



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Απομόνωση στελεχών *Escherichia coli* από δείγματα νερού ποταμού και λυμάτων και έλεγχος των προφίλ αντοχής τους στα αντιβιοτικά



Ονοματεπώνυμο Φοιτητών (ΑΜ)

Αικατερίνη Αγγέλου (16026) & Βασιλική Παπαγιάννη (16081)

Ονοματεπώνυμο Επιβλέποντα: Απόστολος Μπελούκας

Αθήνα, 2021



UNIVERSITY OF WEST ATTICA

FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES
SECTION OF MEDICAL LABORATORIES

DISSERTATION

Isolation of *Escherichia coli* strains from river water and wastewater samples and antibiotic resistance testing



Students Name (CM)

Aikaterini Aggelou (16026) & Vasiliki Papagianni (16081)

Name of Supervisor: Apostolos Beloukas

Athens, 2021

ΜΕΛΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Απόστολος Μπελούκας

Χρυσάνθη Βογιατζάκη

Όλγα Παππά

Δήλωση συγγραφέα προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας

Οι κάτωθι υπογεγραμμένοι Αικατερίνη Αγγέλου του Ιωάννη, με αριθμό μητρώου 16026 και Βασιλική Παπαγιάννη του Χρήστου, με αριθμό μητρώου 16081 φοιτήτριες του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνουμε ότι:

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

Ονόματα φοιτητών

Υπογραφές φοιτητών

Ευχαριστίες

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε όλους όσους βοήθησαν στην εκπόνηση αυτής της διπλωματικής εργασίας. Αρχικά ευχαριστούμε θερμά την υποψήφια διδάκτωρ Χρυσούλα Διολή, η οποία μας καθοδηγούσε στη διεξαγωγή της μελέτης από τα πειραματικά στάδια που διεξάχθηκαν στο εργαστήριο μέχρι και στη τελική συγγραφή της εργασίας. Η συμβολή της ήταν καθοριστική καθώς η βοήθεια της και οι συμβουλές της ήταν πολύτιμες. Ευχαριστούμε, επίσης, τον επιβλέποντα καθηγητή μας Απόστολο Μπελούκα, καθηγητή Μοριακής Μικροβιολογίας και Ιολογίας του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών και Διευθυντή του Εργαστηρίου Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας του τμήματος Βιοϊατρικών επιστημών, που δέχτηκε να αναλάβει την επίβλεψη της παρούσας διπλωματικής εργασίας δίνοντάς μας την ευκαιρία να ενταχθούμε στην επιστημονική ομάδα του Εργαστηρίου Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας (Ε.Μ.Μ.Α.). Τέλος, ευχαριστούμε την οικογένεια μας και τους φίλους μας, που καθημερινά μας στήριξαν κατά τη διάρκεια της εργασίας.

Περίληψη

Η αντιμικροβιακή αντοχή αποτελεί παγκόσμια απειλή Δημόσιας Υγείας. Η χρήση των αντιβιοτικών όχι μόνο στο τομέα της ιατρικής αλλά και στην κτηνιατρική/κτηνοτροφία, γεωργία και στις ιχθυοκαλλιέργειες έχει οδηγήσει στην αύξηση της συγκέντρωσης αντιβιοτικών που καταλήγει στο περιβάλλον. Το γεγονός αυτό έχει διαταράξει την ισορροπία μεταξύ ευαίσθητων και ανθεκτικών πληθυσμών, ευνοώντας την αύξηση των τελευταίων. Στα υδάτινα οικοσυστήματα (όπως λίμνες και ποτάμια) συνεχώς απελευθερώνονται ανθεκτικά βακτήρια, κυρίως μέσω του λύματος, τόσο του νοσοκομειακού όσο και του αστικού. Στα επιβαρυμένα αυτά περιβάλλοντα τα γονίδια αντοχής μπορούν να μεταδοθούν οριζοντίως, από βακτήριο σε βακτήριο, γεγονός που συμβάλει στην περαιτέρω εξάπλωση των ανθεκτικών βακτηριακών πληθυσμών. Το λύμα αποτελεί σημαντική πηγή ανθεκτικών βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων των ανθεκτικών στις κεφαλοσπορίνες στελεχών *Escherichia coli* (*E. coli*). Επομένως, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν: α) η μελέτη των επιπέδων μικροβιακής αντοχής στελεχών *E. coli* σε 18 αντιβιοτικά, που χρησιμοποιούνται ευρέως κατά την κλινική πράξη, β) η ανίχνευση γονιδίων αντοχής που σχετίζονται με τα πρότυπα αντοχής που εμφάνιζαν τα ανθεκτικά στελέχη και γ) η κατάταξή τους σε φυλογενετικές ομάδες, εφαρμόζοντας τη μοριακή μέθοδο του Phylogrouping-triplex pcr. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν 131 στελέχη *E. coli* που είχαν απομονωθεί από δείγματα: α) νοσοκομειακού λύματος που είχε συλλεχθεί από δεξαμενή εξωτερικά του Γενικού Νοσοκομείου της Λιβαδειάς, β) λύματος, που είχε συλλεχθεί από την έξοδο της Εγκατάστασης Επεξεργασίας Λυμάτων (Ε.Ε.Λ) της Λιβαδειάς, γ) νερού από τα ποτάμια Έρκυνα και Βοιωτικού Κηφισού της περιοχής, τα οποία είναι γνωστό πως επηρεάζονται από το λύμα της υπό μελέτης Ε.Ε.Λ. Η πλειοψηφία των στελεχών ήταν ανθεκτικά, με το πρότυπο αντοχής αμπικιλίνη-πιπερακιλίνη να είναι το πιο συχνό. Σε 11 στελέχη, που παρατηρήθηκαν εκτεταμένες αντοχές, ανιχνεύθηκε το ESBL γονίδιο της οικογένειας CTX-M-group1. Τέλος, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μοριακής μεθόδου του Phylogrouping, η ομάδα Α ήταν επικρατέστερη στα στελέχη που απομονώθηκαν από τα ποτάμια και του νοσοκομειακού λύματος, ενώ η Δ επικράτησε στα στελέχη του λύματος

της Ε.Ε.Λ. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη επιβεβαιώνουν την ύπαρξη ανθεκτικών βακτηρίων στο περιβάλλον και μαζί με μελλοντικές μελέτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο μικροβιακής αντοχής σε λύματα και υδάτινα οικοσυστήματα.

Abstract

Antimicrobial resistance is major public health issue. The use of antibiotics, in medicine, veterinary/ livestock farming, agriculture and fish farming has led to an increase in the concentration of antibiotics that ends up in the environment. This fact has upset the balance between sensitive and resistant bacterial populations, favoring the growth of the latter. In aquatic ecosystems (such as lakes and rivers) resistant bacteria are constantly released, mainly through wastewater samples, both hospital and urban. In these congested environments, resistance genes can be transmitted horizontally, from bacterium to bacterium, which contributes to the further spread of resistant bacterial populations. Wastewater is an important source of resistant bacteria, including cephalosporin-resistant *Escherichia coli* (*E. coli*) strains. Therefore, the purpose of this dissertation was: a) to study the levels of microbial resistance of *E. coli* strains in 18 antibiotics, which are widely used in clinical practice, b) to detect resistance genes related to the resistance patterns displayed by resistant strains and c) their classification into phylogenetic groups, applying the molecular method of Phylogrouping-triplex pcr. Specifically, were examined 131 *E. coli* strains that had been isolated from samples of: a) hospital wastewater that had been collected from a tank outside the General Hospital of Livadia, b) wastewater, which had been collected from the exit of the Wastewater Treatment Plant (WWTP) of Livadia, c) water from the rivers Erkyna and Boeotian Kifissos of the area, which are known to be affected by the wastewater of the studied WWTP. The majority of strains were resistant, with the ampicillin-piperacillin resistance pattern being the most common. The ESBL gene of the CTX-M-group1 family was detected in 11 strains. Finally, according to the results of the typing method of Phylogrouping, group A was the predominant in the strains isolated from the rivers and the hospital sewage, while D was dominated among the strains of the wastewater of WWTP. The results obtained from the present study confirm the existence of resistant bacteria in environmental sources and together with future studies can be used to control microbial resistance in wastewater and aquatic ecosystems.

Πίνακας Περιεχομένων

Ευχαριστίες.....	ii
Περίληψη	iv
Abstract	vi
Πίνακας Περιεχομένων	vii
Εισαγωγή.....	1
Κεφάλαιο 1: Θεωρητικό μέρος	3
1.1 Γενικά χαρακτηριστικά του <i>E. coli</i>	3
1.2 Αντιβιοτικά	4
1.2.1 Β-λακτάμες	8
1.3 Αντοχή στα αντιβιοτικά	9
1.3.1 Ένζυμα β-λακταμασών	12
1.3.1.1 Εκτεταμένου φάσματος β –λακταμάσες (Expanded spectrum β-lactamases, ESBL)	14
1.3.1.2.Κεφαλοσπορινάσες (AmpC β-λακταμάσες)	17
1.3.1.3 Καρβαπενεμάσες.....	18
1.4 Διασπορά αντοχής στο ευρύτερο περιβάλλον	19
Κεφάλαιο 2: Πειραματικό μέρος	21
2.1 Σκοπός	21
2.2 Δειγματοληψία.....	21
2.3 Επεξεργασία δειγμάτων	22
2.4 Απομόνωση και ταυτοποίηση στελεχών <i>E. coli</i>	22
2.5 Έλεγχος επιπέδων ευαισθησίας στα αντιβιοτικά	25
2.6 Μοριακός έλεγχος γονιδίων αντοχής	27
2.7 Φυλογενετική τυποποίηση(Phylogrouping) των στελεχών <i>E. coli</i>	28
Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα.....	29
3.1 Αποτελέσματα διήθησης.....	29
3.2 Αποτελέσματα απομόνωσης και ταυτοποίησης.....	30
3.3 Αποτελέσματα του ελέγχου επιπέδου ευαισθησίας στα αντιβιοτικά.....	31
3.3.1 Επίπεδα ευαισθησίας στα αντιβιοτικά των στελεχών του νοσοκομειακού λύματος	31
3.3.2 Επίπεδα ευαισθησίας στα αντιβιοτικά των στελεχών του λύματος της Ε.Ε.Λ.	34
3.3.3 Επίπεδα ευαισθησίας στα αντιβιοτικά των στελεχών που απομονώθηκαν από το νερό του ποταμού Έρκυνα	36
3.3.4 Επίπεδα ευαισθησίας στα αντιβιοτικά των στελεχών που απομονώθηκαν από το νερό του ποταμού Β. Κηφισού (σημείο συνάντησης με Έρκυνα).....	39

3.3.5 Αποτελέσματα των επιπέδων ευαισθησίας στα αντιβιοτικά όλων των στελεχών	41
3.3.6 Αποτελέσματα του φαινοτυπικού τεστ- DDST.....	43
3.4 Αποτελέσματα από το έλεγχο της παρουσίας γονιδίων αντοχής.....	44
3.5 Αποτελέσματα φυλογενετικής τυποποίησης (Phylogrouping) των στελεχών <i>E. coli</i> ...	45
3.5.1 Αποτελέσματα φυλογενετικής τυποποίησης (Phylogrouping) των στελεχών <i>E. coli</i> του νοσοκομειακού λύματος	46
3.5.2 Αποτελέσματα φυλογενετικής τυποποίησης (Phylogrouping) των στελεχών <i>E. coli</i> του λύματος εξόδου της Ε.Ε.Λ.....	46
3.5.3 Αποτελέσματα φυλογενετικής τυποποίησης (Phylogrouping) των στελεχών <i>E.coli</i> που απομονώθηκαν από νερό του Ποταμού Έρκυνα.....	47
3.5.4 Αποτελέσματα φυλογενετικής τυποποίησης (Phylogrouping) των στελεχών <i>E. coli</i> που απομονώθηκαν από νερό του Ποταμού Β. Κηφισού (σημείο συνάντησης με Ποτάμι Έρκυνα).....	47
3.5.5 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα φυλογενετικής τυποποίησης (Phylogrouping) όλων των στελεχών <i>E. coli</i>	48
Κεφάλαιο 4 Συζήτηση.....	49
Βιβλιογραφία	51

Πίνακας εικόνων

Εικόνα 1 Διάγραμμα που απεικονίζει τους τρεις τομείς της Ενιαίας Υγείας	11
Εικόνα 2 Σχεδιάγραμμα που απεικονίζει τους σημαντικότερους μηχανισμούς δράσης των αντιβιοτικών.....	5
Εικόνα 3 Σχηματική απεικόνιση του κοινού β-λακταμικού δακτυλίου των β-λακταμικών αντιβιοτικών	8
Εικόνα 4 Σχηματική απεικόνιση των μηχανισμών πρόσληψης εξωγενούς γενετικού υλικού	9
Εικόνα 5 Απεικόνιση των μηχανισμών αντοχής στα αντιβιοτικά.....	
Εικόνα 6 Σχηματική παρουσίαση των β-λακταμασών σε Gram(-) και Gram(+) βακτήρια	12
Εικόνα 7 Ταξινόμηση των β-λακταμασών.....	13
Εικόνα 8 Παραδείγματα διασποράς αντιμικροβιακής αντοχής.....	20
Εικόνα 9 Τα τέσσερα σημεία δειγματοληψίας	22
Εικόνα 10 Σχηματισμός δακτυλίου στην επιφάνεια του υγρού. Θετική δοκιμασία ινδόλης.....	23
Εικόνα 11 Θετική (αριστερά) και αρνητική (δεξιά) δοκιμασία κιτρικών	24
Εικόνα 12 Παράδειγμα θετικής δοκιμασίας DDS.....	27
Εικόνα 13 Καθορισμός φυλογενετικής ομάδας	28
Εικόνα 14 Ανάπτυξη αποικιών σε CCA και CCA-AMP.....	30
Εικόνα 15 Ποσοστά (%) αντοχής ανά αντιβιοτικό των στελεχών του νοσοκομειακού λύματος	33
Εικόνα 16 Συχνότητα εμφάνισης των τριών προφίλ αντοχής (R, MDR και WT) μεταξύ των στελεχών που απομονώθηκαν από το νοσοκομειακό λύμα	33
Εικόνα 17 Ποσοστά (%) αντοχής ανά αντιβιοτικό των στελεχών του λύματος εξόδου της Ε.Ε.Λ.....	35
Εικόνα 18 Συχνότητα εμφάνισης των τριών προφίλ αντοχής (R, MDR και WT) μεταξύ των στελεχών που απομονώθηκαν από λύμα εξόδου της Ε.Ε.Λ	36
Εικόνα 19 Ποσοστά (%) αντοχής ανά αντιβιοτικό των στελεχών του νερού του ποταμού Έρκυνα.....	38
Εικόνα 20 Συχνότητα εμφάνισης των τριών προφίλ αντοχής (R, MDR και WT) μεταξύ των στελεχών που απομονώθηκαν από το νερό του ποταμού Έρκυνα	38
Εικόνα 21 Ποσοστά (%) αντοχής ανά αντιβιοτικό των στελεχών που απομονώθηκαν από δείγμα νερού που συλλέχθηκε από το σημείο συνάντησης των ποταμών.....	40
Εικόνα 22 Συχνότητα εμφάνισης των τριών προφίλ αντοχής (R, MDR και WT) μεταξύ των στελεχών που απομονώθηκαν από δείγμα νερού που συλλέχθηκε από το σημείο συνάντησης των ποταμών...40	
Εικόνα 23 Συγκεντρωτικό διάγραμμα: παρουσίαση των ποσοστών (%) αντοχής των στελεχών <i>E. coli</i> στον κάθε αντιμικροβιακό παράγοντα ανάλογα με το δείγμα προέλευσης.....	41
Εικόνα 24 Συγκεντρωτικό διάγραμμα: παρουσίαση της συχνότητας εμφάνισης των τριών προφίλ αντοχής (R, MDR και WT) των στελεχών <i>E. coli</i> των τεσσάρων ενδιαιτημάτων	42
Εικόνα 25 Αποτελέσματα φυλογενετικής τυποποίησης (<i>Phylogrouping</i>) των στελεχών <i>E. coli</i> του νοσοκομειακού λύματος.	46
Εικόνα 26 Αποτελέσματα φυλογενετικής τυποποίησης (<i>Phylogrouping</i>) των στελεχών <i>E. coli</i> του λύματος της Ε.Ε.Λ.	46
Εικόνα 27 Αποτελέσματα φυλογενετικής τυποποίησης (<i>Phylogrouping</i>) των στελεχών <i>E. coli</i> που απομονώθηκαν από το νερό του Ποταμού Έρκυνα.	47
Εικόνα 28 Αποτελέσματα φυλογενετικής τυποποίησης (<i>Phylogrouping</i>) των στελεχών <i>E. coli</i> που απομονώθηκαν από το νερό του Ποταμού Β. Κηφισού	47
Εικόνα 29 Συγκεντρωτικό διάγραμμα των ποσοστών (%) εμφάνισης των φυλογενετικών ομάδων των στελεχών <i>E. coli</i> ανάλογα με το δείγμα προέλευσης	48

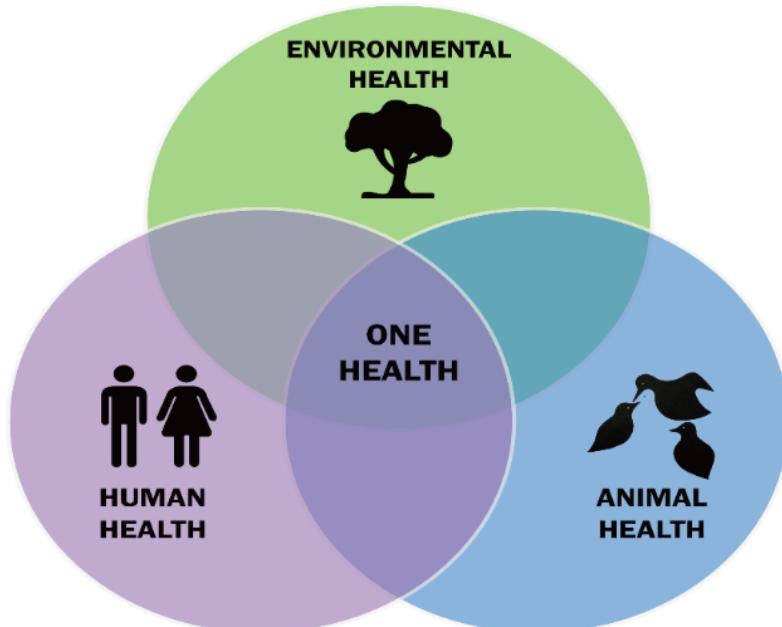
Πίνακας πινάκων

Πίνακας 1 Κυριότερες ομάδες αντιβιοτικών.....	6
Πίνακας 2 Δίσκοι αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν	26
Πίνακας 3 Αποικίες που καταμετρήθηκαν από το δείγμα νοσοκομειακού λύματος	29
Πίνακας 4 Αποικίες που καταμετρήθηκαν από δείγμα λύματος της Ε.Ε.Λ.....	29
Πίνακας 5 Αποικίες που καταμετρήθηκαν από το δείγμα νερού που συλλέχθηκε από το ποτάμι Έρκυνα.....	29
Πίνακας 6 Αποικίες που καταμετρήθηκαν από το δείγμα νερού που συλλέχθηκε από το σημείο συνάντησης των ποταμών Έρκυνα – Β. Κηφισού	30
Πίνακας 7 Επίπεδα ευαισθησίας στα αντιβιοτικά των στελεχών που απομονώθηκαν από το νοσοκομειακό λύμα.....	32
Πίνακας 8 Επίπεδα ευαισθησίας στα αντιβιοτικά των στελεχών που απομονώθηκαν από λύμα της εξόδου της Ε.Ε.Λ	34
Πίνακας 9 Επίπεδα ευαισθησίας στα αντιβιοτικά των στελεχών που απομονώθηκαν από το νερό του ποταμού Έρκυνα.....	36
Πίνακας 10 Επίπεδα ευαισθησίας στα αντιβιοτικά των στελεχών που απομονώθηκαν από νερό του ποταμού Β. Κηφισού (σημείο συνάντησης με Έρκυνα).....	39
Πίνακας 11 Χαρακτηριστικά (Σημείο Δειγματοληψίας, Φυλογενετική Ομάδα, Προφίλ Αντοχής και Πρότυπο Αντοχής) των στελεχών με θετική DDS δοκιμασία	43
Πίνακας 12: Χαρακτηριστικά (Σημείο Δειγματοληψίας, Πρότυπο αντοχής, Προφίλ αντοχής, Φυλογενετική Ομάδα) στελεχών που είχαν το γονίδιο CTX-M group1	45

Εισαγωγή

Η Ενιαία Υγεία αποτελεί μια παγκόσμια στρατηγική που αναγνωρίζει ότι η υγεία των ανθρώπων συνδέεται στενά με την υγεία των ζώων και του ευρύτερου περιβάλλοντος (**Εικόνα 1**). Η ιδέα της Ενιαίας Υγείας δεν είναι καινούρια. Ο όρος αυτός περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Δρ. James Steele, ιδρυτή του Τμήματος Κτηνιατρικής Δημόσιας Υγείας του Αμερικανικού Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) το 1947.

