σχηματισμός βιοϋμενίων (biofilm), στην απόκριση του κυττάρου σε όξινο pH, στο υπεροξείδιο του υδρογόνου και στο οξειδωτικό stress (Lee , Hiibel, Reardon, & Wood , 2010). Στους πίνακες 2.3.1 και 2.3.2 παρουσιάζονται οι συνθήκες τις αντίδρασης καθώς και ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 7 Πρωτόκολλο TRIPLEX PCR για μία αντίδραση.

DreamTaq Buffer 10x (με $MgCl_2$)	2.5μL
dNTPs (10μM)	0.5μL
Primer Forward (20pmol)	1μL (έκαστος)
Primer Reverse (20pmol)	1μL (έκαστος)
DreamTaq DNA polymerase 5U/μL	0.3μL
Water	12.7μL
DNA	3μL
Τελικός όγκος αντίδρασης	25μL

Πίνακας 8 Συνθήκες αντίδρασης

Αρχική αποδιάταξη	Στους 94° C για 5’ à 1 κύκλος	
Αποδιάταξη	Στους 94° C για 30’’	30 κύκλοι
Υβριδισμός	Στους 55° C για 30’’	
Επέκταση	Στους 72° C για 30’’	
Τελική επέκταση	Στους 72° C για 7’ à 1 κύκλος	

2.4 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πηκτή αγαρόζης.

Υλικά και αντιδραστήρια

•TBE 0,5X (stock 5X).

•Agarose (NIPPON GENETICS).

•Midori Green Advance DNA stain (NIPPON GENETICS).

•BLUE JUICE^{TM} LOADING GEL BUFFER 10X (Invitrogen-Thermofischer scientific).

•TrackIt 100bp DNA Ladder (Invitrogen-Thermofischer scientific).

Συσκευές

•Τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας UV (model TVC-312A SPECTROLINE).

•Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Kisker biotech mschoisetrio) και τροφοδοτικό ρεύματος (Electro power supply-EPS 301,Amersham Bioscience).

Κεφάλαιο 3. Αποτελέσματα

3.1 Αποτελέσματα αντιβιογραμμάτων

Βάσει των αποτελεσμάτων από τα αντιβιογράμματα και σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του EUCAST και του CLSI (**βλ.Π1**) κανένα από τα στελέχη που ελέγχθηκαν δεν ήταν άγριου τύπου. Στους παρακάτω Πίνακες (3.1, 3.2) και Εικόνες (3.1, 3.2) παρουσιάζονται αναλυτικά τα χαρακτηριστικά των στελεχών.

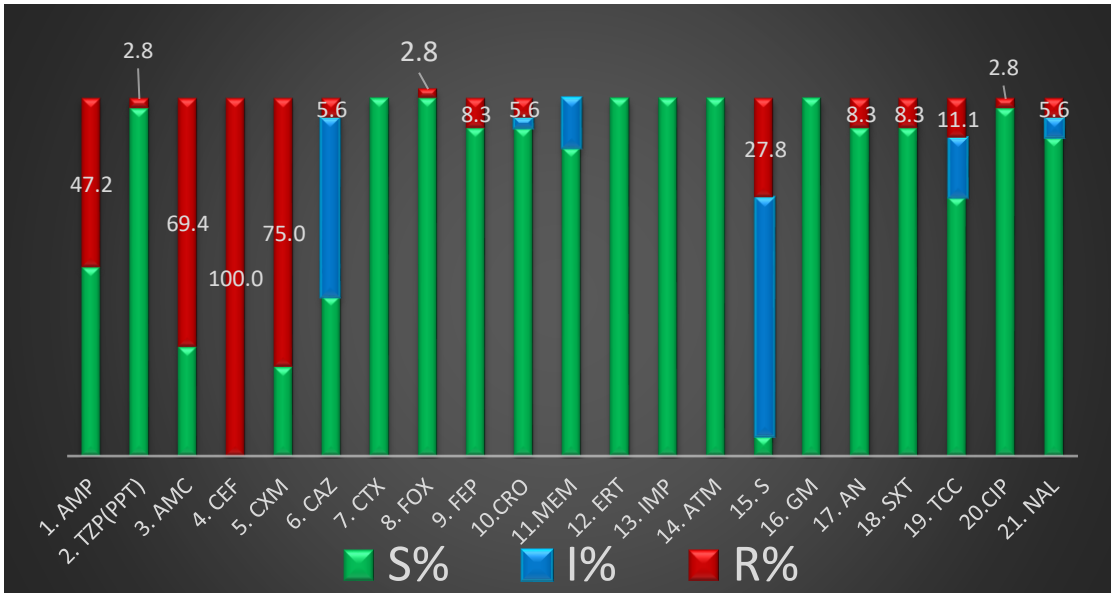
Πίνακας 9 Αποτελέσματα μοριακών και φαινοτυπικών μεθόδων.

Στελέχη	Προφίλ αντοχής	Φαινότυπος	Φυλογενετική ομάδα	Γονίδια αντοχής
147	AMC-CEF-CXM	R	D	-
148	AMP-TZP(PPC)-AMC-CEF-CXM-FEP-S-AN-SXT-TCC-CIP-NAL	XDR	B1	blaTEM
149	CEF-CXM	R	B1	-
150	CEF-CXM	R	B1	-
151	CEF-CXM	R	B1	-
152	AMP-AMC-CEF-CXM-CAZ-S	MDR	B1	-
153	AMC-CEF	R	A	-
154	CEF-CXM	R	A	-
155	CEF-CXM	R	B1	-
156	AMP-CEF-CXM	R	A	-
157	AMP-AMC-CEF-CXM-S-SXT-TCC	MDR	D	blaTEM
158	AMC-CEF-CXM	R	B1	-
159	CEF-CXM-S	R	B1	-
160	AMC-CEF-CXM	R	B1	-
161	AMC-CEF-CXM-S	MDR	B1	-
162	AMP-AMC-CEF-CXM	R	B1	-
163	AMP-AMC-CEF-CXM-S-SXT-TCC	MDR	D	blaTEM
164	CEF-CXM	R	B1	-
175	AMP-AMC-CEF-CXM	R	D	-
176	AMP-AMC-CEF	R	B1	-
177	AMP-AMC-CEF-S	MDR	B1	-
178	AMP-CEF-CXM	R	B1	-
179	AMP-AMC-CEF	MDR	B1	-
180	AMC-CEF-CXM	R	B1	-
181	AMP-CEF-CXM-S	MDR	B1	-
182	AMP-AMC-CEF	R	B1	-
199	AMC-CEF-CXM-S	R	A	-