Τα τελευταία χρόνια όμως γίνεται όλο και πιο σημαντική καθώς έχουν αλλάξει οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ανθρώπων, ζώων και περιβάλλοντός. Παράγοντες που έχουν οδηγήσει σε αυτές τις αλλαγές είναι οι φυσικές καταστροφές, οι πόλεμοι, η κλιματική αλλαγή, η αύξηση του πληθυσμού της γης, η παγκοσμιοποίηση και άλλα. [1, 2, 3].



Εικόνα 1 Διάγραμμα που απεικονίζει τους τρεις τομείς της Ενιαίας Υγείας [4]

Ένα από τα σημαντικότερα ζητήματα που καλείται να επιλύσει η Ενιαία Υγεία είναι το πρόβλημα της μικροβιακής αντοχής, που αποτελεί ίσως τη μεγαλύτερη διαχρονική απειλή για τη Δημόσια Υγεία. Ειδικά τη τελευταία δεκαετία, λόγω της αλόγιστης χρήσης και της κατάχρησης των αντιβιοτικών σε όλους τους τομείς (ιατρική, κτηνιατρική/ κτηνοτροφία, γεωργία, ιχθυοκαλλιέργειες) έχει λάβει τεράστιες διαστάσεις [5].

Η ανίχνευση ανθεκτικών και πολυ-ανθεκτικών κλώνων *E. coli* στο ευρύτερο περιβάλλον έχει προκαλέσει ιδιαίτερη ανησυχία για την επιστημονική κοινότητα, καθώς συγκαταλέγεται στα πιο κοινά Gram- αρνητικά ευκαιριακά παθογόνα που ευθύνεται για πλήθος λοιμώξεων (όπως ουρολοιμώξεις, γαστρεντερίτιδα) [6, 7].

Επομένως, για το περιορισμό του φαινομένου της μικροβιακής αντοχής, όπως και άλλων ζητημάτων Δημόσιας Υγείας, καθίσταται αναγκαία η άμεση συνεργασία ειδικών διαφορετικών ειδικοτήτων, σε τοπικό και παγκόσμιο επίπεδο. [3]

Κεφάλαιο 1: Θεωρητικό μέρος

1.1 Γενικά χαρακτηριστικά του *E. coli*

Το βακτήριο *E. coli* είναι το πιο κοινό Gram- αρνητικό βακτήριο, της οικογένειας Enterobacteriaceae [8]. Είναι κινητό, ελυτροφόρο ή μη και συχνά φέρει μαστίγια. Τα περισσότερα είδη του βακτηρίου είναι αβλαβή ή και επωφελή για τον ανθρώπινο οργανισμό ωστόσο περιστασιακά μπορεί να προκαλέσει ευκαιριακές λοιμώξεις. Πολλά από αυτά αποτελούν μέλη της φυσιολογικής χλωρίδας του εντερικού σωλήνα του ανθρώπου και των θερμόαιμων ζώων. Το βακτήριο εντοπίζεται στο περιβάλλον όπως στο λύμα, το έδαφος και στα ύδατα [8,9] και σύμφωνα με τη διεθνή νομοθεσία χρησιμοποιείται ως βασικός δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης για την αξιολόγηση της ποιότητας του νερού [8,10].

Το βακτήριο *E. coli* απομονώνεται σε περιστατικά βακτηριαμίας (σήψη) 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 [10,11]. Μπορεί να μεταδοθεί: α) μέσω της κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων ή νερού, β) μέσω επαφής με περιττώματα, γ) μέσω κατάποσης μολυσμένου νερού από θάλασσες, λίμνες, κολυμβητικές δεξαμενές κ.τ.λ. [12].

Το *E. coli* εκτός από μη-παθογόνα περιλαμβάνει και παθογόνα στελέχη. Τα παθογόνα είδη κατατάσσονται σε 6 κατηγορίες:

- Τα εντεροαιμορραγικά (Enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC): παράγουν τοξίνες (βεροτοξίνες ή τοξίνες τύπου Shiga) και προκαλούν αιμορραγική κολίτιδα και αιμολυτικό-ουραιμικό σύνδρομο.
- Τα εντεροπαθογόνα (Enteropathogenic *E. coli*, EPEC): προκαλούν εντερίτιδα στα βρέφη.
- Τα εντεροτοξινογόνα (Enterotoxigenic *E. coli*, ETEC): η λοιμογονικότητα τους οφείλεται στις παραγόμενες τοξίνες που οδηγούν στην εκδήλωση διαρροϊκής νόσου. Αποτελούν το συχνότερο αίτιο διάρροιας των ταξιδιωτών.
- Τα εντεροδιεισδυτικά (Enteroinvasive *E. coli*, EIEC): έχουν την ικανότητα εισβολής στα κύτταρα του επιθηλιακού ιστού του εντέρου και προκαλούν δυσεντερία.

- Τα εντεροσυσσωρευτικά *E.coli* (Enteropathogenic *E. coli*, EAEC): ευθύνονται για χρόνια διαρροϊκή νόσο κυρίως σε βρέφη και παιδιά.
- Τα εντεροδιαχεόμενα (Diffusely adherent *E. coli*, DAEC): ευθύνονται για διάρροια σε νεαρά άτομα 1-5 ετών [8, 13, 14,15].

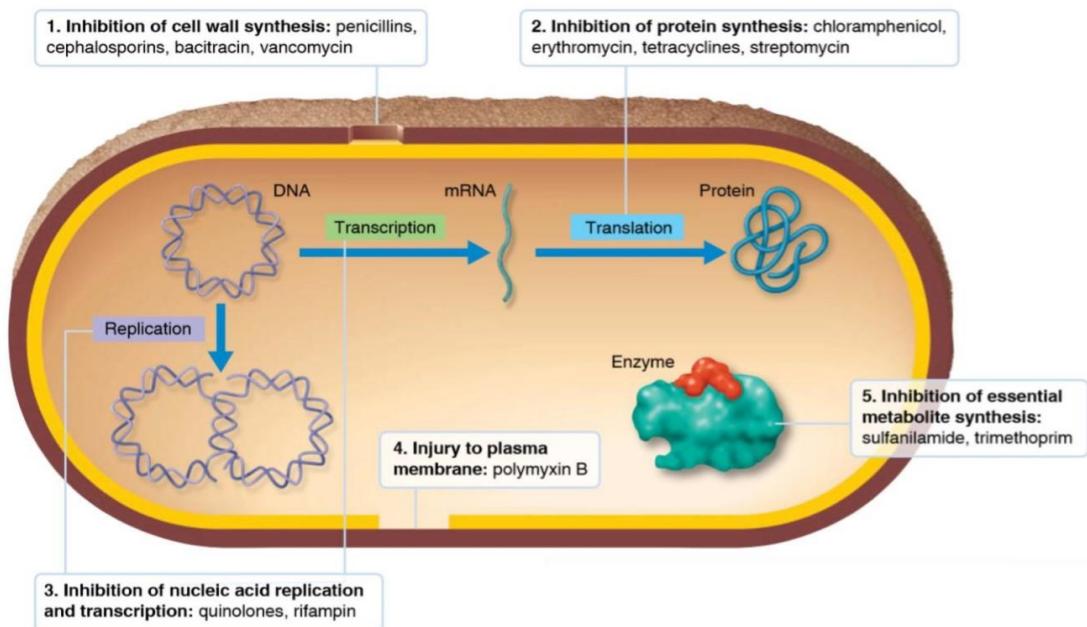
1.2 Αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά μπορεί να είναι φυσικές, ημισυνθετικές ή εξολοκλήρου συνθετικές ουσίες. Ανάλογα με τη δράση τους διακρίνονται σε βακτηριοστατικά (παράγοντες που αναστέλλουν την ανάπτυξη ενός βακτηρίου) και σε βακτηριοκτόνα (θανατώνουν το μικροοργανισμό) [16,17].

Τα αντιβιοτικά αποτελούν τη σημαντικότερη ανακάλυψη της σύγχρονης ιατρικής, καθώς χρησιμοποιούνται ευρέως για τη θεραπεία και τη πρόληψη λοιμώξεων [18, 19]. Χρησιμοποιούνται όχι μόνο στην ιατρική αλλά και στην κτηνιατρική, την κτηνοτροφία, τη γεωργία και στις υδατοκαλλιέργειες [20]. Το κατάλληλο αντιβιοτικό θα πρέπει να παρουσιάζει επιλεκτική δράση, να μπορεί δηλαδή να καταπολεμά τα μικρόβια χωρίς να βλάπτει τον ξενιστή [18].

Υπάρχουν πολλές κατηγορίες αντιβιοτικών (**Πίνακας 1**) καθεμία από τις οποίες έχει συγκεκριμένο τρόπο και στόχο δράσης (**Εικόνα 2**). Τα αντιμικροβιακά φάρμακα, ανάλογα με το φάσμα δράσης διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: στα ευρέος φάσματος, τα οποία είναι δραστικά έναντι πολλών διαφορετικών Gram (+) και Gram (-) βακτηρίων και στα περιορισμένου φάσματος, που είναι δραστικά έναντι μικρού αριθμού βακτηρίων [21].

Στις ανεπιθύμητες ενέργειες των αντιβιοτικών, συμπεριλαμβάνονται η τοξικότητα που δύναται να προκαλέσουν σε ένα ή περισσότερα συστήματα οργάνων και οι αλλεργικές αντιδράσεις. Οι β-λακτάμες έχουν τις λιγότερο συχνές και τις λιγότερο σοβαρές παρενέργειες, καθότι στοχεύουν στην σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης, η οποία απαντάται μόνο στους προκαρυωτικούς οργανισμούς [22].



Εικόνα 2 Σχεδιάγραμμα που απεικονίζει τους σημαντικότερους μηχανισμούς δράσης των αντιβιοτικών 1) Αναστολή σύνθεσης κυτταρικού τοιχώματος 2) Αναστολή πρωτεΐνοσύνθεσης 3) Αναστολή σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων 4) Βλάβες στην κυτταροπλασματική μεμβράνη 5) Αναστολή σύνθεσης βασικών μεταβολιτών [21].

Πίνακας 1 Κυριότερες ομάδες αντιβιοτικών [11,17,21,23]

Ομάδες αντιβιοτικών	Υποομάδες αντιβιοτικών	Αντιμικροβιακό φάσμα	Μηχανισμός δράσης
Πενικιλλίνες*	Φυσικές Πενικιλίνη G Πενικιλίνη V <u>Ημισυνθετικές</u> Οξακιλλίνη Αμπικιλλίνη Αμοξικιλίνη Πιπερακιλλίνη	Στενού φάσματος Gram (+) βακτήρια	Αναστολή σύνθεσης κυτταρικού τοιχώματος
		Ευρέος φάσματος Gram (+) και Gram (-) βακτήρια	
Κεφαλοσπορίνες*	Πρώτης γενιάς Κεφαλοθίνη Κεφαδροξίλη <u>Δεύτερης γενιάς</u> Κεφοξιτίνη Κεφαμανδόλη Κεφουροξίμη <u>Τρίτης γενιάς</u> Κεφατζιδίμη Κεφαπεραζόνη <u>Τέταρτης γενιάς</u> Κεφεπίμη Κεφπιρόμη	Σχετικά στενού φάσματος κυρίως έναντι Gram (-)	Αναστολή σύνθεσης κυτταρικού τοιχώματος
		Ευρέος φάσματος Gram (+) και (-) βακτήρια, αερόβια και αναερόβια	
Μονοβακτάμες*	Αζτρεονάμη	Gram (-) βακτήρια	
Καρβαπενέμες*	Ιμπενέμη Μεροπενέμη	Ευρέος φάσματος Gram (+) και Gram (-) βακτήρια	
Αναστολείς β-λακταμάσης*	Κλαβουλανικό Οξύ Ταζοβακτάμη	Σχετικά Ευρέος φάσματος Gram (+) και (-) βακτήρια	
Αμινογλυκοσίδες	Γενταμικίνη Αμικασίνη Νεομυκίνη Στρεπτομυκίνη	Ευρέος φάσματος Gram (+) και Gram (-) βακτήρια	Αναστολείς της πρωτεΐνοσύνθεσης
Τετρακυκλίνες	Χλωροτετρακυκλίνη Μεθακυκλίνη Οξυτετρακυκλίνη Μινοκυκλίνη Δοξυκυκλίνη	Ευρέος φάσματος Gram (+) και Gram (-) αερόβια και αναερόβια βακτήρια	
Μακρολίδες	Ερυθρομυκίνη Ροξιθρομυκίνη Κλαριθρομυκίνη Αζιθρομυκίνη	Ευρέος φάσματος Gram (+) και Gram (-) βακτήρια	
Λινκοσαμίδες	Λινκομυκίνη Κλιναμυκίνη	Ευρέος φάσματος Gram (+) και Gram (-) βακτήρια	
Χλωραμφενικόλη		Ευρέος φάσματος Gram (+) και Gram (-) αερόβια και αναερόβια βακτήρια	

Φθοριοκινολόνες	Ναλιδικό οξύ Σιπροφλοξασίνη Πεφλοξακίνη Νορφλοξακίνη	Ευρέος φάσματος Gram (+) και Gram (-) αερόβια βακτήρια	Αναστολείς της σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων
Ριφαμυκίνες	Ριφαμπικίνη	Μυκοβακτηρίδια (θεραπεία λέπρας και φυματίωσης)	
Πολυμιξίνες	Πολυμιξίνη Β Πολυμιξίνη Ε	Gram (-) βακτήρια	Βλάβη στην κυτταροπλασματική μεμβράνη
Σουλφονεμίδες	Σουλφαδιαζίνη Σουλφαμεθοξαζόλη Σουλφακεταμίδη	Ευρέος φάσματος Gram (+) και Gram (-) αερόβια βακτήρια	Αναστολή σύνθεσης βασικών μεταβολιτών
Τριμεθοπρίμη			

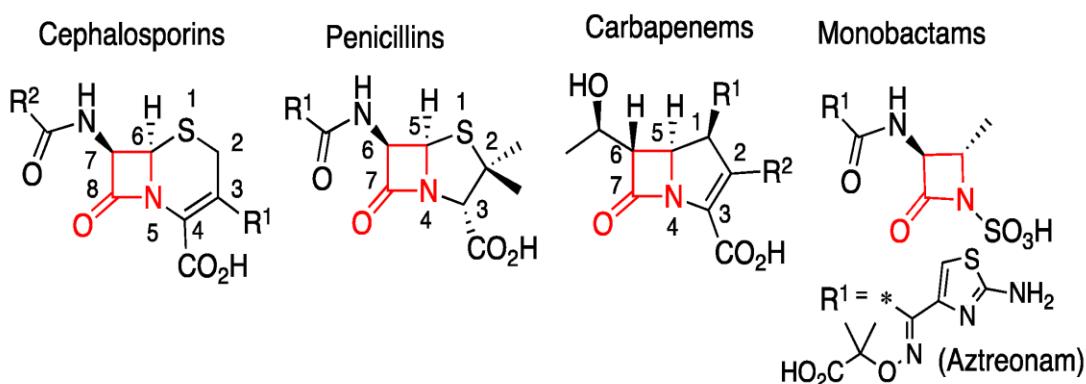
*Ανήκουν στην ομάδα των β-λακταμικών αντιβιοτικών.

1.2.1 β-λακτάμες

Οι β-λακτάμες είναι μια από τις σημαντικότερες και η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη ομάδα αντιβιοτικών. Στην κατηγορία αυτή συμπεριλαμβάνονται οι πενικιλλίνες, οι κεφαλοσπορίνες, οι μονοβακτάμες, οι καρβαπενέμες και οι αναστολείς β-λακταμασών. Όλες οι β-λακτάμες περιέχουν το χαρακτηριστικό β-λακταμικό δακτύλιο (**Εικόνα 3**) [11].

Έχουν βακτηριοκτόνο δράση, καθώς δρουν αναστέλλοντας τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος. Ο β-λακταμικός δακτύλιος έχει παρόμοια δομή με το υπόστρωμα των πενικιλλινο-δεσμευτικών πρωτεΐνων (Penicillin-Binding Proteins, PBPs) με τις οποίες συνδέεται ομοιοπολικά. Τα ένζυμα αυτά συμμετέχουν στον σχηματισμό της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος. Επομένως η σύνδεση αυτή παρεμποδίζει τη φυσιολογική λειτουργία των PBPs, οδηγώντας στην αναστολή της σύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι β-λακτάμες δεν είναι δραστικές σε μικρόβια που δεν έχουν κυτταρικό τοίχωμα ή έχουν αδιαπέραστο κυτταρικό τοίχωμα [11,24].

Χορηγούνται ενδοφλεβιώς ή ενδομυϊκώς. Οι παρενέργειες των β-λακταμών είναι γενικά ήπιες, ενώ οι πιο συνηθισμένες ανεπιθύμητες ενέργειές τους είναι οι άμεσες αντιδράσεις υπερευαισθησίας [25].



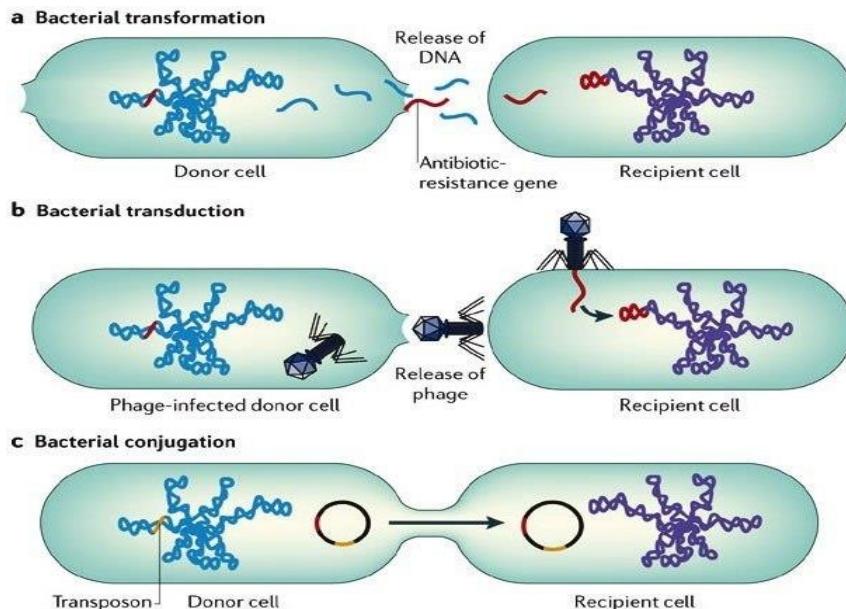
Εικόνα 3 Σχηματική απεικόνιση του κοινού β-λακταμικού δακτυλίου των β-λακταμικών αντιβιοτικών [26]

1.3 Αντοχή στα αντιβιοτικά

Μικροβιακή αντοχή ορίζεται το φαινόμενο κατά το οποίο ένας μικροοργανισμός εμφανίζει ικανότητα επιβίωσης παρουσία αντιβιοτικού και κατά συνέπεια πολλαπλασιασμού και μετάδοσης της ανθεκτικότητας (οριζόντια μεταφορά) σε άλλα μικρόβια [27].

Η αντοχή στα αντιβιοτικά διακρίνεται σε ενδογενή ή επίκτητη. Στην ενδογενή αντοχή τα βακτήρια είναι ανθεκτικά από τη φύση τους σε κάποιες ομάδες αντιβιοτικών, ενώ η επίκτητη οφείλεται είτε σε μεταλλάξεις του γενετικού υλικού του βακτηρίου είτε στην οριζόντια μεταφορά γενετικών στοιχείων (π.χ. πλασμιδίων) που φέρουν γονίδια αντοχής [28].

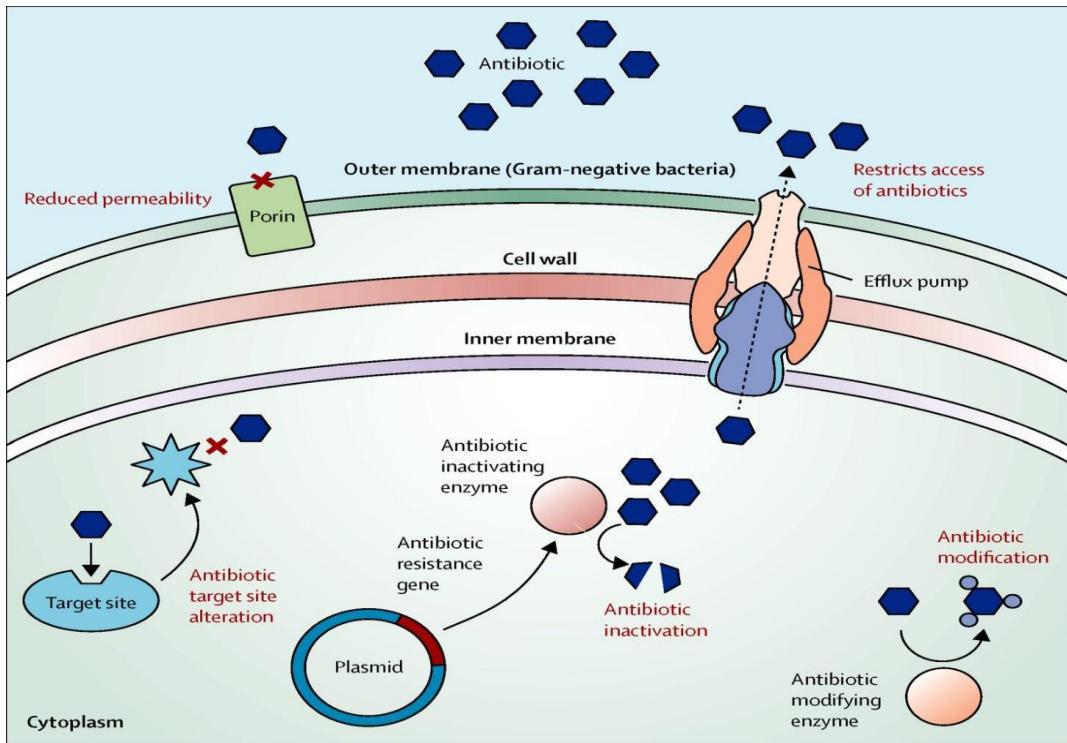
Η απόκτηση εξωγενούς γενετικού υλικού (όπως πλασμίδια, τρανσποζόνια) μπορεί να πραγματοποιηθεί με τους εξής τρόπους: α) με μετασχηματισμό, β) με σύζευξη και γ) μέσω μεταγωγής (μεσολάβηση ων) (**Εικόνα 4**) [16,29] .



Εικόνα 4 Σχηματική απεικόνιση των μηχανισμών πρόσληψης εξωγενούς γενετικού υλικού:
α) με μετασχηματισμό, β) με μεταγωγή, με μεσολάβηση φάγων γ) με σύζευξη [30]

Οι αλλαγές στο γενετικό υλικό των βακτηρίων οδηγούν σε βιοχημικές διαφοροποιήσεις, με τις οποίες επιτυγχάνεται η αντοχή των αντιβιοτικών. Σε αυτούς τους μηχανισμούς αντοχής περιλαμβάνονται (βλ. **Εικόνα 5**):

- Παρεμπόδιση εισόδου του φαρμάκου στο βακτήριο λόγω απουσίας ή μειωμένης έκφρασης εξωτερικών διαμεμβρανικών πρωτεΐνων, [πορίνες (outer membrane proteins, OMPs)]. Ο μηχανισμός αυτός παρατηρείται κυρίως στα Gram- αρνητικά βακτήρια, όπως στη *P. aeruginosa*.
- Τροποποίηση του στόχου δράσης του αντιβιοτικού. Παράδειγμα αποτελεί η παραγωγή τροποποιημένων πενικιλλινο-δεσμευτικών πρωτεΐνων (PBPs), λόγω μεταλλάξεων στα αντίστοιχα γονίδια. Ο μηχανισμός αυτός ευθύνεται για την αντοχή του *Streptococcus pneumoniae* (*Pneumococcus*) στην πενικιλλίνη καθώς και για την αντοχή στελεχών του είδους *Staphylococcus* στην μεθικιλίνη.
- Ενζυμική καταστροφή του αντιβιοτικού. Παράδειγμα αποτελεί η παραγωγή β-λακταμασών, οι οποίες διασπώνται τον β-λακταμικό δακτύλιο, αδρανοποιούν τα β-λακταμικά αντιβιοτικά πριν αυτά προσεγγίσουν το στόχος τους (δηλαδή τις PBPs). Ο μηχανισμός αυτός είναι κοινός μεταξύ των ειδών της οικογένειας *Enterobacteriaceae*, όπως το *E. coli* και *Klebsiella*.
- Ταχεία απάντηση του αντιβιοτικού από το βακτήριο μέσω αντλιών εκροής (efflux pump), πριν αυτό προλάβει να δράσει [21, 29, 31, 32].

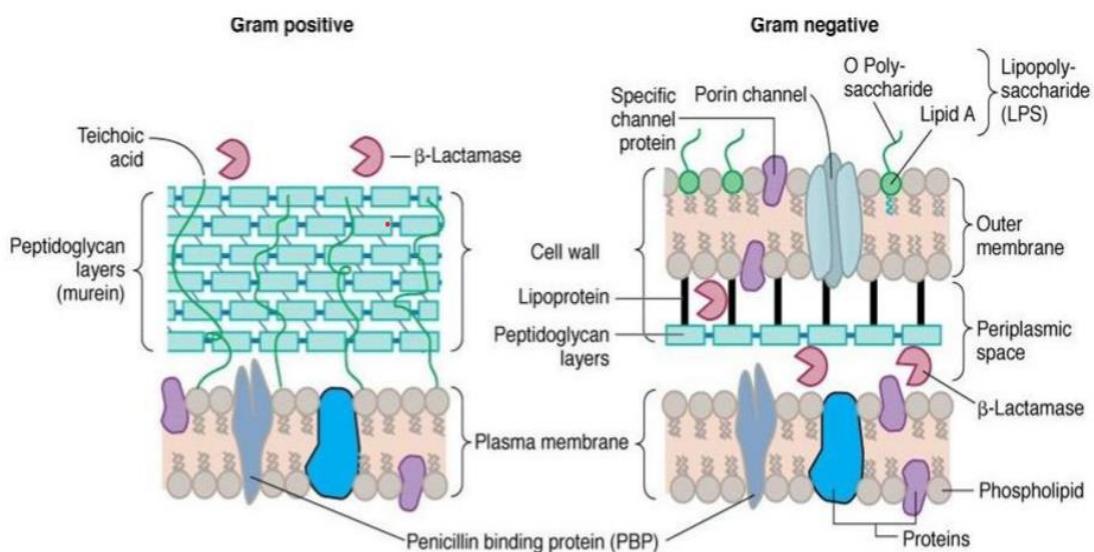


Εικόνα 5 Απεικόνιση των μηχανισμών αντοχής στα αντιβιοτικά [33]

1.3.1 Ένζυμα β-λακταμασών

Οι β-λακταμάσες είναι ένζυμα που αδρανοποιούν τα β-λακταμικά φάρμακα υδρολύοντας τον αμιδικό δεσμό O=C-N του β-λακταμικού δακτυλίου [34].

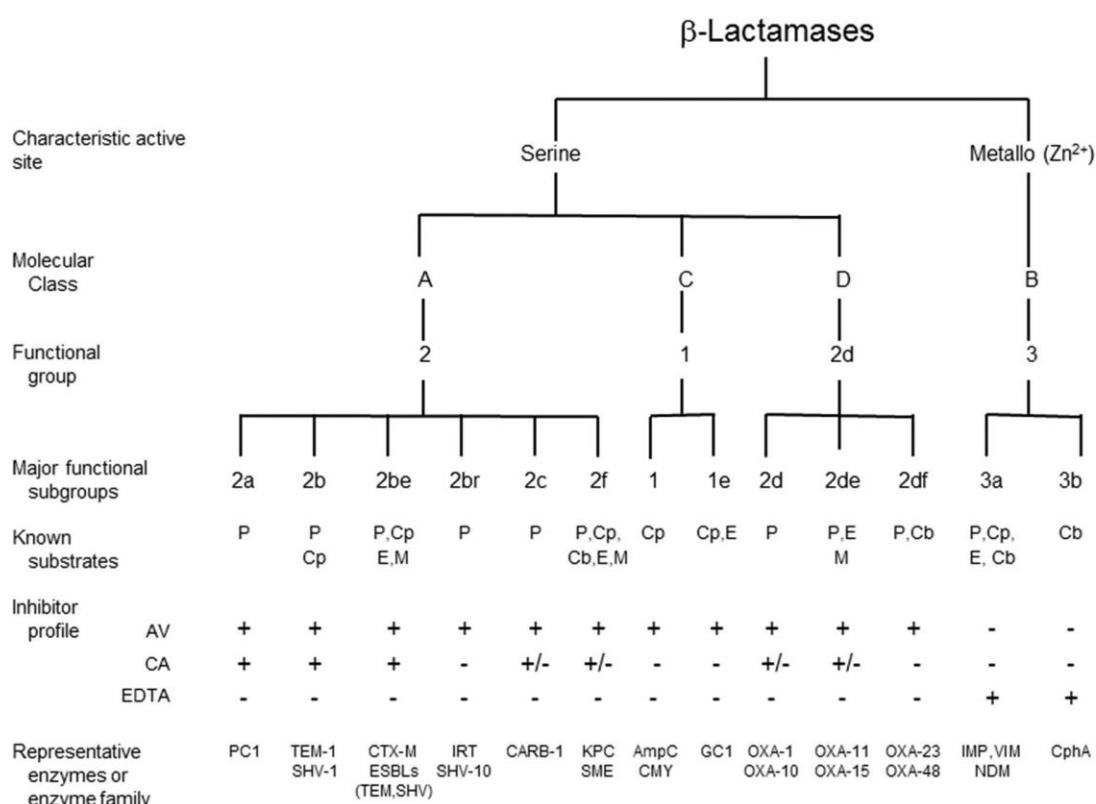
Οι β-λακταμάσες βρίσκονται κυρίως σε Gram (-) βακτήρια (όπως το *E. coli*), αλλά και σε στελέχη *Staphylococcus aureus* [27]. Εκκρίνονται στο εξωκυττάριο χώρο των Gram (+) βακτηρίων ή στο περιπλασμικό χώρο των Gram (-) βακτηρίων (Εικόνα 6) [35]. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις β-λακταμάσες βρίσκονται είτε στο χρωμόσωμα είτε σε πλασμίδια [31].



Εικόνα 6 Σχηματική παρουσίαση των β-λακταμασών σε Gram(-) και Gram(+) βακτήρια [36]

Υπάρχουν δύο συστήματα ταξινόμησης των β-λακταμασών: το λειτουργικό σύστημα ταξινόμησης κατά Bush-Jacoby-Medeiros και η μοριακή ταξινόμηση κατά Ambler. Σύμφωνα με το πρώτο σύστημα (Bush-Jacoby-Medeiros) οι β-λακταμάσες με βάση τις λειτουργικές τους ιδιότητές (προφίλ υποστρώματος και αναστολέων), ταξινομούνται σε ομάδες (groups 1, 2, 3, 4) και υποομάδες (subgroups 2a, 2b, 2be, 2br, 2c, 2d, 2e, 2f). Ωστόσο, το σύστημα που χρησιμοποιείται ευρύτερα είναι η μοριακή ταξινόμηση κατά Ambler, που χωρίζει τις βλακταμάσες σε 4 τάξεις (classes A, B, C, D), με κριτήριο την ομολογία των αμινοξικών τους αλληλουχιών. Στις ομάδες A, C, D ανήκουν οι β-λακταμάσες σερίνης (δηλαδή στο ενεργό τους κέντρο υπάρχει σερίνη), ενώ η ομάδα B περιλαμβάνει τις μεταλλο-β-λακταμάσες,

οι οποίες για να δράσουν χρειάζονται δισθενές μεταλλικό ιόν (συνήθως ψευδάργυρο, Zn^{2+}) (**Εικόνα 7**) [32, 37, 38].



Εικόνα 7 Ταξινόμηση των β-λακταμασών [32]

1.3.1.1 Εκτεταμένου φάσματος β –λακταμάσες (Expanded spectrum β-lactamases, ESBL)

Τα ένζυμα αυτά ανήκουν στην τάξη A κατά Ambler και στην ομάδα 2be κατά Bush [39]. Γενικά, υδρολύουν τις πενικιλίνες, τις κεφαλοσπορίνες 3^{ης} και 4^{ης} γενιάς, καθώς και την αζτρεονάμη. Δεν είναι δραστικές έναντι των καρβαπενέμων και αναστέλλονται από τους αναστολείς β-λακταμασών (π.χ. κλαβουλανικό οξύ και ταζοβακτάμη) [40]. Τα ESBL προήλθαν από μεταλλάξεις των πρώτων στενού φάσματος β-λακταμασών TEM-1, TEM-2 και SHV-1 (που υδρολύουν αμπικιλίνη). Οι μεταλλάξεις αυτές είχαν ως αποτέλεσμα την διεύρυνση του φάσματος των υποστρωμάτων τους και την ικανότητα να προσδίδουν αντοχή στις εκτεταμένου φάσματος κεφαλοσπορίνες (3^{ης} και 4^{ης} γενιάς) [35].

Ο αριθμός των ESBL που έχουν χαρακτηριστεί ως τώρα υπερβαίνει τις 300. Οι συχνότεροι τύποι ESBL είναι οι TEM, SHV και CTX-M. Στα Gram- αρνητικά βακτήρια τα γονίδια των ενζύμων αυτών εδράζονται είτε σε πλασμίδια είτε στο κεντρικό βακτηριακό χρωμόσωμα. Ωστόσο, η ταχεία εξάπλωση των β-λακταμασών οφείλεται στην ύπαρξη των πλασμιδιακών ESBLs γονιδίων. Επιπρόσθετα, τα πλασμίδια που φέρουν ESBL γονίδια, συχνά συν-μεταφέρουν και άλλα γονίδια αντοχής, συμβάλλοντας στο φαινόμενο της πολυ-αντοχής [35,41].

Οι κύριοι μικροοργανισμοί που παράγουν ESBL είναι το *E. coli* και η *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) ωστόσο έχουν εντοπιστεί και σε διάφορα άλλα μέλη της οικογένειας των Εντεροβακτηριακών καθώς και σε ορισμένα αζυμωτικά [35,41]. Η κατακόρυφη αύξηση των Εντεροβακτηριακών που παράγουν ESBL οδήγησε στην αυξημένη χρήση των καρβαπενεμών (τα πιο ισχυρά διαθέσιμα αντιβιοτικά). Το γεγονός αυτό, έχει συντείνει στην αύξηση της αντοχής και στις καρβαπενέμες. Η αντοχή στις καρβαπενέμες αποδίδεται κυρίως στην παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων (καρβαπενεμάσες, όπως οι μεταλλο-β-λακταμάσες) [39].

1) SHV

Το πρώτο *blaSHV-1* γονίδιο ταυτοποιήθηκε το 1970 σε στέλεχος *E. coli*. Το ένζυμο SHV-1 (sulfhydryl reagent variable) είχε εντοπιστεί στο μεταβιβάσιμο, συζευκτικό πλασμίδιο p453 και προσέδιδε αντοχή σε πενικιλίνες και κεφαλοσπορίνες 1^{ης} γενιάς.

Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί παραπάνω από 189 μεταλλάκτες, με ορισμένους από αυτούς να έχουν αναπτύξει ικανότητα υδρόλυσης των κεφαλοσπορινών 3^{ης} γενιάς, της μονομπακτάμης και των καρβαπενέμων. Οι β-λακταμάσες τύπου SHV χωρίζονται σε τρεις υπο-ομάδες:

- (i) Την 2b: τα ένζυμα που εντάσσονται σε αυτή την υπο-ομάδα υδρολύουν πενικιλίνες και 1ης γενιάς κεφαλοσπορίνες (π.χ. κεφαλοθίνη) ενώ αναστέλλονται ισχυρά από το κλαβουλανικό.
- (ii) Την 2br: τα ένζυμα αυτής της κατηγορίας δεν επηρεάζονται από το κλαβουλανικό οξύ.
- (iii) Την 2be: η οποία συνιστά τα SHV/ESBLs τα οποία υδρολύουν μία ή περισσότερες οξίμινο- κεφαλοσπορίνες (κεφοταξίμη, κεφταζιδίμη) και αζτρεονάμη [35,42].

Συγκρίνοντας κάθε SHV/ESBL με το SHV-1 (δηλαδή τον πρώτο τύπο που ταυτοποιήθηκε) διαπιστώνεται διαφορά σε μια (SHV-2, SHV-6, SHV-8, SHV-24, SHV-27, SHV-38, SHV-41, SHV-57, SHV-98, SHV-99, SHV-102, SHV-104) έως και έξι (SHV-128) αντικαταστάσεις αμινοξέων.

Μέσα από μελέτες έχει αποδειχθεί πως οι SHV- μεταλλάκτες, όπως και οι περισσότερες β-λακταμάσες εκτεταμένου φάσματος, παρατηρούνται σε όλα τα ενδιαιτήματα (όπως σε νερά αναψυχής: λίμνες και ποτάμια, αστικά και μη επεξεργασμένα νοσοκομειακά λύματα, σε παραγωγικά και άγρια ζώα, σε λαχανικά) δυσχεραίνοντας τον περιορισμό της μικροβιακής αντοχής στα αντιβιοτικά [43].

2) TEM

Τα ένζυμα TEM κυρίως απαντώνται σε Gram- αρνητικά βακτήρια. Περίπου το 90% της αντοχής στην αμπικιλίνη των Gram- αρνητικών βακτηρίων οφείλεται στην παρουσία ενζύμων τύπου TEM [41,44].