200	AMC-CEF	R	B1	-
201	AMC-CEF	R	B1	-
202	AMP-AMC-CEF-CXM-CAZ-FOX	R	B1	-
203	AMP-AMC-CEF-CXM	R	A	-
204	AMP-AMC-CEF-CXM	R	A	-
205	CEF-CXM	R	B1	-
206	AMP-CEF	R	B1	-
207	AMC-CEF-CXM	R	A	-
208	AMC-CEF	R	B1	-

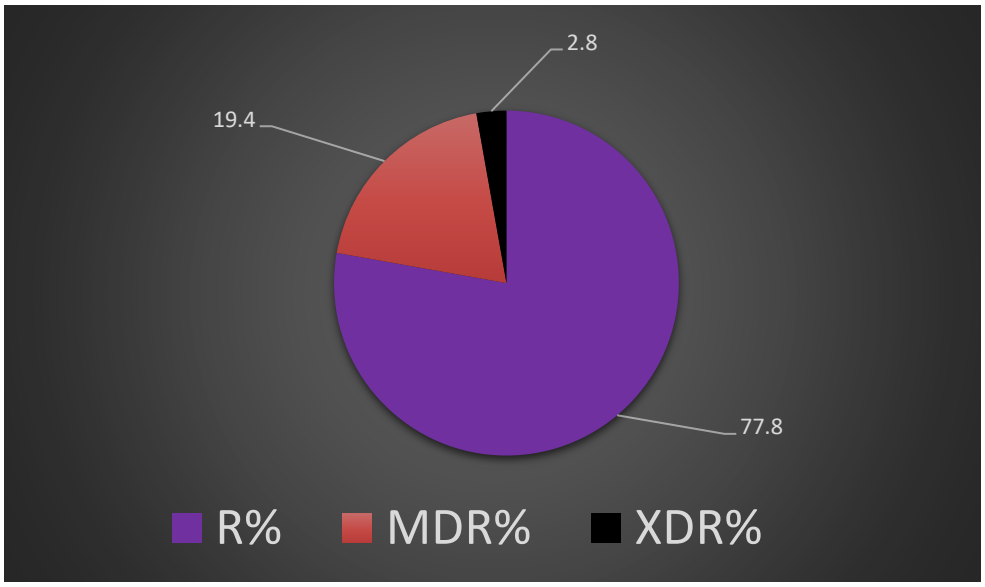
Πίνακας 10 Το συνολικό ποσοστό των φαινοτύπων σε κάθε αντιβιοτικό.

Αντιβιοτικά/Φαινότυπος	S%	I%	R%
1. AMP	52,8	0,0	47,2
2. TZP(PPT)	97,2	0,0	2,8
3. AMC	30,6	0,0	69,4
4. CEF	0,0	0,0	100,0
5. CXM	25,0	0,0	75,0
6. CAZ	44,4	50,0	5,6
7. CTX	100,0	0,0	0,0
8. FOX	97,2	0,0	2,8
9. FEP	91,7	0,0	8,3
10.CRO	91,7	2,8	5,6
11.MEM	86,1	13,9	0,0
12. ERT	100,0	0,0	0,0
13. IMP	100,0	0,0	0,0
14. ATM	100,0	0,0	0,0
15. S	5,6	66,7	27,8
16. GM	100,0	0,0	0,0
17. AN	91,7	0,0	8,3
18. SXT	91,7	0,0	8,3
19. TCC	72,2	16,7	11,1
20.CIP	97,2	0,0	2,8
21. NAL	88,9	5,6	5,6



Εικόνα 18 Η ποσοστιαία κατανομή των τριών φαινοτύπων των στελεχών στα 21 αντιβιοτικά που εξετάσθηκαν: S→Susceptible/Ευαίσθητο, I→Intermediate/Μειωμένη ευαισθησία, R→Resistant/Ανθεκτικό.

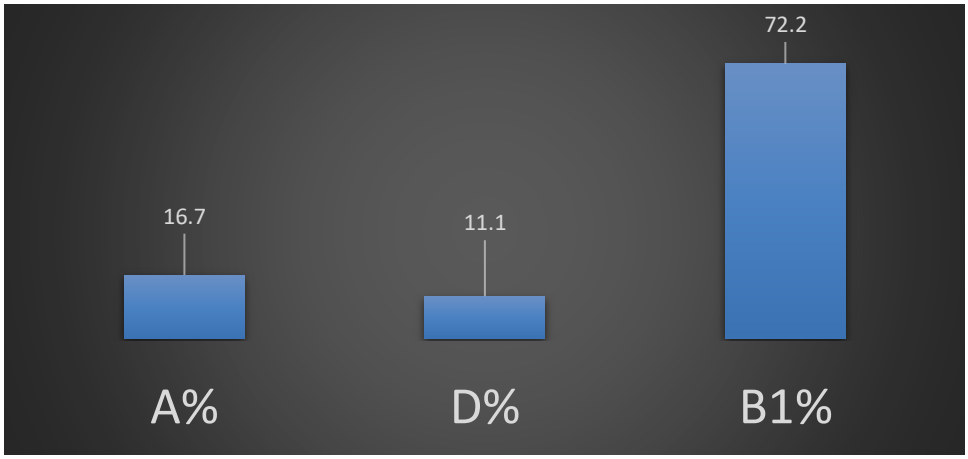
Όλα τα στελέχη παρουσίασαν αντοχή τουλάχιστον σε ένα αντιβιοτικό. Αρκετά ήταν πολυανθετικά (MDR, Multi drug resistant) καθώς εμφάνισαν αντοχή σε τρείς ή και παραπάνω ομάδες αντιβιοτικών. Τα στελέχη με εκτεταμένη αντοχή (XDR, Extensively drug resistant) παρουσιάζουν αντοχή σε όλα εκτός από μία ή δύο ομάδες αντιβιοτικών (Basak, Singh, & Rajurkar, 2016).