Το 1965 στην Ελλάδα, ταυτοποιήθηκε το πρώτο γονίδιο TEM (TEM-1) από ανθεκτικό στέλεχος *E. coli* που απομονώθηκε από ασθενή. Το ένζυμο TEM-1 υδρολύει τις πενικιλίνες και τις κεφαλοσπορίνες 1^{ης} γενιάς (όπως η κεφαλοριδίνη). Από το TEM-1 προήλθε το TEM-2, με το οποίο διαφέρει σε ένα ή περισσότερα αμινοξέα. Ωστόσο έχουν παρόμοιο υδρολυτικό προφίλ και δεν θεωρούνται ESBL [35].

Τα γονίδια των TEM/ESBL κυρίως εδράζονται σε πλασμίδια και προέρχονται από μεταλλάξεις των αρχικών γονιδιακών τύπων TEM (TEM-1 και TEM-2) [45]. Οι μεταλλάξεις αυτές οδηγούν σε μονές ή πολλαπλές αντικαταστάσεις αμινοξέων που βρίσκονται γύρω από το ενεργό κέντρο.

Το 1987 στη Γαλλία, από στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* ταυτοποιήθηκε ο τύπος TEM-3, που λόγω της βελτιωμένης δράσης έναντι της κεφοταξίμης, είχε ονομαστεί αρχικά CTX-1. Το ένζυμο TEM-3 διέφερε από το TEM-2 σε δύο αμινοξέα [35,46].

Το TEM-12 ήταν το πρώτο TEM/ESBL και ανιχνεύθηκε σε στέλεχος *Klebsiella oxytoca*, το 1982 στην Αγγλία. Πλέον, η λίστα των ενζύμων TEM έχει ξεπεράσει τα 223 και συνεχίζει να αυξάνεται, καθώς συνεχώς γίνονται αναφορές για νέους μεταλλάκτες που εντοπίζονται παγκοσμίως [47].

3) CTX-M

Τα ένζυμα CTX-M κωδικοποιούνται από πλασμιδιακά γονίδια και αποτελούν την πλέον ταχέως αναπτυσσόμενη οικογένεια ESBLs. Είναι κεφοταξιμάσες, καθώς υδρολύουν αποτελεσματικότερα την κεφοταξίμη και την κεφεπίμη παρά την κεφταζίδιμη. Ακόμα, αναστέλλονται περίπου 10 φορές καλύτερα από την ταζοβακτάμη παρά από το κλαβουλανικό οξύ [41,45]. Τα πλασμίδια των CTX-M συχνά συν-μεταφέρουν και άλλα στοιχεία που προσδίδουν αντοχή μειώνοντας σημαντικά την απόκριση στη θεραπεία αντιβιοτικών. Συγκριτικά με τα άλλα ESBL,

τα CTX-M έχουν αποδειχθεί πιο αποτελεσματικά και έχουν επικρατήσει σε ποικίλα περιβάλλοντα έναντι των άλλων τύπων ESBL (όπως το TEM). Μέχρι στιγμής, έχουν αναφερθεί παραπάνω από 172 παραλλαγές CTX-M.

Σε αντίθεση με τα ESBL τύπου TEM και SHV, τα τύπου CTX-M δεν προέκυψαν από μεταλλάξεις ήδη υπαρχόντων ενζύμων. Συγκεκριμένα προέρχονται από το χρωμοσωματικό γονίδιο του είδους *Kluyvera sp* (βακτήριο που εντοπίζεται στο περιβάλλον) [45].

Ταξινομούνται σε 6 υποομάδες (CTX-M-1, CTX-M-2, CTXM-8, CTX-M-9, CTX-M-25) βάσει των αμινοξικών αλληλουχίων [48]. Τα ένζυμα CTX-M-15 και CTX-M-14 είναι οι πιο συνηθισμένες παραλλαγές που ανιχνεύονται παγκοσμίως, ακολουθούμενα από τα CTX-M-2, CTX-M-3 και CTX-M-1 [47].

1.3.1.2. Κεφαλοσπορινάσες (AmpC β-λακταμάσες)

Ανήκουν στην τάξη C κατά Ambler και στην ομάδα 1 κατά Bush. [49] Στις κεφαλοσπορινάσες συγκαταλέγονται οι CMY, FOX, ACC, LAT, ACT, MOX, DHA [50]. Η έκφρασή τους μπορεί να είναι ιδιοσυστασιακή, επαγώγιμη (ως απόκριση στην έκθεση σε β-λακτάμες) ή αποκατεσταλμένη (οδηγεί σε μόνιμη υπερπαραγωγή). Τα γονίδια των β-λακταμάσων εντοπίζονται είτε σε πλασμίδια είτε στο βασικό βακτηριακό χρωμόσωμα και μπορεί να είναι είτε επαγώγιμες είτε μη. Προσδίδουν αντοχή στις περισσότερες πενικιλλίνες, σε ορισμένες κεφαλοσπορίνες (όπως κεφοξιτίνη, κεφαλοθίνη) καθώς και σε συνδυασμούς αναστολέων β-λακταμάσων. Σε πολλά βακτήρια όπως στα περισσότερα εντεροβακτηριακά, τα ένζυμα AmpC επάγονται και εξαιτίας μεταλλάξεων τα επίπεδα έκφρασής τους μπορεί να αυξηθούν κατακόρυφα. Η υπερ-έκφραση προσδίδει ικανοποιητική αντοχή σε εκτεταμένου φάσματος κεφαλοσπορίνες συμπεριλαμβανομένων της κεφοταξίμης, της κεφταζιδίμης και της κεφτριαξόνης. Επιπρόσθετα, όταν συνυπάρχει απώλεια πορινών προκαλείται αντοχή και στις καρβαπενέμες [50,51].

1.3.1.3 Καρβαπενεμάσες

Οι καρβαπεναμάσες έχουν την ικανότητα να υδρολύουν καρβαπενέμες, τα πλέον ισχυρά διαθέσιμα αντιβιοτικά, και ταξινομούνται κατά Ambler στις εξής μοριακές τάξεις:

- 1.A: Χρωμοσωματικές: SME, NMC/IMI, Πλασμιδιακές (KPC, GES)
- 2.B: Μεταλλο-β-λακταμάσες (VIM, NDM και IMP) και
- 3.D: οξακιλινάσες με δράση καρβαπενεμάσης, γνωστές και ως CHDLs (Class D carbapenem-hydrolyzing β-lactamases). Σε αυτή τη κατηγορία ανήκει και το ένζυμο OXA-48] [52,53].

Σύμφωνα με το Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, τα Εντεροβακτηριακά που είναι ανθεκτικά σε καρβαπενέμες αποτελούν ιδιαίτερα σοβαρό ζήτημα για την υγεία του ανθρώπου λόγω της υψηλής συσχέτισης τους με θνησιμότητα και νοσηρότητα [54]. Οι πιο αποτελεσματικοί και συχνοί τύποι καρβαπενεμασών είναι οι: KPC, VIM, IMP, NDM [55].

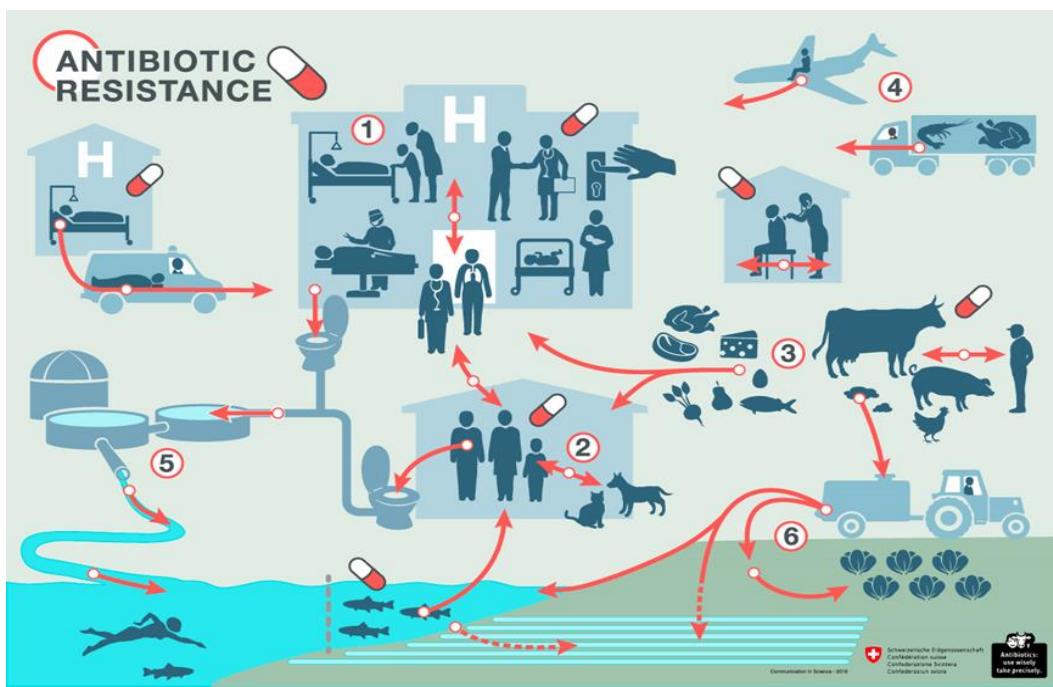
1.4 Διασπορά αντοχής στο ευρύτερο περιβάλλον

Είναι πλέον γνωστό πως η μικροβιακή αντοχή δεν περιορίζεται μόνο στο χώρο του νοσοκομείου. Συνεχώς σε περιβαλλοντικά ενδιαιτήματα (όπως λίμνες, ποτάμια, θάλασσες, λύμα) εντοπίζονται ανθεκτικά βακτήρια, συμπεριλαμβανομένων των ανθεκτικών στελεχών *E.coli* [56].

Οι άνθρωποι προσβάλλονται από ανθεκτικά βακτήρια μέσω της επαφής με άλλους ανθρώπους, ζώα, μολυσμένα τρόφιμα ή νερό (**Εικόνα 8**) [57]. Τα ανθεκτικά βακτήρια από τα ζώα μπορούν να μεταδοθούν στον άνθρωπο είτε με άμεση επαφή είτε μέσω κατανάλωσης τροφίμων ζωικής προέλευσης [16,58]. Επιπλέον, το μεταναστευτικό κύμα, τα επαγγελματικά ταξίδια, ο τουρισμός, το διεθνές εμπόριο και γενικότερα η παγκοσμιοποίηση έχουν συμβάλει στην εξάπλωση των πολυ-ανθεκτικών στελεχών [58].

Στο περιβάλλον απελευθερώνονται ανθεκτικά μικρόβια αλλά και υψηλές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών μέσω των διάφορων ανθρώπινων δραστηριοτήτων. Η αύξηση των επιπέδων στο περιβάλλον τροφοδοτεί το φαινόμενο της αντοχής, καθώς ευνοεί την επικράτηση των ανθεκτικών βακτηριακών πληθυσμών [16,17].

Ειδικά για το υδάτινο περιβάλλον έχει αναφερθεί ότι αποτελεί δεξαμενή ανθεκτικών στελεχών και γονιδίων αντοχής [16]. Η παγκόσμια εξάπλωση βακτηρίων που παράγουν εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (ESBL), ιδίως στελεχών *E. coli* και *Klebsiella pneumoniae*, αποτελεί σοβαρό ζήτημα για την αντιμετώπιση λοιμώξεων που οφείλονται σε πολυ-ανθεκτικά βακτήρια. Από τη δεκαετία του 2000, τα ποσοστά ανίχνευσης στελεχών *E. coli* που παράγουν ESBL τύπου CTX-M στην κοινότητα έχουν αυξηθεί δραματικά. Το γεγονός αυτό οδηγεί και στην αύξηση τους εντός του χώρου του νοσοκομείου [56,59].



Εικόνα 8 Παραδείγματα διασποράς αντιμικροβιακής αντοχής [60]

Κεφάλαιο 2: Πειραματικό μέρος

2.1 Σκοπός

Σκοπός της πτυχιακής εργασίας είναι:

- A. Η απομόνωση στελεχών *E. coli* από δείγματα νερού ποταμού και λυμάτων (νοσοκομειακού και αστικού).
- B. Η μελέτη των προφίλ αντοχής τους
- Γ. Η ανίχνευση γονιδίων αντοχής που ευθύνονται για τα πρότυπα αντοχής των στελεχών
- Δ. Ταξινόμηση σε φυλογενετικές ομάδες
- Ε. Η μεταξύ τους σύγκριση

2.2 Δειγματοληψία

Κατά την δειγματοληψία του Νοεμβρίου 2020 πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία πεδίου στην περιοχή της Λιβαδειάς, κατά την οποία συλλέχθηκαν τα εξής δείγματα:

1. Μερικώς επεξεργασμένο λύμα από το Γενικό Νοσοκομείο της Λιβαδειάς (από δεξαμενή εξωτερικά του Νοσοκομείου)
2. Λύμα από την έξοδο της εγκατάστασης επεξεργασίας λύματος (Ε.Ε.Λ.) της Λιβαδειάς
3. Νερό από το ποτάμι Έρκυνα της Λιβαδειάς (σημείο που απέχει 100m από την έξοδο των λυμάτων, ΣΔ1 του χάρτη στην **Εικόνα 9**)
4. Νερό από το σημείο συνάντησης του ποταμού Έρκυνα με το Βοιωτικό Κηφισό (περίπου 6 Km από την έξοδο των λυμάτων της Ε.Ε.Λ., σημείο ΣΔ2 του χάρτη στην **Εικόνα 9**).

Τα δείγματα νερού και λύματος επεξεργάστηκαν σύμφωνα με την πρότυπη μέθοδο διήθησης από μεμβράνες για την ανίχνευση και καταμέτρηση αποικιών *E.coli* (ISO 9308.01-1:2017).



Εικόνα 9 Τα τέσσερα σημεία δειγματοληψίας

2.3 Επεξεργασία δειγμάτων

Αρχικά τα δείγματα παρατηρήθηκαν μακροσκοπικά και στη συνέχεια, ύστερα από καλή ανάδευση ξεκίνησε η διαδικασία της διήθησης σε κατάλληλη διηθητική συσκευή μέσω μεμβράνης Whatman, Schleicher and Schuell 0,45μm (ISO 9308.01-1:2017). Αμέσως μετά οι μεμβράνες τοποθετήθηκαν στο εκλεκτικό υπόστρωμα χρωμογόνου άγαρ (chromogenic coliform agar-CCA) με και χωρίς προσθήκη αντιβιοτικού αμπικιλίνης (AMP). Τα τρυβλία επωάστηκαν στους 37°C για 24 ώρες.

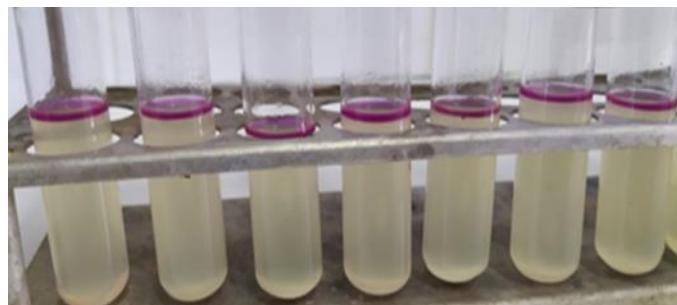
2.4 Απομόνωση και ταυτοποίηση στελεχών *E. coli*

Μετά την επώαση ακολούθησε καταμέτρηση και απομόνωση των αποικιών που δίνουν θετική αντίδραση β-D-γαλακτοσιδάσης και β-D-γλυκούρονιδάσης (οι αποικίες *E.coli* στο CCA έχουν σκούρο μπλε έως βιολετί χρώμα) (ISO 9308.01-1:2017). Στη συνέχεια οι ύποπτες αποικίες *E. coli* που απομονώθηκαν ταυτοποιήθηκαν περαιτέρω. Η περαιτέρω ταυτοποίηση στηρίχθηκε στην μορφολογία και το χρώμα των αποικιών στο εκλεκτικό/διαχωριστικό θρεπτικό MacConkey agar, σε βιοχημικές μεθόδους και σε μοριακές δοκιμασίες.

Το MacConkey καθώς περιέχει χολικά άλατα και κρυσταλλικό ιώδες, που εμποδίζουν την ανάπτυξη των περισσότερων Gram+ βακτηρίων, χρησιμοποιείται για την εκλεκτική απομόνωση των Gram-αρνητικών βακτηρίων. Επίσης περιέχει πεπτόνη, λακτόζη και ουδέτερο ερυθρό ως δείκτη pH που χρωματίζει κόκκινες τις αποικίες που διασπούν την λακτόζη όπως είναι το *E.coli* [23].

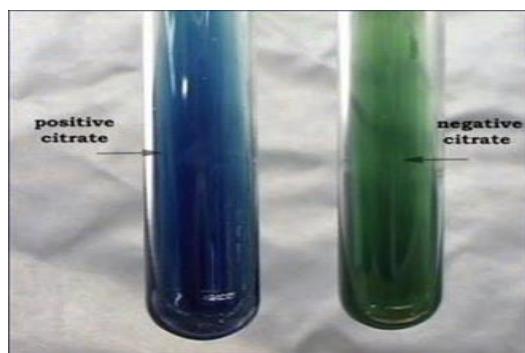
Για την **βιοχημική ταυτοποίηση** των ύποπτων αποικιών *E. coli* εφαρμόστηκαν οι δοκιμασίες ινδόλης και κιτρικών.

Η δοκιμασία ινδόλης βασίζεται στο ότι ορισμένα βακτήρια, όπως το *E.coli*, έχουν ικανότητα διάσπασης του αμινοξέος τρυπτοφάνης, από την οποία παράγεται ινδόλη. Σκοπός της είναι η διαφοροποίηση της *E.coli* από *Klebsiella pneumoniae/Enterobacter* (που δίνουν αρνητικό αποτέλεσμα). Η παραγωγή ινδόλης ανιχνεύεται με την προσθήκη αντιδραστηρίου που περιέχει την χημική ένωση παρα-διμεθυλ-αμινο-βενζαλδευδη (αντιδραστήριο Kovac's). Συγκεκριμένα, σε θετική αντίδραση σχηματίζεται εντός 30'' δακτύλιος κόκκινου-κερασί χρώματος στην επιφάνεια του υγρού θρεπτικού μέσου Tryptophan broth (Trypton water) (**Εικόνα 10**).



Εικόνα 10 Σχηματισμός δακτυλίου στην επιφάνεια του υγρού. Θετική δοκιμασία ινδόλης.

Η δοκιμασία κιτρικών στηρίζεται στην ικανότητα των βακτηρίων να χρησιμοποιούν τα κιτρικά άλατα ως μοναδική πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη τους, με αποτέλεσμα την αλκαλοποίηση του θρεπτικού υποστρώματος. Σκοπός της δοκιμασίας είναι η διαφοροποίηση μεταξύ *E.coli* (δίνει αρνητικό αποτέλεσμα) και της *Klebsiella/Enterobacter/Proteus* (δίνουν θετικό αποτέλεσμα). Για την δοκιμασία αυτή χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα Simmon's. Σε θετικό αποτέλεσμα το υλικό από πράσινο γίνεται σκούρο μπλε ενώ σε αρνητικό αποτέλεσμα διατηρεί το πράσινο χρώμα του (**Εικόνα 11**).



Εικόνα 11 Θετική (αριστερά) και αρνητική (δεξιά) δοκιμασία κιτρικών [61]

Η **μοριακή ταυτοποίηση** των στελεχών *E. coli* βασίστηκε στην ανίχνευση του συντηρημένου (housekeeping) γονιδίου της β-γλυκουρονιδάσης, uidA με την μοριακή μέθοδο της PCR [62].