Εικόνα 19 Τα ποσοστά επί τις εκατό των στελεχών που ανήκουν στους παραπάνω φαινότυπους.

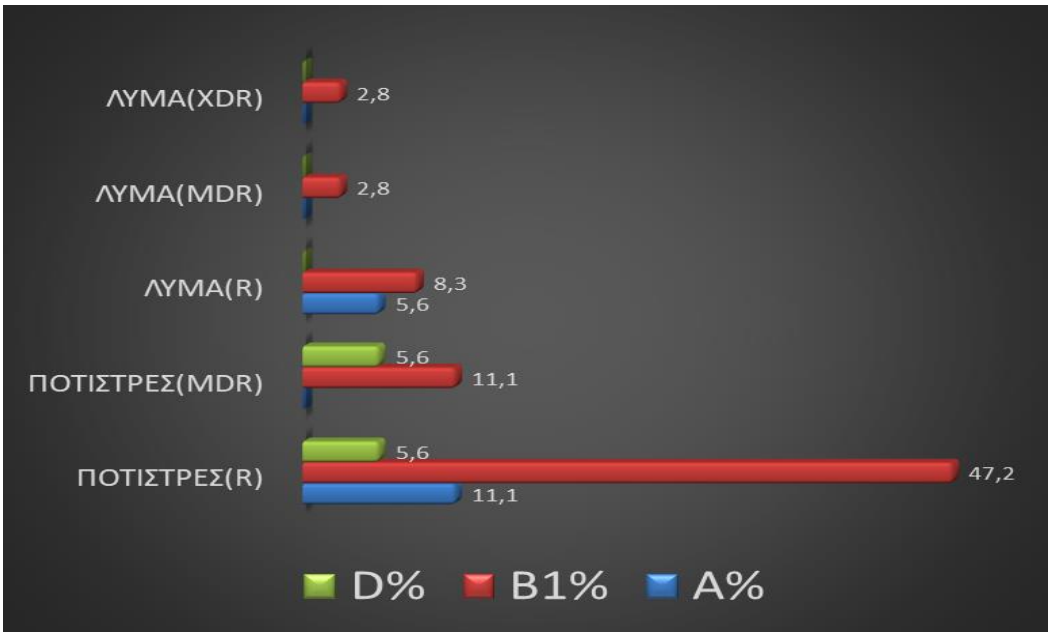
3.2 Αποτελέσματα της PCR για την φυλογενετική τυποποίηση των στελεχών-Phylotyping

Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα τις τυποποιητικής μεθόδου (Triplex PCR) σε ποσοστά επί τις στην **Εικόνα 3.2.1** ενώ στην **Εικόνα 3.2.2** τα στελέχη ταξινομούνται βάση της φυλογενετικής ομάδας όπου ανήκουν σε συνδυασμό με την προέλευση του δείγματος. Στην **Εικόνα 3.2.3** συνδυάζονται τα αποτελέσματα της τυποποίησης των στελεχών *E.coli*, των φαινοτύπων που προέκυψαν από τα αντιβιογράμματα και από την προέλευση των στελεχών (ποτίστρες ή λύμα).



Εικόνα 20 Φυλογενετική ταξινόμηση στις ομάδες A,B1 και D.

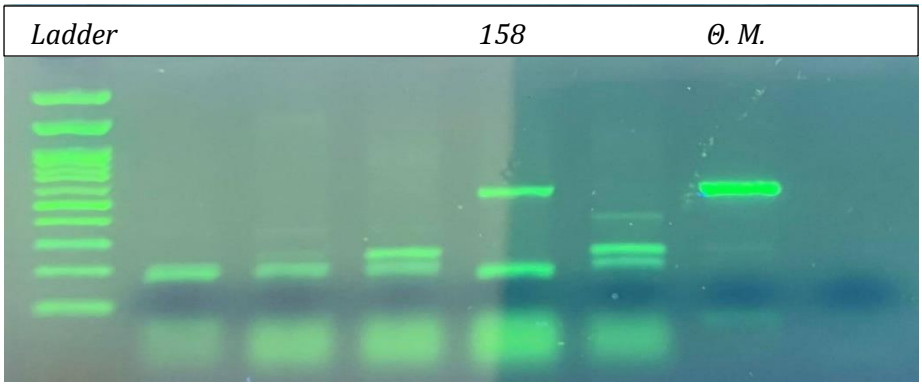
Εικόνα 21 Προέλευση των στελεχών E.coli σε συνδυασμό με τις φυλογενετικές ομάδες που ανήκουν.



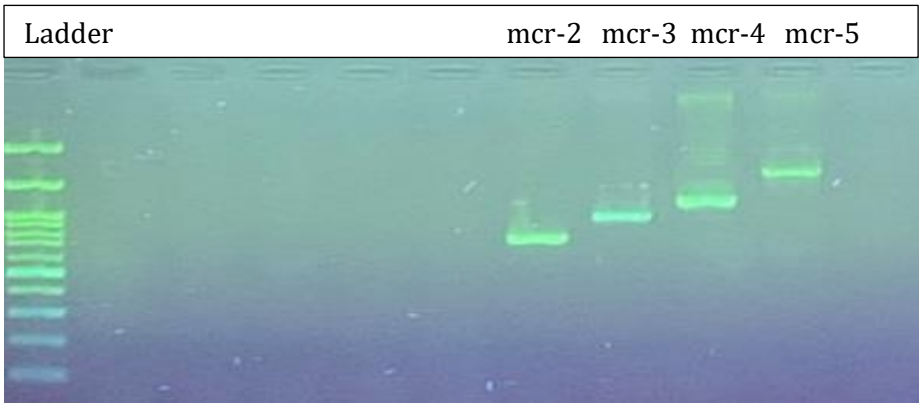
Εικόνα 22 Η ποσοστιαία κατανομή των στελεχών στους φαινοτύπους R, MDR, XDR σε συνδυασμό με την φυλογενετική ομάδα και την προέλευση του δείγματος από όπου απομονώθηκαν.

3.3 Αποτελέσματα της PCR για την ανίχνευση γονιδίων αντοχής

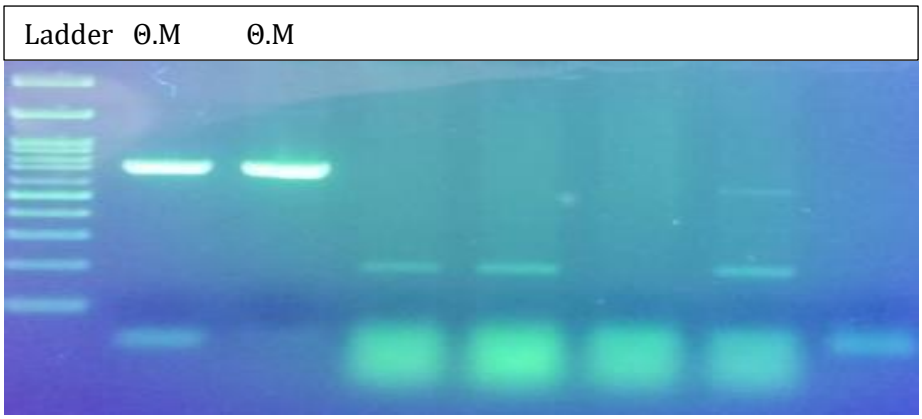
Σύμφωνα με τον **Πίνακα 3.1.1** εντοπίστηκαν 3 στελέχη να φέρουν τα γονίδια αντοχής blaTEM, ενώ κανένα στέλεχος δεν βρέθηκε να φέρει άλλα γονίδια αντοχής. Παρακάτω παρουσιάζονται παραδείγματα από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης PCR:



Εικόνα 23 Αποτέλεσμα της PCR για την ανίχνευση του γονιδίου blaTEM.



Εικόνα 24 Αποτελέσματα της PCR για την ανίχνευση των γονιδίων mcr-2,-3,-4,-5.



Εικόνα 25 Αποτελέσματα της PCR για την ανίχνευση του γονιδίου blaOXA-48

Κεφάλαιο 4. Συζήτηση – Συμπεράσματα

4.1 Ανακεφαλαίωση

Τα κυριότερα συμπεράσματα τις συγκεκριμένης έρευνας παρατίθενται παρακάτω:

1. Κανένα από τα εξεταζόμενα στελέχη δεν ήτανε άγριου τύπου.
2. Όλα τα στελέχη ήτανε ανθεκτικά στην κεφαλοθίνη (CEF).
3. Το μεγαλύτερο ποσοστό των στελεχών ήτανε ανθεκτικό , ενώ το υπόλοιπο πολυανθεκτικό (MDR), και ένα στέλεχος εξαιρετικά ανθεκτικό (XDR).
4. Δεν βρέθηκε κανένα στέλεχος να φέρει τα γονίδια mcr-1,-2,-3,-4,-5.
5. Δεν βρέθηκε κανένα στέλεχος να φέρει το γονίδιο blaOXA-48.
6. Τρία στελέχη φέραν το γονίδιο blaTEM.
7. Η φυλογενετική ομάδα που επικράτησε ήταν η B1, ακολουθούμενη από την A και την D αντιστοίχως, ενώ κανέναν δεν κατατάχθηκε στην ομάδα B2.
8. Τα στελέχη 148, 157 και 163 κατατάχθηκαν στις ομάδες D και B1 αντίστοιχα και φέραν τα blaTEM γονίδια και υπέδειξαν εξαιρετικά πολυανθεκτικό και πολυανθεκτικό φαινότυπο αντίστοιχα.
9. Βάσει του τυποποιητικού σχήματος το σύνολο των στελεχών βρέθηκε να ανήκει στην B1 φυλογενετική ομάδα με ποσοστό 72,2%, στην A ομάδα με ποσοστό 16,7% και στην ομάδα D με ποσοστό 11,%.

4.2 Συζήτηση/Συμπεράσματα

Τα ανησυχητικά επίπεδα αντιμικροβιακής αντοχής, είναι ένα ζήτημα που απασχολεί όχι μόνο την ιατρική αλλά και την κτηνιατρική. Το φαινόμενο αυτό πλέον αναγνωρίζεται ως ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα του σύγχρονου κόσμου και αποτελεί απειλή για τη παγκόσμια υγεία. Για αυτό τον λόγο, από το 2015, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ), ο Διεθνής Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) και ο Παγκόσμιος Οργανισμός για την Υγεία των Ζώων (World Organisation for Animal Health, OIE), συντάχθηκαν για να αντιμετωπίζουν συλλογικά το πρόβλημα της αντιμικροβιακής αντοχής καθώς και άλλων υφιστάμενων ζητημάτων (Rousham , Unicomb , & Islam , 2018). Το σχέδιο δράσης για την καταπολέμηση της αντιμικροβιακής αντοχής βασίζεται στους άξονες της επιτήρησης της υπεύθυνης χρήσης των αντιβιοτικών στον άνθρωπο, στην κτηνιατρική/κτηνοτροφία και στο περιβάλλον.