2.5 Έλεγχος επιπέδων ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

Ο έλεγχος της μικροβιακής ευαισθησίας πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών σε άγαρ (μέθοδος Kirby Bauer). Τα στελέχη εξετάστηκαν ως προς την ευαισθησία τους σε 18 ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά 7 διαφορετικών τάξεων: πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες, μονομπακτάμες, αμινογλυκοσίδες, φλουροκινολόνες και ο συνδιασμός τριμεθοπορίνη–σουλφαμεθοξαζόλη (**Πίνακας 2**). Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων και ο χαρακτηρισμός των στελεχών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις προτεινόμενες οδηγίες του EUCAST/ECOFFS [63].

Σύμφωνα με τις οδηγίες αυτές, χαρακτηρίστηκαν ως:

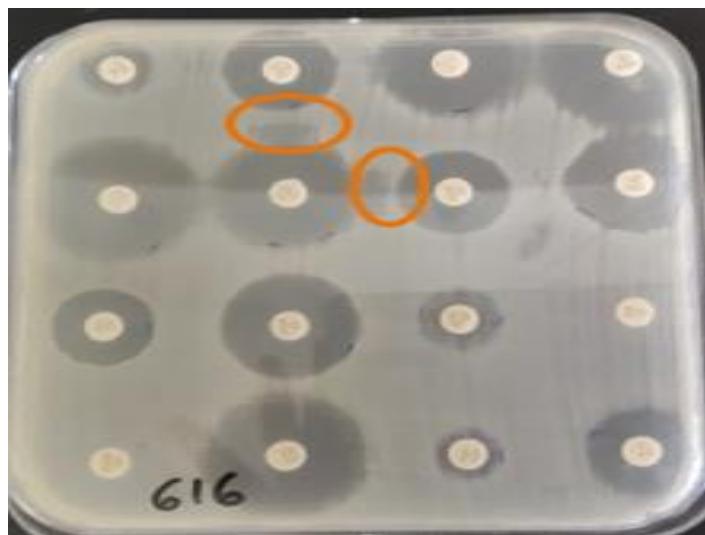
- Ευαίσθητα/άγριου τύπου (wild type, WT): δεν παρουσιάζουν αντοχή σε καμία κατηγορία αντιβιοτικών
- Ανθεκτικά (resistant,R): παρουσιάζουν αντοχή σε τουλάχιστον μια κατηγορία αντιβιοτικών
- Πολυ-ανθεκτικά (multi-drug resistant, MDR): παρουσιάζουν αντοχή σε τουλάχιστον τρεις κατηγορίες αντιβιοτικών

Πίνακας 2 Δίσκοι αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν

Κατηγορία αντιβιοτικού	Αντιβιοτικά δισκία	Περιεκτικότητα ανά δισκίο	Όρια
Πενικιλλίνες	Αιμοξικιλίνη+Κλαβουλανικό οξύ (AMC)	30µg	WT: ≥ 19
	Πιπερακιλλίνη+Ταζοβακτάμη (TZP)	36µg	WT: ≥ 20
	Αμπικιλλίνη (AMP)	10µg	WT: ≥ 14
	Πιπερακιλλίνη (PIP)	100µg	WT: ≥ 20
Κεφαλοσπορίνες	Κεφοξιτίνη (FOX)	30µg	WT: ≥ 19
	Κεφοταξίμη (CTX)	30µg	WT: ≥ 23
	Κεφταζιδίμη (CAZ)	30µg	WT: ≥ 22
	Κεφουροξίμη (CXM)	30µg	WT: ≥ 18
	Κεφεπίμη (FEP)	30µg	WT: ≥ 28
	Κεφτριαζόνη (CRO)	30µg	WT: ≥ 25
Μονοβακτάμες	Αζτρεονάμη (ATM)	30µg	WT: ≥ 26
Καρβαπενέμες	Μεροπενέμη (MEM)	10µg	WT: ≥ 25
	Ιμπενέμη (IMP)	10µg	WT: ≥ 25
Αμονογλυκοσίδες	Γενταμικίνη (GM)	10µg	WT: ≥ 16
	Αμικασίνη (AN)	30µg	WT: ≥ 18
Φλουροκινολόνες	Ναλικό οξύ (NAL)	30µg	WT: ≥ 17
	Σιπροφλοξασίνη (CIP)	5µg	WT: ≥ 25
Ανάμεικτος Παράγοντας	Σουλφαμεθαξαζόλη+Τριμεθοπρίμη (STX)	25µg	WT: ≥ 16

Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε φαινοτυπικός έλεγχος της παραγωγής β-λακταμασών εκτεταμένου φάσματος (ESBLs) με τη δοκιμασία συνέργειας με κλαβουλανικό οξύ (Double-disk synergy test, DDST). Το DDST πραγματοποιείται τοποθετώντας δίσκους κεφαλοσπορίνης (FEP, CAZ, CTX) και αζτρεονάμης (ATM) δίπλα σε δίσκο που περιέχει κλαβουλανικό οξύ (αμοξυκιλίνη/κλαβουλανικό, AMC). Σε θετικό αποτέλεσμα παρατηρείται παρεκτροπή της ζώνης αναστολής.

(Εικόνα 12)



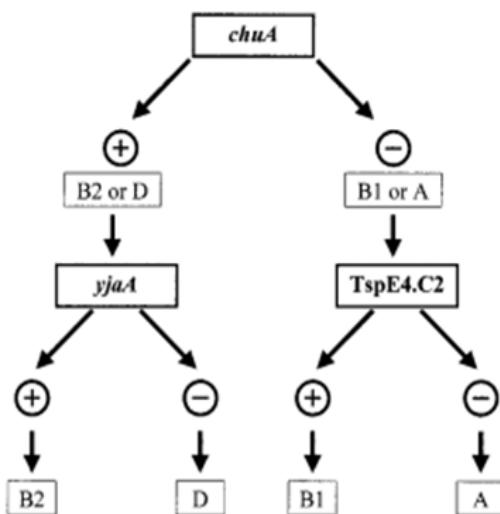
Εικόνα 12 Παράδειγμα θετικής δοκιμασίας DDS

2.6 Μοριακός έλεγχος γονιδίων αντοχής

Τα DDST- θετικά στελέχη ελέγχθηκαν στη συνέχεια για την παρουσία γονιδίων που εκφράζουν για ESBL [blaTEM-A, blaCTX-M (groups 1 και 2)], με τη μοριακή μέθοδο της PCR βάσει δημοσιευμένων πρωτοκόλλων [64,65].

2.7 Φυλογενετική τυποποίηση(Phylogrouping) των στελεχών *E. coli*

Η κατάταξη των στελεχών σε φυλογενετικές ομάδες βασίστηκε στη μέθοδο triplex (τριπλής) PCR-Phylogrouping βάσει δημοσιευμένου πρωτοκόλλου [66]. Με την μέθοδο αυτή προσδιορίζεται η παρουσία ή απουσία δύο γονιδίων των *chuA*, *yjaA* και ενός γενετικού τόπου άγνωστης λειτουργίας του *TspE4.C2*. Η τεχνική αυτή βοηθά στην ταξινόμηση των στελεχών σε τέσσερεις φυλογενετικές ομάδες (A, B1, B2 και D) σύμφωνα με το διάγραμμα της **Εικόνας 13**.



Εικόνα 13 Καθορισμός φυλογενετικής ομάδας [66]

Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα

3.1 Αποτελέσματα διήθησης

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζεται ο αριθμός των αποικιών που καταμετρήθηκαν σε διαφορετικούς όγκους με και χωρίς προσθήκη του αντιβιοτικού αμπικιλίνης (AMP) από το νοσοκομειακό λύμα (**Πίνακας 3**), από το λύμα εξόδου της εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων (Ε.Ε.Λ) (**Πίνακας 4**), από το ποτάμι Έρκυνα (**Πίνακας 5**) και από τη συνάντηση ποταμών Έρκυνα – Β. Κηφισού (**Πίνακας 6**).

Πίνακας 3 Αποικίες που καταμετρήθηκαν από το δείγμα νοσοκομειακού λύματος

ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	ΟΓΚΟΣ ΠΟΥ ΔΙΗΘΗΘΗΚΕ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΠΟΙΚΙΩΝ
CCA	1	Συρροή
	0,1	94
	0,01	29
CCA-AMP	1	85
	0,1	12
	0,01	0

Πίνακας 4 Αποικίες που καταμετρήθηκαν από δείγμα λύματος της Ε.Ε.Λ.

ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	ΟΓΚΟΣ ΠΟΥ ΔΙΗΘΗΘΗΚΕ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΠΟΙΚΙΩΝ
CCA	1	Συρροή
	0,1	38
	0,01	9
CCA-AMP	1	20
	0,1	4
	0,01	0

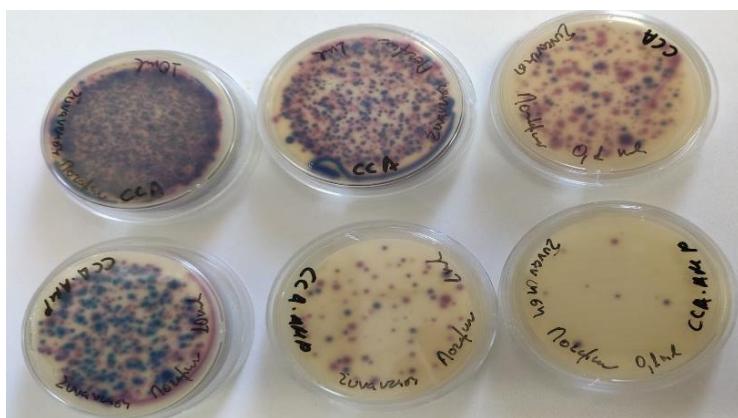
Πίνακας 5 Αποικίες που καταμετρήθηκαν από το δείγμα νερού που συλλέχθηκε από το ποτάμι Έρκυνα

ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	ΟΓΚΟΣ ΠΟΥ ΔΙΗΘΗΘΗΚΕ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΠΟΙΚΙΩΝ
CCA	10	Συρροή
	1	Συρροή
	0,1	90
	0,01	35
CCA-AMP	10	89
	1	25
	0,1	2

Πίνακας 6 Αποικίες που καταμετρήθηκαν από το δείγμα νερού που συλλέχθηκε από το σημείο συνάντησης των ποταμών Έρκυνα – Β. Κηφισού

ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	ΟΓΚΟΣ ΠΟΥ ΔΙΗΘΗΘΗΚΕ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΠΟΙΚΙΩΝ
CCA	10	Συρροή
	1	80
	0,1	43
CCA-AMP	10	86
	1	20
	0,1	2

Στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 14**) βλέπουμε τις αποικίες που έχουν αναπτυχθεί σε CCA και σε CCA-AMP από το δείγμα νερού που συλλέχθηκε από το σημείο συνάντησης των ποταμών. Σε υψηλούς όγκους διήθησης στο CCA παρατηρούμε συρροή αποικιών, ενώ στο CCA-AMP οι αποικίες είναι πολύ πιο λίγες και ευδιάκριτες.



Εικόνα 14 Ανάπτυξη αποικιών σε CCA και CCA-AMP.

3.2 Αποτελέσματα απομόνωσης και ταυτοποίησης

Από τις αποικίες που καταμετρήθηκαν απομονώθηκαν:

- 21 στελέχη από νοσοκομειακό λύμα
- 37 στελέχη από το λύμα εξόδου της εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων
- 65 στελέχη από το ποτάμι Έρκυνα
- 20 στελέχη από τη συνάντηση ποταμών

Βάσει των αποτελεσμάτων των ταυτοποιητικών μεθόδων, ως *E. coli* ταυτοποιήθηκαν:

- 18 στελέχη από νοσοκομειακό λύμα
- 36 στελέχη από το λύμα εξόδου από εγκατάσταση επεξεργασία λύματος
- 62 στελέχη από το νερό του ποταμού Έρκυνα
- 15 στελέχη από το νερό του σημείου συνάντησης των ποταμών

Τα υπόλοιπα απορρίφθηκαν λόγω άχρωμων αποικιών στο υλικό MacConkey, αρνητικού τεστ ινδόλης ή θετικό Simmon's ή έλλειψης γονιδίου uidA.

3.3 Αποτελέσματα του ελέγχου επιπέδου ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

Βάσει των αποτελεσμάτων από τα αντιβιογράμματα και σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του EUCAST/ECOFFS παρουσιάζονται αναλυτικά τα χαρακτηριστικά των στελεχών από το νοσοκομειακό λύμα (**Πίνακας 7**), από το λύμα εξόδου της Ε.Ε.Λ. (**Πίνακας 8**), από το ποτάμι Έρκυνα (**Πίνακας 9**) και από το ποτάμι Β. Κησισσού (σημείο συνάντησης με Έρκυνα) (**Πίνακας 10**).

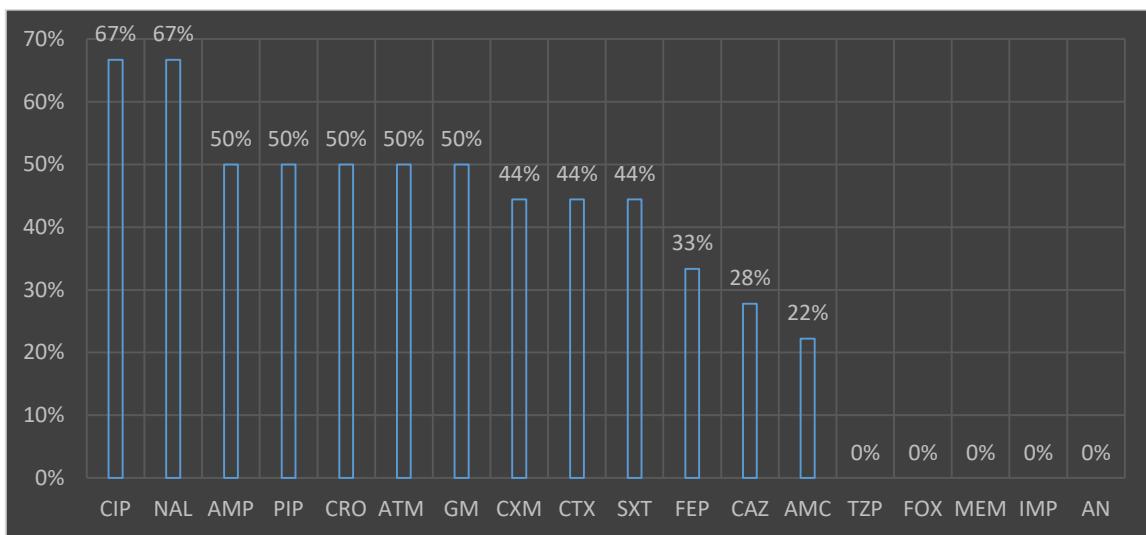
3.3.1 Επίπεδα ευαισθησίας στα αντιβιοτικά των στελεχών του νοσοκομειακού λύματος

Στον **Πίνακα 7** παρουσιάζονται αναλυτικά τα χαρακτηριστικά των στελεχών που προήλθαν από το νοσοκομειακό λύμα.

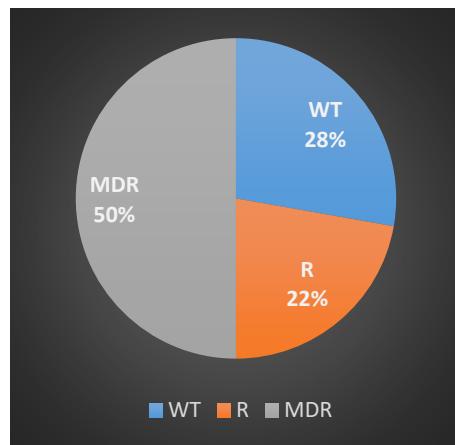
Πίνακας 7 Επίπεδα ευαισθησίας στα αντιβιοτικά των στελεχών που απομονώθηκαν από το νοσοκομειακό λύμα

Στέλεχος	Πρότυπο Αντοχής	Προφίλ αντοχής
670		WT
671	CIP, NAL	R
672		WT
673	AMP,PIP,CAZ, CRO, ATM, NAL	MDR
674	CIP, NAL	R
675		WT
676		WT
677		WT
678	AMP,AMC,PIP,CXM,CAZ,CTX, FEP, CRO, ATM, GN, SXT, CIP, NAL	MDR
679	CIP, NAL	R
680	AMP,AMC,PIP,CXM,CAZ,CTX, FEP, CRO, ATM, GN, SXT, CIP, NAL	MDR
681	AMP,PIP,CXM,CTX, FEP, CRO, GN, SXT, CIP, NAL	MDR
682	AMP,AMC,PIP,CXM,CAZ,CTX, FEP, CRO, ATM, GN, SXT, CIP, NAL	MDR
683	AMP,AMC,PIP,CXM,CAZ,CTX, FEP, CRO, ATM, GN, SXT, CIP, NAL	MDR
684	AMP,PIP,CXM,CTX, CRO, ATM, GN, SXT, CIP, NAL	MDR
685	AMP, PIP, CXM, CTX, CRO, ATM, GN, SXT, CIP, NAL	MDR
686	AMP, AMC, PIP, CXM, CTX, CRO, ATM, GN, SXT, CIP, NAL	MDR
690	NAL	R

Στο παρακάτω διάγραμμα (**Εικόνα 15**) φαίνονται τα ποσοστά (%) αντοχής, στον κάθε αντιβιοτικό παράγοντα, των στελεχών που απομονώθηκαν από το νοσοκομειακό λύμα. Παρατηρούμε ότι η συχνότητα αντοχής στις φθοριοκινολόνες (CIP, NAL) και στις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς (CAZ, FEP, CTX, CRO) ήταν πολύ υψηλή.



Εικόνα 15 Ποσοστά (%) αντοχής ανά αντιβιοτικό των στελεχών του νοσοκομειακού λύματος



Εικόνα 16 Συχνότητα εμφάνισης των τριών προφίλ αντοχής (R, MDR και WT) μεταξύ των στελεχών που απομονώθηκαν από το νοσοκομειακό λύμα

Από τα 18 στελέχη του νοσοκομειακού λύματος τα 5 (28%) ήταν άγριου τύπου (WT), τα 4 (22%) ανθεκτικά (R) ενώ η πλειοψηφία των στελεχών (9/18 ή 50%) ήταν πολυ-ανθεκτικά στελέχη (MDR).

3.3.2 Επίπεδα ευαισθησίας στα αντιβιοτικά των στελεχών του λύματος της Ε.Ε.Λ.

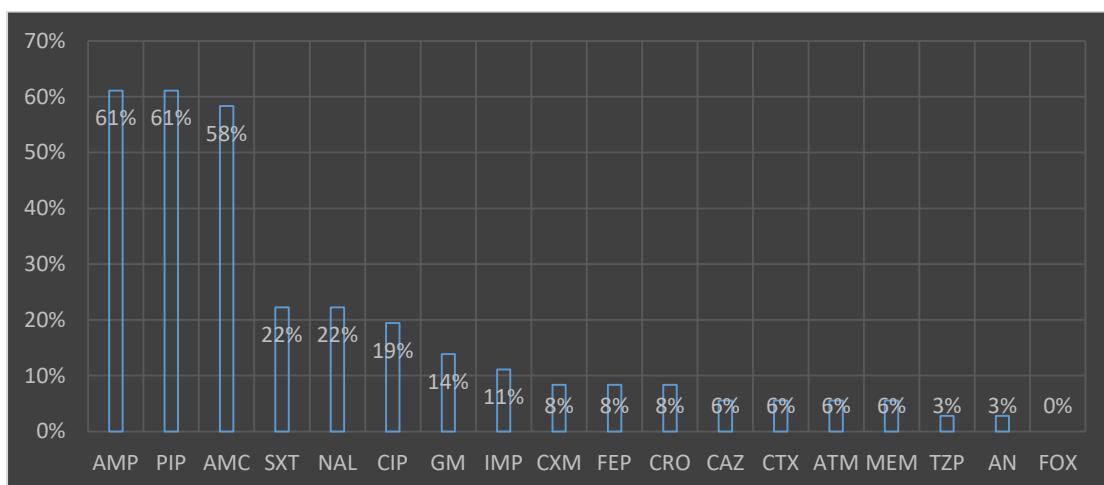
Στον **Πίνακα 8** παρουσιάζονται αναλυτικά τα χαρακτηριστικά των στελεχών που απομονώθηκαν από το λύμα της εξόδου της Ε.Ε.Λ.