Η χρήση αντιβιοτικών, στους χώρους υγειονομικής περίθαλψης, στην γεωργία, την κτηνιατρική/κτηνοτροφία, στις υδατοκαλλιέργειες, αναγνωρίζεται ως ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που τροφοδοτούν την αντοχή στα αντιβιοτικά. Η υπερβολική χρήση και η κατάχρηση των αντιμικροβιακών ασκεί επιλεκτική πίεση, τόσο στους βακτηριακούς πληθυσμούς της φυσιολογικής χλωρίδας των ανθρώπων και των ζώων όσο και στους περιβαλλοντικούς βακτηριακούς πληθυσμούς, ενισχύοντας την επικράτηση των ανθεκτικών στελεχών και την μεταφορά χαρακτηριστικών που προσδίδουν (WHO, Antimicrobial resistance: global report on surveillance , 2014), (Novo , André , Viana, Nunes, & Manaia , 2013).

Στα κλινικά περιβάλλοντα το φαινόμενο της αντοχής έχει εκτενώς χαρακτηριστεί και μελετηθεί ενώ αντίθετα τα δεδομένα και οι μελέτες σχετικά με την αντοχή στο περιβάλλον είναι πολύ περιορισμένες.

Τόσο τα υδάτινα οικοσυστήματα όσο και τα λύματα παίζουν σημαντικό ρόλο ως δεξαμενές ανθεκτικών βακτηρίων. Τα βακτήρια αναπτύσσουν ανθεκτικότητα έναντι των αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται στις υγειονομικές μονάδες, στη γεωργία και στην κτηνοτροφία ή στους ρύπους από τη βιομηχανία με την απόκτηση κινητών γενετικών στοιχείων (πλασμίδια, ιντεγκρόνια). Χαρακτηριστικό παράδειγμα πλασμιδιακών γονιδίων είναι τα *mcr*, τα οποία προσδίδουν αντοχή στην κολιστίνη. Τα γονίδια *mcr* έχουν εντοπιστεί κυρίως σε εντεροβακτηριακά, και πιο συχνά σε στελέχη *E.coli,* τόσο σε κλινικά όσο και περιβαλλοντικά.

Το 2016 στην Κίνα το *mcr-1* εντοπίστηκε σε στέλεχος *E.coli* που απομονώθηκε από δείγμα νερού από ποτίστρα πουλερικών, καθώς και σε στελέχη *E.coli* που απομονώθηκαν από νερά σε σφαγεία πουλερικών και χοίρων. Πιο πρόσφατα τον Ιανουάριο του 2020, έγινε η πρώτη αναφορά *mcr*-1 γονίδιου στην Ελλάδα, σε στελέχη *E. coli* που απομονώθηκαν από το γάλα άρρωστων ζώων (Filioussis , et al., 2020). Τέλος μια αναδρομική έρευνα του 2016 που διεξήχθη στην Κίνα, αποκάλυψε την παρουσία του γονιδίου *mcr-1* σε στελέχη *E.coli* που είχαν απομονωθεί από πουλερικά, κατά το χρονικό διάστημα 1970-2014, βοηθώντας στην συλλογή πολύτιμων επιδημιολογικών δεδομένων σχετικά με την διασπορά των μηχανισμών αντοχής.

Στην παρούσα εργασία στελέχη *E.coli*, που είχαν απομονωθεί το 2014 από λιμνάζοντα νερά (απόβλητα) και νερά από ποτίστρες τριών διαφορετικών βουστασίων της Λειβαδιάς, ελέγχθηκαν για την ευαισθησία τους στα αντιβιοτικά και την παρουσία γονιδίων *mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4* και *mcr-5*, καθώς και άλλων γονιδίων αντοχής (*TEM* και *OXA-48*). Από τα στελέχη *E.coli* που ελέγχθηκαν κανένα δεν ήταν *mcr*-θετικό. Ωστόσο, τρία από αυτά βρέθηκαν θετικά για το πλασμιδιακό γονίδιο TEM, που προσδίδει αντοχή στις εκτεταμένου φάσματος β-λακτάμες. Επίσης, κανένα από αυτά δεν ήταν άγριου τύπου. Το 19,4% των στελεχών χαρακτηρίστηκε ως πολυανθεκτικά (MDR) και το 77,8% ως ανθεκτικά (R). Δεδομένου ότι τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα εργασία εφαρμόζονται ευρέως στην κλινική πράξη, τα υψηλά επίπεδα αντοχής εγείρουν ιδιαίτερες ανησυχίες. Επιπρόσθετα, βάσει της τυποποιητικής τεχνικής (Phylogrouping) το μεγαλύτερο ποσοστό των στελεχών κατατάχθηκε στην φυλογενετική ομάδα Β1. Η ομάδα αυτή χαρακτηρίζεται από την παρουσία δύο γονιδίων, τα οποία είναι γνωστό ότι συμβάλουν στην παθογένεια των βακτηρίων *E. coli*. Επίσης, σε αρκετές έρευνες τα στελέχη *E.coli* της ομάδα Β1 θεωρούνται ότι ευθύνονται για τις πιο σοβαρές λοιμώξεις.

Το βακτήριο *E.coli* απαντάται στο έδαφος και στο υδάτινο οικοσύστημα, ενώ παράλληλα συγκαταλέγεται στα πιο κοινά παθογόνα του ανθρώπου και ευθύνεται για πολλές λοιμώξεις της κοινότητας και του νοσοκομείου. Ταυτόχρονα, θεωρείται βασικός δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης, τόσο του πρωτογενούς, όσο και του επεξεργασμένου νερού και επομένως αποτελεί υποχρεωτική μικροβιολογική παράμετρο ελέγχου του νερού, σύμφωνα με την ελληνική (Ποιότητα νερών, ΚΕΕΛΠΝΟ 2014, 282/Β/19-9-2017, Κ.Υ.Α.Γ.δ.Γ.ο) και ευρωπαϊκή νομοθεσία (ΚΥΑ Γ1(δ)/ ΓΠ οικ.67322).

Επομένως, η ανίχνευση ανθεκτικών και πολυανθεκτικών στελεχών *E.coli* σε δείγμα λύματος και ποτίστρων βουστασίων είναι ιδιαίτερα ανησυχητική. Αυτό υποδηλώνει πως τα

ανθεκτικά αυτά στελέχη προέρχονταν από τη μικροβιολογική χλωρίδα του εντέρου αυτών των ζώων παραγωγής, γεγονός που μπορεί να συσχετιστεί με τη διασπορά της αντοχής στον άνθρωπο, μέσω της κατανάλωσης κρέατος. Επιπρόσθετα, δεδομένου ότι το λύμα αυτό καταλήγει σε ποτάμια ή επαναχρησιμοποιείται για την άρδευση, αποτελεί μέσο διασποράς των ανθεκτικών βακτηρίων στο ευρύτερο περιβάλλον.

Συμπερασματικά είναι ιδιαίτερα σημαντικό να πραγματοποιούνται συστηματικές μελέτες σε δείγματα ποικίλων υδάτινων οικοσυστημάτων που θα στοχεύουν στον έλεγχο της μικροβιακής αντοχής και των μηχανισμών αντοχής των στελεχών *E.coli*, στην ανάλυση του γενετικού υποβάθρου καθώς και στην ανίχνευση των κυκλοφορούντων γονοτύπων.

Βιβλιογραφία

Andersen, J., He, G.-X., Kakarla , P., Ranjana, K., Kumar, S., Lakra, W., . . . Varela, M. (2015). Multidrug Efflux Pumps from Enterobacteriaceae, Vibrio cholerae and Staphylococcus aureus Bacterial Food Pathogens.

Antunes, N., & . Fisher, J. (2014). Acquired Class D β-Lactamases.

Babakhani, S., & Oloomi, M. (2018). Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria.

Basak, S., Singh, P., & Rajurkar, M. (2016). Multidrug Resistant and Extensively Drug Resistant Bacteria: A Study.

Bonardi , S., & Pitino, R. (2019). Carbapenemase-producing bacteria in food-producing animals, wildlife and environment: A challenge for human health.

Greenwood, D., Slack, R., Peutherer, J., & Barer, M. (2016). *ΙΑΤΡΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ.* Broken Hill.

Hammerl, J., Borowiak, M., Schmoge, 1., Shamoun, D., Grobbel, M., Malorny, ,., . . . Kasbohrer, A. (2018). mcr-5 and a novel mcr-5.2 variant in Escherichia coli isolates from food and food-producing animals, Germany, 2010 to 2017.

Mulvey, M., & Simor, A. (2009). Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be?

Pérez-Etayo, L., Berzosa , M., Go, D., & Vitas , A. (2018). Prevalence of Integrons and Insertion Sequences in ESBL-Producing E. coli Isolated from Different Sources in Navarra, Spain.

Pitout, J., Peirano, G., Kock, M., Strydom, K.-A., & Matsumura, Y. (2019). The Global Ascendency of OXA-48-Type Carbapenemases.

Rousham, E., Unicomb, L., & Islam, M. (2018). Human, animal and environmental contributors to antibiotic resistance in low-resource settings: integrating behavioural, epidemiological and One Health approaches.

Yin, W., Li, H., Shen, Y., Liu, Z., Wang, S., Shen, Z., . . . Wang, Y. (2017). Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene mcr-3 in Escherichia coli.

Zurfluh, K., Nüesch-Inderbinen, M., Poirel, L., Nordmann, P., Hächler, H., & Stephan, R. (2015). Emergence of Escherichia coli producing OXA-48 β-lactamase in the community in Switzerland.

Aghapour, Z., Gholizadeh, P., Ganbarov, K., Bialvaei, A., Mahmood, S., Tanomand, A., . . . Kafil, H. (2019). Molecular mechanisms related to colistin resistance in Enterobacteriaceae.

Albiger , B., Glasner , C., Struelens , M., Grundmann , H., & Monnet , D. (2015). Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: assessment by national experts from 38 countries.

Ambler, R. (1980). The structure of β-lactamases.

Anthony RM Coates, G. H. (2011). REVIEW: Novel classes of antibiotics or more of the same? *British Journal of Pharmacology*.

Antunes, N., Lamoureaux, T., Toth, M., Stewart, N., Frase, H., & Vakulenko, S. (2014). Class D β-Lactamases: Are They All Carbapenemases?

Babic , M., Hujer , A., & Bonomo , R. (2006). What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases.

Bailey , J., Pinyon , J., Anantham , S., & Hall , R. (2011). Distribution of the blaTEM gene and blaTEM-containing transposons in commensal Escherichia coli.

Bernardo, F., & Vargas-Maya, N. (2017). Escherichia coli as a Model Organism and Its Application in Biotechnology. In A. Samie, *Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications.*

Borowiak, M., Fischer, J., Hammerl, J., Hendriksen, R., Szabo, I., & Burkhard , M. (2017). Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, mcr-5, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi B.

Bouaziz , A., Loucif, L., Ayachi , A., Guehaz , K., Bendjama , E., & Rolain , J. (2017). Migratory White Stork (Ciconia ciconia): A Potential Vector of the OXA-48-Producing Escherichia coli ST38 Clone in Algeria.

Bradford, P. (2001). [24] Extended-Spectrum β-Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat.

Bradford, P., & Bush , K. (2016). b-Lactams and b-Lactamase Inhibitors: An Overview.

Bush, K., Jacoby, G., & Medeiros, A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure.

Carattoli , A., Villa , L., Feudi , C., Curcio , L., Orsini, S., Luppi , A., . . . Magistrali , C. (2017). Novel plasmid-mediated colistin resistance mcr-4 gene in Salmonella and Escherichia coli, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016.

Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2000). Rapid and Simple Determination of the Escherichia coli Phylogenetic Group.

FAO-OIE-WHO. (2010). The FAO-OIE-WHO Collaboration .