Πίνακας 8 Επίπεδα ευαισθησίας στα αντιβιοτικά των στελεχών που απομονώθηκαν από λύμα της εξόδου της Ε.Ε.Λ.

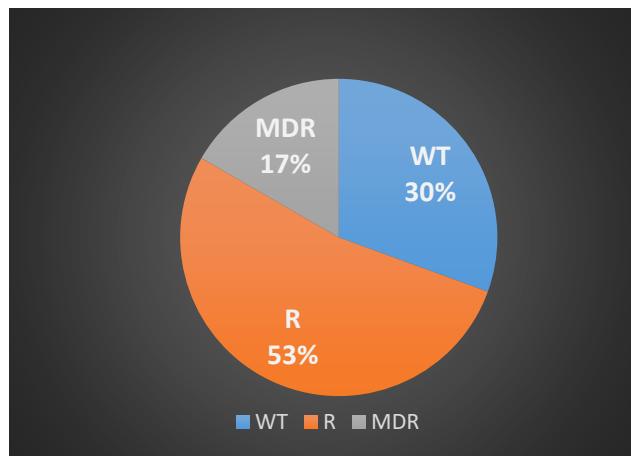
Στέλεχος	Πρότυπο Αντοχής	Προφίλ αντοχής
633	AMP, PIP, GN	R
634	AMP, AMC, PIP, IMP, NAL	MDR
635	AMP, AMC, PIP	R
636	AMP, AMC, PIP	R
637	AMP, AMC, PIP	R
638	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, SXT, NAL	MDR
639	AMP, AMC, PIP, FEP, SXT	R
640	AMP, PIP, SXT, CIP, NAL	R
641	AMP, AMC, PIP, SXT, CIP, NAL	MDR
642	AMP, AMC, TZP, PIP, SXT	R
643	AMP, AMC, PIP, GN	R
644	AMP, AMC, PIP	R
645	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, NAL	MDR
646	AMP, AMC, PIP	R
647	AMP, AMC, PIP	R
648	AMP, AMC, PIP	R
649	AMP, AMC, PIP, CIP, NAL	R
650	AMP, AMC, PIP, GN	R
651	AMP, AMC, PIP	R
652	AMP, PIP, GN, SXT, CIP, NAL	MDR
653		WT
654		WT
655	AMP, PIP	R
656	SXT	R
658		WT
659	AMP, PIP, GN, SXT, CIP, NAL	MDR
660		WT
661	AMC, CXM, CRO, AN	R
662		WT
663		WT
664		WT
665		WT

666	IMP, AN	R
667		WT
668		WT
669		WT

Στο παρακάτω διάγραμμα (**Είκονα 17**) παρουσιάζονται τα ποσοστά (%) αντοχής, στο κάθε αντιβιοτικό, των στελεχών που προήλθαν από το λύμα εξόδου της Ε.Ε.Λ. Παρατηρούμε ότι τα στελέχη ήταν περισσότερο ανθεκτικά στις πενικιλίνες: Αμπικιλίνη(AMP), Πιπερακιλίνη(PIP) αλλά και σε Αμοξυκιλίνη-Κλαβουλανικό Οξύ (AMC).



Εικόνα 17 Ποσοστά (%) αντοχής ανά αντιβιοτικό των στελεχών του λύματος εξόδου της Ε.Ε.Λ



Εικόνα 18 Συχνότητα εμφάνισης των τριών προφίλ αντοχής (R, MDR και WT) μεταξύ των στελεχών που απομονώθηκαν από λύμα εξόδου της Ε.Ε.Λ

Από τα 36 στελέχη, τα 10 (30%) ήταν άγριου τύπου (WT), τα 6 (17%) πολυ-ανθεκτικά (MDR), ενώ η πλειοψηφία των στελεχών (19/36, 53%) χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικά

3.3.3 Επίπεδα ευαισθησίας στα αντιβιοτικά των στελεχών που απομονώθηκαν από το νερό του ποταμού Έρκυνα

Στον **Πίνακα 9** παρουσιάζονται αναλυτικά τα χαρακτηριστικά των στελεχών που απομονώθηκαν από το νερό του ποταμού Έρκυνα.

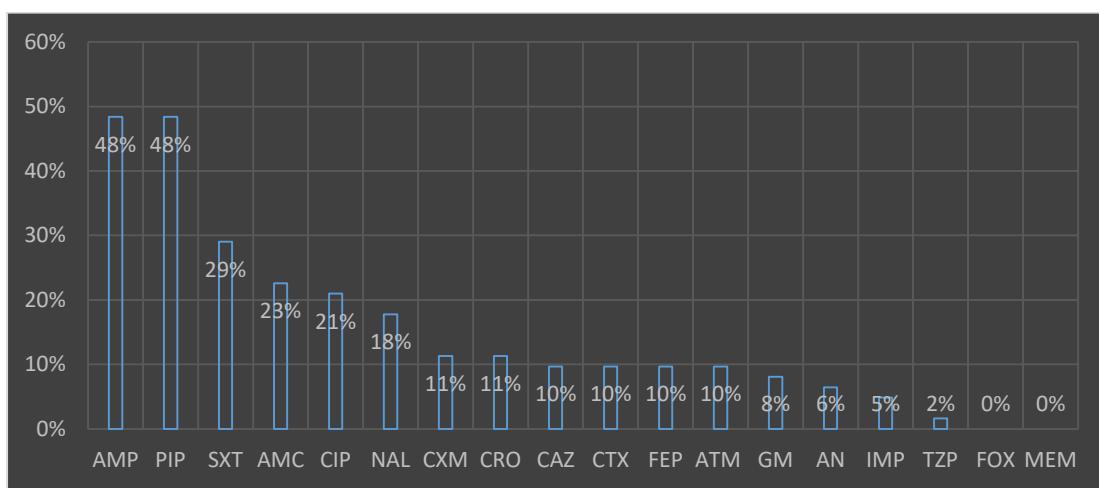
Πίνακας 9 Επίπεδα ευαισθησίας στα αντιβιοτικά των στελεχών που απομονώθηκαν από το νερό του ποταμού Έρκυνα

Στέλεχος	Πρότυπο Αντοχής	Προφίλ αντοχής
588	AMP, PIP	R
589	AMP, AMC, PIP	R
590	AMP, AMC, PIP, SXT	R
591	AMP, AMC, PIP	R
592	AMP, AMC, PIP, SXT	R
594	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, CRO, ATM, CIP, NAL	MDR
595	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM	MDR
596	AMP, AMC, PIP, SXT	R
597	AMP, PIP, SXT	R
598	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, GN, SXT, NAL	MDR

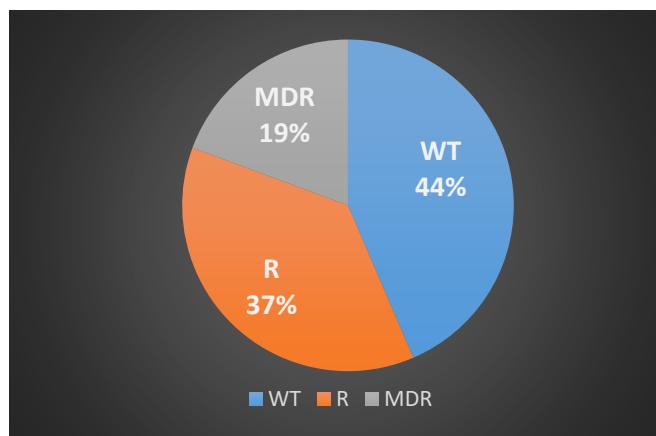
599	AMP, PIP, AN, CIP	MDR
600	AMP, AMC, PIP	R
601	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO	R
602	AMP, PIP, CXM, CAZ, CRO, ATM	MDR
603	AMP, AMC, TZP, PIP, ATM, GN, AN, SXT	MDR
604	AMP, AMC, PIP	R
605	AMP, PIP	R
606	AMP, AMC, PIP, SXT, CIP, NAL	MDR
607	AMP, AMC, PIP, GN, AN, SXT, CIP, NAL	MDR
608	AMP, AMC, PIP, SXT	R
609	AMP, PIP	R
610	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, GN, SXT, NAL	MDR
611	AMP, PIP, CXM, CTX, FEP, CRO	R
632	AMP, PIP, CIP, NAL	R
691		WT
692		WT
693	AMP, AMC, PIP, SXT, CIP, NAL	MDR
694		WT
695		WT
696	SXT, NAL, CIP	R
697	AMP, PIP, STX	R
698	AMP, PIP, STX, NAL	MDR
699		WT
700	STX, NAL	R
701		WT
702	IMP, STX	R
703		WT
704		WT
705	AMC	R
706		WT
707		WT
708		WT
709		WT
710	AMP, PIP	R
711		WT
712		WT
713		WT
714		WT
715		WT
716		WT
717	FEP, CIP, NAL	R
718	AMP, PIP, GM, STX, CIP, NAL	MDR
719		WT
720	AMP, PIP	R
721		WT
722		WT

723	WT
724	WT
725	WT
726	WT
727	WT
728	WT

Στο παρακάτω διάγραμμα (**Εικόνα 19**) παρουσιάζονται τα ποσοστά (%) αντοχής, στο κάθε αντιβιοτικό, των στελεχών που απομονώθηκαν από το νερό του ποταμού Έρκυνα. Παρατηρούμε ότι τα στελέχη ήταν περισσότερο ανθεκτικά στις πενικιλίνες: Αμπικιλίνη (AMP), Πιπερακιλίνη (PIP).



Εικόνα 19 Ποσοστά (%) αντοχής ανά αντιβιοτικό των στελεχών του νερού του ποταμού Έρκυνα



Εικόνα 20 Συχνότητα εμφάνισης των τριών προφίλ αντοχής (R, MDR και WT) μεταξύ των στελεχών που απομονώθηκαν από το νερό του ποταμού Έρκυνα

Από τα 62 στελέχη, τα 23 (37%) ήταν ανθεκτικά (R), τα 6 (17%) ήταν πολύ-ανθεκτικά (MDR), ενώ τα άγριου τύπου ήταν 27 (44%).

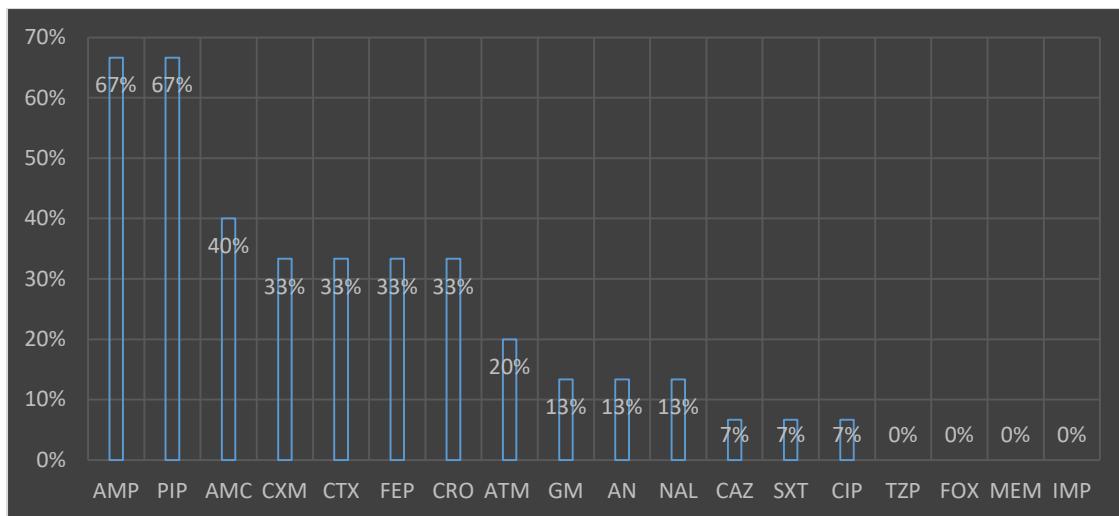
3.3.4 Επίπεδα ευαισθησίας στα αντιβιοτικά των στελεχών που απομονώθηκαν από το νερό του ποταμού Β. Κηφισού (σημείο συνάντησης με Έρκυνα)

Στον **Πίνακα 10** παρουσιάζονται αναλυτικά τα χαρακτηριστικά των στελεχών που απομονώθηκαν από νερό του ποταμού Β. Κηφισού (σημείο συνάντησης με Έρκυνα).

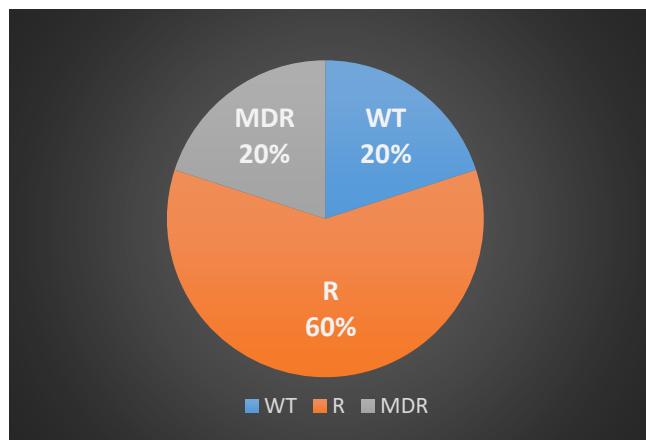
Πίνακας 10 Επίπεδα ευαισθησίας στα αντιβιοτικά των στελεχών που απομονώθηκαν από νερό του ποταμού Β. Κηφισού (σημείο συνάντησης με Έρκυνα)

Στέλεχος	Πρότυπο Αντοχής	Προφίλ αντοχής
612	AMP, AMC, PIP, NAL	R
613	AMP, AMC, PIP	R
614	AMP, PIP, CXM, CTX, FEP, CRO	R
615	AMP, PIP, GN	R
616	AMP, PIP, CXM, CTX, FEP, CRO	R
617	AMP, AMC, PIP	R
618	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM	MDR
619	AMP, AMC, PIP	R
620	AMP, PIP, CXM, CTX, FEP, CRO, ATM, AN	MDR
623	SXT, CIP, NAL	R
624		WT
626		WT
628	GN	R
629		WT
630	AMP, AMC, PIP, CXM, CTX, FEP, CRO, ATM, AN	MDR

Στο παρακάτω διάγραμμα (**Εικόνα 21**) φαίνονται τα ποσοστά (%) στο κάθε αντιβιοτικό, των στελεχών που προήλθαν από το σημείο συνάντησης των ποταμών. Σύμφωνα με αυτό τα περισσότερα στελέχη παρουσίασαν αντοχή στις πενικιλίνες: Αμπικιλίνη (AMP), Πιπερακιλίνη (PIP) ενώ αρκετά συχνή ήταν η συχνότητα εμφάνισης αντοχής στις κεφαλοσπορίνες (FEP, CTX, CRO).



Εικόνα 21 Ποσοστά (%) αντοχής ανά αντιβιοτικό των στελεχών που απομονώθηκαν από δείγμα νερού που συλλέχθηκε από το σημείο συνάντησης των ποταμών

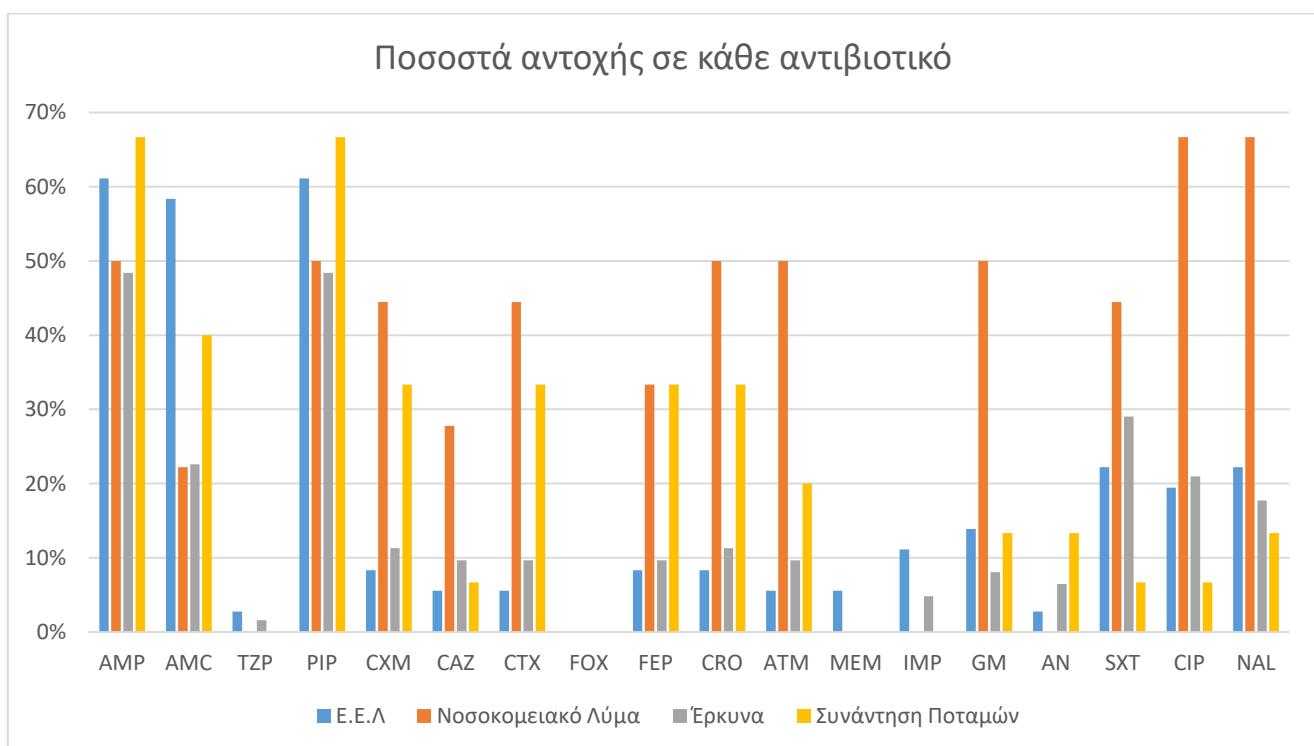


Εικόνα 22 Συχνότητα εμφάνισης των τριών προφίλ αντοχής (R, MDR και WT) μεταξύ των στελεχών που απομονώθηκαν από δείγμα νερού που συλλέχθηκε από το σημείο συνάντησης των ποταμών

Από τα 15 στελέχη τα 3 (20%) ήταν άγριου τύπου, τα 3 (20%) πολυ-ανθεκτικά (MDR) ενώ 9 (60%) χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικά (R).