Filioussis , G., Kachrimanidou , M., Christodoulopoulos, G., Kyritsi , M., Hadjichristodoulou, C., Adamopoulou, M., . . . Grinberg , A. (2020). Short communication: Bovine mastitis caused by a multidrug-resistant, mcr-1-positive (colistin-resistant), extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli clone on a Greek dairy farm.

FORD, M. (2019). *MEDICAL MICROBIOLOGY.* OXFORD: OXFORD UNIVERSITY PRESS.

Gillings, M. R. (2014). *Integrons: Past, Present, and Future.*

Jose M. Munita, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance.

Kiiru , J., Butaye, P., Goddeeris , B., & Kariuki, S. (2013). Analysis for prevalence and physical linkages amongst integrons, ISEcp1, ISCR1, Tn21 and Tn7 encountered in Escherichia coli strains from hospitalized and non-hospitalized patients in Kenya during a 19-year period (1992-2011).

Krebs, J., Coldstein, E., & Kilpatrick, S. (2012). *LEWIN GONIDIA X.* Broken HiLL,Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.

Lee , J., Hiibel, S., Reardon, K., & Wood , T. (2010). Identification of stress-related proteins in Escherichia coli using the pollutant cis-dichloroethylene.

Liu , Y., Wang, Y., Walsh , T., Yi , L., Zhang , R., Spencer , J., . . . Shen , J. (2015). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study.

Lowy, F., & Furuya, Y. (2006). Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting.

Merijn, L., Salverda, J., Arjan , G., & Barlow, M. (2010). Natural evolution of TEM-1 β-lactamase: experimental reconstruction and clinical relevance.

Mims, C., Playfair, J., Roitt, I., & Wakelin, D. (2010). *Μικροβιολογία.* ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ Π.Χ ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ.

Munoz-Price, ,. (2019). Extended-spectrum beta-lactamases.

MURRAY, P., RESENTHAL, S., & PFALLER, A. (2016). *ΙΑΤΡΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ.* ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΚΔΟΣΗΣ ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ Α.Ε.

Nordmann, P., Naas , T., & Poirel , L. (2011). Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae.

Oteo , J., Mencía , A., Bautista , V., Pastor , N., Lara , N., González-González , F., & García-Peña , F. (2018). Colonization with Enterobacteriaceae-Producing ESBLs, AmpCs, and OXA-48 in Wild Avian Species, Spain 2015-2016.

Palzkill, T. (2012). Metallo-β-lactamase structure and function.

Partridge, S., Kwong, S., Firth, N., & Jenses, S. (2018). *Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance.*

Paterson, D., Hujer, K., Hujer , A., Yeiser, B., Bonomo, M., Rice, L., . . . International Klebsiella Study Group. (2003). Extended-Spectrum -Lactamases in Klebsiella pneumoniae.

Ploy , M., Lambert, T., Couty , J., & Denis , F. (2000). Integrons: an antibiotic resistance gene capture and expression system.

Poirel , L., Madec , J., Lupo , A., Schink , A., Kieffer , N., Nordmann , P., & Schwarz, S. (2018, July 12). Antimicrobial Resistance in Escherichia coli. *Microbiology spectrum*, p. 41.

Poirel, L., Héritier, C., & Tolün, V. (2004). Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in Klebsiella pneumoniae.

Pormohammad, A., Nasiri, M., & Azimi, T. (2019). Prevalence of antibiotic resistance in Escherichia coli strains simultaneously isolated from humans, animals, food, and the environment: a systematic review and meta-analysis.

Pulss, S., Stolle, I., Stamm, I., Leidner , U., Heydel, C., Semmler, T., . . . Ewers, C. (2018). Multispecies and Clonal Dissemination of OXA-48 Carbapenemase in Enterobacteriaceae From Companion Animals in Germany, 2009—2016.

Rebelo , A., Bortolaia , V., Kjeldgaard , J., Pedersen ,, S., Leekitcharoenphon, P., Hansen , I., . . . Hendriksen , R. (2018). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes.

Singh , N., Singhal , N., & Virdi, J. (2018). Genetic Environment of blaTEM-1, blaCTX-M-15, blaCMY-42 and Characterization of Integrons of Escherichia coli Isolated From an Indian Urban Aquatic Environment.

Smet, A., Martel , A., Persoons, D., Dewulf , J., Heyndrickx , M., Herman, L., . . . Butaye , P. (2010). [25] Broad-spectrum β-lactamases among Enterobacteriaceae of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health.

Tortora , G., Berdell, F., & Case , C. (2017). *Εισαγωγή στη Μικροβιολογία 2η έκδοση* (Τόμ. 16). Broken Hill. Ανάκτηση 9 22, 1998, από Ariadne: http://www.ariadne.ac.uk/issue16/cover

Tropp, B. (2014). *Βασικές αρχές μοριακής βιολογίας.*

TUSOM-PHARMAWIKI. (n.d.). Retrieved from betalactam_pharm: http://tmedweb.tulane.edu/pharmwiki/doku.php/betalactam_pharm

van Hoek, A., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A., & Aarts, H. (2011). Acquired Antibiotic Resistance Genes: An Overview.

Voulgari , E., Zarkotou , O., Ranellou , K., Karageorgopoulos , D., Vrioni , G., Mamali , V., . . . Tsakris , A. (2013). Outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae in Greece involving an ST11 clone.

Watchon, J., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M., & Losick, R. (2017). *Μοριακή Βιολογία του Γονιδίου.* Εκδόσεις Utopia.

White, P., Mclver, C., & Rawlinson, W. (2001). *Integrons and Gene Cassettes in theEnterobacteriaceae.*

WHO. (2018). *Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS)* . Retrieved from The detection and reporting of colistin resistance : https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/277175/WHO-WSI-AMR-2018.4-eng.pdf

Xavier, B., Lammens, C., Ruhal, R., Kumar-Singh, S., Butaye, P., Goossens, H., & Malhotra-Kumar, S. (2016). Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in Escherichia coli, Belgium, June 2016.