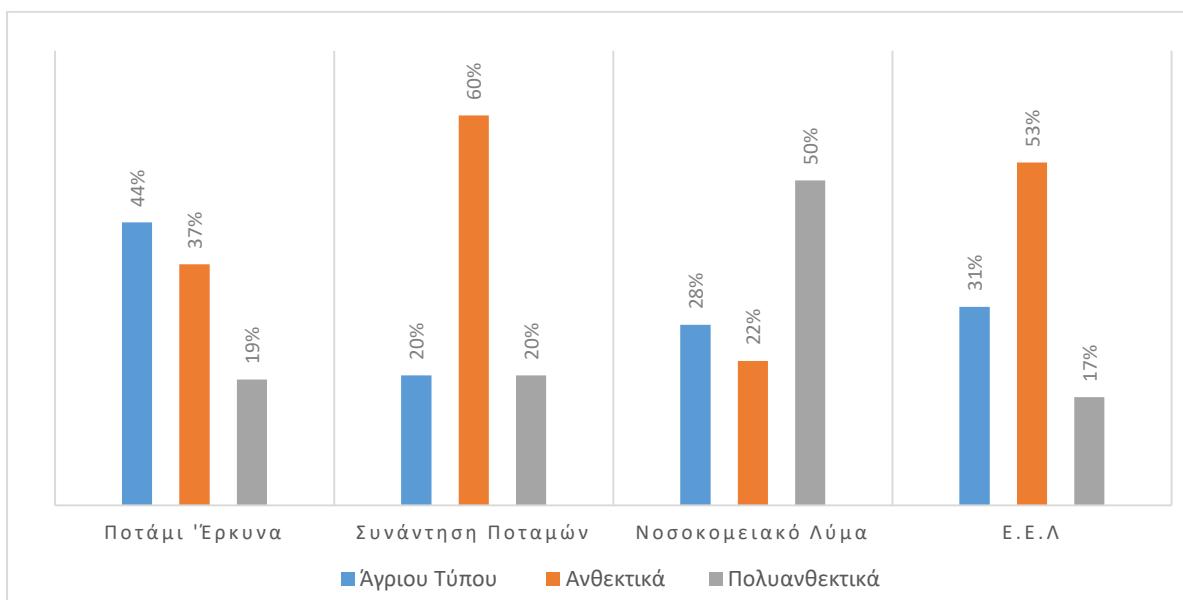
3.3.5 Αποτελέσματα των επιπέδων ευαισθησίας στα αντιβιοτικά όλων των στελεχών

Στο παρακάτω διάγραμμα (**Εικόνα 23**) συνοψίζονται τα ποσοστά αντοχής που εμφάνισαν τα στελέχη *E. coli* στον κάθε αντιμικροβιακό παράγοντα, ανάλογα με το δείγμα προέλευσης. Είναι εμφανές ότι η πλειοψηφία των στελεχών, και των τεσσάρων δειγμάτων, παρουσίασε αντοχή στην αμπικιλίνη και στην πιπερακιλίνη. Επίσης, τα στελέχη του νοσοκομειακού λύματος, συγκριτικά με αυτά των άλλων σημείων, εμφάνισαν αυξημένη συχνότητα αντοχής σε κινολόνες (CIP και NAL) αλλά και σε κεφαλοσπορίνες. Τέλος, παρατηρούμε ότι στα αντιβιοτικά: TZP, MEM, IMP, AN και FOX, τα περισσότερα στελέχη ήταν ευαίσθητα.



Εικόνα 23 Συγκεντρωτικό διάγραμμα: παρουσίαση των ποσοστών (%) αντοχής των στελεχών *E. coli* στον κάθε αντιμικροβιακό παράγοντα ανάλογα με το δείγμα προέλευσης

Παρατηρώντας την **Εικόνα 24**, είναι εμφανές ότι η πλειοψηφία των στελεχών του νοσοκομειακού λύματος (50%) ήταν πολυ-ανθεκτική (MDR). Επίσης, τα περισσότερα στελέχη που προέρχονταν από το σημείο συνάντησης των ποταμών αλλά και από το λύμα της Ε.Ε.Λ. ήταν ανθεκτικά (R). Τέλος, όσο αναφορά τα στελέχη από το νερό του ποταμού Έρκυνα, τα στελέχη που εμφάνισαν τουλάχιστον μία αντοχή (R και MDR) ήταν περίπου ίσα με τα ευαίσθητα.



Εικόνα 24 Συγκεντρωτικό διάγραμμα: παρουσίαση της συχνότητας εμφάνισης των τριών προφίλ αντοχής (R, MDR και WT) των στελεχών *E. coli* των τεσσάρων ενδιαιτημάτων

3.3.6 Αποτελέσματα του φαινοτυπικού τεστ- DDST

Συνολικά παρατηρήθηκαν 23 DDST- θετικά στελέχη

- 9 από το λύμα νοσοκομείου
- 2 από το λύμα της Ε.Ε.Λ.
- 7 από το ποτάμι Έρκυνα
- 5 από το σημείο συνάντησης των Ποταμών

Πίνακας 11 Χαρακτηριστικά (Σημείο Δειγματοληψίας, Φυλογενετική Ομάδα, Προφίλ Αντοχής και Πρότυπο Αντοχής) των στελεχών με θετική DDS δοκιμασία

Στέλεχος	Σημείο Δειγματοληψίας	Φυλογενετική Ομάδα	Προφίλ Αντοχής	Πρότυπο Αντοχής	DDST
594	Ποτάμι Έρκυνα	B1	MDR	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, CRO, ATM, CIP, NAL	+
595	Ποτάμι Έρκυνα	B2	MDR	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM	+
598	Ποτάμι Έρκυνα	D	XDR	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, GN, SXT, NAL	+
601	Ποτάμι Έρκυνα	A	R	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO	+
602	Ποτάμι Έρκυνα	A	MDR	AMP, PIP, CXM, CAZ, CRO, ATM	+
610	Ποτάμι Έρκυνα	D	MDR	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, GN, SXT, NAL	+
611	Ποτάμι Έρκυνα	A	R	AMP, PIP, CXM, CTX, FEP, CRO	+
614	Συνάντηση Ποταμών	A	R	AMP, PIP, CXM, CTX, FEP, CRO	+
616	Συνάντηση Ποταμών	A	R	AMP, PIP, CXM, CTX, FEP, CRO	+
618	Συνάντηση Ποταμών	A	MDR	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM	+
620	Συνάντηση Ποταμών	A	MDR	AMP, PIP, CXM, CTX, FEP, CRO, ATM, AN	+
630	Συνάντηση Ποταμών	A	MDR	AMP, AMC, PIP, CXM, CTX, FEP, CRO, ATM, AN	+
638	Λύμα-Έξοδος Ε.Ε.Λ	D	MDR	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, SXT, NAL	+
645	Λύμα-Έξοδος Ε.Ε.Λ	D	MDR	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, NAL	+
673	Λύμα Νοσοκομείου	A	MDR	AMP, PIP, CAZ, CRO, ATM, NAL	+
678	Λύμα Νοσοκομείου	A	MDR	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, GN, SXT, CIP, NAL	+
680	Λύμα Νοσοκομείου	A	MDR	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, GN, SXT, CIP, NAL	+
681	Λύμα Νοσοκομείου	A	MDR	AMP, PIP, CXM, CTX, FEP, CRO, GN, SXT, CIP, NAL	+
682	Λύμα Νοσοκομείου	A	MDR	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, GN, SXT, CIP, NAL	+
683	Λύμα Νοσοκομείου	A	MDR	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, GN, SXT, CIP, NAL	+
684	Λύμα Νοσοκομείου	A	MDR	AMP, PIP, CXM, CTX, CRO, ATM, GN, SXT, CIP, NAL	+
685	Λύμα Νοσοκομείου	A	MDR	AMP, PIP, CXM, CTX, CRO, ATM, GN, SXT, CIP, NAL	+
686	Λύμα Νοσοκομείου	A	MDR	AMP, AMC, PIP, CXM, CTX, CRO, ATM, GN, SXT, CIP, NAL	+

3.4 Αποτελέσματα από το έλεγχο της παρουσίας γονιδίων αντοχής

Από τα 23 DDST θετικά στελέχη:

- 11 ήταν θετικά για το γονίδιο CTX-M group1 εκ των οποίων
 - 3 στελέχη απομονώθηκαν από το νερό του Έρκυνα (σημείο 100m από έξοδο λυμάτων της Ε.Ε.Λ.)
 - 2 στελέχη απομονώθηκαν από το λύμα της εξόδου της Ε.Ε.Λ
 - 6 στελέχη απομονώθηκαν από το νοσοκομειακό λύμα
- Κανένα δεν έδωσε θετικό αποτέλεσμα για τα γονίδια CTX-M group 2 και TEM.

Όλα τα στελέχη που είχαν το γονίδιο CTX-M- group 1 ήταν πολυ-ανθεκτικά (MDR)

(Πίνακα 12).

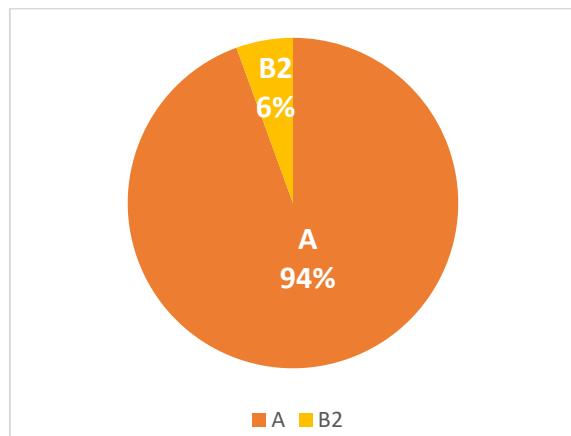
Πίνακας 12: Χαρακτηριστικά (Σημείο Δειγματοληψίας, Πρότυπο αντοχής, Προφίλ αντοχής, Φυλογενετική Ομάδα) στελεχών που είχαν το γονίδιο CTX-M group1

Στέλεχος	Σημείο Δειγματοληψίας	Φυλογενετική Ομάδα	Πρότυπο Αντοχής	Προφίλ αντοχής	CTX-M1
595	Ποτάμι Έρκυνα (100m από την έξοδο Ε.Ε.Λ)	B2	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM	MDR	+
598	Ποτάμι Έρκυνα (100m από την έξοδο Ε.Ε.Λ)	D	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, GN, SXT, NAL	MDR	+
610	Ποτάμι Έρκυνα (100m από την έξοδο Ε.Ε.Λ)	D	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, GN, SXT, NAL	MDR	+
638	Λύμα-Έξοδος βιολογικού	D	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, SXT, NAL	MDR	+
645	Λύμα-Έξοδος βιολογικού	D	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, NAL	MDR	+
678	Λύμα Νοσοκομείου	A	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, GN, SXT, CIP, NAL	MDR	+
681	Λύμα Νοσοκομείου	A	AMP, PIP, CXM, CTX, FEP, CRO, GN, SXT, CIP, NAL	MDR	+
682	Λύμα Νοσοκομείου	A	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, GN, SXT, CIP, NAL	MDR	+
683	Λύμα Νοσοκομείου	A	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, GN, SXT, CIP, NAL	MDR	+
685	Λύμα Νοσοκομείου	A	AMP, PIP, CXM, CTX, CRO, ATM, GN, SXT, CIP, NAL	MDR	+
686	Λύμα Νοσοκομείου	A	AMP, AMC, PIP, CXM, CTX, CRO, ATM, GN, SXT, CIP, NAL	MDR	+

3.5 Αποτελέσματα φυλογενετικής τυποποίησης (Phylogrouping) των στελεχών *E. coli*

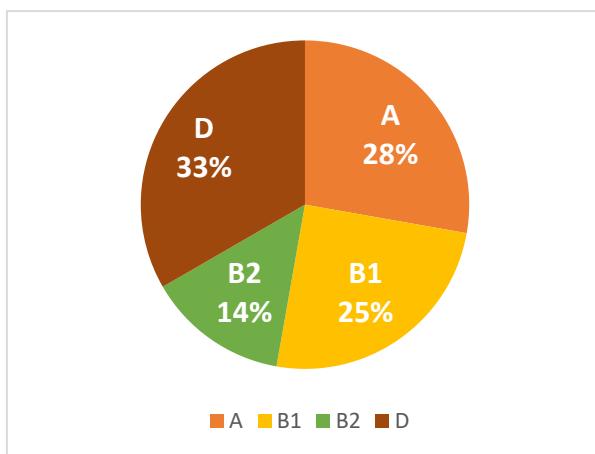
Σε αυτή την ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μεθόδου phylogrouping-triplex PCR, με την οποία τα στελέχη κατατάχθηκαν στις ομάδες A, B1, B2, D.

3.5.1 Αποτελέσματα φυλογενετικής τυποποίησης (Phylogrouping) των στελεχών *E. coli* του νοσοκομειακού λύματος



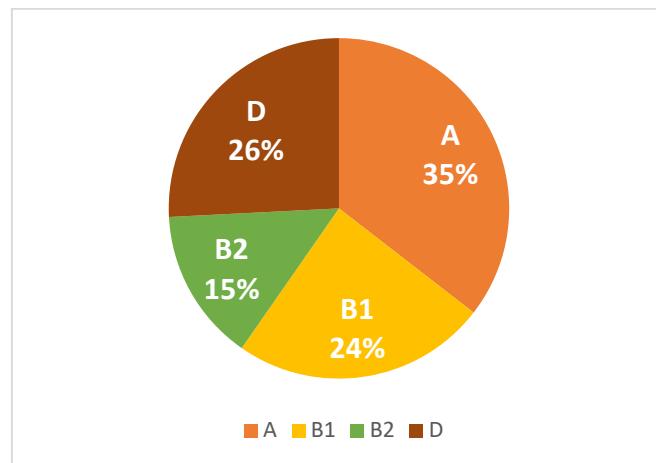
Εικόνα 25 Αποτελέσματα φυλογενετικής τυποποίησης (Phylogrouping) των στελεχών *E. coli* του νοσοκομειακού λύματος. Η πλειοψηφία των στελεχών 17/18 ή 94% κατατάχθηκε στην ομάδα A, ενώ μόλις το 6% (1/18) στην ομάδα B2.

3.5.2 Αποτελέσματα φυλογενετικής τυποποίησης (Phylogrouping) των στελεχών *E. coli* του λύματος εξόδου της Ε.Ε.Λ.



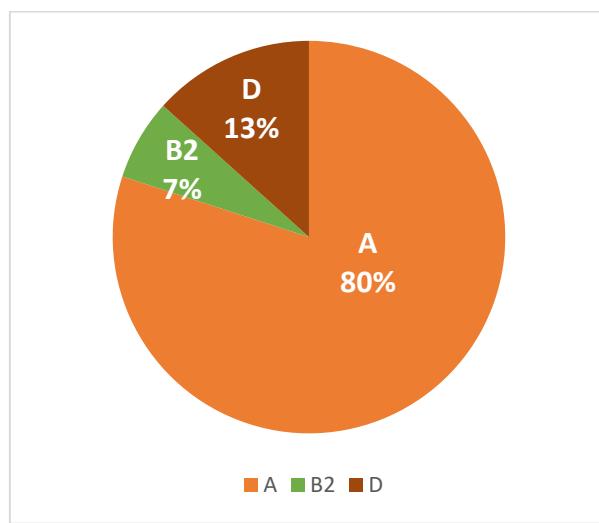
Εικόνα 26 Αποτελέσματα φυλογενετικής τυποποίησης (Phylogrouping) των στελεχών *E. coli* του λύματος της Ε.Ε.Λ. Τα περισσότερα στελέχη κατατάχθηκαν στην ομάδα D (12/36 ή 33%) ενώ ακολούθησαν οι ομάδες A (10/36 ή 28%), η B1 (9/36 ή 25%) και B2 με (5/36 ή 14%).

3.5.3 Αποτελέσματα φυλογενετικής τυποποίησης (Phylogrouping) των στελεχών *E.coli* που απομονώθηκαν από νερό του Ποταμού Έρκυνα



Εικόνα 27 Αποτελέσματα φυλογενετικής τυποποίησης (Phylogrouping) των στελεχών *E. coli* που απομονώθηκαν από το νερό του Ποταμού Έρκυνα. Το μεγαλύτερο ποσοστό των στελεχών κατατάχθηκε στην ομάδα A ($22/62$ ή 35%) ενώ ακολούθησαν η D ($16/62$ ή 26%), B1 ($15/62$ ή 24%) και τέλος η B2 ($9/62$ ή 15%).

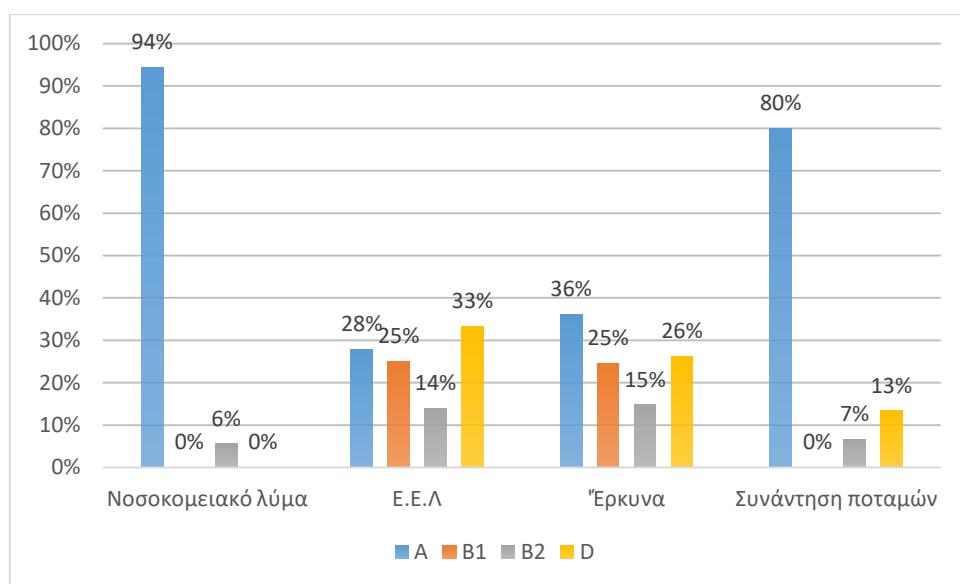
3.5.4 Αποτελέσματα φυλογενετικής τυποποίησης (Phylogrouping) των στελεχών *E. coli* που απομονώθηκαν από νερό του Ποταμού Β. Κηφισού (σημείο συνάντησης με Ποτάμι Έρκυνα)



Εικόνα 28 Αποτελέσματα φυλογενετικής τυποποίησης (Phylogrouping) των στελεχών *E. coli* που απομονώθηκαν από το νερό του Ποταμού Β. Κηφισού (σημείο συνάντησης με Ποτάμι Έρκυνα). Η συντριπτική πλειοψηφία των στελεχών κατατάχθηκε στην ομάδα A ($12/15$ ή 80%), ενώ μόλις 13% ($2/15$) στην ομάδα D και το 7% ($1/15$) στην ομάδα B2.

3.5.5 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα φυλογενετικής τυποποίησης (Phylogrouping) όλων των στελεχών *E. coli*

Στην **Εικόνα 29** παρουσιάζονται συνολικά τα ποσοστά εμφάνισης των φυλογενετικών ομάδων των στελεχών *E. coli* και των τεσσάρων σημείων δειγματοληψίας. Παρατηρούμε ότι οι φυλογενετικές ομάδες, στις οποίες εντάχθηκαν τα στελέχη του λύματος της Ε.Ε.Λ. και του ποταμού Έρκυνα, έχουν σχεδόν τις ίδιες συχνότητες εμφάνισης. Κάτι που είναι αναμενόμενο καθότι το λύμα της Ε.Ε.Λ καταλήγει στον ποταμό Έρκυνα.



Εικόνα 29 Συγκεντρωτικό διάγραμμα των ποσοστών (%) εμφάνισης των φυλογενετικών ομάδων των στελεχών *E. coli* ανάλογα με το δείγμα προέλευσης

Κεφάλαιο 4 Συζήτηση

Τα νοσοκομεία αποτελούν βασική εστία πολυ-ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών. Ως εκ τούτου, στο νοσοκομειακό λύμα αποβάλλονται υψηλές συγκεντρώσεις ανθεκτικών βακτηρίων αλλά και αντιβιοτικών, τα οποία τελικά καταλήγουν σε υδάτινους αποδέκτες (π.χ. ποτάμια) [67].

Βάσει βιβλιογραφίας, βακτήρια που παράγουν β-λακταμάσες εκτεταμένου φάσματος (ESBL) συνεχώς ανιχνεύονται σε λύματα (νοσοκομειακά, αστικά) αλλά και σε υδάτινα οικοσυστήματα (ποτάμια, λίμνες) [68,69,70]. Γεγονός που αποδεικνύεται και στη παρούσα μελέτη. Συγκεκριμένα, τόσο στα δείγματα λύματος (του νοσοκομείου και της Ε.Ε.Λ.) όσο και στο δείγμα νερού από το Ποτάμι Έρκυνα (το οποίο επιβαρύνεται άμεσα από το λύμα της Ε.Ε.Λ.) βρέθηκαν ανθεκτικά και πολύ-ανθεκτικά στελέχη με παρόμοια πρότυπα αντοχής. Συνολικά ανιχνεύθηκαν 23 ESBL θετικά στελέχη, εκ των τα 11 ήταν θετικά για το γονίδιο της οικογένειας CTX-M group 1. Από τα 11 τα 6 προέρχονταν από το νοσοκομειακό λύμα, τα 2 από το λύμα της Ε.Ε.Λ και 3 από το νερό του Ποταμού Έρκυνα.

Στην παρούσα μελέτη όπως και σε άλλες [71] παρατηρήθηκε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των στελεχών *E. coli* που απομονώθηκε από τα λύματα του Νοσοκομείου της Λιβαδείας και της Ε.Ε.Λ. χαρακτηρίστηκαν ως πολυ-ανθεκτικά (MDR) και ανθεκτικά (R) αντίστοιχα, και εμφάνισαν αντοχές σε κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς (FEP, CTX, CRO, CAZ), φθοριοκινολόνες (CIP, NAL), πενικιλίνες (AMP, PIP, AMC) και στο συνδυασμό τριμεθοπρίμης-σουλφαμεθοξαζόλης (SXT). Ειδικά τα στελέχη του νοσοκομειακού λύματος παρουσίασαν τα υψηλότερα ποσοστά αντοχής (πάνω από το 44%) σε κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς και φθοριοκινολόνες.

Όσον αφορά τα στελέχη *E. coli*, που απομονώθηκαν από το νερό των ποταμών Έρκυνα και Β. Κηφισού (σημείο συνάντησης με Έρκυνα), ένα υψηλό ποσοστό ήταν ανθεκτικό (R) και πολυ-ανθεκτικό (MDR). Η πλειοψηφία των στελεχών παρουσίαζε αντοχή στις πενικιλίνες (AMP, PIP), ενώ σποραδικά παρατηρήθηκαν και αντοχές στις κεφαλοσπορίνες (FEP, CTX, CRO).

Η παρουσία τέτοιων ανθεκτικών στελεχών στα συγκεκριμένα δείγματα εκθέτουν σε κίνδυνο την υγεία του ανθρώπου, δεδομένου ότι τόσο το νερό από το ποτάμι Έρκυνα και Β. Κηφισού όσο και το λύμα, χρησιμοποιούνται για αρδευτικούς σκοπούς και ως βελτιωτικά εδάφους, αντίστοιχα[72]. Επιπλέον, τα αντιβιοτικά στα οποία παρουσιάστηκαν οι αντοχές χρησιμοποιούνται ευρέως για την αντιμετώπιση λοιμώξεων. Ως εκ τούτου, η πιθανή επαφή με περιβαλλοντικά ανθεκτικά στελέχη μπορεί να οδηγήσει σε ανάπτυξη λοιμωξης που δεν αντιμετωπίζεται εύκολα.

Με βάση τα αποτελέσματα της φυλογενετικής τυποποίησης (Phylogrouping) ένα ποσοστό των στελεχών *E. coli* που απομονώθηκε από τα διάφορα σημεία δειγματοληψίας κατατάχθηκε στις ομάδες B2 και D. Στην ομάδα D κατατάχθηκε η πλειοψηφία των στελεχών από το λύμα εξόδου της Ε.Ε.Λ (33%) ενώ σχετικά υψηλό ήταν και το ποσοστό εμφάνισής της στα στελέχη του Ποταμού Έρκυνα (26%). Στην ομάδα B2 κατατάχθηκε το 6% και το 14% των στελεχών από το λύμα νοσοκομείου και της Ε.Ε.Λ, αντίστοιχα, καθώς και το 15% και το 7% των στελεχών από το ποτάμι Έρκυνα και Β. Κηφισού, αντίστοιχα. Τα βακτήρια που εντάχθηκαν σε αυτές τις ομάδες είχαν το γονίδιο *chuA*, το οποίο εκφράζει για υποδοχέα πρόσληψης της ομάδας αίμης. Το γονίδιο αυτό υπάρχει κυρίως στο γονιδίωμα των εντεροαιμορραγικών *E. Coli* [73]. Αυτό υποδηλώνει πως πιθανότατα τα στελέχη *E. coli* που κατατάχθηκαν σε αυτές τις ομάδες είναι παθογόνα. Βέβαια, αυτό θα αποδειχθεί μέσα από την εφαρμογή επιπλέον μοριακών μεθόδων ανίχνευσης γονιδίων τοξινών. Επιπρόσθετα, το γεγονός ότι ένα ποσοστό στελεχών των ομάδων D και B2 (συνολικά 46) ήταν ανθεκτικά και πολύ-ανθεκτικά (σύνολο 31) αυξάνει ακόμα περισσότερο το κίνδυνο.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας είναι ιδιαίτερα ανησυχητικά, καθώς ανιχνεύθηκαν ανθεκτικά βακτήρια τόσο σε λύματα, όσο και ποτάμια. Γίνεται, λοιπόν, αντιληπτό ότι η εξάπλωση της αντοχής στο περιβάλλον συσχετίζεται και με τη διοχέτευση των αστικών και νοσοκομειακών λυμάτων στο σδάτινο οικοσύστημα. Συνεπώς, προτείνεται τα νοσοκομεία να έχουν εγκαταστάσεις για την προεπεξεργασία των νοσοκομειακών λυμάτων πριν την απελευθέρωσή τους στο περιβάλλον [74].

Βιβλιογραφία

1. FAO-OIE-WHO.The FAO-OIE-WHO Collaboration. (2010). Ανακτήθηκε από <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6503741/>
2. ΕΘΝΙΚΟΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ (ΕΟΔΥ). Ενιαία Υγεία. Ανακτήθηκε από https://eody.gov.gr/mikroviaki-antochi-kai-loimoxeis-poy-syndeontai-me-choroys-parochis-ygeias/eniaia-ygeia/?fbclid=IwAR0UVSb2knEiaYykm1tsPZ1k6dbqLi-ehL2jVu726zvZirRwF_jMtoEXXBQ
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). One Health Basics. Αναρτήθηκε από <https://www.cdc.gov/onehealth/basics/index.html>
4. One Health concept gains importance. Ανακτήθηκε από <https://www.thehindu.com/news/national/kerala/one-health-concept-gains-importance/article30832842.ece>
5. Ferri M, Ranucci E, Romagnoli P, Giaccone V. Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017 Sep 2;57(13):2857-2876.
6. Fagerström A, Mölling P, Khan FA, Sundqvist M, Jass J, Söderquist B. Comparative distribution of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from urine infections and environmental waters. *PLoS One.* 2019 Nov 7;14(11):e0224861.
7. Paitan Y. Current Trends in Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli*. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2018;416:181-211.
8. Jang J, Hur HG, Sadowsky MJ, Byappanahalli MN, Yan T, Ishii S. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. *J Appl Microbiol.* 2017 Sep;123(3):570-581.
9. Leimbach A, Hacker J, Dobrindt U. *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;358:3-32.
10. Μαυρίδου, Α., Καμπούρης, Μ. & Νικολαϊδου, Α. Γενική Μικροβιολογία. Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης. 2012.
11. Mims, C., Playfair, J., Roitt, I., Wakelin, D. & Williams, R. Μικροβιολογία. Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης. 2010.

12. Μαυρίδου, Α., Βανταράκης, Α., Ευστρατίου, Μ. & Αρβανιτίδου-Βαγιωνά Μ. Μικροβιολογία & Επιδημιολογία νερού. Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης. 2014.
13. Monteiro R, Ageorges V, Rojas-Lopez M, Schmidt H, Weiss A, Bertin Y, Forano E, Jubelin G, Henderson IR, Livrelli V, Gobert AP, Rosini R, Soriani M, Desvaux M. A secretome view of colonisation factors in Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* (STEC): from enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) to related enteropathotypes. *FEMS Microbiol Lett.* 2016 Aug;363(16):fnw179.
14. Greenwood, D., Slack, R., Peutherer, J., & Barer, M. ΙΑΤΡΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ. Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης. 2016.
15. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Escherichia coli (E. coli)*. Ανακτήθηκε από <https://www.cdc.gov/ecoli/index.html>
16. Manyi-Loh C, Mamphweli S, Meyer E, Okoh A. Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications. *Molecules*. 2018 Mar 30;23(4):795.
17. Simonsen, T., Aarbakke, J., Colemanan, I. K. I., Sinnott, P. & Lyssa, R. Νοσηλευτική Φαρμακολογία. Broken Hill. 2009.
18. Singh SB, Young K, Silver LL. What is an "ideal" antibiotic? Discovery challenges and path forward. *Biochem Pharmacol.* 2017 Jun 1;133:63-73.
19. Roth N, Käsbohrer A, Mayrhofer S, Zitz U, Hofacre C, Domig KJ. The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview. *Poult Sci.* 2019 Apr 1;98(4):1791-1804.
20. Su S, Li C, Yang J, Xu Q, Qiu Z, Xue B, Wang S, Zhao C, Xiao Z, Wang J, Shen Z. Distribution of Antibiotic Resistance Genes in Three Different Natural Water Bodies-A Lake, River and Sea. *Int J Environ Res Public Health.* 2020 Jan 15;17(2):552.
21. Tortora, G., Funke, B. & Case, C. Εισαγωγή στη Μικροβιολογία. Broken Hill. 2017.
22. Cunha BA. Antibiotic side effects. *Med Clin North Am.* 2001 Jan;85(1):149-85.
23. Σκεπαστιανός, Π. & Καραμητρούσης, Ε. Θρεπτικά υποστρώματα και μεταβολισμός. Εκδόσεις University studio press. 2015.

24. Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, Thomson K, Rubinstein E, Hoban DJ, Noreddin AM, Karlowsky JA. Comparative review of the carbapenems. *Drugs*. 2007;67(7):1027-52.
25. Vardakas KZ, Kalimeris GD, Triarides NA, Falagas ME. An update on adverse drug reactions related to β -lactam antibiotics. *Expert Opin Drug Saf*. 2018 May;17(5):499-508.
26. Palacios AR, Rossi MA, Mahler GS, Vila AJ. Metallo- β -Lactamase Inhibitors Inspired on Snapshots from the Catalytic Mechanism. *Biomolecules*. 2020 Jun 3;10(6):854.
27. Alós JI. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global [Antibiotic resistance: A global crisis]. *Enferm Infect Microbiol Clin*. 2015 Dec;33(10):692-9. Spanish.
28. Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2015 Jan;13(1):42-51.
29. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). How Antibiotic Resistance Happens. Ανακτήθηκε από <https://www.cdc.gov/drugresistance/about/how-resistance-happens.html>
30. Γριβάκου, Ε. Διερεύνηση μεθόδων φαινοτυπικού ελέγχου για ανίχνευση εκτεταμένου φάσματος β -λακταμασών στα Gram-αρνητικά βακτήρια.(Διδακτορική Διατριβή).Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ελλάδα. 2013. Αναρτήθηκε από <https://docplayer.gr/111437863-Didaktoriki-diatrivi-diereynisi-methodon-fainotypikoy-eleghoy-gia-anihneysi-ektetamenoy-fasmatos-v-laktamason-sta-gram-arnitika-vaktiria.html>
31. Oh EJ, Lee S, Park YJ, Park JJ, Park K, Kim SI, Kang MW, Kim BK. Prevalence of metallo-beta-lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean university hospital and comparison of screening methods for detecting metallo-beta-lactamase. *J Microbiol Methods*. 2003 Sep;54(3):411-8.
32. Bush K. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018 Sep 24;62(10):e01076-18.
33. Antibiotic resistance mechanisms. Ανακτήθηκε από

https://www.researchgate.net/figure/Drug-inactivation-or-alteration-process_fig2_345950669

34. Bush K, Bradford PA. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016 Aug 1;6(8):a025247.
35. Κρίστο, Ι. Φαινοτυπική και μοριακή μελέτη των β -λακταμασών ευρέως φάσματος και καρβαπενεμασών σε πολυανθεκτικά στελέχη εντεροβακτηριακών. (Διδακτορική Διατριβή. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα. 2013. Αναρτήθηκε από <https://thesis.ekt.gr/thesisBookReader/id/29246?lang=el#page/1/mode/1up>
36. <https://quizlet.com/200447026/fa-microbiology-basic-bacteriology-flash-cards/?fbclid=IwAR250RFCGX->
37. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980 May 16;289(1036):321-31.
38. Bush K. Characterization of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989 Mar;33(3):259-63.
39. Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Extended-spectrum beta-lactamases (ESbLs): characterization, epidemiology and detection. *Crit Rev Microbiol.* 2004;30(1):25-32.
40. Kawamura K, Nagano N, Suzuki M, Wachino JI, Kimura K, Arakawa Y. ESBL-producing *Escherichia coli* [1] and Its Rapid Rise among Healthy People. *Food Saf (Tokyo).* 2017 Dec 29;5(4):122-150.
41. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001 Oct;14(4):933-51, table of contents.
42. Heritage J, M'Zali FH, Gascoyne-Binzi D, Hawkey PM. Evolution and spread of SHV extended-spectrum beta-lactamases in gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 1999 Sep;44(3):309-18.
43. Liakopoulos A, Mevius D, Ceccarelli D. A Review of SHV Extended-Spectrum β -Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. *Front Microbiol.* 2016 Sep 5;7:1374.
44. Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995 Oct;8(4):557-84

45. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005 Oct;18(4):657-86.
46. Gazouli M, Tzelepi E, Markogiannakis A, Legakis NJ, Tzouvelekis LS. Two novel plasmid-mediated cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamases (CTX-M-5 and CTX-M-6) from *Salmonella typhimurium*. *FEMS Microbiol Lett.* 1998 Aug 15;165(2):289-93.
47. Ur Rahman S, Ali T, Ali I, Khan NA, Han B, Gao J. The Growing Genetic and Functional Diversity of Extended Spectrum Beta-Lactamases. *Biomed Res Int.* 2018 Mar 26;2018:9519718.
48. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Jan;48(1):1-14.
49. Meini S, Tascini C, Cei M, Sozio E, Rossolini GM. AmpC β -lactamase-producing Enterobacteriales: what a clinician should know. *Infection.* 2019 Jun;47(3):363-375.
50. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Jan;22(1):161-82, Table of Contents.
51. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 Jan;46(1):1-11.
52. Bonomo RA, Burd EM, Conly J, Limbago BM, Poirel L, Segre JA, Westblade LF. Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge. *Clin Infect Dis.* 2018 Apr 3;66(8):1290-1297.
53. Tammaro PD, Simner PJ. Phenotypic Detection of Carbapenemase-Producing Organisms from Clinical Isolates. *J Clin Microbiol.* 2018 Oct 25;56(11):e01140-18.
54. Kopotsa K, Osei Sekyere J, Mbelle NM. Plasmid evolution in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a review. *Ann N Y Acad Sci.* 2019 Dec;1457(1):61-91.
55. Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Ther Adv Infect Dis.* 2016 Feb;3(1):15-21.
56. Vivas R, Barbosa AAT, Dolabela SS, Jain S. Multidrug-Resistant Bacteria and Alternative Methods to Control Them: An Overview. *Microb Drug Resist.* 2019 Jul/Aug;25(6):890-908.

57. McEwen SA, Collignon PJ. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiol Spectr*. 2018 Mar;6(2).
58. Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF, Di Ilio C. Escherichia coli in Europe: an overview. *Int J Environ Res Public Health*. 2013 Nov 25;10(12):6235-54.
59. Chong Y, Shimoda S, Shimono N. Current epidemiology, genetic evolution and clinical impact of extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. *Infect Genet Evol*. 2018 Jul;61:185-188.
60. Causes and transmission paths of antibiotic-resistant bacteria. Ανακτήθηκε από <https://www.bag.admin.ch/bag/en/home/krankheiten/infektionskrankheiten-bekaempfen/antibiotikaresistenzen/wie-breiten-sich-antibiotikaresistenzen-aus-.html>
61. Microbiology and Infectious Diseases. Citrate utilisation test : Principle, Procedure and Expected results. Ανακτήθηκε από <http://microbesinfo.com/2013/05/citrate-utilisation-test/?fbclid=IwAR2jij3z1INyxwatl1hG-mdGDqEBDS3XmcB87SwyNafcgN1946iTSE1Zdj8>
62. Bej AK, DiCesare JL, Haff L, Atlas RM. Detection of Escherichia coli and Shigella spp. in water by using the polymerase chain reaction and gene probes for uid. *Appl Environ Microbiol*. 1991 Apr;57(4):1013-7.
63. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10, (2020). Ανακτήθηκε από http://www.eucast.org/mic_distributions_and_ecoffs
64. Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Jan;57(1):154-5.
65. EUCAST guideline for the detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, The EUCAST guideline on detection of resistance mechanisms v 2.0 (2017-07-11)
66. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol*. 2000 Oct;66(10):4555-8.

67. Cahill N, O'Connor L, Mahon B, Varley Á, McGrath E, Ryan P, Cormican M, Brehony C, Jolley KA, Maiden MC, Brisse S, Morris D. Hospital effluent: A reservoir for carbapenemase-producing Enterobacteriales? *Sci Total Environ.* 2019 Jul 1;672:618-624.
68. Olson AB, Silverman M, Boyd DA, McGeer A, Willey BM, Pong-Porter V, Daneman N, Mulvey MR. Identification of a progenitor of the CTX-M-9 group of extended-spectrum beta-lactamases from *Kluyvera georgiana* isolated in Guyana. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 May;49(5):2112-5.
69. Liu H, Zhou H, Li Q, Peng Q, Zhao Q, Wang J, Liu X. Molecular characteristics of extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from the rivers and lakes in Northwest China. *BMC Microbiol.* 2018 Oct 4;18(1):125. ,Atta, H. I., Idris,
70. S. M., Gulumbe, B. H., & Awoniyi, O. J. (2021). Detection of extended spectrum beta-lactamase genes in strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from recreational water and tertiary hospital waste water in Zaria, Nigeria. *International journal of environmental health research*, 1–9
71. Chaudhry TH, Aslam B, Arshad MI, Nawaz Z, Waseem M. Occurrence of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in hospital settings and waste. *Pak J Pharm Sci.* 2019 Mar;32(2 (Supplementary)):773-778.
72. Hassen B, Abbassi MS, Benlabidi S, Ruiz-Ripa L, Mama OM, Ibrahim C, Hassen A, Hammami S, Torres C. Genetic characterization of ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from wastewater and river water in Tunisia: predominance of CTX-M-15 and high genetic diversity. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2020 Dec;27(35):44368-44377.
73. Nagy G, Dobrindt U, Kupfer M, Emödy L, Karch H, Hacker J. Expression of hemin receptor molecule ChuA is influenced by RfaH in uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect Immun.* 2001 Mar;69(3):1924-8.
74. Mbanga J, Abia ALK, Amoako DG, Essack SY. Quantitative microbial risk assessment for waterborne pathogens in a wastewater treatment plant and its receiving surface water body. *BMC Microbiol.* 2020 Nov 12;20(1):346.