Διολή, Χ. (2017). *Μελέτη των κλινικών στελεχών Kpneumoniae που παράγουν την καρβαπενεμάση OXA-48 τα οποία στάλθηκαν στο Κεντρικό Εργαστήριο Δημόσιας Υγείας το πρώτο εξάμηνο του 2017.* Αθήνα: ΕΘΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ.

Λεμπέση, Ε. (2013). Αντοχή στα β-λακταμικά.

Μικροβιακή Ανθεκτικότητα και Νοσοκομειακές Λοιμώξεις. (χ.χ.). Ανάκτηση από Υπουργείο Υγείας Κύπρου: https://www.moh.gov.cy/moh/moh.nsf/All/6B4121829D8502A5C2257C210026E74C

Παράρτημα 1

ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ (5'-3'):

Εκκινητές	**Αλληλουχία εκκινητών (5'-3')**
*mcr1*_320bp_fw	AGTCCGTTTGTTCTTGTGGC
*mcr1*_320bp_rev	AGATCCTTGGTCTCGGCTTG
*mcr2*_700bp_fw	CAAGTGTGTTGGTCGCAGTT
*mcr2*_700bp_rev	TCTAGCCCGACAAGCATACC
*mcr3*_900bp_fw	AAATAAAAATTGTTCCGCTTATG
*mcr3*_900bp_rev	AATGGAGATCCCCGTTTTT
*mcr4*_1100bp_fw	TCACTTTCATCACTGCGTTG
*mcr4*_1100bp_rev	TTGGTCCATGACTACCAATG
mcr5_1644bp_fw	ATGCGGTTGTCTGCATTTATC
*mcr5*_1644bp_rev	TCATTGTGGTTGTCCTTTTCTG

Εκκινητές	**Αλληλουχία εκκινητών (5'-3')**
ChuA_279bp_fw	GACGAACCAACGGTCAGGAT
ChuA_279bp_rev	TGCCGCCAGTACCAAAGACA
YjaA_211bp_fw	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG
YjaA_211bp_rev	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC
TspE4C2_152bp_fw	GAGTAATGTCGGGGCATTCA

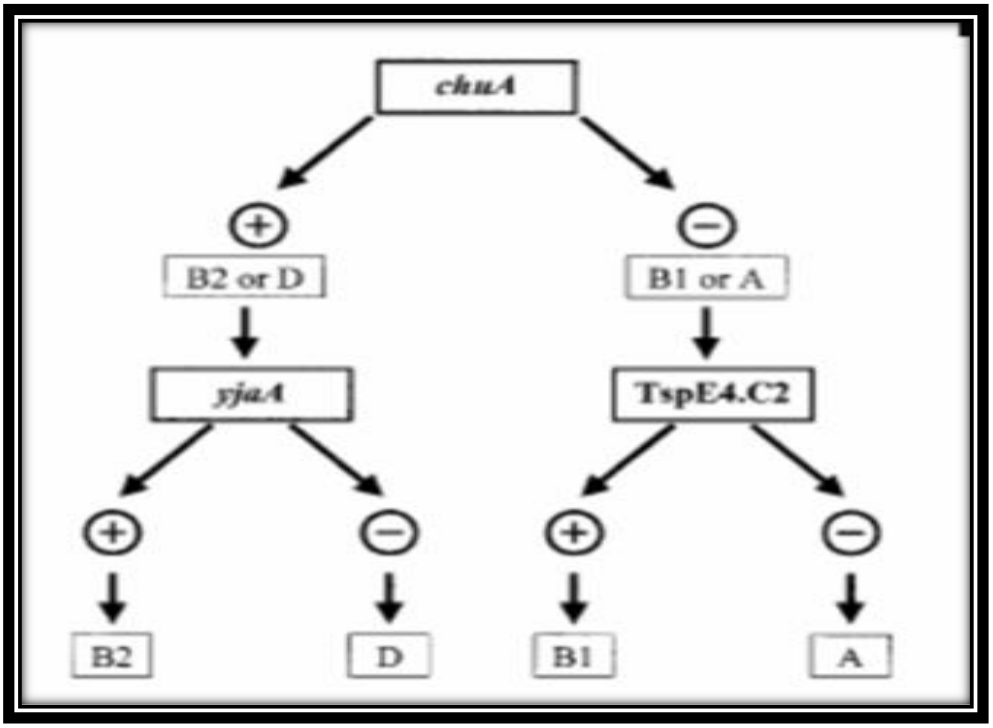
Εκκινητές	**Αλληλουχία εκκινητών (5'-3')**
TspE4C2_152bp_rev	CGCGCCAACAAAGTATTACG

Εκκινητές	**Αλληλουχία εκκινητών (5'-3')**
TEM_600bp_fw	AAACGCTGGTGAAAGTA
TEM_600bp_rev	AGCGATCTGTCTAT
OXA-48_800bp_fw	GCGTGGTTAAGGATGAACAC
OXA-48_800bp_rev	CATCAAGTTCAACCCAACCG

<u>Στελέχη αναφοράς:</u>

mcr-1	Escherichia coli 2012–60–1176–27
mcr-2	E. coli KP37
mcr-3	E. coli 2013-SQ352
mcr-4	E. coli DH5α
mcr-5	Salmonella 13-SA01718
ChuA,YjaA,TspE4C2	E. coli ATCC 222523
OXA-48 και TEM	Χρησιμοποιήθηκαν στελέχη που υπήρχαν στο εργαστήριο και είχανε βρεθεί θετικά για τα αντίστοιχα γονίδια.

Ιστοσελίδες για την αξιολόγηση των αντιβιογραμμάτων:

- EUCAST ECV VALUES: https://mic.eucast.org/Eucast2/
- CLSI M100-ED29:2019 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 29th free edition: http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20M100%20ED29:2019&scope=user

Διάκριση φυλογενετικών ομάδων: