

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

«Προσδιορισμός αντιβιοαντοχής και ανίχνευση μηχανισμών
αντοχής σε στελέχη *Pseudomonas aeruginosa* που
απομονώθηκαν από δίκτυα ύδρευσης νοσηλευτικών ιδρυμάτων
της ελληνικής επικράτειας το διάστημα 2017-2022»

Πτυχιακή Εργασία
Αναστάσιος Τριανταφύλλου του Ελευθερίου
Λάρισα, 2023

University of Thessaly
Health science department
Department of Biochemistry and Biotechnology



UNIVERSITY OF
THESSALY

«Determination of antibiotic resistance and detection of
antibiotic resistance mechanisms at *Pseudomonas aeruginosa*
that were isolated from water supply networks of hospitals in
Greece in the period 2017-2022»

Diploma
Anastasios Triantafyllou Eleftherios
Larissa, 2023

Τριμελής Επιτροπή

Χρήστος Χατζηχριστοδούλου

Καθηγητής Υγιεινής και Επιδημιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
(Επιβλέπων Καθηγητής)

Δημήτριος Μόσιαλος

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Συνεπιβλέπων Καθηγητής)

Σωτήριος Βασιλειάδης

Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας-Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του κ. Χατζηχριστοδούλου Χρήστου, Καθηγητή Υγιεινής και Επιδημιολογίας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Επιβλέποντα Καθηγητή μου, κ. Χατζηχριστοδούλου Χρήστο, για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριό του, καθώς και για τις συμβουλές και την καθοδήγησή του καθόλη τη διάρκεια της μελέτης. Η αμέριστη βοήθειά του ήταν ανεκτίμητη για την ολοκλήρωση του πειραματικού αλλά και του θεωρητικού σκέλους της εργασίας.

Στο ίδιο πλαίσιο ευγνωμοσύνης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Μόσιαλο Δημήτριο, για την πληθώρα γνώσεων που μου προσέφερε τα χρόνια της φοίτησης μου στο Τμήμα, καθώς και στον κ. Βασιλειάδη Σωτήριο, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, για την συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή.

Επίσης, θα ήθελα να απευθύνω τις ευχαριστίες μου στην κ. Κυρίτση Μαρία, μέλος του εργαστηρίου Υγιεινής και Επιδημιολογίας και στην κ. Βουλγαρίδη Ιωάννα, μέλος του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου του Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας για την απεριόριστη βοήθεια που μου προσέφεραν από την διεκπεραίωση του πειραματικού σκέλους, μέχρι την ερμηνεία, τη συγγραφή και τη διόρθωση της εργασίας.

Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά τα μέλη του εργαστηρίου Υγιεινής και Επιδημιολογίας, που ήταν πάντα πρόθυμα να λύσουν τις απορίες μου και να με βοηθήσουν να ξεπεράσω κάθε πιθανή δυσκολία που συνάντησα κατά τη διάρκεια της μελέτης μου, καθώς και το Μικροβιολογικό Εργαστήριο του Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας και το ιδιωτικό κτηνιατρικό εργαστήριο Vet Αναλύσεις για την μερική παραχώρηση των χώρων και υλικών για την διεκπεραίωση της εργασίας αυτής και τις συμβουλές των μελών του.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου προς την οικογένεια και τους στενούς μου φίλους για την ψυχική τους υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περίληψη

Μια κατηγορία νοσημάτων, τα υδατογενή, ευθύνονται για ασθένειες ή ακόμα και θάνατο αρκετών ατόμων και προκαλούνται από κατανάλωση ή επαφή με μολυσματικό νερό. Ακόμα μεγαλύτερο θέμα υπάρχει στα νοσοκομεία καθώς εκεί βρίσκονται ασθενείς και η επιβάρυνση από κάποιο βακτήριο που μπορεί να προκαλέσει τέτοιο νόσημα μπορεί να αποβεί μοιραίο. Από τα πιο γνωστά και πανταχού παρόντα βακτήρια σε τέτοιες περιπτώσεις είναι η *Pseudomonas aeruginosa*. Το Gram (-) αυτό βακτήριο έχει διάφορα συστήματα για επίθεση στον ξενιστή, με σημαντικότερο το σχηματισμό βιοφίλμ, που βοηθά και στην επιβίωση σε διάφορα περιβάλλοντα και εκμεταλλεύεται κάθε ευκαιρία για προσβολή των ασθενών. Είναι, επίσης, σημαντικό να αναφερθεί η μεγάλη ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά που αποκτά ή έχει ενδογενώς. Η Πολιτεία αντιλαμβανόμενη την σοβαρότητα της κατάστασης έθεσε σε εφαρμογή Διατάγματα με σκοπό την ανίχνευση του βακτηρίου, την δημιουργία προφίλ ανθεκτικότητας και την εξάλειψη του. Στην παρούσα έρευνα, λοιπόν, δημιουργήθηκαν τα προφίλ ανθεκτικότητας 200 βακτηρίων *Pseudomonas aeruginosa* που απομονώθηκαν από πάνω από 30 νοσοκομεία της Ελληνικής επικράτειας την περίοδο 2017-2022. Ένα ποσοστό της τάξης του 17,5% αντανάκλα στα στελέχη που είναι ανθεκτικά σε τουλάχιστον ένα αντιβιοτικό, ενώ τα υπόλοιπα είναι ευαίσθητα σε όλα τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν. Στο σύνολο των στελεχών, η ιμιπενέμη φαίνεται να είναι το αντιβιοτικό στο οποίο εμφανίζεται η μεγαλύτερη ανθεκτικότητα, ενώ την μικρότερη την εμφανίζει η μεροπενέμη και σιπροφλοξασίνη. Στα ανθεκτικά στελέχη το ευεργετικό αποτέλεσμα είναι η πλήρης ευαισθησία στην κολιστίνη. Τέλος, αποτελεί έναν πολύ σημαντικό στόχο η συνέχιση της πειραματικής αυτής διαδικασίας με νέες προσεγγίσεις, καθώς επίσης και η ανάπτυξη νέων και εναλλακτικών θεραπειών για την καταπολέμηση της *Pseudomonas aeruginosa*.

Abstract

The waterborne diseases are responsible for the illness or even death of several people and is caused by the consumption or coming into contact with contaminated water. An even bigger issue exists in hospitals as there are patients with a disease and an extra disease caused by a bacterium can lead even to death. Among the most well-known and ubiquitous bacteria in these cases is *Pseudomonas aeruginosa*. This Gram (-) bacterium has several systems for attacking the host, with the most important being the formation of biofilms, which also helps to survive in various environments and takes advantage of every opportunity to attack patients. It is also important to mention the high resistance to antibiotics that it acquires or has intrinsic. Realizing the importance of the situation, the Greek State targets the detection of the bacterium, the creation of a resistance profile and finally, eliminate it. In this research, therefore, we created the resistance profiles of 200 *Pseudomonas aeruginosa* bacteria isolated from more than 30 hospitals in the Greek territory in the period of 2017-2022. A percentage of 17,5% reflects the strains that are resistant to at least one antibiotic, while the rest are sensitive to all antibiotics used. Among all strains, imipenem appears to be the most resistant antibiotic, while meropenem and ciprofloxacin show the least resistance. The beneficial effect in resistant strains is that all of them have sensitivity in colistin. Finally, a very important goal is to continue this experimental process with new approaches, as well as the development of new and alternative treatments to eliminate *Pseudomonas aeruginosa*.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	10
1.1 Υδατογενή νοσήματα.....	10
1.1.1 Υδατογενή νοσήματα που οφείλονται σε κατανάλωση νερού	10
1.1.2 Υδατογενή νοσήματα που οφείλονται σε νερά νοσοκομειακών μονάδων.....	11
1.2 Νομοθεσία	14
1.2.1 Νομοθεσία στην Ελλάδα	14
1.2.2 Νομοθεσία στην Ευρώπη	17
1.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	17
1.3.1 Χαρακτηριστικά <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
1.3.2 Τροπισμός <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	19
1.3.3 Ασθένειες λόγω <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
1.3.3.1 Δημόσια μέρη.....	20
1.3.3.2 Νοσοκομειακά ιδρύματα	21
1.3.4 Τρόποι επίθεσης <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
1.3.4.1 Σχηματισμός βιοφίλμ.....	24
1.3.4.2 Συστήματα Quorum Sensing	25
1.3.4.3 Φλαγγελίνη.....	26
1.3.4.4 Πυοβερδίνη (PVD).....	26
1.3.4.5 Τύπος IV pili	26
1.3.4.6 Λιποπολυσακχαρίτης (LPS) και πρωτεΐνες εξωτερικής μεμβράνης (OMPs).....	27
1.3.4.7 Σύστημα έκκρισης III (T3SS).....	27
1.3.4.8 Σύστημα έκκρισης VI.....	28
1.3.4.9 Σύστημα έκκρισης II	29
1.4 Η απάντηση του ξενιστή στην λοίμωξη του αναπνευστικού συστήματος από <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	30
1.5 Θεραπεία έναντι στην <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	31
1.5.1 β-λακτάμη.....	31
1.5.2 Φλοροκινολόνες	32
1.5.3 Τετρακυκλίνες.....	32
1.5.4 Αμινογλυκοσίδες	33
1.5.5 Πολυμυξίνες	33
1.6 Αντοχή της <i>Pseudomonas aeruginosa</i> στα αντιβιοτικά	33
1.6.1 Ενδογενής αντοχή στα αντιβιοτικά	33
1.6.2 Επίκτητη αντοχή στα αντιβιοτικά	35
1.7 Εναλλακτικές θεραπείες έναντι στην <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	38

1.7.1 Αναστολή συστήματος QS	38
1.7.2 Χήλωση σιδήρου	39
1.7.3 Θεραπεία με φάγο.....	39
1.7.4 Εμβόλιο	40
1.7.5 Νανοσωματίδια	40
1.8 Γιατί ψάχνουμε την <i>P. aeruginosa</i> στο νερό	42
1.9 One health και ΕΟΔΥ	42
2. Σκοπός	44
3. Υλικά	44
3.1 Υπόστρωμα CN <i>Pseudomonas</i> agar	44
3.2 Αιματούχο τρυβλίο-υπόστρωμα.....	45
3.3 Nutrient Agar.....	45
3.4 Κάρτα Vitek AST-N215.....	45
3.5 Κάρτα Vitek AST-N376 και XN10.....	46
4. Μεθοδολογία	46
4.1 Ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της <i>P. aeruginosa</i>	46
4.2 Ανακαλλιέργεια στελεχών <i>P. aeruginosa</i>	48
4.3 Vitek	48
4.4 Maldi ToF MS.....	49
4.5 Colistin test.....	50
5. Αποτελέσματα	51
5.1 Αποτελέσματα ανακαλλιεργειών	51
5.2 Αποτελέσματα Vitek	51
5.2.1 Αποτελέσματα ανά αντιβιοτικά κάρτας AST-N215.....	52
5.2.2 Αποτελέσματα των ανθεκτικών στελεχών	58
5.2.2.1 Αποτελέσματα των AST-N376 και XN10	58
5.2.3 Ανιχνευμένοι φαινότυποι	64
5.3 Αποτελέσματα Maldi-ToF.....	66
5.4 Αποτελέσματα colistin test.....	66
6. Συμπεράσματα	67
6.1 Γενικά συμπεράσματα.....	67
6.2 Προέλευση ανθεκτικών στελεχών.....	67
6.3 Επανάληψη διάφορων στελεχών	69
6.4 Μη αναλυμένα δείγματα	70
6.5 Φαινότυποι	70
6.6 Κολιστίνη	71

7. Συζήτηση.....	71
7.1 Σύγκριση με κλινικά δείγματα.....	71
7.2 Ύπαρξη άλλων βακτηρίων στα δίκτυα ύδρευσης νοσοκομείων	72
7.3 Άλλες χώρες	73
7.4 Μελλοντικές προσεγγίσεις	74
8. Σύνοψη	75
9. Βιβλιογραφία.....	75

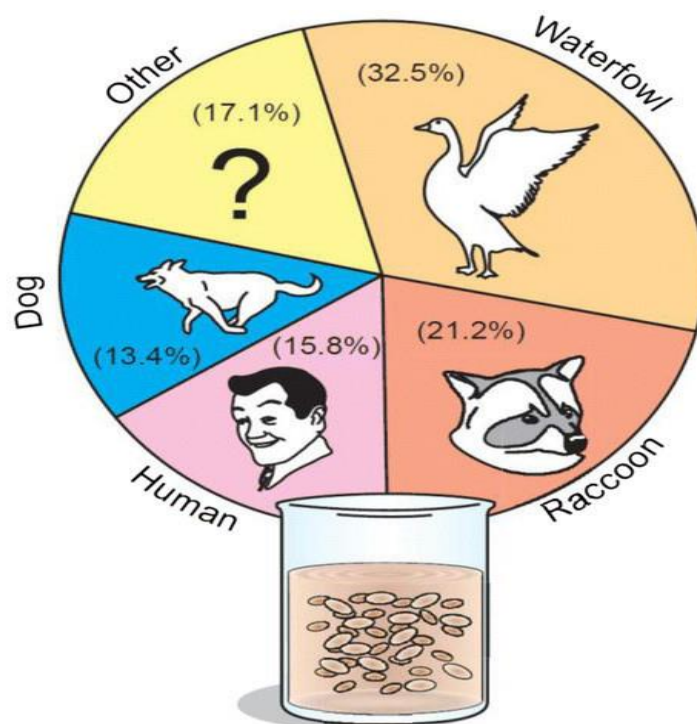
1. Εισαγωγή

1.1 Υδατογενή νοσήματα

Το νερό είναι ένας από τους σημαντικότερους πόρους για την ανθρωπότητα, καθώς οι χρήσεις του και τα οφέλη του είναι αμέτρητα. Παρ' όλ' αυτά, έχει συνδεθεί με διάφορα νοσήματα, τα οποία καλούνται υδατογενή. Ως υδατογενές νόσημα ορίζεται κάθε νόσημα που προκαλείται από κατανάλωση νερού, ή επαφή με μολυσμένο νερό ή αερομεταφερόμενως εξαιτίας διαφόρων βακτηρίων, ιών ή πρωτόζωων. Υπολογίζεται ότι ετησίως υπάρχουν πάνω από 2 εκατομμύρια θάνατοι που οφείλονται σε υδατογενή νοσήματα (Ramírez-Castillo et al., 2015). Οι ασθένειες αυτές χαρακτηρίζονται από διάρροια (Pandey P. et al., 2014) και άλλα συμπτώματα του γαστρεντερικού συστήματος ή μπορεί να είναι συστηματικές, όπως η ηπατίτιδα Α (Abutaleb A. et al., 2020) και ο τυφοειδής πυρετός (Parry C. M. et al., 2002).

1.1.1 Υδατογενή νοσήματα που οφείλονται σε κατανάλωση νερού

Είναι αποδεδειγμένο πως η πλειοψηφία των υδατογενών νοσημάτων προκαλούνται από κατανάλωση μολυσμένου νερού. Οι πηγές μόλυνσης των συστημάτων παροχής για κατανάλωση νερού είναι ανθρώπινα απόβλητα, ζωικά απόβλητα, περιττώματα αγρίων ζώων καθώς και υδρόβιων πτηνών (**Εικόνα 1**), κάτι το οποίο αποδείχθηκε μέσω του Microbial Source Tracking (MST). Σύμφωνα με αυτό, χρησιμοποιούνται διάφοροι μέθοδοι για την διάκριση ανθρώπινων και μη ανθρώπινων πηγών μόλυνσης κοπράνων (Pandey P. et al., 2014).



Εικόνα 1: Πηγές μόλυνσης των συστημάτων παροχής (Pandey P. et al., 2014)

Η διαρκής επανεμφάνιση των παθογόνων που προκαλούν υδατογενή νοσήματα οφείλεται σε διάφορους λόγους, όπως είναι η μόλυνση του νερού όπως προαναφέρθηκε

και οι αλλαγές στην τεχνολογία επεξεργασίας του πόσιμου νερού. (Ramírez-Castillo et al., 2015) Στον **Πίνακα 1** φαίνονται συγκεντρωτικά κάποια υδατογενή νοσήματα και οι μικροοργανισμοί που τα προκαλούν.

ΠΑΘΟΓΟΝΟ	ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ-ΑΣΘΕΝΕΙΑ	ΣΗΜΑΣΙΑ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΥΠΑΡΞΗΣ ΣΤΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΠΟΣΙΜΟΥ ΝΕΡΟΥ
<i>Campylobacter spp</i>	Διάρροια, γαστρεντερίτιδα	Υψηλή	Ήπια
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Μελιδίωση	Υψηλή	Ποικίλλει
<i>Legionella pneumophila</i>	Οξεία πνευμονία (Νόσος Λεγεωνάριων)	Υψηλή	Ποικίλλει
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Λοίμωξη πνευμόνων, φλεγμονή νεφρών, σήψη	Μέτρια	Ποικίλλει
<i>Salmonella enterica</i>	Τυφώδης πυρετός	Υψηλή	Ήπια
<i>Shigella spp.</i>	Δυσεντερία (σιγκέλωση)	Υψηλή	Χαμηλή
<i>Vibrio cholera</i>	Γαστρεντερίτιδα, χολέρα	Υψηλή	Χαμηλή
Ροταϊοί, Νοροϊοί	Γαστρεντερίτιδα	Υψηλή	Υψηλή
Ιός ηπατίτιδας Α Ιός ηπατίτιδας Ε	Ηπατίτιδα	Υψηλή	Υψηλή

Πίνακας 1: Παθογόνοι μικροοργανισμοί σε συστήματα πόσιμου νερού και συμπτώματα-ασθένειες που προκαλούν (Ramírez-Castillo et al., 2015)

1.1.2 Υδατογενή νοσήματα που οφείλονται σε νερά νοσοκομειακών μονάδων

Ένα ακόμα θέμα, το οποίο είναι παγκοσμίως βεληνεκούς, είναι η ασφάλεια στα συστήματα ύδρευσης στις νοσοκομειακές μονάδες. Στην περίπτωση αυτή, υδατογενή νοσήματα προκαλούνται από παθογόνα, όπως είναι η *Legionella pneumophila* καθώς και άλλα Gram αρνητικά βακτήρια (**Πίνακας 2**). Αυτοί οι παθογόνοι μικροοργανισμοί βρίσκονται είτε στα υδραυλικά συστήματα των νοσοκομείων είτε προσκολλώνται σε βιοφίλμ στα συστήματα παροχής νερού ή κοντά τους. (Decker B. et al., 2014) Ως βιοφίλμ ορίζεται μια κοινότητα βακτηρίων διαφόρων ειδών -μπορεί να αποτελείται και από ένα μόνο είδος-, τα οποία έχουν την ικανότητα να παράγουν πολυσακχαρίτες που δημιουργούν γύρω τους μια προστατευτική κάψα και τα βοηθά να προσκολληθούν σε διάφορες επιφάνειες (Wei Q et al., 2013). Οι τρόποι μετάδοσης των παθογόνων αυτών

στους ασθενείς και το νοσοκομειακό προσωπικό ποικίλουν, με τους σημαντικότερους να είναι:

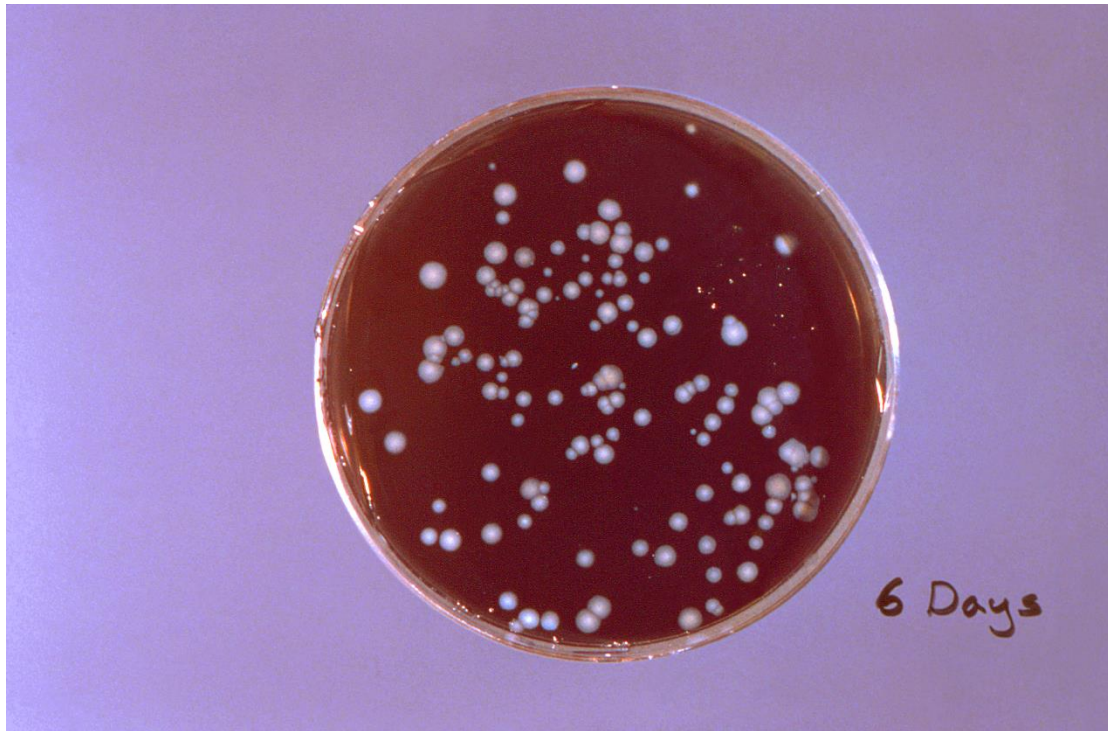
- Κατανάλωση μολυσμένου νερού
- Μεταφορά σταγονιδίων από το μπάνιο του δωματίου
- Αντικείμενα (π.χ. πετσέτες) που ήρθαν σε επαφή με μολυσμένο νερό
- Κακές συνθήκες υγιεινής του προσωπικού (π.χ. μη πλύσιμο χεριών, πλύσιμο χεριών με μολυσμένο νερό) και στην συνέχεια, εξάπλωση εντός και εκτός νοσοκομείου

(Decker B. et al., 2014)

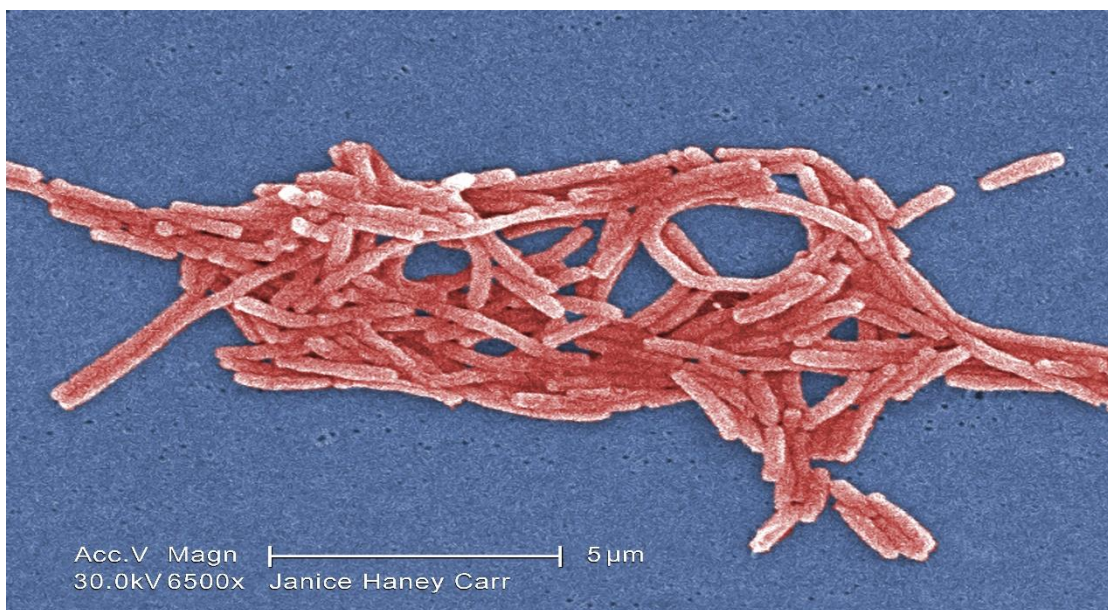
ΠΑΘΟΓΟΝΟ	ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ-ΑΣΘΕΝΕΙΑ
<i>Legionella pneumophila</i>	Οξεία πνευμονία (Νόσος Λεγεωνάριων)
<i>Serratia marcescens</i>	Πνευμονία
<i>Acinetobacter spp.</i>	Βακτηραιμία
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Λοίμωξη πνευμόνων, φλεγμονή νεφρών, σήψη
<i>Clostridium difficile</i>	Διάρροια
<i>Cryptosporidium spp</i>	Διάρροια
<i>Stenotrophomonas spp</i>	Βακτηραιμία
<i>Mycobacterium avium</i>	Λοίμωξη πνευμόνων

Πίνακας 2: Παθογόνοι μικροοργανισμοί σε νερά νοσοκομειακών μονάδων και συμπτώματα-ασθένειες που προκαλούν (Mehtar S., 2019)

Έρευνες έχουν δείξει ότι πάνω από το 15% των υδατογενών νοσημάτων σε νοσοκομεία οφείλονται στη νόσο των Λεγεωνάριων και συγκεκριμένα, στο βακτήριο *Legionella pneumophilla* (**Εικόνα 2, Εικόνα 3**). Η νόσος αυτή προκαλεί βαριά πνευμονία και ένα ποσοστό της τάξης του 30% που πάσχουν από την νόσο αυτή, καταλήγουν σε θάνατο. Το βακτήριο αυτό είναι Gram αρνητικό και ζει και αναπτύσσεται σε θερμοκρασία 20-50°C, με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 40 °C. Σε θερμοκρασία πάνω από 60 °C αδρανοποιείται και πεθαίνει (Decker B. et al., 2014).



Εικόνα 2: Τρυβλίο με αποικίες *Legionella* (Williams M., 2009)



Εικόνα 3: Φωτογραφία *Legionella* από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Feeley J., 1978)

Όπως προαναφέρθηκε, εκτός του βακτηρίου *Legionella pneumophilla* έχουν αναφερθεί και άλλα υδατογενή νοσήματα που προκαλούνται από άλλα Gram αρνητικά βακτήρια με τα κυριότερα να είναι τα *Pseudomonas aeruginosa* και *Klebsiella* spp. Το σημείο από το οποίο ξεκινάει η μετάδοση της πλειοψηφίας των περιπτώσεων των συγκεκριμένων νοσημάτων φαίνεται να είναι ο νεροχύτης και η αποχέτευση του, τα οποία βρίσκονται στα μπάνια των δωματίων των ασθενών. Ένα άλλο αξιοσημείωτο γεγονός για τα βακτήρια αυτά είναι η μεγάλη ανθεκτικότητα που έχουν αναπτύξει σε

διάφορα αντιβιοτικά, κάτι το οποίο θα αναλυθεί περαιτέρω στην συνέχεια (Decker B. et al., 2014).

Τέλος, μια ακόμα κατηγορία βακτηρίων στα συστήματα νερού στα νοσοκομεία που προκαλούν ασθένεια είναι τα μη φυματιώδη μυκοβακτήρια. Το είδος των βακτηρίων αυτών αποικίζει και τα υδραυλικά συστήματα των νοσοκομείων και συστήματα παροχής νερού. Οι περισσότερες περιπτώσεις τέτοιων μυκοβακτηρίων που καταγράφηκαν ανήκουν στο είδος *Mycobacterium avium* (MAC) και τα συμπτώματα που προκαλούν είναι παρόμοια με αυτά της γρίπης (Decker B. et al., 2014).

1.2 Νομοθεσία

1.2.1 Νομοθεσία στην Ελλάδα

Από τα παραπάνω κατανοούμε πλήρως την σημασία και τον κίνδυνο που ελλοχεύουν τα υδατογενή νοσήματα καθώς μπορούν να αποβούν θανατηφόρα για τον ασθενή. Έτσι, το ελληνικό κράτος με κοινή υπουργική απόφαση δημοσίευσε το ΦΕΚ 3525/Β στις 25-05-2023, που αφορά την «Ποιότητα νερού ανθρώπινης κατανάλωσης». Σκοπός της υπουργικής απόφασης αυτής ήταν η συμμόρφωση της Ελληνικής Νομοθεσίας με βάση τις διατάξεις της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ε.Ε.) με στόχο την προστασία της υγείας των πολιτών του Ελληνικού κράτους από τις επιπτώσεις από την μόλυνση του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης.

Στο άρθρο 2 του συγκεκριμένου ΦΕΚ, ορίστηκαν τα παρακάτω: «Νερό ανθρώπινης κατανάλωσης», «Οικιακές χρήσεις», «Οικιακά συστήματα διανομής» και «Επικύρωση». Οι ποιοτικές προδιαγραφές αναφέρουν τις τιμές των παραμέτρων για το νερό που καταναλώνεται από τους πολίτες και παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3**. Η ανάλυση των δειγμάτων νερού πρέπει να ξεκινάει εντός 12 ωρών από τη δειγματοληψία, ενώ η θερμοκρασία διατήρησης των δειγμάτων θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 2-8°C. Οι παράμετροι αυτές τηρούνται σε συγκεκριμένα σημεία :

- Σημείο που βγαίνει από την βρύση (για το νερό που παρέχεται από το δίκτυο διανομής)
- Σημείο όπου το νερό βγαίνει από το βυτίο (για το νερό που παρέχεται από το βυτίο)
- Σημείο στο οποίο το νερό τοποθετείται σε δοχεία (για το νερό που τοποθετείται σε δοχεία ή φιάλες)
- Σημείο όπου το νερό χρησιμοποιείται στις επιχειρήσεις (για το νερό που χρησιμοποιείται σε επιχειρήσεις παραγωγής τροφίμων)

Παράμετρος	Παραμετρική τιμή	Μέθοδος
<i>Escherichia coli</i>	0/250ml	EN ISO 9308
Εντερόκοκκοι	0/250ml	EN ISO 7899
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0/250ml	EN ISO 16266
Αριθμός αποικιών σε 22°C	100/ml	EN ISO 6222
Αριθμός αποικιών σε 37°C	20/ml	EN ISO 6222

Πίνακας 3: Παραμετρικές τιμές σε νερά (ΦΕΚ 3525/Β)

Επίσης, το συγκεκριμένο ΦΕΚ ορίζει και την συχνότητα που πρέπει να διενεργούνται οι έλεγχοι αυτοί στα προαναφερθέντα σημεία. Ο αριθμός υγειονομικών ελέγχων μεταβάλλεται με βάση τον όγκο νερού που διανέμεται ή παράγεται ημερησίως στην ζώνη παροχής. Ως ζώνη παροχής ορίζεται μια γεωγραφικά καθορισμένη περιοχή εντός της οποίας το νερό ανθρώπινης κατανάλωσης εισέρχεται από μια ή περισσότερες πηγές και η ποιότητα του μπορεί να θεωρηθεί ομοιόμορφη. Στον **Πίνακα 4**, παρουσιάζεται η συχνότητα υγειονομικών ελέγχων σε συνάρτηση με τον όγκο νερού της ζώνης παροχής.

$V < 100 \text{ m}^3$	Τουλάχιστον 1 φορά/3 έτη
$100 < V < 1000 \text{ m}^3$	1/έτος
$1000 < V < 10000 \text{ m}^3$	2/έτος
$10000 < V < 100000 \text{ m}^3$	3/έτος
$V > 100000 \text{ m}^3$	4/έτος

Πίνακας 4: Συχνότητα υγειονομικών ελέγχων (ΦΕΚ 3525/Β)

Ως υγειονομικός έλεγχος ορίζεται η διαδικασία κατά την οποία γίνεται υγειονομική αναγνώριση των τμημάτων του συστήματος ύδρευσης και του τρόπου λειτουργίας του και στην συνέχεια, δειγματοληψία νερού για εργαστηριακές εξετάσεις των παραμέτρων που φαίνονται στον **Πίνακα 3** και έλεγχο για υπολειμματικό χλώριο. Τα αποτελέσματα των εξετάσεων αυτών αποστέλλονται στο αρμόδιο τμήμα που είναι το Υπουργείο Υγείας.

Στην περίπτωση που το νερό ανθρώπινης κατανάλωσης που ελέγχθηκε δεν πληροί τις παραμετρικές τιμές του **Πίνακα 3**, οι υπεύθυνοι οφείλουν να αποκαταστήσουν την ποιότητα του κάνοντας τις απαραίτητες επανορθωτικές ενέργειες. Μέχρι την πλήρη αποκατάσταση της ποιότητας του νερού, οι αρμόδιες Αρχές διακόπτουν ή περιορίζουν την χρήση του καθώς αποτελεί ενδεχόμενο κίνδυνο για την υγεία των πολιτών, οι οποίοι και ενημερώνονται πλήρως. Οι αρμόδιες Αρχές είναι οι Υπηρεσίες Περιβαλλοντικής Υγιεινής και Υγειονομικού Ελέγχου των Περιφερειακών Ενοτήτων και σε επιτελικό βαθμό το Υπουργείο Υγείας. Οι υπεύθυνοι στις περιπτώσεις αυτές, ορίζονται από τις αρμόδιες Αρχές και ποικίλλουν ανάλογα με την τοποθεσία του δικτύου ύδρευσης.

Δεδομένης της σοβαρότητας της υγείας των ασθενών των νοσοκομειακών μονάδων, ο νομοθέτης έχει επιβάλει τον καθορισμό διαφορετικών επιπλέον και αυστηρότερων παραμέτρων παρακολούθησης για το νερό στο εσωτερικό δίκτυο ύδρευσης νοσοκομείων, κλινικών και κέντρων υγείας, τα οποία φαίνονται στον **Πίνακα 5**:

Παράμετρος	Παραμετρική τιμή	Μέθοδος
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0 cfu/100ml	EN ISO 16266
<i>Legionella</i>	1000cfu/1L	EN ISO 11731

Πίνακας 5: Παραμετρικές τιμές σε νερά σε νοσοκομειακά ιδρύματα (ΦΕΚ 3525/Β)

Εκτός των μικροβιολογικών παραμέτρων, γίνεται και έλεγχος ορισμένων χημικών παραμέτρων και άλλων φυσικών χαρακτηριστικών στο νερό, όπως για παράδειγμα :

- Γεύση
- Οσμή
- Χρώμα
- Αγωγιμότητα
- Θολερότητα
- pH
- Αμμώνιο
- Χλωριούχα
- Σίδηρος
- Χρώμιο
- Νιτρικά
- Παρασιτοκτόνα

Μια ακόμη απαίτηση που ορίζει η νομοθεσία για την λήψη ορθών αποτελεσμάτων είναι η δειγματοληψία, η οποία θα πρέπει να τηρεί κάποιες απαιτήσεις στα σημεία τήρησης που προαναφέρθηκαν. Αρχικά, τα δείγματα που λαμβάνονται για χημικές παραμέτρους θα πρέπει να λαμβάνονται στη βρύση του καταναλωτή χωρίς προηγούμενη έκπλυση και το δείγμα να λαμβάνεται τυχαία μέσα στην μέρα. Όσον αφορά τον καθορισμό των μικροβιολογικών παραμέτρων στα διάφορα σημεία και χώρους δειγματοληψίας, τα δείγματα λαμβάνονται σύμφωνα με το πρότυπο EN ISO 19458. Για τα βακτήρια *Legionella* και *Pseudomonas aeruginosa* έχουν καθοριστεί συγκεκριμένες οδηγίες δειγματοληψίας, και συγκεκριμένα λήψη κρύου και ζεστού δείγματος, χωρίς να χρησιμοποιηθεί η συγκεκριμένη βρύση που θα γίνει η δειγματοληψία για δυο (2) ώρες. Η ανίχνευση και καταμέτρηση των βακτηρίων αυτών υλοποιείται σύμφωνα με τα ισχύοντα διεθνή πρότυπα ISO 11731 για την *Legionella* και ISO 16266 για την *Pseudomonas aeruginosa*.

Στο σημείο αυτό είναι σημαντικό να τονιστεί πως πριν την Υπουργική απόφαση αυτή και την εγκαθίδρυση του ΦΕΚ 3525/Β στις 25-05-2023, ήταν σε ισχύ το ΦΕΚ 3282/Β από τις 19-09-2017 χωρίς όμως να έχει πολλές διαφορές με το ισχύον. Σε αντίθεση με το πιο παλιό, το ΦΕΚ892/Β από τις 11-07-2001 με διάφορες τροποποιήσεις στην περίοδο μέχρι το νέο ΦΕΚ. Οι διαφορές ανάμεσα στα δυο αυτά ΦΕΚ είναι αρκετές, με σημαντικότερη φυσικά την προσθήκη του άρθρου που υποχρεώνει τον έλεγχο των νοσοκομειακών και νοσηλειακών ιδρυμάτων για ύπαρξη και ποσοτικοποίηση των βακτηρίων *Legionella* και *Pseudomonas aeruginosa*. Η προσθήκη αυτή ήταν απαραίτητο να πραγματοποιηθεί, διότι αποτελούσε επιτακτική ανάγκη ο περιορισμός και ίσως η πλήρης εξάλειψη των φαινομένων των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων από τα βακτήρια αυτά. Για τον λόγο αυτόν, λοιπόν, πραγματοποιείται και η παρούσα πτυχιική εργασία.

Ανίχνευση και καταμέτρηση *Pseudomonas aeruginosa* στο νερό

Όσον αφορά την *Pseudomonas aeruginosa*, ακολουθείται το ISO 16266 όπως προαναφέρθηκε. Σύμφωνα με αυτό, αναλύεται η ανίχνευση και η καταμέτρηση του βακτηρίου μέσω της διήθησης μέσω μεμβράνης. Αρχικά, όγκος 100 ή 250ml δείγματος

νερού φιλτράρεται μέσω μεμβράνης με πόρους 0,45μm και ύστερα, η μεμβράνη αυτή τοποθετείται σε εκλεκτικό μέσο καλλιέργειας και αυτό σε κλίβανο με συγκεκριμένες συνθήκες. Ο όγκος που χρησιμοποιείται στην αρχή είναι 250ml στην περίπτωση που το δείγμα νερού έχει παρθεί από εμφιαλωμένα νερά ή δοχεία, ενώ τα 100ml για όλες τις υπόλοιπες πηγές. Το μέσο καλλιέργειας που χρησιμοποιείται είναι το *Pseudomonas* agar base/CN-agar, το οποίο είναι άκρως εκλεκτικό για το βακτήριο. Οι συνθήκες καλλιέργειας είναι στους 36±2 °C για 44±4 h σε κλίβανο. Παρ' ολ' αυτά, τα τρυβλία με τις μεμβράνες εξετάζονται και στις 22±2 h σε περίπτωση που υπάρχει υπερανάπτυξη του βακτηρίου. Με το πέρας του χρόνου αυτού, γίνεται καταμέτρηση των τυπικών μπλε/πράσινων αποικιών, οι οποίες είναι επιβεβαιωμένες αποικίες *Pseudomonas aeruginosa*. Στην συνέχεια, το τρυβλίο με την μεμβράνη θα εξεταστεί υπό την ακτινοβολία UV, έτσι ώστε να προσδιοριστούν αποικίες που φωσφορίζουν και οι οποίες θεωρούνται ύποπτες *Pseudomonas aeruginosa*. Η επιβεβαίωση αυτών υλοποιείται με το broth ακεταμίδης. Τέλος, υπάρχουν, καφεκόκκινες αποικίες που θεωρούνται ύποπτες *Pseudomonas aeruginosa* και η επιβεβαίωσή τους γίνεται με το τεστ οξειδάσης, το broth ακεταμίδης και το μέσο King's B. Ο συνολικός αριθμός των αποικιών της *Pseudomonas aeruginosa* και το αποτέλεσμα δίνεται σε συνάρτηση με τον όγκο που εξετάστηκε. (ISO 16266)

1.2.2 Νομοθεσία στην Ευρώπη

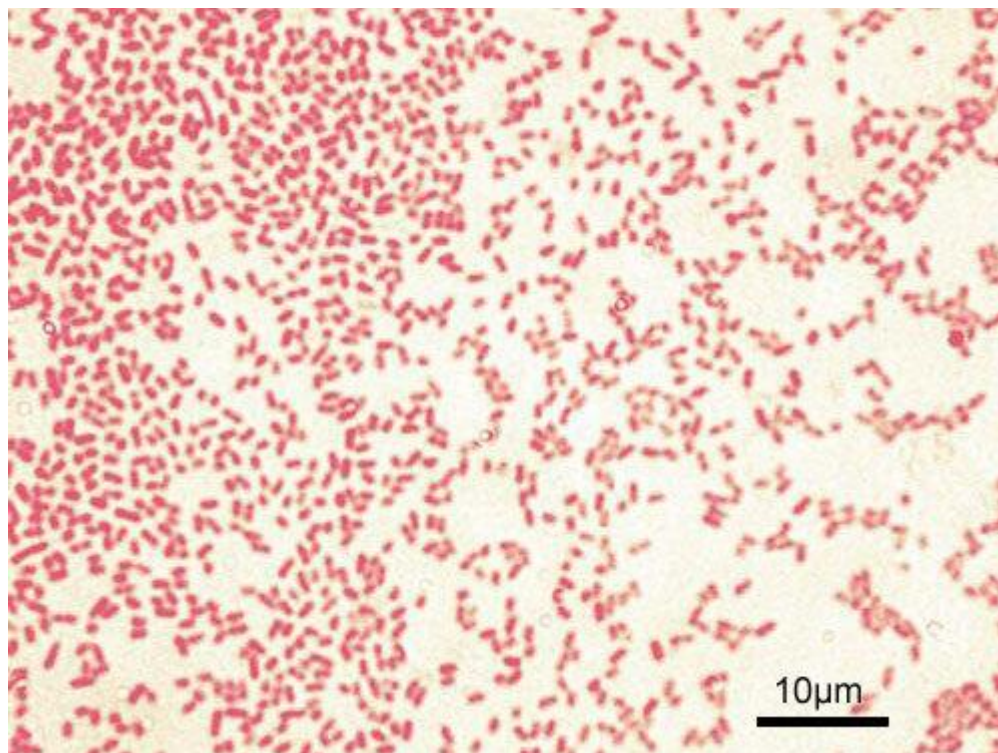
Στην Ευρώπη και πιο συγκεκριμένα, στην Ευρωπαϊκή Ένωση ακολουθείται το ίδιο πρότυπο και οι ίδιες οδηγίες σχετικά με την ανίχνευση βακτηρίων στο νερό που προκαλούν ασθένειες. Σύμφωνα με την οδηγία 98/83/EK του Συμβουλίου της 3^{ης} Νοεμβρίου 1998, το Συμβούλιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης έδωσε τις απαραίτητες οδηγίες και εντολές προς όλα τα κράτη-μέλη σχετικά με την ποιότητα του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης. Φυσικά, υπήρχαν διάφορες τροποποιήσεις με σημαντικότερη αυτή στις 06-10-2015. Με βάση αυτές τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, συμμορφώθηκαν όλες οι χώρες που ανήκαν τότε στην Ευρωπαϊκή Ένωση και συμμορφώνεται κάθε νέο μέλος της. Επομένως, στην Ευρώπη, ισχύει το ίδιο νομοθετικό πλαίσιο με αυτό της Ελλάδας, το οποίο αναλύθηκε πλήρως στο προηγούμενο παράρτημα. (Οδηγία 98/83/EK)

1.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Το 1850 ένας Γάλλος στρατιωτικός φυσικός, ο Charles-Emmanuel Sedillot, παρατήρησε πως τα νοσοκομειακά ρούχα κάποιων ασθενών συχνά χρωματίζονταν με μια ουσία μπλε-πράσινο έχοντας και μια γλυκιά οσμή. Αυτή ήταν η πρώτη αναφορά στο βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa*, χωρίς όμως να γνωρίζουν ότι πρόκειται για το βακτήριο αυτό. 30 χρόνια μετά, το 1882, ο Γάλλος φαρμακοποιός Carle Gessard, απομόνωσε επιτυχώς την *Pseudomonas aeruginosa* το οποίο αρχικά ονομαζόταν *Bacillus pyocyaneus*, λόγω της πυοκυανίνης -κάτι το οποίο θα αναλυθεί στην συνέχεια- και η έρευνα αυτή δημοσιεύτηκε σε περιοδικό με τίτλο "On the blue and green coloration of bandages". (de Sousa T. et al., 2021)

1.3.1 Χαρακτηριστικά *Pseudomonas aeruginosa*

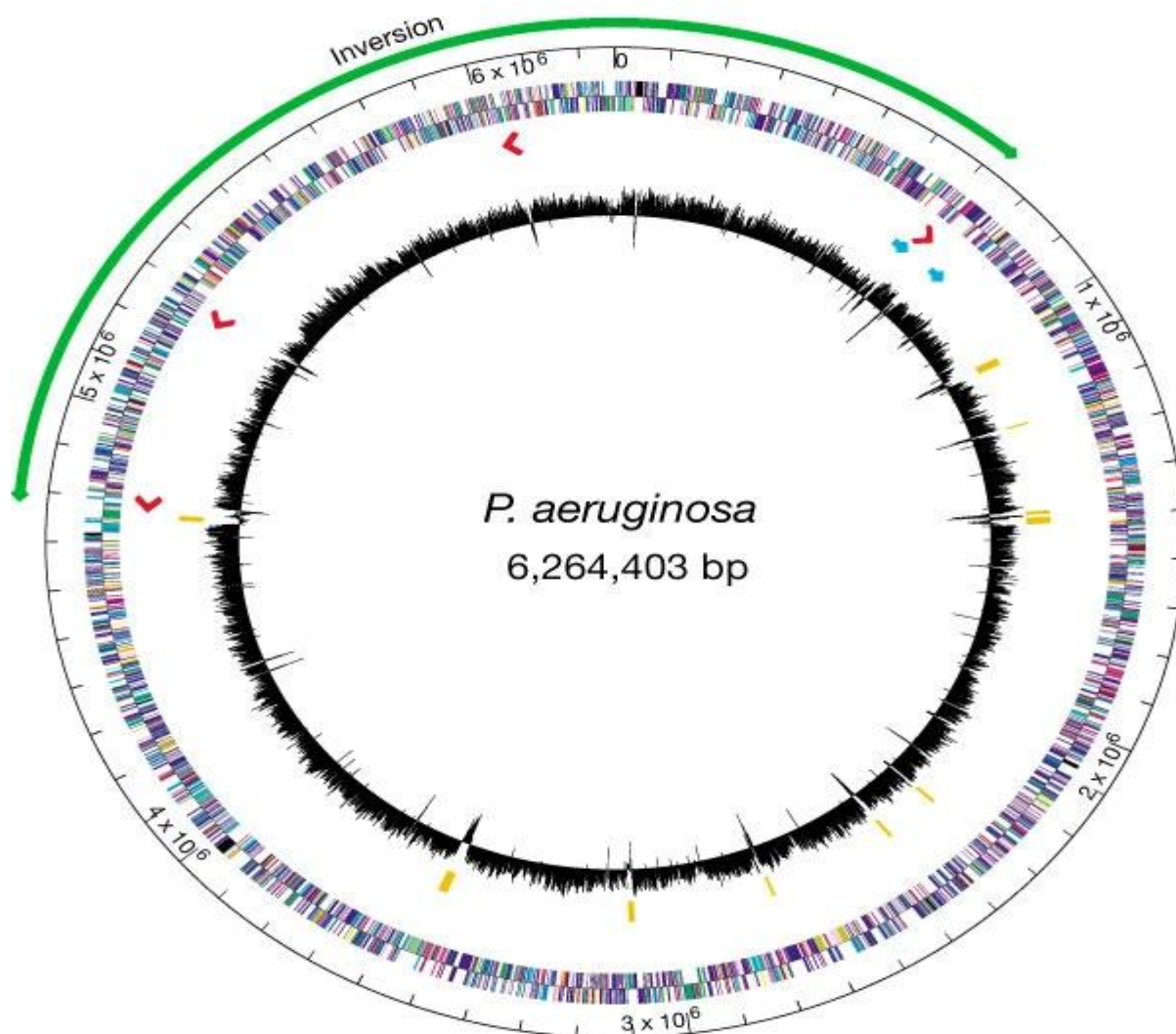
Η *Pseudomonas aeruginosa* είναι ένα «πανταχού παρόν» Gram αρνητικό βακτήριο και ανήκει στα γ-πρωτεοβακτήρια στην οικογένεια *Pseudomonadaceae*. Σχηματίζει βακίλους μεγέθους 0.5-3μm και έχει ένα μαστίγιο που της επιτρέπει την κίνηση. (de Sousa T. et al., 2021) Είναι προαιρετικά αερόβιο, καθώς μπορεί να χρησιμοποιήσει τόσο το οξυγόνο όσο και το νιτρικό ή άλλους αποδοχείς ηλεκτρονίων στην αερόβια και αναερόβια αναπνοή, αντίστοιχα. (de Sousa T. et al., 2021, Pang Z. et al., 2019) Στην **Εικόνα 4**, παρατηρούμε εικόνα από μικροσκόπιο και φαίνονται τα βαμμένα κόκκινα κύτταρα της *P. aeruginosa*.



Εικόνα 4: Φωτογραφία με αποικίες της *P. aeruginosa* από μικροσκόπιο (Wilson et al., 2022)

Το γονιδίωμα της είναι 5.5-7 Mbp και κωδικοποιεί αρκετά ρυθμιστικά ένζυμα που παίζουν ρόλο στον μεταβολισμό, μετακίνηση και εκροή ουσιών. Αυτό επιτρέπει στο βακτήριο να είναι μεταβολικά ευέλικτο και να μπορεί να προσαρμόζεται σε περιβαλλοντικές αλλαγές και έτσι, δικαίως ονομάζεται καιροσκοπικό παθογόνο (*opportunistic pathogen*) και «πανταχού παρόν» βακτήριο (*ubiquitous bacterium*). (de Sousa T. et al., 2021, Pang Z. et al., 2019, Gellatly S. L. et al., 2013) Ένα αξιοθαύμαστο στοιχείο που βρέθηκε μετά από αλληλούχηση του στελέχους PA01 (*Pseudomonas aeruginosa* strain 01), το οποίο είχε απομονωθεί πρώτη φορά από πληγή σε ασθενή στην Μελβούρνη το 1954 (Grace A. et al., 2022), ήταν ότι 521 γονίδια κωδικοποιούσαν ρυθμιστικές πρωτεΐνες, δηλαδή περίπου το 10% του γονιδιώματος της. (Gellatly S. L. et al., 2013) Παρακάτω στην **Εικόνα 5**, φαίνεται το γονιδίωμα της *P. aeruginosa* σε κυκλική μορφή. Ο εξωτερικός κύκλος δείχνει την θέση των χρωμοσωμάτων σε ζεύγη βάσεων και η κατανομή των γονιδίων φαίνεται με τα χρωματιστά κουτάκια. Η εξωτερική μεριά είναι ο θετικός (+) κλώνος και η εσωτερική ο αρνητικός (-) κλώνος, σύμφωνα με την φορά της μεταγραφής. Τα κόκκινα βέλη υποδεικνύουν τις θέσεις και

την φορά της μετάφρασης από το ριβοσωμικό RNA, ενώ τα μπλε βέλη υποδεικνύουν πιθανές θέσεις βακτηριοφάγων. Τέλος, στην μέση ο μαύρος κύκλος υποδεικνύει το ποσοστό G+C και στις κίτρινες μπάρες, το ποσοστό G+C ξεπερνά τις 3.0 kb. (Stover C. et al., 2000)



Εικόνα 5: Γονιδίωμα *P. aeruginosa* (Stover C. et al., 2000)

1.3.2 Τροπισμός *Pseudomonas aeruginosa*

Το συγκεκριμένο βακτήριο μπορεί να βρεθεί σε πολλά και διαφορετικά περιβάλλοντα, όπως για παράδειγμα στο έδαφος, σε νερό και σε τρόφιμα, και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι μπορεί να καταναλώσει διάφορα θρεπτικά οργανικά στοιχεία για την επιβίωση του. Η ικανότητα αυτή είναι που αυξάνει την πιθανότητα για έκθεση από το βακτήριο αυτό και για τον λόγο αυτό υπάρχουν τόσα κρούσματα. Έχει απομονωθεί από πολλά μέρη, καθώς και στα νοσοκομεία έχει απομονωθεί από αναπνευστήρες, νεροχύτες, μπάνια και φυσικοθεραπεία. Έτσι, είναι αντιληπτό πως στελέχη της *P. aeruginosa* μπορούν να βρεθούν παντού και να προκαλέσουν ασθένεια έως και θάνατο σε ειδικές περιπτώσεις. (Wood S. et al., 2023)

1.3.3 Ασθένειες λόγω *Pseudomonas aeruginosa*

Η *P. aeruginosa* ευθύνεται για πολλές ασθένειες, μερικές σοβαρές και άλλες όχι τόσο, αλλά από έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, το ποσοστό θνησιμότητας λόγω μόλυνσης από *P. aeruginosa* μπορεί να φτάσει και το 40%. (Wood S. et al., 2023) Στον **Πίνακα 6** παρατηρούμε κάποιες κοινές λοιμώξεις από το βακτήριο καθώς και τις πιο κοινές οδούς που γίνονται οι λοιμώξεις.

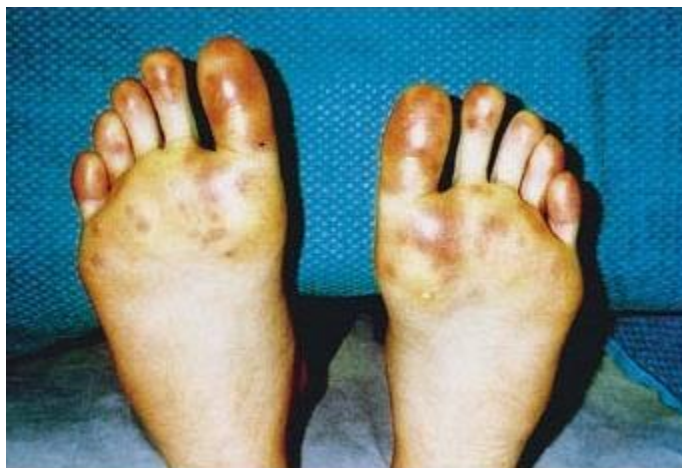
ΛΟΙΜΩΞΗ	ΑΙΤΙΑ
Μαλακός ιστός	Ανοιχτές πληγές
Ουροποιητικό σύστημα	Ουροκαθετήρας
Βακτηρεμία	Ανοσοκατεσταλμένου
Αναπνευστικό σύστημα	Κυστική ίνωση, χρόνια λοίμωξη αναπνευστικού
Ωτίτιδα	Τραυματισμός αυτιού, πλύσιμο με μη καθαρό νερό
Κερατίτιδα	Πλύσιμο με μη καθαρό νερό

Πίνακας 6: Κοινές λοιμώξεις από *P. aeruginosa* (Wood S. et al., 2023)

Η λίστα με τις λοιμώξεις και τις ασθένειες που προκαλεί το βακτήριο αυτό διαρκώς μεγαλώνει. Κάποιες από αυτές παρατηρούνται σε δημόσια μέρη, ενώ άλλες σε νοσοκομειακά ιδρύματα.

1.3.3.1 Δημόσια μέρη

Σε μέρη όπου συχνάζει πολύς κόσμος, όπως για παράδειγμα τα κοινά μπάνια, τουαλέτες και πισίνες, είναι συχνό φαινόμενο η παραμονή της *P. aeruginosa* στο νερό. Τα συμπτώματα, βέβαια, που προκαλεί δεν είναι πολύ σοβαρά και σε αυτά συγκαταλέγονται εξανθήματα στο δέρμα, σύνδρομο «hot foot» και πιο σπάνια, σηπτική αρθρίτιδα. (Kerr K. G. et al., 2009) Στα συμπτώματα του «hot foot» συνδρόμου συγκαταλέγονται ο έντονος πόνος στα χαμηλά τμήματα του ποδιού, το πρήξιμο τους και μια αίσθηση καψίματος, καθώς επίσης οι ασθενείς εμφανίζουν πυρετό. Η κλινική εικόνα του συνδρόμου φαίνεται στην **Εικόνα 6**. (Fiorillo L. et al., 2001) Όσον αφορά την σηπτική αρθρίτιδα, πρόκειται για μια φλεγμονή των αρθρώσεων, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε οστεομυελίτιδα, σήψη ή ακόμα και θάνατο. (Momodu II. et al., 2023)



Εικόνα 6: Κλινική εικόνα συνδρόμου Hot Foot (Fiorillo L. et al., 2001)

1.3.3.2 Νοσοκομειακά ιδρύματα

Το βακτήριο αυτό έχει χαρακτηριστεί από πολλούς γιατρούς και ερευνητές ως ‘βακτήριο-δολοφόνος’ στα νοσοκομεία. Οι πιο σοβαρές λοιμώξεις στην περίπτωση αυτή είναι η βακτηριαιμία, η πνευμονία, η λοίμωξη του ουροποιητικού συστήματος και η επιμόλυνση τραυμάτων. Όμως, άτομα που έχουν ανοσοκατασταλεί λόγω χημειοθεραπειών ή άτομα χειρουργημένα που χρειάζονται ειδικό εξοπλισμό, όπως καθετήρες και τραχειοστομία, βρίσκονται σε πολύ μεγαλύτερο κίνδυνο μόλυνσης από *P. aeruginosa*. (Kerr K. G. et al., 2009)

Το βακτήριο αυτό μπορεί να προκαλέσει σοβαρές οξείες λοιμώξεις που συμπεριλαμβάνουν λοιμώξεις αναπνευστικού, όπως είναι οι HAP (Hospital Acquired Pneumonia) και VAP (Ventilator-Associated Pneumonia), δηλαδή λοιμώξεις αναπνευστικού που οφείλονται στο νοσοκομείο ή στον αναπνευστήρα. Άλλες οξείες λοιμώξεις είναι η κερατίτιδα (Wood S. et al., 2023) -μόλυνση ή ερεθισμός του κερατοειδούς και είναι αιτία τύφλωσης (Sara T. L., 2020)-, η λοίμωξη ουροποιητικού συστήματος, η οστεομυελίτιδα -μόλυνση στο οστό (Carek P. J., et al., 2001)- και ενδοκαρδίτιδα -μόλυνση του ενδοκαρδίου (Pruthi S., 2022). Πολλές φορές, στις παραπάνω περιπτώσεις, το επόμενο βήμα στους ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, είναι η βακτηριαιμία και επακολούθως η σηπτική καταπληξία του οργανισμού. (Wood S. et al., 2023)

Πολλές αναφορές σε νοσοκομεία κάνουν λόγο ότι η *P. aeruginosa* είναι μόλις δεύτερη πίσω από τον *Staphylococcus aureus* σε ποσοστά ενδονοσοκομειακής λοίμωξης. (Wood S. et al., 2023) Στην Ρώμη την διετία 2008-2010, σε Μονάδα Αυξημένης Φροντίδας (ΜΑΦ) το ποσοστό θανάτου από ενδονοσοκομειακή λοίμωξη από *P. aeruginosa* άγγιξε το 44,5% (Tumbarello M. et al., 2013).

Εκτός των οξείων λοιμώξεων, η *P. aeruginosa* μπορεί να προκαλέσει και χρόνιες λοιμώξεις. Η σημαντικότερη είναι η κυστική ίνωση και το βακτήριο αυτό αποτελεί τον πιο σημαντικό παράγοντα για χάσιμο λειτουργίας των πνευμόνων στα άτομα αυτά κάτι το οποίο συνεπάγεται με θάνατο. (Wood S. et al., 2023) Η κυστική ίνωση είναι μια γενετική διαταραχή που προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) και οδηγεί στην παραγωγή βλέννας στις επιφάνειες των αεραγωγών. (Pang Z. et al., 2019) Επιπροσθέτως, οι ανοιχτές πληγές είναι πολύ ευάλωτες σε μολύνσεις από το βακτήριο αυτό και μπορούν να προκαλέσουν αρκετά συμπτώματα στον ασθενή. (Wood S. et al., 2023)

Όπως προαναφέρθηκε, η *P. aeruginosa* εντοπίζεται πολύ συχνά σε περιπτώσεις ατόμων που είναι ανοσοκατεσταλμένα και είναι υπεύθυνη για πολύ σοβαρές λοιμώξεις. Οι περιπτώσεις αυτών αφορούν ασθενείς με AIDS, ασθενείς με καρκίνο που υπόκεινται σε χημειοθεραπεία και ασθενείς που έχουν λάβει μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων. Στους ασθενείς με AIDS βρέθηκε ότι η *P. aeruginosa* ήταν αυτή που ευθυνόταν για το 8-25% για συμπτώματα, όπως πνευμονία, σήψη και λοίμωξη ουροποιητικού. Ένα ανάλογο συμπέρασμα βγήκε και για τους ασθενείς με πολύ μειωμένα ουδετερόφιλα

(neutropenia) εξαιτίας χημειοθεραπειών για καταπολέμηση καρκίνου και ιδιαιτέρως, για καταπολέμηση λευχαιμίας. (Wood S. et al., 2023)

Μια άλλη κατηγορία ατόμων στα νοσοκομεία που είναι ευάλωτα στην μόλυνση από *P. aeruginosa* είναι οι δέκτες μεταμόσχευσης οργάνων (SOT – Solid Organ Transplant). Ο λόγος που είναι ευάλωτα τα άτομα αυτά είναι η χρήση ισχυρών ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων για την πρόληψη της απόρριψης του μοσχεύματος. (Wood S. et al., 2023) Σύμφωνα με τους Wood S. et al., (2023), άτομα που δέχτηκαν μόσχευμα και σχετίστηκαν με μόλυνση της κυκλοφορίας του αίματος, έχουν αρκετά μεγάλα ποσοστά νοσηρότητας από το βακτήριο αυτό. Πιο συγκεκριμένα, τα δεδομένα φαίνονται στον **Πίνακα 7.** +32

Ποσοστό μόλυνσης	Σημείο μόλυνσης
5-11%	Νεφροί
8-24%	Καρδιά
8-26%	Πνεύμονας
61-69%	Έντερο
10-34%	Ήπαρ

Πίνακας 7: Ποσοστά και σημεία μόλυνσης από *P. aeruginosa* σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς (Wood S. et al., 2023)

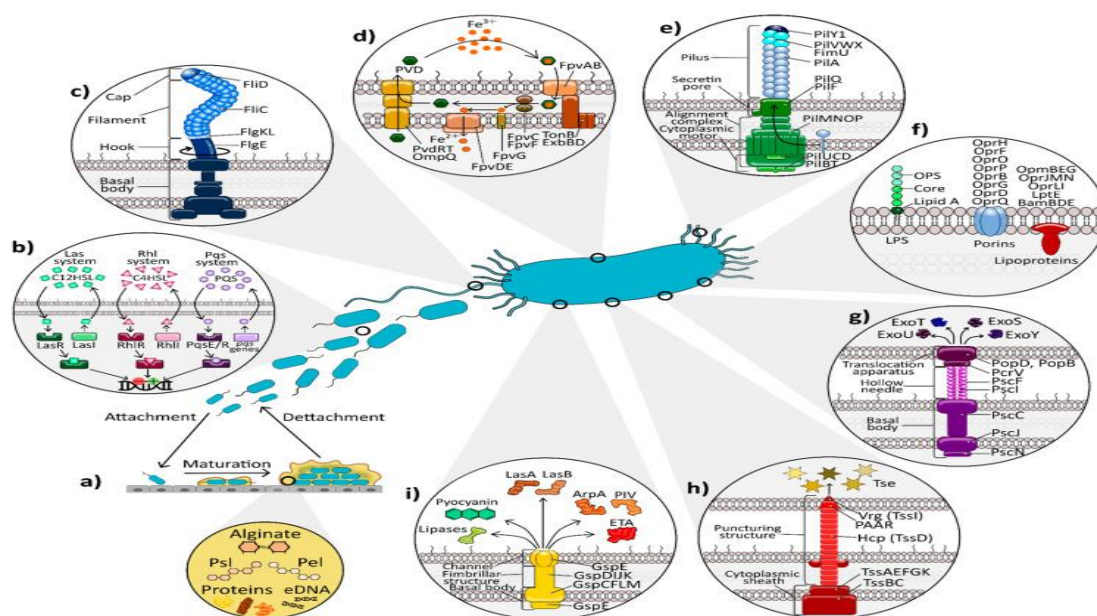
Η *P. aeruginosa* μπορεί, επίσης, να μολύνει ασθενείς που έχουν υποστεί καψίματα. Η ομάδα ατόμων αυτή, έχει ως χαρακτηριστικό γνώρισμα την υπερφλεγμονώδη απόκριση κυτοκίνης και την υπολειτουργία της έμφυτης και προσαρμοστικής ανοσίας, γεγονός που την καταστεί ως ομάδα σοβαρής ανοσοκαταστολής. (Wood S. et al., 2023) Πιο συγκεκριμένα, η υπερφλεγμονώδη απόκριση, αλλιώς γνωστή ως συστηματικό σύνδρομο φλεγμονώδους απάντησης (SIRS – Systemic Inflammatory Response Syndrome), χαρακτηρίζεται από αύξηση κυτοκινών, όπως η ιντερλευκίνη-18 (IL-18), η ιντερλευκίνη-1β (IL-1β) και ο παράγοντας TNF-α. Η απάντηση αυτή προκαλείται από την έκκριση των DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns) και PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) από τους τραυματισμένους ιστούς. Η υπερέκκριση των μορίων αυτών ευθύνεται στην υπερρύθμιση των υποδοχέων TLRs (Toll-Like Receptors), που ενεργοποιούνται από το έγκαυμα. Επίσης, οι ιντερλευκίνες που προαναφέρθηκαν, παράγονται σε πολύ μεγάλες ποσότητες από το NLRP3 inflammasome, έναν κύριο ρυθμιστή παραγωγής κυτοκινών, ο οποίος ενεργοποιείται από το έγκαυμα. Έτσι, από τα παραπάνω βγαίνει το συμπέρασμα ότι η υπερέκφραση των αμυντικών αυτών μορίων μπορεί να αποδειχθεί μοιραία για τον ασθενή από έγκαυμα, καθώς εν τέλει, όλο αυτό μπορεί να «επιτεθεί» στον ίδιο τον ασθενή. (Wood S. et al., 2023, Irrera N. et al., 2020, Chen X et al., 2019) Όσον αφορά την υπολειτουργία της έμφυτης και προσαρμοστικής ανοσίας, αυτό συμβαίνει εξαιτίας του συμπλόκου LPC (Lipid Protein Complex) που επάγεται από την υπερβολική ζέστη - που υπάρχει στα εγκαύματα- και εκκρίνεται στην κυκλοφορία του αίματος, οδηγώντας, έτσι, στην αναστολή παραγωγής αμυντικών μορίων, δηλαδή των B και T λεμφοκυττάρων και πιο ειδικά, των CD4⁺ και CD8⁺. (Wood S. et al., 2023, Chen X et al., 2019) Η *P. aeruginosa*, λοιπόν, στις μονάδες των νοσοκομείων για τους ασθενείς που φέρουν εγκαύματα, φαίνεται να είναι η πιο συχνή μόλυνση. Σύμφωνα κιόλας με μια έρευνα που αφορούσε περίπου 17.000 ασθενείς που είχαν υποστεί εγκαύματα στην

Κίνα το διάστημα 2006-2019, η λοίμωξη από *P. aeruginosa* και *Staphylococcus aureus* ήταν οι δυο υψηλότερες λοιμώξεις στους ασθενείς αυτούς. Το εντυπωσιακό στην έρευνα αυτή ήταν ότι το ποσοστό της *P. aeruginosa* αυξήθηκε περίπου κατά 8% στο πέρασμα των χρόνων, ενώ το ποσοστό του *Staphylococcus aureus* παρέμεινε ίδιο. (Wood S. et al., 2023, Chen H et al., 2009)

Τέλος, είναι πλήρως κατανοητό και αναμενόμενο πως τα άτομα στα νοσοκομειακά ιδρύματα που πάσχουν από πρωτοπαθείς διαταραχές ανοσοανεπάρκειας (Primary Immunodeficiency Disorders - PIDDs) πάσχουν από πολλές επιμολύνσεις ενδονοσοκομειακές με την λοίμωξη από *P. aeruginosa* να είναι σε μεγάλα ποσοστά, όπως επίσης και τα ποσοστά θανάτου τους από αυτήν. Στην κατηγορία των διαταραχών αυτών ανήκουν πολλές ασθένειες με γενετικό υπόβαθρο που επηρεάζουν το ανοσοποιητικό σύστημα και ένα παράδειγμα αποτελεί το αυτοάνοσο λεμφοπολλαπλασιαστικό σύνδρομο (Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome - ALPS). (Wood S. et al., 2023, NIAID Primary Immune Deficiency Clinic, 2016, Great Ormond Street Hospital, and Great North Children's Hospital, 2018)

1.3.4 Τρόποι επίθεσης *Pseudomonas aeruginosa*

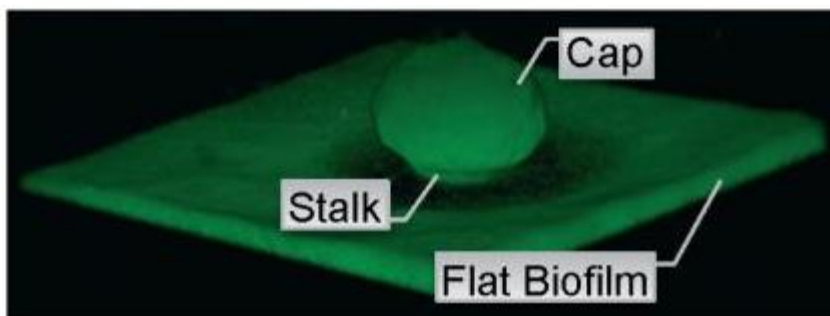
Η *Pseudomonas aeruginosa* στις λοιμώξεις του αναπνευστικού έχει πολλούς μηχανισμούς με τους οποίους μπορεί να μολύνει τον ξενιστή και να ξεκινήσει η παθογένεση της. Οι παράγοντες λοιμογόνου δράσης του βακτηρίου αυτού φαίνονται συνοπτικά στην **Εικόνα 7**. (Jurado-Martín I et al., 2021)



Εικόνα 7: Λοιμογόνοι παράγοντες της *P. aeruginosa*: (a) Σχηματισμός βιοφίλμ (b) τα 3 κύρια συστήματα quorum sensing (QS) (Las, Rhl και Pqs) (c) φλαγγελίνες (d) πυοβερδίνη (PVD) (e) τύπος 4 pili (T4P) (f) λιποπολυσακχαρίδιο (LPS) και πρωτεΐνες εξωτερικής μεμβράνης (OMPs) (g) σύστημα έκκρισης III (T3SS) (h) σύστημα έκκρισης VI (T6SS) (i) σύστημα έκκρισης II (T2SS) (Jurado-Martín I et al., 2021)

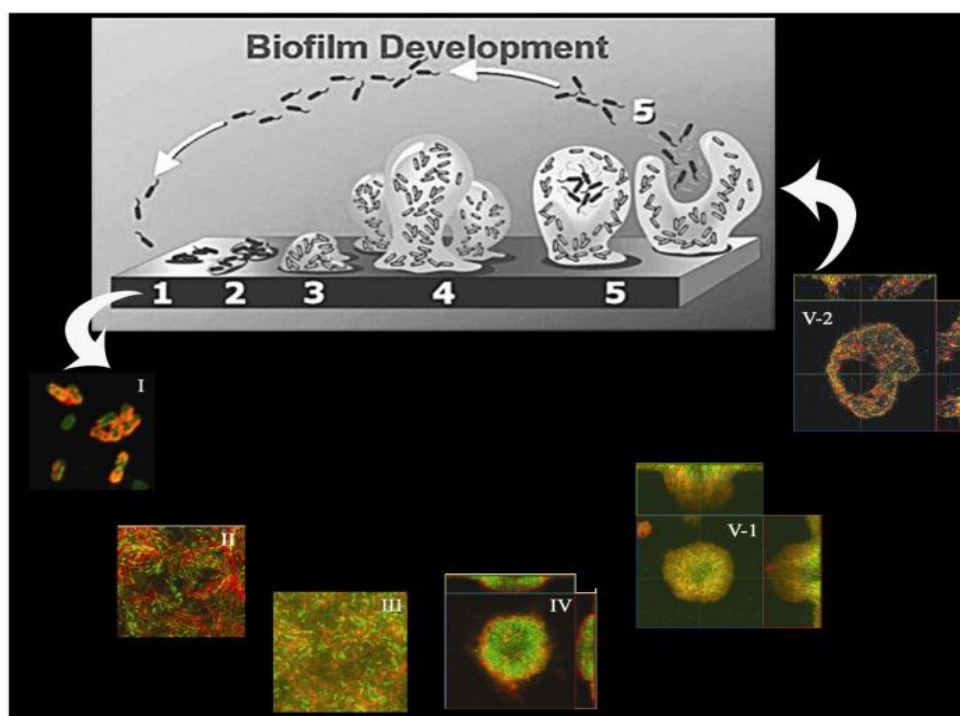
1.3.4.1 Σχηματισμός βιοφίλμ

Ως βιοφίλμ ορίζεται μια κοινότητα βακτηρίων διαφόρων ειδών -μπορεί να αποτελείται και από ένα μόνο είδος-, τα οποία έχουν την ικανότητα να παράγουν πολυσακχαρίτες που δημιουργούν μια προστατευτική κάψα γύρω τους και τα βοηθά να προσκολληθούν σε διάφορες επιφάνειες. Ευθύνεται σε πολύ μεγάλο βαθμό για την αντιβιοαντοχή που παρουσιάζει το βακτήριο. (Wei Q et al., 2013) Τα βιοφίλμ της *P. aeruginosa* έχουν σχήμα μανιταριού και ένα πολύπλοκο δίκτυο καναλιών που διανείμουν θρεπτικά και απομακρύνουν τα άχρηστα παραπροϊόντα (Jurado-Martín I et al., 2021). Στην **Εικόνα 8**, παρατηρούμε μια μικρογραφία ενός βιοφίλμ της *P. aeruginosa* ανεπτυγμένη σε flow-cell για 3 ημέρες. (Jurado-Martín I et al., 2021, Mann EE et al., 2012)



Εικόνα 8: Φωτογραφία ενός βιοφίλμ *P. aeruginosa* από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Ως stalk ορίζεται το αρχικό σύμπλοκο των αποικιών και ως cap οι επόμενοι πληθυσμοί (Mann EE et al., 2012)

Το βιοφίλμ ξεκινά να παράγεται με την αύξηση ενός ενδοκυτταρικού αγγελιαφόρου, του c-di-GMP, ο οποίος επάγει την βιοσύνθεση αντχεσινών (adhesins) και εξωπολυσακχαριστών (EPS). Η σύνθεση αυτών των EPS καθώς και η κινητικότητα του βακτηρίου επηρεάζεται από διάφορα ένζυμα (λιπάσες, εστεράσες) που ελέγχονται από το σύστημα QS και αυτό έχει ως συνέπεια, την άμεση επιρροή τους στον σχηματισμό του βιοφίλμ. (Jurado-Martín I et al., 2021) Οι EPS αποτελούνται, εκτός από πολυσακχαρίτες, και από πρωτεΐνες και εξωκυττάριο DNA και λειτουργούν ως μήτρα (Wei Q et al., 2013). Τα στάδια παραγωγής του βιοφίλμ της *P. aeruginosa* παριστάνονται σχηματικά στην Εικόνα 9. Αρχικά, υπάρχει η πρώτη προσκόλληση (I), η οποία γίνεται μη αναστρέψιμη εξαιτίας της σύνδεσης και των βακτηρίων αναμεταξύ τους και της παγίδευσης τους μέσα στην μήτρα (II). Στην συνέχεια, σχηματίζεται αποικία (III) και τέλος, το βιοφίλμ ωριμάζει (IV) και εξαπλώνεται (V). Το κόκκινο χρώμα στις φωτογραφίες της **Εικόνας 9** είναι οι εξωπολυσακχαρίτες και πιο συγκεκριμένα, ο Psl, ενώ το πράσινο χρώμα είναι τα κύτταρα. Επίσης, στα στάδια 4 και 5 παρατηρούμε την δομή μανιταριού που έχει το βιοφίλμ. (Wei Q et al., 2013, Ma L et al., 2009)



Εικόνα 9: Στάδια παραγωγής βιοφίλμ (Wei Q et al., 2013, Ma L et al., 2009)

1.3.4.2 Συστήματα Quorum Sensing

Το σύστημα αυτό είναι πολύ σημαντικό για την ρύθμιση πολλών γονιδίων που επιτρέπουν την επικοινωνία μεταξύ κυττάρων και την περιβαλλοντική προσαρμογή. Στην ουσία τα βακτήρια με το σύστημα αυτό παράγουν και απελευθερώνουν σήματα, τα οποία αλληλεπιδρούν με υποδοχείς επηρεάζοντας έτσι, την έκφραση άλλων γονιδίων που ευθύνονται για την παραγωγή των παραγόντων λοιμογόνου δράσης. (Jurado-Martín I et al., 2021, Lee J et al., 2015) Η *P. aeruginosa* έχει 4 τέτοια συστήματα: το Las, το Rhl, το Pqs και το Iqs. Το σύστημα Las είναι αυτό που ρυθμίζει τα υπόλοιπα, το Iqs ρυθμίζει το Pqs και αυτό το Rhl, το οποίο μειωρρυθμίζει το Pqs.

Το σύστημα Las δημιουργεί σύμπλοκο που ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων των λοιμογόνων παραγόντων που ευθύνονται για τις οξείες λοιμώξεις. Προκαλεί, επίσης, απόπτωση σε επιθηλιακά κύτταρα της αναπνευστικής οδού και καταστρέφει τους χασμοσύνδεσμούς τους. (Jurado-Martín I et al., 2021)

Το σύστημα Pqs παράγει τον κύριο παράγοντα λοιμογόνου δράσης, τον PqsE. Η πρωτεΐνη αυτή με την αρωγή του συστήματος Rhl, εμπλέκεται στην παραγωγή της πυοκυανίνης. Εμπλέκεται, ακόμη, και στην ενδογενή αντοχή που παρουσιάζει το βακτήριο στα αντιβιοτικά (Jurado-Martín I et al., 2021).

Το σύστημα Iqs ανιχνεύει τον περιορισμό των φωσφορικών, που είναι κοινό παράδειγμα στρες κατά την διάρκεια μόλυνσης και έτσι, ρυθμίζει την παραγωγή των λοιμογόνων παραγόντων. Βοηθάει, ακόμη, και στην απόπτωση κυττάρων του ξενιστή. Για το σύστημα αυτό πάντως δεν έχουν βρεθεί πολλά καθώς πρόκειται για νέα ανακάλυψη.

1.3.4.3 Φλαγγελίνη

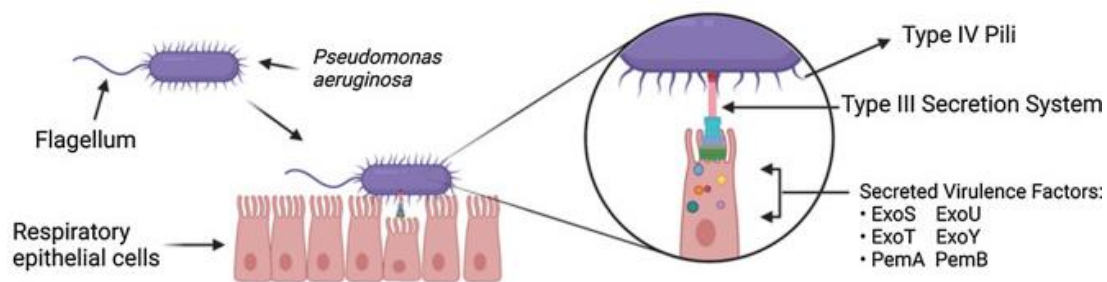
Όπως προαναφέρθηκε, η *P. aeruginosa* έχει ένα μονό μαστίγιο που αποτελείται από νήμα κατασκευασμένο από πολυμερισμένη φλαγγελίνη (FliC), πρωτεΐνη cap (FliD), το άγκιστρο στην βάση του (FlgE), δυο άλλες πρωτεΐνες-άγκιστρα (FlgKL) και κάποια άλλα μόρια. Το μαστίγιο είναι υπεύθυνο για την μετακίνηση του βακτηρίου σε υδάτινα περιβάλλοντα (Jurado-Martín I et al., 2021). Η μετακίνηση του βάσει χημικού ερεθίσματος, δηλαδή η χημειοταξία, (Stock J.B., and Baker M.D, 2009) είναι απαραίτητη για την *P. aeruginosa* για την πρόσδεση της στο επιθήλιο της αναπνευστικής οδού. Για τον λόγο αυτό θεωρείται ως ένας παράγοντας λοιμογόνος (Jurado-Martín I et al., 2021). Επίσης, σύμφωνα με μια έρευνα, μεταλλαγμένα στελέχη που δεν έχουν φλαγγελίνες, όπως για παράδειγμα την FlgE, έχασαν την ανθεκτικότητα τους στην πρωτεΐνη SP-A, μια κύρια πρωτεΐνη του ανοσοποιητικού που αναγνωρίζει παθογόνα και τα οδηγεί για φαγοκύττωση (Jurado-Martín I et al., 2021, Zhang S et al., 2007, Alcorn J. L. et al., 2017). Έτσι, εκτός της κίνησης, το μαστίγιο φαίνεται να διαδραματίζει ρόλο και στην παθογένεση. Τέλος, το μαστίγιο βοηθάει και στο αρχικό στάδιο παραγωγής του βιοφίλμ (Jurado-Martín I et al., 2021).

1.3.4.4 Πυοβερδίνη (PVD)

Η πυοβερδίνη είναι το σημαντικότερο σιδηροφόρο για την *P. aeruginosa*. Το σιδηροφόρο είναι χηλικό μόριο με υψηλή συγγένεια για τον σίδηρο, που είναι ένα από τα απαραίτητα στοιχεία για τους μικροοργανισμούς. Παράγονται ως απόκριση στην έλλειψη σιδήρου από τα βακτήρια, αλλά είναι επίσης και παράγοντας λοιμογόνου δράσης (Jurado-Martín I et al., 2021, Dauner M. et al., 2020, Khasheii B. et al., 2021). Η πυοβερδίνη, λοιπόν, αποτελείται από την πεπτιδική αλυσίδα που ποικίλλει και ένα συντηρημένο χρωμοφόρο που προσδένεται με τον σίδηρο. Παρόλο που είναι μια διαδικασία απαραίτητη για το βακτήριο, αυτό μπορεί να έχει και επιπτώσεις. Κατά την διαδικασία αυτή, παράγεται σε υψηλές συγκεντρώσεις ROS, κάτι το οποίο οδηγεί σε κυττοτοξικότητα. (Jurado-Martín I et al., 2021)

1.3.4.5 Τύπος IV pili

Πρόκειται για αναδιπλούμενα νηματοειδή κομμάτια. Αποτελούνται από πολλά μόρια της πρωτεΐνης major pilin (PilA), οι οποίες βοηθούν στην δημιουργία του pili και εμπλέκονται στην προσκόλληση και επίθεση. Η δομή αυτή παίζει ρόλο στην δημιουργία του βιοφίλμ και πιο συγκεκριμένα, στην δημιουργία του «μανιταριού», αλλά και στην αντοχή στα αντιβιοτικά. Επιπροσθέτως, με την κινητικότητα και την προσκόλληση που προσφέρει στο βακτήριο, το βοηθά να ξεκινήσει την μόλυνση. Η κίνηση που προσφέρει οφείλεται σε συνεχείς κύκλους από επιμήκυνση, προσκόλληση και αποκόλληση ινών του τύπου IV pili. Τέλος, μπορεί να προσφέρει στο βακτήριο και αντοχή στην φαγοκύττωση από το SP-A, που είναι μια πρωτεΐνη στους πνεύμονες με αντιμικροβιακές δράσεις (Tan R. et al., 2014) και να ενεργοποιήσει το φλεγμονόσωμα (inflammasome) που είναι ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο και παίζει ρόλο στην απάντηση σε λοίμωξη ή στρες (de Zoete M.R. et al., 2014). Στην **Εικόνα 10** φαίνεται πως το βακτήριο επιτίθεται σε επιθηλιακά κύτταρα της αναπνευστικής οδού. Αυτό συμβαίνει μέσω της πρόσδεσης του τύπου IV pili και στην συνέχεια, υπάρχει έκκριση διάφορων λοιμογόνων παραγόντων από το σύστημα έκκρισης III. (Reynolds D et al., 2021)



Εικόνα 10: Επίθεση *P. aeruginosa* σε αναπνευστικά επιθηλιακά κύτταρα (Reynolds D et al., 2021)

1.3.4.6 Λιποπολυσακχαρίτης (LPS) και πρωτεΐνες εξωτερικής μεμβράνης (OMPs)

Ένας άλλος τρόπος «επίθεσης» του βακτηρίου στον ξενιστή είναι η εξωτερική μεμβράνη (Outer Membrane - OM) του. Η εξωτερική μεμβράνη έχει μια ασυμμετρία στο διπλό στρώμα που έχει και περιορίζει αρκετά την είσοδο επικίνδυνων για το βακτήριο μορίων. Η εσωτερική μεριά αποτελείται από φωσφολιπίδια, ενώ η εξωτερική από λιποπολυσακχαρίτη (LPS) και πρωτεΐνες που ονομάζονται outer membrane proteins (OMPs). (Jurado-Martín I et al., 2021)

Ο λιποπολυσακχαρίτης αποτελείται από 3 περιοχές: το λιπίδιο A, την πυρηνική περιοχή και τον O-πολυσακχαρίτη (OPS). Η λειτουργία του είναι να διαμεσολαβεί στην επικοινωνία με τα κύτταρα-ξενιστές, να προκαλεί τραύμα στους ιστούς και να επάγει παραγωγή ROS και φλεγμονωδών μορίων, όπως IL-1 και IL-6. Συμμετέχει και στην παραγωγή των βιοφίλμ. Το λιπίδιο A είναι ένα γλυκολιπίδιο που μεσολαβεί στην ενδοτοξικότητα. Επικοινωνεί με το σύστημα quorum sensing (QS) και βοηθά την μεμβράνη να καμπυλωθεί έτσι ώστε να δημιουργηθούν κύστες της εξωτερικής μεμβράνης (Outer Membrane Vesicles - OMV), που βοηθούν στην μεταφορά των παραγόντων λοιμογόνου δράσης. (Jurado-Martín I et al., 2021, Florez C et al., 2017) Ο O-πολυσακχαρίτης είναι μια μακριά αλυσίδα επαναλαμβανόμενων πολυσακχαριτών που επεκτείνεται εκτός της εξωτερικής μεμβράνης του βακτηρίου. Εμπλέκεται με την προστασία του βακτηρίου αποτρέποντας τη φαγοκύτωση, το προστατεύει από το οξειδωτικό στρες και από την επαγωγή NETωσης (NETosis), μιας διαδικασίας παραγωγής NETs, δηλαδή εξωκυττάρων παγίδων ουδετερόφιλων. (Jurado-Martín I et al., 2021, Vorobjeva NV et al., 2020)

Οι πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης (OMPs) είναι είτε πορίνες είτε λιποπρωτεΐνες. Η πρώτη κατηγορία είναι στην ουσία κανάλια-πρωτεΐνες που χρησιμεύουν στην ανταλλαγή διάφορων μορίων με σημαντικότερη να είναι η OprF για την ακεραιότητα και μόλυνση του βακτηρίου. Η δεύτερη κατηγορία των OMPs είναι οι λιποπρωτεΐνες. Κάποιες από αυτές παίζουν ρόλο στην βιογένεση της εξωτερικής μεμβράνης, ενώ άλλες βοηθούν στην διατήρηση της ακεραιότητας του κυττάρου. (Jurado-Martín I et al., 2021)

1.3.4.7 Σύστημα έκκρισης III (T3SS)

Η *P. aeruginosa* έχει 5 συστήματα έκκρισης που χρησιμοποιεί για να εκκρίνει τοξίνες και υδρολυτικά ένζυμα με σκοπό να επιτεθεί στον ξενιστή. Τα συστήματα I και V είναι

τα πιο απλά του βακτηρίου αυτού και πρόσφατα, ανακαλύφθηκε και το σύστημα VI. (Jurado-Martín I et al., 2021)

Το σύστημα III εισάγει τοξικούς παράγοντες απευθείας στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου-ξενιστή. Αυτό πραγματοποιείται μέσω του «injectisome» που αποτελείται από 20 πρωτεΐνες, οι οποίες μεταφέρουν παράγοντες μέσω της βακτηριακής μεμβράνης και μετά τους μεταφέρουν στον ξενιστή μέσω της μεμβράνης των κυττάρων του. Οι πρωτεΐνες που μεταφέρουν τους τοξικούς παράγοντες ανήκουν στο «σύμπλοκο της έκκρισης», ενώ οι υπόλοιπες πρωτεΐνες ανήκουν στο «σύμπλοκο της μεταφοράς». Το «injectisome» ενεργοποιείται μόνο μετά από κάποια συγκεκριμένα σήματα, όπως για παράδειγμα χαμηλή συγκέντρωση εξωκυττάρου ασβεστίου (Ca^{2+}) ή την επαφή του βακτηρίου με το κύτταρο-ξενιστή μέσω του μαστιγίου. (Jurado-Martín I et al., 2021)

Το σύστημα έκκρισης τύπου III συνήθως εισάγει στο κύτταρο-ξενιστή 4 τοξικούς παράγοντες. Αυτοί είναι οι ExoU, ExoT, ExoS και ExoY. (Jurado-Martín I et al., 2021, Anantharajah A. et al., 2016)

Η ExoU φαίνεται να είναι η πιο τοξική καθώς ευθύνεται για σήψη και θνησιμότητα σε πολλές περιπτώσεις. Έχει δράση φωσφολιπάσης και καταστρέφει την κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων του ξενιστή προκαλώντας έτσι πολύ γρήγορο κυτταρικό θάνατο. (Jurado-Martín I et al., 2021, Anantharajah A. et al., 2016)

Η ExoY τοξίνη παράγεται από την πλειοψηφία των βακτηρίων *P. aeruginosa* και ενεργοποιεί πρωτεϊνικές κινάσες, αφού αυξάνει τα επίπεδα κυκλικών νουκλεοτιδίων, όπως είναι για παράδειγμα το cAMP. Έτσι, προκαλείται στο κύτταρο αποσυναμορλόγηση του μικροσωληνίσκου και πιο συγκεκριμένα, των ινιδίων ακτίνης, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την δυσλειτουργία των οργάνων. (Jurado-Martín I et al., 2021, Anantharajah A. et al., 2016)

Παρομοίως, η ExoT παράγεται σχεδόν από όλα τα βακτήρια. Έχει διττή λειτουργία, δηλαδή έχει δράση GTPάσης, ενεργοποιώντας την πρωτεΐνη GAP και δράση ADRPT (Adenosine Diphosphate Ribosyl Transferase), το οποίο βοηθάει στην φαγοκύτωση. Στην πρώτη περίπτωση, η πρωτεΐνη GAP απενεργοποιεί 3 GTPάσες που ρυθμίζουν την οργάνωση του κυτταροσκελετού και συνεπώς, το κύτταρο δεν μπορεί να μετακινηθεί. (Jurado-Martín I et al., 2021, Anantharajah A. et al., 2016)

Τέλος, η ExoS σύμφωνα με το Sarges E. et al. (2020) σχετίστηκε με τις χρόνιες λοιμώξεις και κυρίως με την κυστική ίνωση. Έχει την ίδια διττή λειτουργία με την ExoT. Η μόνη διαφορά τους είναι ότι στα αρχικά στάδια της λοίμωξης η ExoS προκαλεί φαγοκύτωση σε ουδετερόφιλα. (Jurado-Martín I et al., 2021, Anantharajah A. et al., 2016)

1.3.4.8 Σύστημα έκκρισης VI

Όπως προαναφέρθηκε το σύστημα έκκρισης VI ανακαλύφθηκε πρόσφατα. Αποτελείται από 2 πρωτεΐνες ακίδες (spike proteins) που περιβάλλονται από ένα κυτταροπλασματικό περίβλημα. Παράγει την τοξίνη Tse, η οποία καταστρέφει την μικροβιακή χλωρίδα του ξενιστή και γενικά, δρα με παρόμοιο τρόπο με το σύστημα

έκκρισης III, αφού μπορεί να εκκρίνει απευθείας αυτόν τον λοιμογόνο παράγοντα. (Jurado-Martín I et al., 2021, Sana TG et al., 2016)

1.3.4.9 Σύστημα έκκρισης II

Το σύστημα αυτό της *P. aeruginosa* είναι το πιο πολύπλοκο σύστημα έκκρισης, καθώς απελευθερώνει πολλές και διάφορες πρωτεΐνες και το ίδιο αποτελείται από 10 πρωτεΐνες. Οι πιο βασικές ουσίες που εκκρίνει είναι η εξωτοξίνη A, πρωτεολυτικά ένζυμα, λιπολυτικά ένζυμα και πυοκυανίνη. (Jurado-Martín I et al., 2021)

Η εξωτοξίνη A αποτελεί τον πιο τοξικό λοιμογόνο παράγοντα και είναι μια τρανσφεράση, η οποία όταν απελευθερώνεται δένεται σε κύτταρα του ξενιστή μέσω υποδοχέων. Με την πρόσδεση της ξεκινάει την διαδικασία νέκρωσης του κυττάρου, αναστέλλοντας την πρωτεϊνσύνθεση και ενεργοποιώντας κασπάσες που παίζουν ρόλο στην απόπτωση. (Jurado-Martín I et al., 2021)

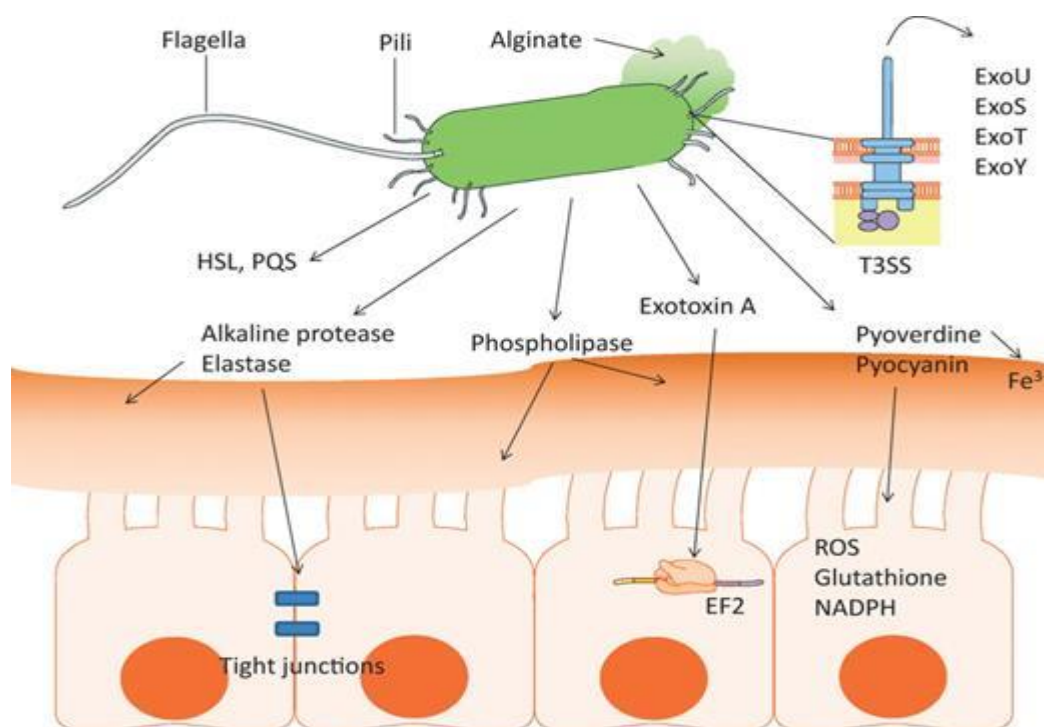
Τα πρωτεολυτικά ένζυμα που απελευθερώνει η *P. aeruginosa* ευθύνονται για τις οξείες λοιμώξεις. Τα πιο γνωστά είναι οι ελαστάσες LasA και LasB, η τύπου IV πρωτεάση, η μικρή πρωτεάση *P. aeruginosa* (PASP) και η αμινοπεπτιδάση *P. aeruginosa* (PAAP). Οι ελαστάσες ρυθμίζονται από το σύστημα QS και καταστρέφουν την ελαστίνη, η οποία είναι μια πολύ ελαστική πρωτεΐνη και δίνει μεγάλη ελαστικότητα στα κύτταρα. (Jurado-Martín I et al., 2021, Kristensen J.H. et al., 2016) Επίσης, καταστρέφουν τους επιθηλιακούς χασμοσυνδέσμους και πρωτεΐνες επιφάνειας και κυτοκίνες. Από τις δυο ελαστάσες το μεγαλύτερο μέρος της δουλειάς το κάνει η LasB, ενώ η LasA έχει περισσότερο ρόλο βοηθητικό και ρυθμιστικό και πολύ πιθανό να εμπλέκεται και στους μηχανισμούς αντιβιοαντοχής. Από την άλλη μεριά, η τύπου IV πρωτεάση είναι μια πρωτεάση σερίνης και παίζει ρόλο τόσο στην λοιμογόνο δράση του βακτηρίου, όσο και στην παθογένεση στην κυστική ίνωση. Η πρωτεάση αυτή καταστρέφει το κολλαγόνο και συνεισφέρει σε μεγάλο βαθμό στην καταστροφή των ιστών. (Jurado-Martín I et al., 2021)

Τα λιπολυτικά ένζυμα καταστρέφουν λιπίδια και απελευθερώνουν λιπιδικά οξέα και γλυκερόλη ως τελικά προϊόντα. Η LipA είναι η σημαντικότερη λιπάση της *P. aeruginosa* και κωδικοποιείται από το οπερόνιο *lipA/lipH*. Ένα άλλο λιπολυτικό ένζυμο είναι η φωσφολιπάση C που υδρολύει τα φωσφολιπίδια και την σφιγγομυελίνη της μεμβράνης και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στους ασθενείς με κυστική ίνωση, αφού μειωρρυθμίζει τις πρωτεΐνες επιφάνειας του πνεύμονα. (Jurado-Martín I et al., 2021)

Τέλος, το σύστημα έκκρισης II εκκρίνει και πυοκυανίνη, η οποία είναι ένας δευτερος μεταβολίτης και ευθύνεται για το πράσινο-μπλε χρώμα των αποικιών σε καλλιέργεια *P. aeruginosa*. Έχει φλεγμονώδη αποτελέσματα και παράγει ελεύθερες ρίζες και έτσι, ευθύνεται για την σοβαρότητα της λοίμωξης και την λειτουργία των πνευμόνων. Αυξάνει το ενδοκυτταρικό ROS προκαλώντας οξειδωτικό στρες και καταστρέφοντας στοιχεία του κυττάρου. Ακόμη, βοηθάει στον σχηματισμό του βιοφίλμ και στην απόκτηση αντοχής στα αντιβιοτικά. (Jurado-Martín I et al., 2021)

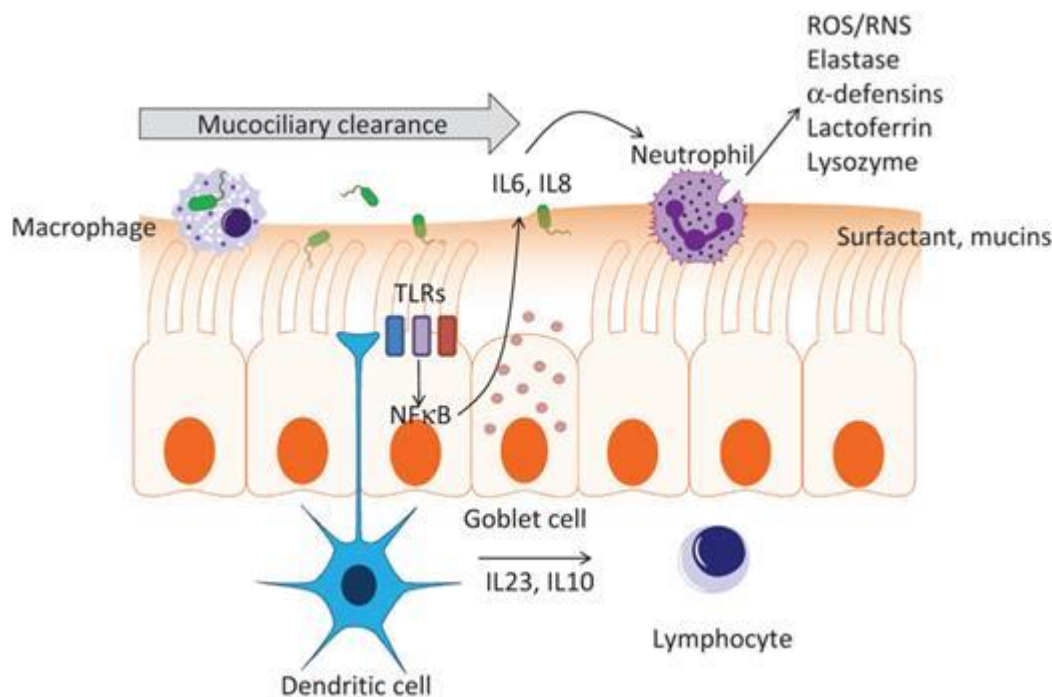
1.4 Η απάντηση του ξενιστή στην λοίμωξη του αναπνευστικού συστήματος από *Pseudomonas aeruginosa*

Η *Pseudomonas aeruginosa* με το μαστίγιο και το τύπου 4 pili μπορούν να προσδεθούν στο επιθήλιο του ξενιστή. Από την στιγμή της πρόσδεσης το σύστημα έκκρισης III θα εισάγει τοξίνες στο κύτταρο και γενικά, και άλλοι λοιμογόννοι παράγοντες θα εκκριθούν από το βακτήριο, όπως πρωτεάσες, και θα έχουν σοβαρές επιπτώσεις στα κύτταρα του ξενιστή. Όλα αυτά παρατηρούνται στην **Εικόνα 11**. (Gellatly S. L. et al., 2013)



Εικόνα 11: Επίθεση *P. aeruginosa* (Gellatly S. L. et al., 2013)

Στον αεραγωγό η πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού είναι το επιθήλιο, καθώς παίζει ρόλο στην απάντηση στην λοίμωξη μέσω της έμφυτης ανοσίας του ξενιστή. Η ανοσολογική άμυνα έχει πολλούς τύπους κυττάρων, όπως για παράδειγμα είναι τα δενδριτικά κύτταρα, τα T-κύτταρα, τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα. Τα κύτταρα αυτά πρέπει να συνεργαστούν για την εξάλειψη του βακτηρίου από τον οργανισμό. Στην **Εικόνα 12** παρουσιάζεται ένα αναλυτικό σχήμα με το επιθήλιο και την άμυνα έναντι στην *Pseudomonas aeruginosa*. Τα βακτήρια, λοιπόν, παγιδεύονται σε ένα παχύρρεστο στρώμα βλέννας και οι υποδοχείς TLRs μπορούν να αναγνωρίσουν τα λοιμογόνα τύπου 4 pili, τον λιποπολυσακχαρίτη και το μαστίγιο και έτσι, ξεκινάει η ανοσοαπόκριση μέσω του μονοπατιού σηματοδότησης NFκB. Ύστερα, μακροφάγα και ουδετερόφιλα στρατολογούνται από την ιντερλευκίνη-8 (IL-8) και σκοτώνουν το παθογόνο βακτήριο. Ταυτόχρονα, δενδριτικά κύτταρα ενεργοποιούν την προσαρμοστική ανοσία, δηλαδή B και T κύτταρα. (Gellatly S. L. et al., 2013)



Εικόνα 12: Απάντηση ξενιστή σε *P. aeruginosa* (Gellatly S. L. et al., 2013)

1.5 Θεραπεία έναντι στην *Pseudomonas aeruginosa*

Η θεραπεία έναντι σε αυτό το βακτήριο σύμφωνα με το CDC (Center for Disease Control and prevention) είναι κατά βάση με χρήση αντιβιοτικών. Αντιβιοτικό ορίζεται ως φάρμακο το οποίο καταπολεμά τις λοιμώξεις από βακτήρια σε ανθρώπους και ζώα σκοτώνοντας το βακτήριο που την προκάλεσε ή περιορίζοντας την ανάπτυξη του. (Wood S. et al., 2023, CDC, 2021) Κάθε αντιβιοτικό έχει διαφορετική στοχευμένη δράση και στον **Πίνακα 8** φαίνονται συνοπτικά κάποια από τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται έναντι στην *P. aeruginosa* και το που στοχεύουν για την εξουδετέρωση της. (Wood S. et al., 2023)

ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	ΣΤΟΧΟΣ
β-λακτάμη (β-lactam)	Μη παραγωγή πεπτιδογλυκάνης στην κυτταρική μεμβράνη
Φλοροκινολόνες (fluoroquinolones)	Αναστολή σύνθεσης DNA
Τετρακυκλίνη (tetracycline)	Αναστολή πρωτεϊνοσύνθεσης
Αμινογλυκοσίδες (aminoglycosides)	Αναστολή πρωτεϊνοσύνθεσης
Πολυμυξίνες (polymyxins)	Λιπίδιο A

Πίνακας 8: Στόχοι αντιβιοτικών θεραπειών έναντι σε *P. aeruginosa* (Wood S. et al., 2023)

1.5.1 β-λακτάμη

Η β-λακτάμη είναι ικανή να σκοτώσει τα παθογόνα βακτήρια διαταράσσοντας την πεπτιδογλυκάνη στην κυτταρική μεμβράνη μέσω σύνδεσης σε πρωτεΐνες που συνδέονται με πενικιλίνη (penicillin-binding proteins - PBPs). Υπάρχουν δυο κατηγορίες: οι μη-καρβαπενέμες και οι καρβαπενέμες. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν

τα αντιβιοτικά κεφταζιδίμη (ceftazidime) και κεφεπίμη (ceferime) και συνήθως, είναι η πρώτη θεραπεία που δίνεται για την αντιμετώπιση της *P. aeruginosa*. Ως τελευταία λύση θεωρείται η κεφιντεροκόλη (cefiderocol), ένα αντιβιοτικό που πρόσφατα πήρε έγκριση από τον FDA και ανήκει στην κατηγορία των κεφαλοσπορινών. (Wood S. et al., 2023)

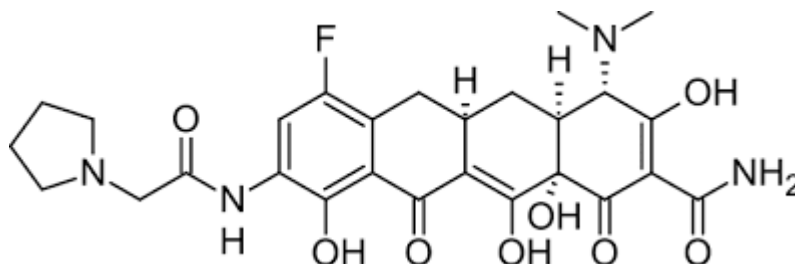
Ωστόσο, η προσέγγιση του συνδυασμού β-λακταμών θεωρείται η καλύτερη λύση ακόμα και έναντι σε MDR και XDR στελεχών *P. aeruginosa*, δηλαδή στελεχών που είναι πολύ ανθεκτικά ή υπερβολικά πολύ ανθεκτικά σε αντιβιοτικά. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι ο συνδυασμός κεφταζιδίμης/αβιμπακτάμης με ποσοστό επιτυχίας >90%. (Wood S. et al., 2023)

1.5.2 Φλοροκινολόνες

Οι φλοροκινολόνες είναι αντιβιοτικά που καταστρέφουν τα βακτήρια μέσω αναστολής της DNA γυράσης και της τοποϊσομεράσης IV, που είναι βασικά στοιχεία για την σύνθεση DNA στα βακτήρια. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν η σιπροφλοξασίνη (ciprofloxacin) και η λεβοφλοξασίνη (levofloxacin). Τα αντιβιοτικά αυτά συνιστάνται να χρησιμοποιηθούν σε λοιμώξεις ωτικές, επιδερμικές και στο ουροποιητικό σύστημα. (Wood S. et al., 2023)

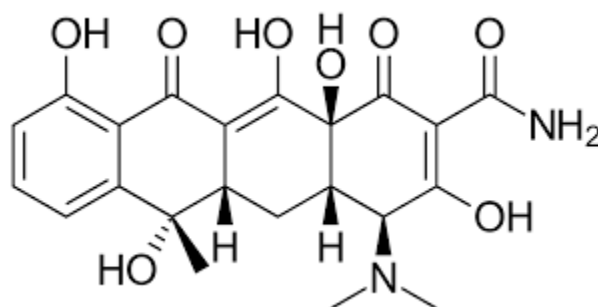
1.5.3 Τετρακυκλίνες

Η τετρακυκλίνη (**Εικόνα 13**) συνήθως δεν είναι πολύ αποτελεσματική έναντι στην *P. aeruginosa* και ίσως ενισχύσει την λοιμογόνο δράση του συστήματος έκκρισης III. Ωστόσο, η εραβακυκλίνη (eravacycline) (**Εικόνα 14**), ένα συνθετικό αντιβιοτικό που έχει αλλαγές στο τετρακυκλικό δακτύλιο D και έτσι, του επιτρέπει να αναστέλλει πιο εύκολα και αποτελεσματικά την πρωτεϊνοσύνθεση αναστέλλοντας τις ριβοσωμικές υπομονάδες 30S και 50S. (Wood S. et al., 2023)



Εικόνα 13: Χημική δομή τετρακυκλίνης

Retrieved from Wikipedia



Εικόνα 14: Χημική δομή εραβακυκλίνης (Melvin A. C., 2017)

1.5.4 Αμινογλυκοσίδες

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν αντιβιοτικά όπως η γενταμυκίνη, η αμικασίνη και η τομπραμυκίνη. Όπως και η τετρακυκλίνη, στοχεύουν την ριβοσωμική υπομονάδα 30S, αναστέλλοντας έτσι την πρωτεϊνοσύνθεση. Σε πολλές έρευνες και κλινικές δοκιμές που έχουν πραγματοποιηθεί, φαίνεται ξεκάθαρα πως τα αντιβιοτικά αυτής της κατηγορίας μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο στην καταπολέμηση λοιμώξεων αναπνευστικού και ουροποιητικού συστήματος και ακόμα και σε ασθενείς με κυστική ίνωση χωρίς, όμως, να προκληθούν σοβαρές παρενέργειες. (Wood S. et al., 2023)

1.5.5 Πολυμυξίνες

Η τελευταία κατηγορία που είναι και η τελευταία γραμμή θεραπείας αντιβιοτικών είναι οι πολυμυξίνες (κολιστίνη, πολυμυξίνη Β). Οι πολυμυξίνες σκοτώνουν την *P. aeruginosa* στοχεύοντας το λιπίδιο Α του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) και έτσι καταστρέφεται η μεμβράνη των κυττάρων της. Η χρήση τους έχει συσχετιστεί με πολλές και σοβαρές παρενέργειες, όπως νεφροτοξικότητα και νευροτοξικότητα, γι' αυτό και δεν προτιμάται. (Wood S. et al., 2023)

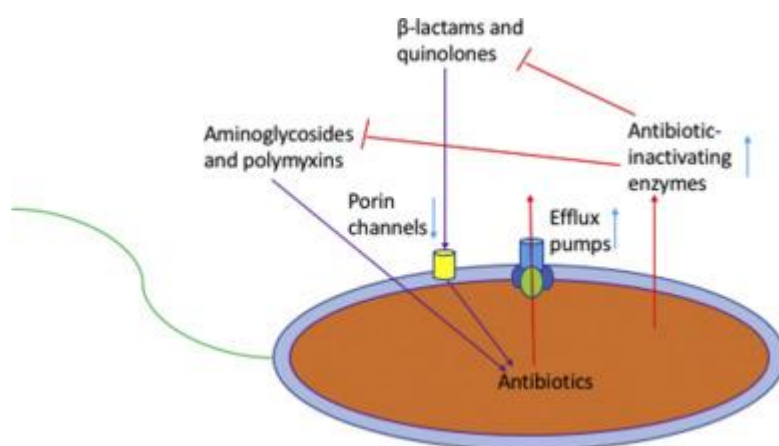
1.6 Αντοχή της *Pseudomonas aeruginosa* στα αντιβιοτικά

Γενικά, η αντοχή στα αντιβιοτικά συμβαίνει όταν τα βακτήρια προσπαθούν να αποφύγουν την δράση τους μέσω διάφορων μηχανισμών. Κάποια βακτήρια εξουδετερώνουν το αντιβιοτικό αλλάζοντας κάποιο στοιχείο τους ή αποβάλλοντας το από το κύτταρο. Υπάρχουν 2 κατηγορίες αντοχής στα αντιβιοτικά: η ενδογενής αντοχή και η επίκτητη αντοχή που προκαλείται λόγω γενετικής αλλαγής (μετάλλαξης) ή μεταφοράς DNA. Η ενδογενής αντοχή υπάρχει λόγω εξέλιξης και δρα αλλάζοντας την δομή του αντιβιοτικού. (Habboush Y. et al., 2023)

Σύμφωνα με τον CDC, σε έρευνα του 2015 στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, κάθε χρόνο υπήρχαν περίπου 50.000 λοιμώξεις σε νοσοκομειακά ιδρύματα από *P. aeruginosa* και εξ αυτών περίπου 6.000 αφορούσαν MDR (Multi-Drug Resistant) στελέχη της και περίπου 400 άτομα έχαναν την ζωή τους από αυτό. (Ventola CL., 2015, CDC, 2022) Η *P. aeruginosa* είναι πλέον εξαιρετικά δύσκολη στο να καταπολεμηθεί με αντιβιοτικά λόγω της ενδογενούς αντοχής που διαθέτει, καθώς και της επίκτητης αντοχής σε αντιβιοτικά. (Gellatly S. L. et al., 2013)

1.6.1 Ενδογενής αντοχή στα αντιβιοτικά

Το είδος αυτό αφορά στην ικανότητα του βακτηρίου να μειώνει έως και εξαλείφει την δράση των αντιβιοτικών μέσω έμφυτων χαρακτηριστικών. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της αδιαπερατότητας της μεμβράνης, των συστημάτων-αντλιών που εκκρίνουν τα αντιβιοτικά από το κύτταρο και της παραγωγής ενζύμων απενεργοποίησης αντιβιοτικών (β-λακταμάσες). Στην **Εικόνα 15** παρατηρείται συνοπτικά αυτός ο ενδογενής μηχανισμός αντοχής στα αντιβιοτικά. (Pang Z. et al., 2019)



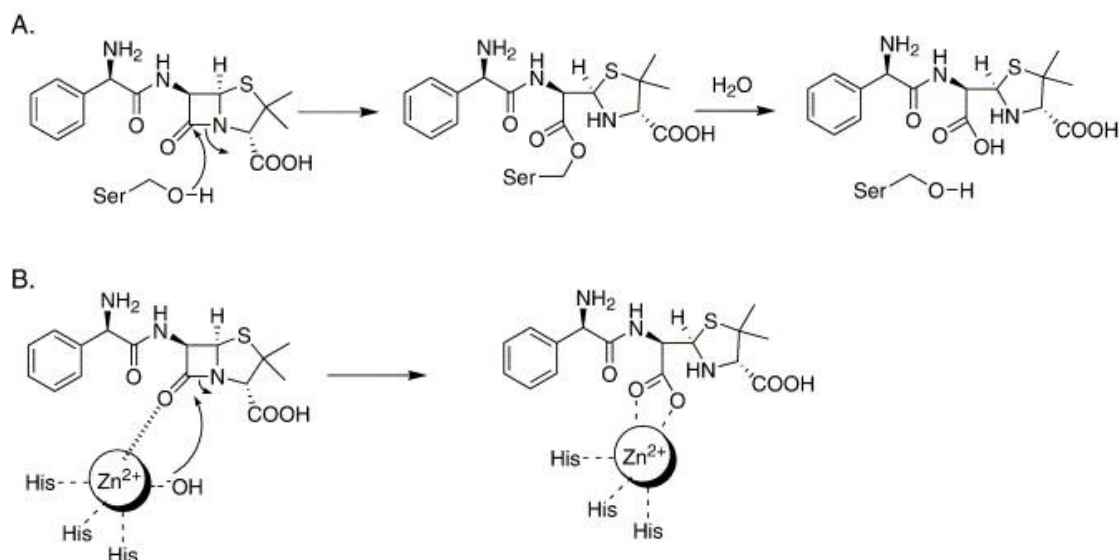
Εικόνα 15: Ενδογενής μηχανισμός αντιβιοαντοχής της *P. aeruginosa* (Pang Z. et al., 2019)

Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 15**, τα περισσότερα αντιβιοτικά πρέπει να διαπεράσουν την μεμβράνη για να φτάσουν στους ενδοκυτταρικούς στόχους τους, όπως για παράδειγμα είναι η αμικασίνη –ανήκει στις αμινογλυκοσίδες- που σταματά την πρωτεϊνوسύνθεση αφού προσδένεται με την ριβοσωμική υπομονάδα 30S. Άλλα αντιβιοτικά είναι οι β-λακτάμες και οι κινολόνες που εισέρχονται στο κύτταρο μέσω πορινών, ενώ οι πολυμυξίνες και οι αμινογλυκοσίδες εκμεταλλεύονται τον λιποπολυσακχαρίτη LPS και έτσι, εισέρχονται στο κύτταρο. Η *P. aeruginosa* έχει πολλές πορίνες (OprB, OprD, OprP, OprH) που έχουν ρόλο διαμεσολαβητή για τα αντιβιοτικά. Η OprD είναι μια από τις σημαντικότερες, καθώς έχει σημεία πρόσδεσης για καρβαπενέμες -είδος β-λακταμών- και απουσία της, αυξάνεται η αντοχή για το είδος αντιβιοτικών αυτών. Ένα άλλο παράδειγμα είναι η OprH, η οποία όταν υπερεκφράζεται όταν υπάρχει έλλειμμα μαγνησίου (Mg^{2+}) και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη αντοχή στην πολυμυξίνη B και την γενταμικίνη. (Pang Z. et al., 2019)

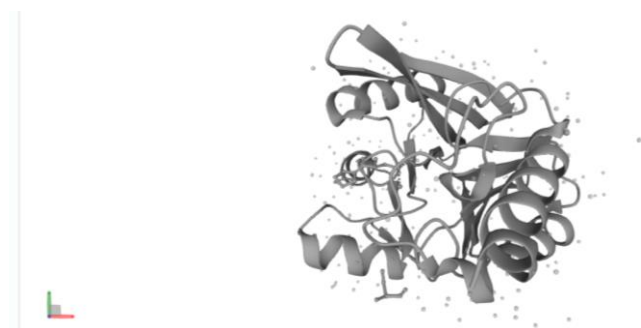
Στην ενδογενή αντοχή σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν, επίσης, και οι αντλίες εκροής ουσιών που στην ουσία, είναι μεμβρανικοί μεταφορείς (Mex-multidrug efflux) ή/και κανάλια πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης (Opr) και υπάρχουν διάφορες οικογένειες. Για παράδειγμα, η MexAB-OprM είναι υπεύθυνη για την έκκριση των β-λακταμών και κινολονών. Έχει βρεθεί ότι υπερέκφραση κάποιων τέτοιων οικογενειών οδηγεί σε αντιβιοαντοχή. (Pang Z. et al., 2019)

Τέλος, το κύτταρο είναι ικανό να παράγει ένζυμα που απενεργοποιούν τα αντιβιοτικά, καταστρέφοντας τα ή τροποποιώντας τα. Τέτοια ένζυμα είναι οι β-λακταμάσες και τα αμινογλυκοσιδικά-τροποποιητικά ένζυμα, τα οποία υδρολύουν αμίνες ή εστέρες. Η β-λακταμάση κωδικοποιείται από το γονίδιο *ampC* και σπάει τον αμιδικό δεσμό του δακτυλίου των β-λακταμών. Οι β-λακταμάσες κατηγοριοποιούνται με βάση την αμινοξική αλληλουχία σε β-λακταμάσες σερίνης -δηλαδή γίνεται η υδρόλυση σε σερίνη- και μεταλλο-β-λακταμάσες -που απαιτούν ψευδάργυρο (Zn) για την διάσπαση- και οι 2 αυτές κατηγορίες είναι οι πιο δυναμικές, καταστρέφοντας ολοκληρωτικά τους στόχους τους. Στην **Εικόνα 16** φαίνονται οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται από τις 2 αυτές κατηγορίες, ενώ στην **Εικόνα 17** φαίνεται η κρυσταλλική δομή μιας μέταλλο-β-λακταμάσης. (Pang Z. et al., 2019, Wright G. D. et al., 2005) Οι β-

λακταμάσες, λοιπόν, έχει βρεθεί ότι αναστέλλουν κεφαλοσπορίνες, πενικιλίνη και αζτρεονάμη και ταξινομούνται επίσης, σε κεφαλοσπορινάσες, πενικιλινάσες, ESBL (Extended Spectrum Beta Lactamases) και καρβαπενεμάσες (με αυξανόμενη σειρά δυναμικής). Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί αντιβιοτικά που καταστέλλουν την δράση των β-λακταμασών και αυτά είναι η σουλβακτάμη και το κλαβουλανικό και χρησιμοποιούνται πάντα σε συνδυασμό. (Pang Z. et al., 2019)



Εικόνα 16: Αντιδράσεις που καταλύουν οι β-λακταμάσες (Wright G. D. et al., 2005)



Εικόνα 17: Κρυσταλλική δομή μέταλλο-β-λακταμάσης (Uniprot)

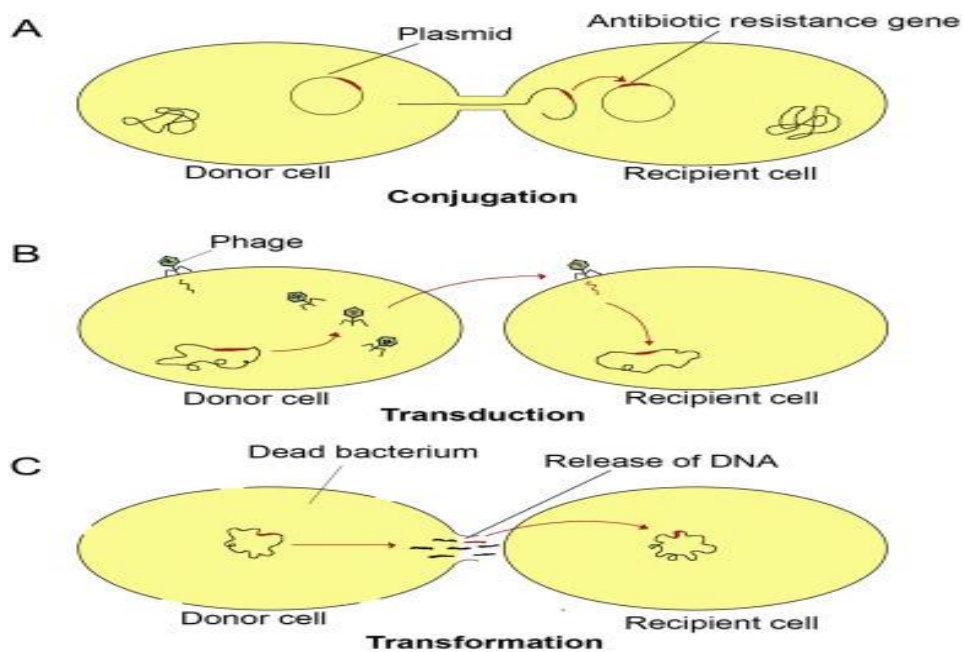
1.6.2 Επίκτητη αντοχή στα αντιβιοτικά

Αυτή λαμβάνεται μέσω μεταλλαγών ή απόκτηση γονιδίων ανθεκτικότητας μέσω οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς. Η επίκτητη αντοχή είναι αυτή που εν τέλει θα βοηθήσει στην ανάπτυξη των MDR στελεχών, κάνοντας, έτσι, το έργο εξάλειψης του μικροοργανισμού και της λοίμωξης που προκαλεί, εξαιρετικά δύσκολο. (Pang Z. et al., 2019)

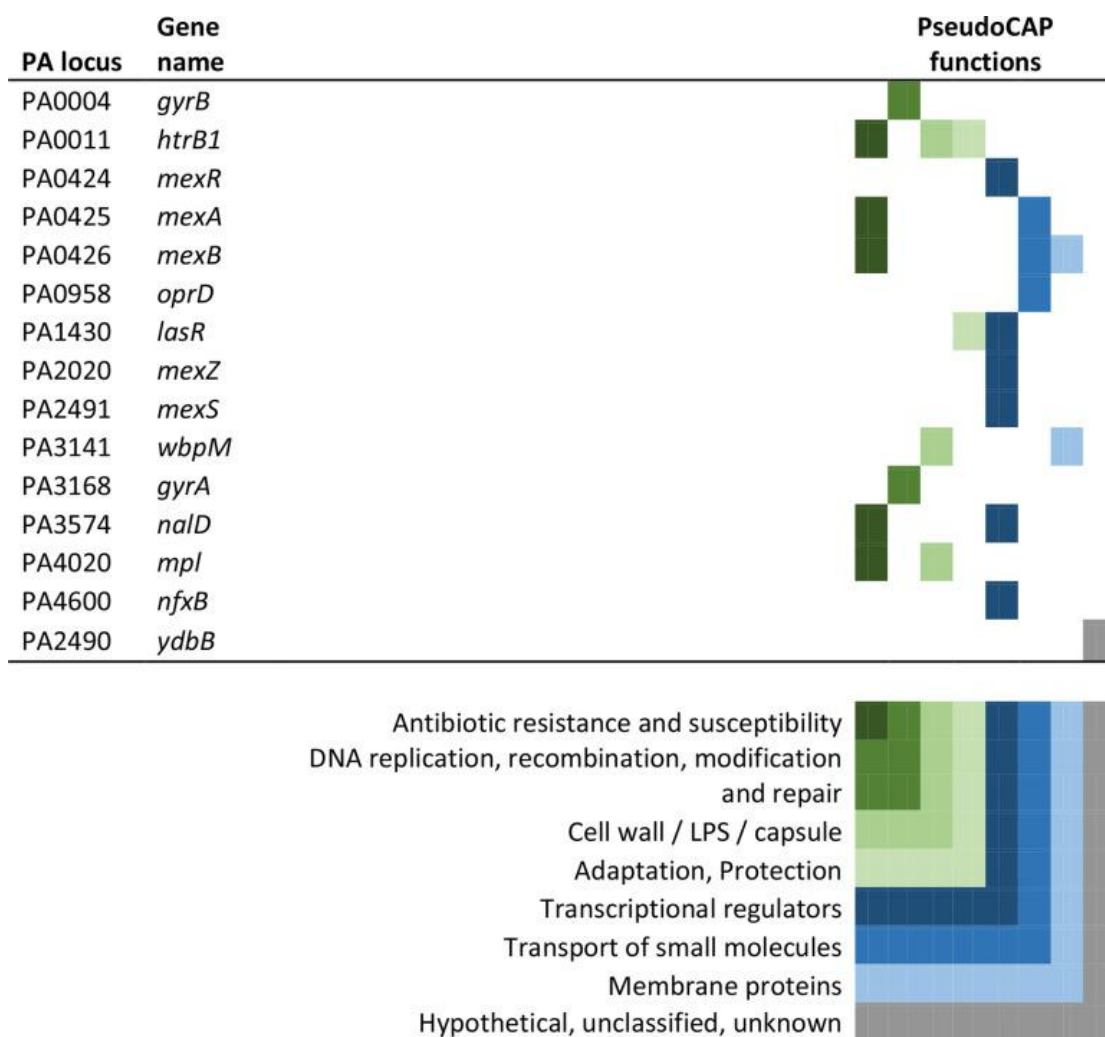
Οι μεταλλάξεις μπορούν να μειώσουν την πρόσληψη αντιβιοτικών, να τροποποιήσουν τους στόχους των αντιβιοτικών και να υπερεκφράσουν αντλίες εκροής ή ένζυμα απενεργοποίησης αντιβιοτικών. Τυχαίες μεταλλάξεις σε πορίνες, οι οποίες ουσιαστικά είναι αυτές που επιτρέπουν να διαπεράσουν τα αντιβιοτικά από την μεμβράνη, μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση και την λειτουργία τους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να

μειωθεί η αδιαπερατότητα της μεμβράνης και έτσι, να αυξηθεί η αντοχή στα αντιβιοτικά. Πολλές έρευνες την τελευταία εικοσαετία έχουν δείξει ότι μεταλλάξεις σε γονίδια πορινών και αντλιών εκροής επιφέρουν σημαντικές αλλαγές στα αντίστοιχα ένζυμα και πρωτεΐνες που έχουν ως τελικό αποτέλεσμα την απόκτηση αντοχής σε αντίστοιχα αντιβιοτικά. Ένα ακόμη παράδειγμα αποτελεί οι μεταλλάξεις στο σημείο πρόσδεσης των κινολονών, οι οποίες αναστέλλουν την βακτηριακή αντιγραφή DNA στοχεύοντας την τοποϊσομεράση IV και την DNA γυράση. Οι μεταλλάξεις αυτές πραγματοποιούνται στα γονίδια των ενζύμων αυτών (gyrA,gyrB-DNA γυράση, parC,parE- τοποϊσομεράση IV) και προκαλούν μείωση της συγγένειας στην πρόσδεση και έτσι, υψηλή αντοχή στις κινολόνες. Τέλος, έχουν παρατηρηθεί και χαρακτηριστεί μεταλλάξεις που υπερεκφράζουν ένζυμα που απενεργοποιούν αντιβιοτικά, και πιο συγκεκριμένα, β-λακταμάσες. Στην περίπτωση αυτή, η μετάλλαξη πραγματοποιείται στο γονίδιο ampC, οδηγώντας στην υπερπαραγωγή β-λακταμασών και έτσι, σε ισχυρή αντοχή σε κεφαλοσπορίνες. (Pang Z. et al., 2019)

Η δεύτερη περίπτωση απόκτησης αντιβιοαντοχής είναι η απόκτηση γονιδίων ανθεκτικότητας. Αυτά μεταφέρονται μέσω πλασμιδίων, τρανσποζονίων, ιντεγκρονίων και προφάγων και μεταφέρονται από το ένα βακτήριο στο άλλο μέσω οριζόντιας μεταφοράς. (Pang Z. et al., 2019) Τα τρανσποζόνια είναι αλληλουχίες DNA που μπορούν να μεταφέρονται από μια περιοχή του γονιδιώματος σε μια άλλη. (W.S. Reznikoff et al., 2009) Τα ιντεγκρόνια είναι διμερή, τα οποία η πρώτη περιοχή αποτελείται από γονίδιο που κωδικοποιεί μικροδορυφόρο (SSR-Simple Sequence Repeats) με περιοχή-στόχο για ανασυνδυασμό (attI) και η δεύτερη περιοχή αποτελείται από DNA (γονιδιακή κασέτα) που σχετίζεται επίσης με περιοχή ανασυνδυασμού (attC). Ο ανασυνδυασμός των δυο αυτών περιοχών βοηθάει στην απόκτηση αντοχής σε αντιβιοτικά. (Pang Z. et al., 2019, Warren D. et al., 2013) Προφάγοι είναι στην ουσία μια κατηγορία βακτηριοφάγων. (Sausseureau E. et al., 2012) Ο μηχανισμός οριζόντιας μεταφοράς εμπεριέχει την σύζευξη, μεταγωγή και μετασχηματισμό, κάτι το οποίο παρατηρείται στην **Εικόνα 18**. Η σύζευξη είναι η διαδικασία μεταφοράς DNA απευθείας μέσω φυσικής επαφής των δυο κυττάρων, στην διαδικασία της μεταγωγής η μεταφορά γίνεται μέσω βακτηριοφάγων, ενώ κατά τον μετασχηματισμό τα βακτήρια λαμβάνουν τμήματα DNA από το περιβάλλον και τα ενσωματώνουν στο γονιδίωμα τους. (Pang Z. et al., 2019) Για παράδειγμα, έχουν αναφερθεί γονίδια ανθεκτικότητας σε αμινογλυκοσίδες και β-λακτάμες και πιο συγκεκριμένα, σε γονίδια για μέταλλο-β-λακταμάσες (NDM, VIM) που μεταφέρονταν από ιντεγκρόνια ή πλασμίδια. Γονίδια ανθεκτικότητας αμινογλυκοσίδων είναι τα aacA29a και aacA29b, τα οποία βρίσκονται σε γονιδιακή κασέτα β-λακταμάσης. (Pang Z. et al., 2019, Poirel L. et al., 2001)



Εικόνα 18: Τρόποι οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων (Pang Z. et al., 2019)



Εικόνα 19: Γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά και αντιστοίχιση με τρόπο ή περιοχή δράσης (Sommer LM et al., 2020)

Στην **Εικόνα 19** παρατηρούνται 15 γονίδια με αντοχή σε αντιβιοτικά και επιλέχθηκαν διότι έχουν βρεθεί σε αεραγωγούς με ασθενείς με κυστική ίνωση. Έχει γίνει και αντιστοίχιση του κάθε γονιδίου με την περιοχή ή τον τρόπο δράσης τους.

Στον **Πίνακα 9** φαίνονται συνοπτικά κάποια παραδείγματα αντιβιοαντοχής της *P. aeruginosa*. (Gellatly S. L. et al., 2013)

Μηχανισμός	Είδος αντοχής	Παράδειγμα
Αντλίες έκκρισης	Ενδογενής	MexAB-OprM (κεφαλοσπορίνες)
Αδιαπερατότητα εξωτερικής μεμβράνης	Ενδογενής	OprF, OprD (καρβαπενέμες, αμινογλυκοσίδες)
β-λακταμάσες	Ενδογενής	AmpC (πενικιλίνη)
Μετάλλαξη	Επίκτητη	DNA γυράση, DNA τοποϊσομεράση (κινολόνες)
Οριζόντια μεταφορά	Επίκτητη	Μέταλλο-β-λακταμάσες (πενικιλίνη, κεφαλοσπορίνες)

Πίνακας 9: Παραδείγματα αντιβιοαντοχής της *P. aeruginosa* (Gellatly S. L. et al., 2013)

1.7 Εναλλακτικές θεραπείες έναντι στην *Pseudomonas aeruginosa*

Όπως προαναφέρθηκε, η αλόγιστη και κακή χρήση των αντιβιοτικών έναντι σε αυτόν τον παθογόνο μικροοργανισμό οδήγησε στην εμφάνιση αντιβιοαντοχής του σε αυτά και έτσι στην ανάπτυξη και δοκιμή νέων θεραπευτικών στρατηγικών. Κάποιες από αυτές είναι αναστολή του συστήματος QS, χήλωση σιδήρου, θεραπεία με φάγο, εμβόλιο, αντιμικροβιακά πεπτίδια και νανοσωματίδια. Παρακάτω κάποια από αυτά θα αναλυθούν. (Pang Z. et al., 2019)

1.7.1 Αναστολή συστήματος QS

Όπως προαναφέρθηκε, το σύστημα QS είναι μηχανισμός που ελέγχει την γονιδιακή έκφραση και πιο συγκεκριμένα, στην *P. aeruginosa* ρυθμίζει τους λοιμογόνους παράγοντες και τον σχηματισμό του βιοφίλμ. Η αναστολή του συστήματος αυτού, λοιπόν, θα έχει ως αποτέλεσμα την μείωση παραγωγής βιοφίλμ, την μείωση κινδύνου λοίμωξης και την εμφάνιση αντοχής σε αντιβιοτικά. Αναστολείς του συστήματος θεωρούνται πως είναι η καροτενοειδής ζεαξανθίνη (carotenoid zeaxanthin), η οποία προσδένεται στους υποδοχείς σήματος του συστήματος QS, δηλαδή στους LasR και RhlR και έτσι, αποτρέπει την έκκριση των παραγόντων lasB και rhlA. Κάτι παρόμοιο έχει βρεθεί ότι συμβαίνει και με τα φλαβονοειδή. (Pang Z. et al., 2019, Reuter et al., 2016)

1.7.2 Χήλωση σιδήρου

Ο σίδηρος είναι από τα πιο σημαντικά στοιχεία για τα βακτήρια και παίζει ρόλο στην παραγωγή ενέργειας και στην αντιγραφή του DNA. Σε ασθενείς με κυστική ίνωση και λοίμωξη από *P. aeruginosa*, βρέθηκαν υψηλά επίπεδα σιδήρου υποδεικνύοντας έτσι ότι έχει κάποιο ρόλο στην λοίμωξη. Για τον λόγο αυτό, αναπτύχθηκε μια νέα στρατηγική για τον περιορισμό του σιδήρου από το βακτήριο. Πιο συγκεκριμένα, οι χηλικοί παράγοντες για τον σίδηρο, όπως το EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) (Pang Z. et al., 2019, Chitambar C.R., 2010, George T. et al., 2022) και το DTPA (2,2-dipyridyl-diethylenetriaminepentacetic acid), εξασθένησαν την ανάπτυξη του βακτηρίου και τον σχηματισμό βιοφίλμ. Επίσης, ένας άλλος τέτοιος παράγοντας είναι το γάλλιο, αλλά το στοιχείο αυτό έχει και πολλές παρενέργειες, όπως ανοσοκαταστολή. (Pang Z. et al., 2019, Chitambar C.R., 2010)

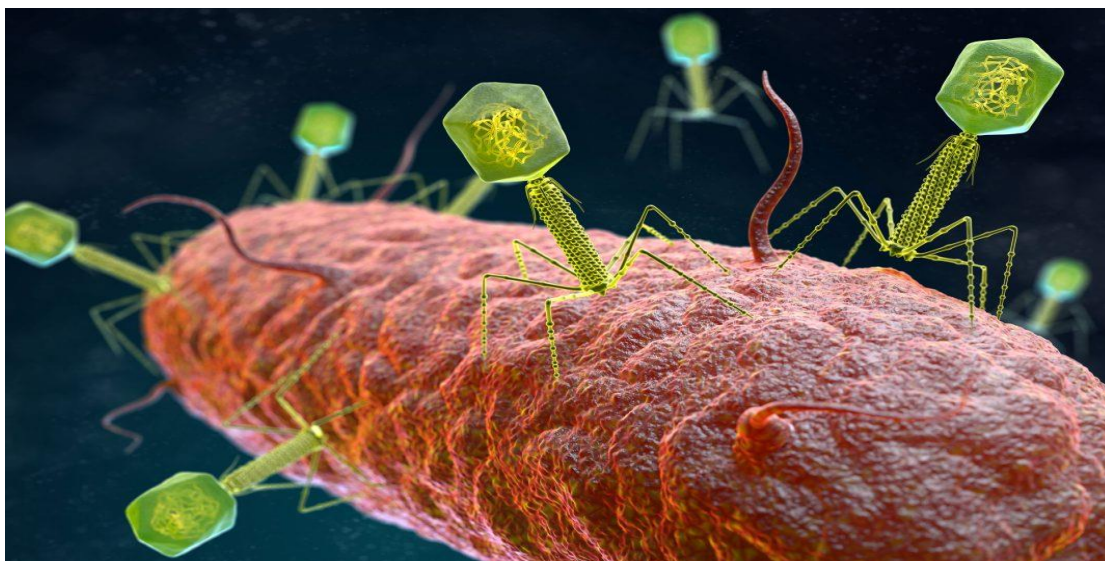
1.7.3 Θεραπεία με φάγο

Αρχικά, φάγοι (βακτηριοφάγοι) ορίζονται ως ιοί που σκοτώνουν βακτήρια προκαλώντας τους λύση. Μέχρι το 2015 έχουν χαρακτηριστεί 137 διαφορετικοί φάγοι που δρουν ενάντια στην *P. aeruginosa* αντί των αντιβιοτικών. (Pang Z. et al., 2019, Aislinn D. R.-N. et al., 2023)

Η χρήση φάγων έχουν πολλά πλεονεκτήματα με το σημαντικότερο να είναι η δραστηριότητα τους έναντι στα ισχυρά βιοφίλμ του βακτηρίου αυτού. Πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι η χρήση συγκεκριμένων φάγων σε συστήματα και υλικά νοσοκομείων -όπου παρατηρούνται πολλές επιμολύνσεις- έχουν καταφέρει να τα «καθαρίσουν» από τα βιοφίλμ της *P. aeruginosa* ασχέτως της σοβαρότητας της λοίμωξης ή της αντιβιοαντοχής. (Pang Z. et al., 2019)

Υπάρχει, ακόμη, και ένας άλλος τρόπος εκμετάλλευσης των βακτηριοφάγων, ο οποίος είναι η γενετική τροποποίηση τους και η χρήση τους ως «οχήματα» για μεταφορά αντιμικροβιακών παραγόντων. Στην περίπτωση αυτή, οι παράγοντες αυτοί θα εκκριθούν από τους φάγους στο βακτήριο και θα προκαλέσουν λύση του και άρα θάνατο. (Pang Z. et al., 2019)

Υπάρχει, βέβαια, ένα μεγάλο μειονέκτημα, το οποίο αφορά την βακτηριακή αντοχή στους φάγους, κάτι το οποίο πραγματοποιείται με πολλούς τρόπους. Κάποιοι από αυτούς είναι η αναστολή της πρόσδεσης του φάγου στους βακτηριακούς υποδοχείς, η αποτροπή της εισόδου του DNA του στο βακτήριο και η καταστροφή του φάγου από το σύστημα CRISPR/Cas. Η *P. aeruginosa* είναι ένα βακτήριο το οποίο χρησιμοποιεί τα πρώτα δυο συστήματα που αναφέρθηκαν ως άμυνα σε φάγους και το τελευταίο ως σύστημα αντεπίθεσης. (Pang Z. et al., 2019)



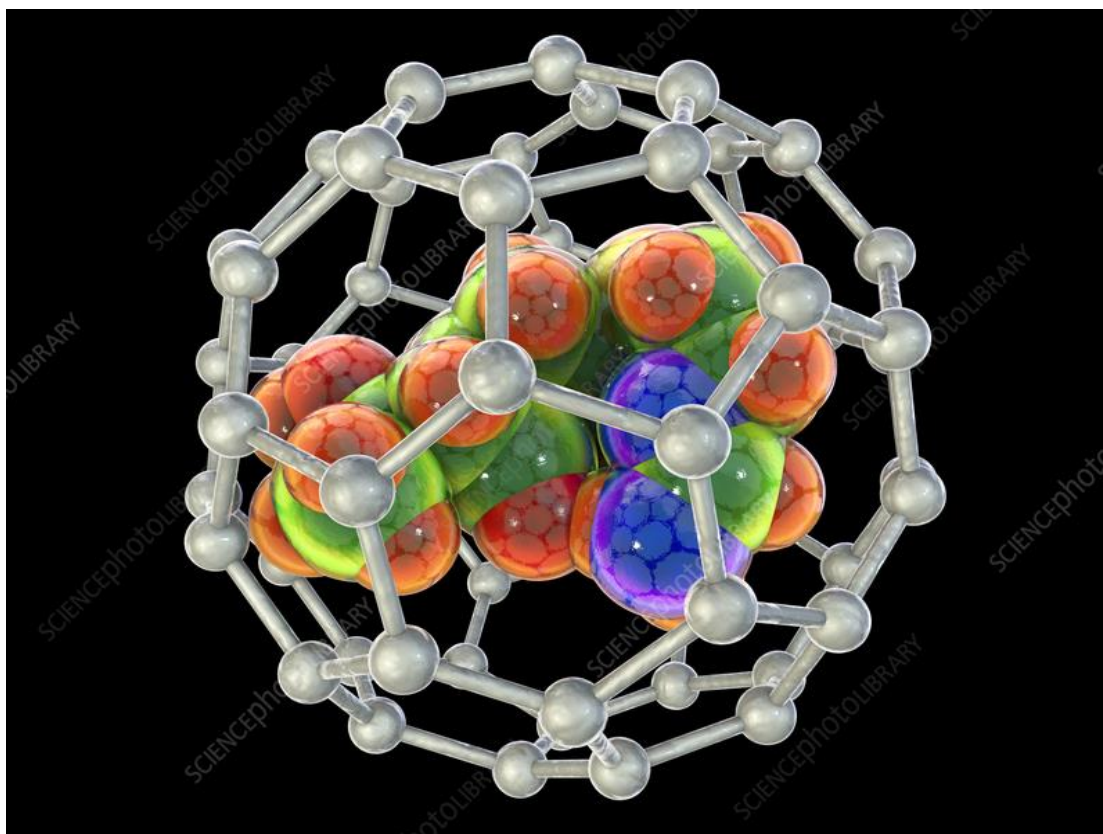
Εικόνα 20: Δράση φάγου έναντι σε *P. aeruginosa* (Vuksanaj K., 2022)

1.7.4 Εμβόλιο

Όπως γενικά με όλα τα εμβόλια, έτσι και στην περίπτωση αυτή, ένα εμβόλιο θα έχει την στρατηγική και τον ρόλο του να προλάβει λοιμώξεις. Το θετικό σε αυτήν την περίπτωση είναι ότι τα αντιγόνα του βακτηρίου αυτού που είναι υπεύθυνα για την λοίμωξη, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανές ανοσολογικές αποκρίσεις και κάποια από αυτά είναι οι πρωτεΐνες εξωτερικής μεμβράνης, οι πρωτεΐνες του συστήματος έκκρισης τύπου III και του μαστιγίου. Έχουν δημιουργηθεί τέτοιου είδους εμβόλια, αλλά μόνο αυτά που καταπολεμούσαν τις πρωτεΐνες εξωτερικής μεμβράνης και το μαστίγιο έχουν προχωρήσει σε κλινικές δοκιμές, έχοντας όμως χαμηλή αποτελεσματικότητα. (Pang Z. et al., 2019)

1.7.5 Νανοσωματίδια

Τα νανοσωματίδια είναι μικρά σωματίδια τα οποία έχουν αντιμικροβιακή δράση και δρουν έναντι σε βακτηριακές μεμβράνες, στην αναστολή δημιουργίας βιοφίλμ καθώς επίσης και μπορούν να μεταφέρουν αντιβιοτικές ουσίες. Στην ουσία, εντός του νανοσωματιδίου προστίθενται αντιβιοτικές ουσίες και από την στιγμή της κατανάλωσης από τον οργανισμό-ξενιστή, το νανοσωματίδιο θα διαπεράσει το βιοφίλμ και έπειτα, θα δράσει η αντιβιοτική ουσία. Η στρατηγική αυτή ονομάζεται αλλιώς «Δούρειος Ίππος». (Pang Z. et al., 2019) Αυτό έχει δειχθεί in vitro το 2012 με νανοσωματίδια που εμπεριείχαν αμπικιλίνη και χορηγήθηκαν σε στελέχη *P. aeruginosa* με αντοχή στην αμπικιλίνη και τα αποτελέσματα ήταν ευεργετικά, καθώς υπήρξε μεγάλο ποσοστό θανάτου του βακτηρίου. (Pang Z. et al., 2019, Brown A. N. et al., 2012) Παρ' ολ' αυτά, η στρατηγική αυτή ελλοχεύει πολλούς κινδύνους και παρενέργειες, όπως για παράδειγμα καρδιακά προβλήματα. (Pang Z. et al., 2019)



Εικόνα 21: Νανοσωματίδιο (Kon K., *Science Photo Library*)

Στον **Πίνακα 10** φαίνονται κάποιες από αυτές τις στρατηγικές με τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματά τους. (Pang Z. et al., 2019)

ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ	ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ	ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ
Αναστολή συστήματος QS	Μείωση παραγωγής βιοφίλμ, μείωση κινδύνου για εμφάνιση αντιβιοαντοχής	Μικρό εύρος χρήσης, ανεπιθύμητες επιδράσεις στα «καλά» βακτήρια
Χήλωση σιδήρου	Εγκεκριμένο από τον FDA, εύκολη χορήγηση	Τοξικότητα
Θεραπεία με φάγο	Υψηλή ειδικότητα στα στοχευμένα βακτήρια, εύκολη χορήγηση	Βακτηριακή αντοχή, αστάθεια του φάγου
Εμβόλιο	Ενίσχυση ανοσίας ξενιστή, προφύλαξη από ασθένεια	Χαμηλή αποτελεσματικότητα, μη εγκεκριμένα εμβόλια
Νανοσωματίδια	Καταστροφή βιοφίλμ, μεταφορείς αντιβιοτικών	Τοξικότητα

Πίνακας 10: Εναλλακτικές θεραπείες έναντι *P. aeruginosa* με τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματά τους (Pang Z. et al., 2019)

1.8 Γιατί ψάχνουμε την *P. aeruginosa* στο νερό

Από όλα τα παραπάνω είναι πλήρως κατανοητό και αντιληπτό το πόσο επικίνδυνη μπορεί να γίνει μια μόλυνση από *P. aeruginosa*. Η παρακολούθηση και ανίχνευση της σε πηγές νερού -είτε πόσιμου είτε για άλλες χρήσεις- είναι σημαντική για την αξιολόγηση της ποιότητας του, τον εντοπισμό πιθανών κινδύνων για την δημόσια υγεία και τέλος, την εφαρμογή κατάλληλων μέτρων ελέγχου για πρόληψη και αντιμετώπιση της. Η *P. aeruginosa* ξεκινά να αποτελεί κίνδυνο για τον άνθρωπο από την στιγμή που έρθει σε επαφή με το δέρμα του ξενιστή. Οπότε, σε είναι λογικό να γίνονται διαρκώς προσπάθειες για την ανίχνευση της στο νερό (σε όλες τις πηγές που έχουν αναφερθεί).

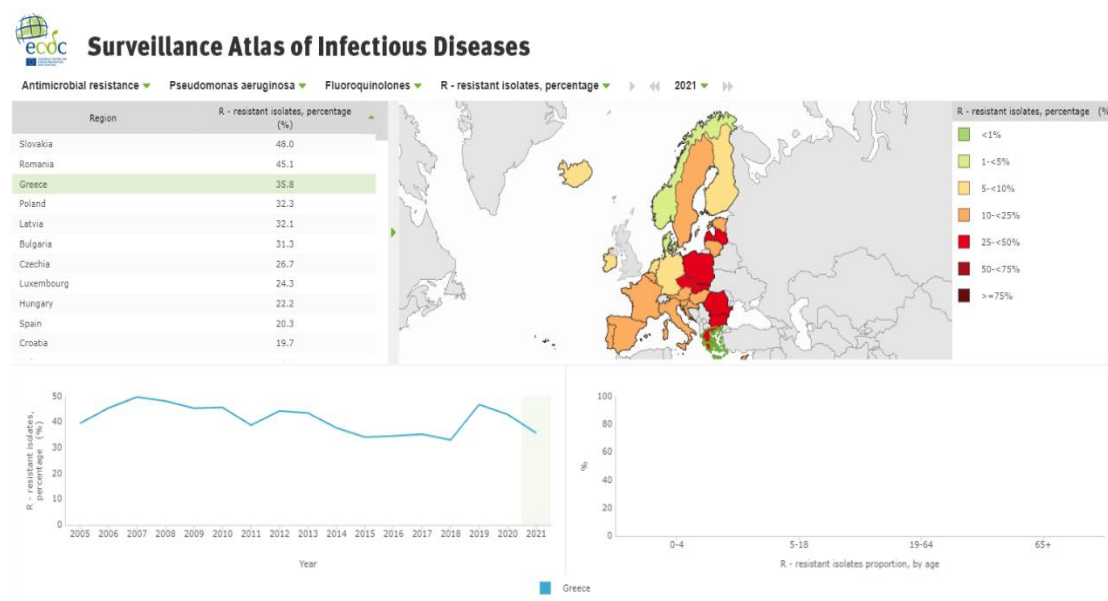
1.9 One health και ΕΟΔΥ

Ο Ε.Ο.Δ.Υ. (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας) με στόχο την επιτήρηση της μικροβιακής αντοχής έχει θεσπίσει τον δείκτη επιτήρησης μικροβιακής αντοχής, έτσι ώστε να γίνεται συνεχής καταγραφή των ποσοστών αντοχής των σημαντικότερων νοσοκομειακών παθογόνων μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά. Η αντοχή αυτή μετρίεται ως εξής:

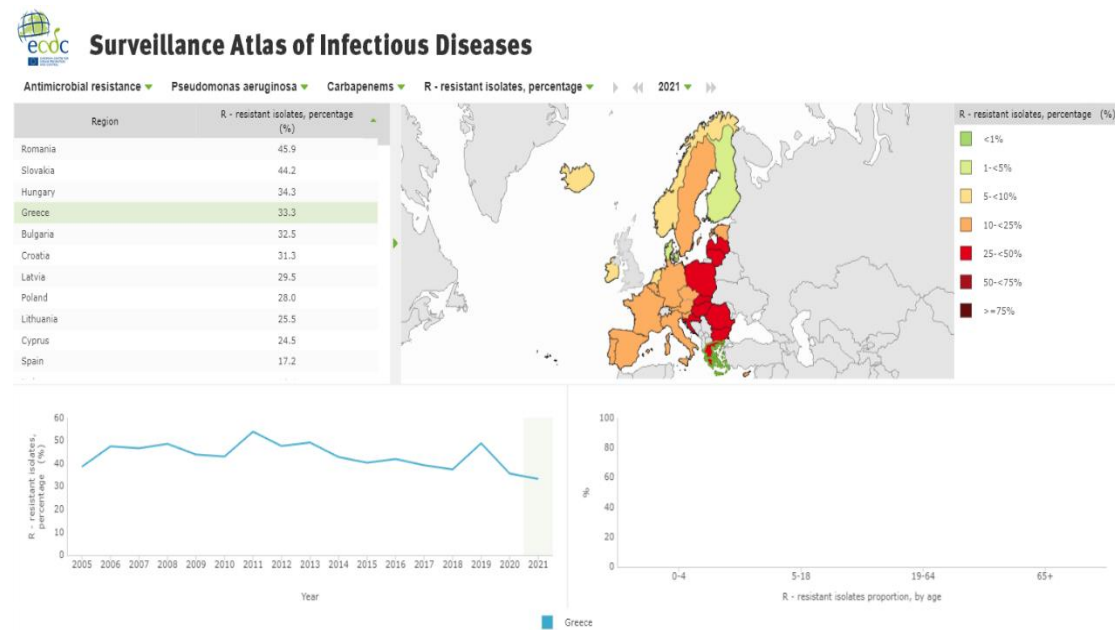
$$\text{Αντοχή μικροοργανισμού σε συγκεκριμένο μικροβιακό παράγοντα} = \frac{\text{Αριθμός μη ευαίσθητων στελεχών}}{\text{Σύνολο ελεγχθέντων στελεχών}} \times 100/\text{εξάμηνο}$$

Στον δείκτη αυτό καταγράφονται μόνο τα στελέχη που απομονώθηκαν από αιμοκαλλιέργειες νοσηλευόμενων ασθενών και το δείγμα θα πρέπει να έχει ληφθεί μετά το πρώτο 48ωρο από την εισαγωγή του ασθενούς στο νοσοκομείο.

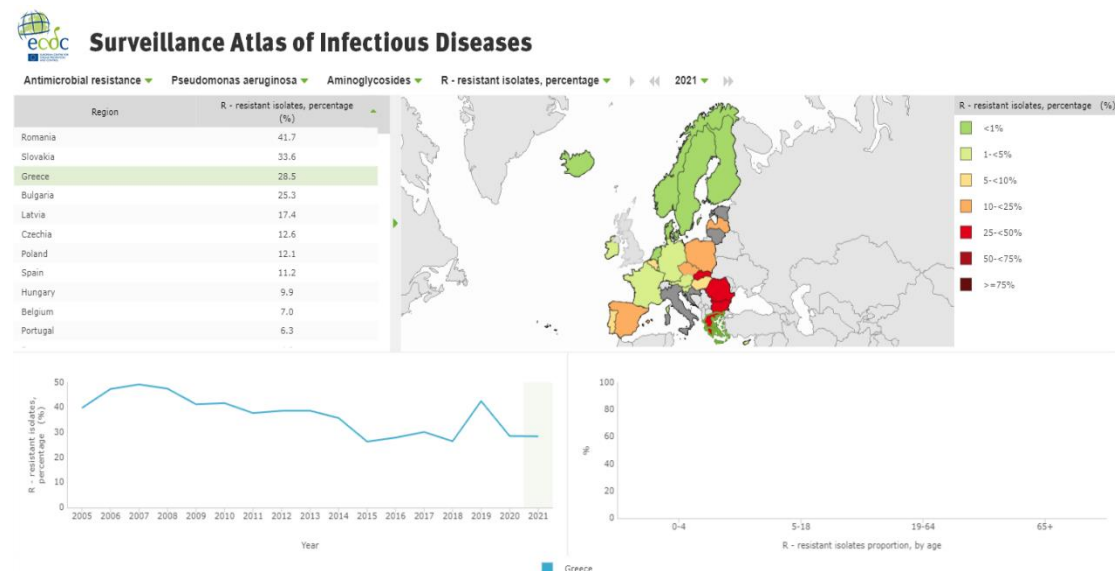
Στις **Εικόνες 22, 23, 24 και 25** παρατηρούμε τους άτλαντες που παρέχουν πληροφορίες για αντοχή της *P. aeruginosa* σε αντιβιοτικά. (Retrieved from: “Surveillance Atlas of Infectious Diseases.” [Atlas.ecdc.europa.eu](https://atlas.ecdc.europa.eu/).)



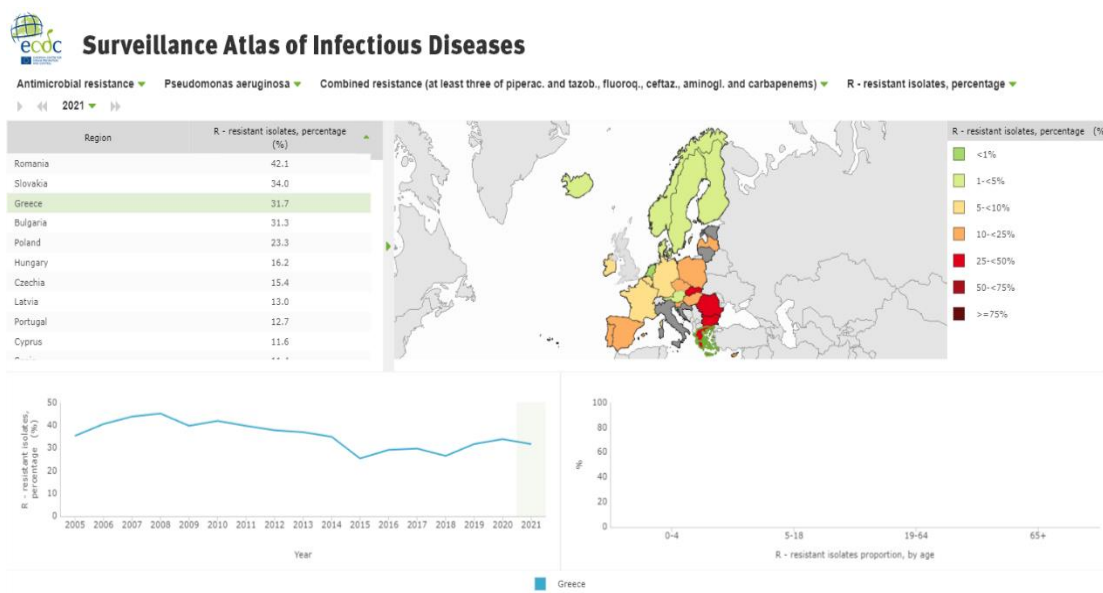
Εικόνα 22: Άτλας αντοχής *P. aeruginosa* σε φλοροκινολόνες. Η Ελλάδα βρίσκεται στην τρίτη θέση στην Ευρώπη



Εικόνα 23: Άτλας αντοχής *P. aeruginosa* σε καρβαπενέμες. Η Ελλάδα βρίσκεται στην τέταρτη θέση στην Ευρώπη



Εικόνα 24: Άτλας αντοχής *P. aeruginosa* σε αμινογλυκοσίδες. Η Ελλάδα βρίσκεται στην τρίτη θέση στην Ευρώπη



Εικόνα 25: Άτλας αντοχής *P. aeruginosa* σε συνδυαστική θεραπεία με πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη, φλοροκινολόνες, αμινογλυκοσίδες και καρβαπενέμες. Η Ελλάδα βρίσκεται στην τρίτη θέση στην Ευρώπη

Από τους άτλαντες αυτούς είναι κατανοητό πως η Ελλάδα είναι στις 3 χειρότερες χώρες όσον αφορά την αντοχή της *P. aeruginosa* στα αντιβιοτικά που προαναφέρθηκαν, γεγονός πολύ ανησυχητικό για τα επόμενα χρόνια στον τομέα της υγείας και υγιεινής και στις νοσοκομειακές μονάδες και τους ασθενείς τους ανά την χώρα που έρχονται καθημερινά αντιμέτωποι με MDR και XDR στελέχη της *P. aeruginosa*.

2. Σκοπός

Σκοπός, λοιπόν, της παρούσας εργασίας είναι η ανίχνευση και η καταγραφή στελεχών της *P. aeruginosa* που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στα περισσότερο χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά για την καταπολέμηση της. Τα στελέχη αυτά είναι απομονωμένα από τα δίκτυα ύδρευσης διαφόρων νοσοκομειακών και νοσηλειακών ιδρυμάτων στην Ελλάδα το διάστημα 2017-2022. Επίσης, θα πραγματοποιηθεί καταγραφή και των αντιβιοτικών στα οποία είναι ανθεκτικά τα στελέχη αυτά, καθώς και ανίχνευση των γονιδίων ανθεκτικότητας που ευθύνονται για την αντοχή αυτή.

3. Υλικά

3.1 Υπόστρωμα CN *Pseudomonas* agar

Χρησιμοποιήθηκε το υπόψη θρεπτικό υλικό (ThermoFisher Scientific) για την ανίχνευση της *P. aeruginosa*, το οποίο είναι εκλεκτικό για το βακτήριο αυτό. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της ουσίας σετριμίδη (cetrimide) που περιέχει, η οποία ενισχύει την ανάπτυξη της *P. aeruginosa* καταστέλλοντας ταυτόχρονα άλλα ανταγωνιστικά βακτήρια. (Thermofisher, <https://www.thermofisher.com>).

3.2 Αιματούχο τρυβλίο-υπόστρωμα

Πρόκειται για ένα κοινό θρεπτικό υλικό, το οποίο έχει γενικά ευρεία χρήση, επιτρέποντας την ανάπτυξη πολύ μεγάλου εύρους βακτηρίων. Αποτελείται από αίμα συνήθως, προβάτου, πεπτόνη, εκχύλισμα ζύμης, άγαρ, NaCl και απιονισμένο νερό. (Sagar A., 2022) Στην **Εικόνα 26** φαίνονται ένα τρυβλίο με αιματούχο άγαρ και ένα με το CN *Pseudomonas* agar.



Εικόνα 26: Αιματούχο και CN *Pseudomonas* agar υποστρώματα (Microbe Notes, 2019, IStock, 2019)

3.3 Nutrient Agar

Το θρεπτικό αυτό υλικό παρασκευάστηκε από αφυδατωμένο υλικό (Oxoid). Αποτελείται από εκχύλισμα ζύμης, πεπτόνη, NaCl και άγαρ με τελικό pH=7,4. Στο θρεπτικό αυτό αναπτύσσονται όλοι οι μικροοργανισμοί και είναι μη εκλεκτικό. (Oxoid, 2019)

3.4 Κάρτα Vitek AST-N215

Αρχικά, για τη διερεύνηση της ανθεκτικότητας των στελεχών *Pseudomonas aeruginosa*, χρησιμοποιήθηκε η κάρτα Vitek AST-N215. Αυτή περιέχει διάφορα αντιβιοτικά, αλλά χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα αντι-ψευδομοναδικά που ήταν πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη (piperacillin/tazobactam), κεφταζιδίμη (ceftazidime), ιμιπενέμη (imipenem), μεροπενέμη (meropenem), γενταμικίνη (gentamicin), τομπραμικίνη (tobramycin) και σιπροφλοξασίνη (ciprofloxacin), καθώς επίσης και η κεφαλοθίνη (cefalotin) στην οποία η *P. aeruginosa* έχει ενδογενή αντοχή. Στην **Εικόνα 27** φαίνεται μια κάρτα Vitek AST-N215.



Εικόνα 27: Κάρτα Vitek AST-N215

3.5 Κάρτα Vitek AST-N376 και XN10

Σε στελέχη που εμφάνισαν ιδιαίτερα ανθεκτικότητα στην ιμιπενέμη, χρησιμοποιήθηκαν οι κάρτες AST N376 και XN10, με τις οποίες διερευνήθηκε η ευαισθησία στα παρακάτω αντιβιοτικά: αμικασίνη (amikacin), αζτρεονάμη (aztreonam), κεφεπίμη (ceferime), κεφταζιδίμη/αβιβακτάμη (ceftazidime/avivactam), κεφτολοζάνη/ταζομπακτάμη (ceftolozane/tazobactam), κολιστίνη (colistin), φωσφομυκίνη (fosfomycin) και λεβοφλοξασίνη (levofloxacin).

Στον **Πίνακα 11** φαίνονται οι αραιώσεις των αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε κάρτα, σύμφωνα πάντα με την BioMerieux.

Κατηγορία αντιβιοτικών	Αντιβιοτικό	Συγκεντρώσεις (mg/L)
Πενικιλίνες (η πιπερακιλλίνη)	Πιπερακιλλίνη/Ταζομπακτάμη	2/4, 8/4, 24/4, 32/4, 32/8, 48/8
Καρβαπενέμες	Ιμιπενέμη	1, 2, 6, 12
	Μεροπενέμη	0.5, 2, 6, 12
Αμινογλυκοσίδες	Γενταμικίνη	4, 16, 32
	Τομπραμυκίνη	8, 16, 64
	Αμικασίνη	2, 4, 16, 48
Μονοβακτάμες	Αζτρεονάμη	2, 8, 32
Κεφαλοσπορίνες	Κεφαλοθίνη	2, 8, 32
	Κεφαζιδίμη	1, 2, 8, 32
	Κεφεπίμη	0.25, 1, 4, 16, 32
	Κεφταζιδίμη/Αβιβακτάμη	0.06/4, 0.25/4, 1/4, 4/4, 8/4
	Κεφτολοζάνη/Ταζομπακτάμη	0.5/4, 1/4, 4/4, 8/4, 32/4
Φλοροκινολόνες	Σιπροφλοξασίνη	0.5, 2, 4
	Λεβοφλοξασίνη	0.25, 0.5, 2, 8
Πολυμυξίνες	Κολιστίνη	4, 16, 32
Φωσφονικά	Φωσφομυκίνη	8, 16, 32

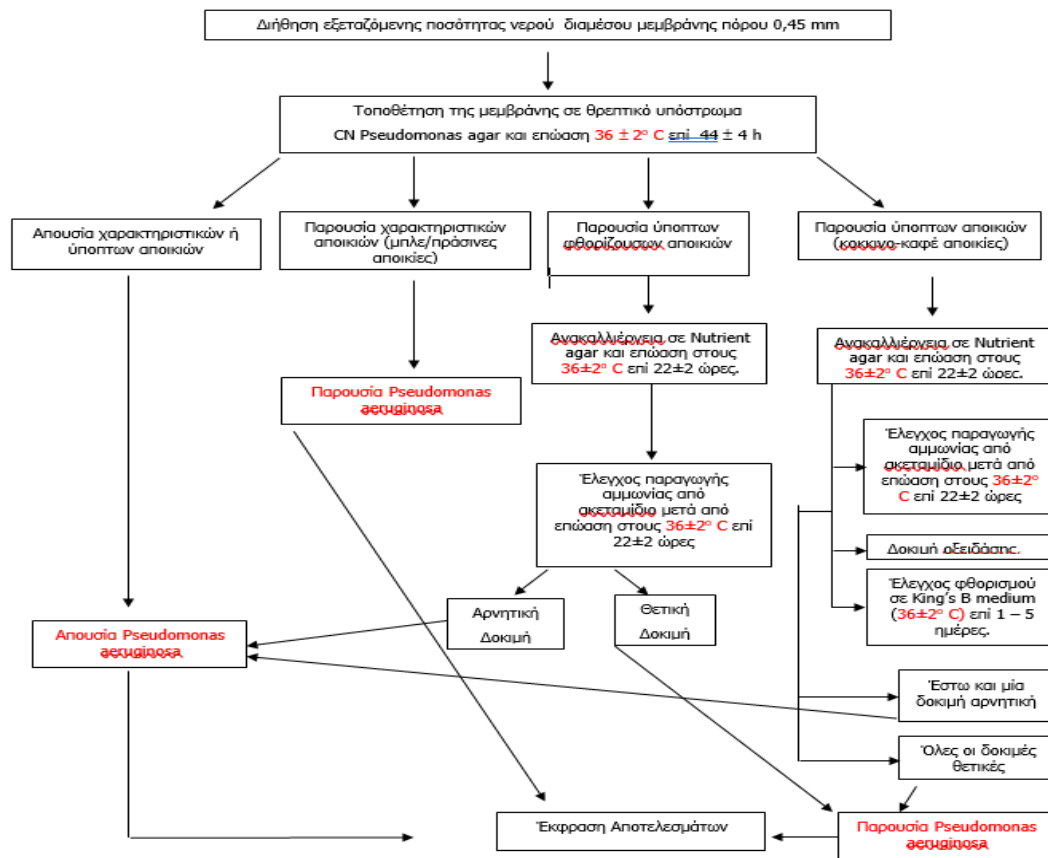
Πίνακας 11: Συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν

4. Μεθοδολογία

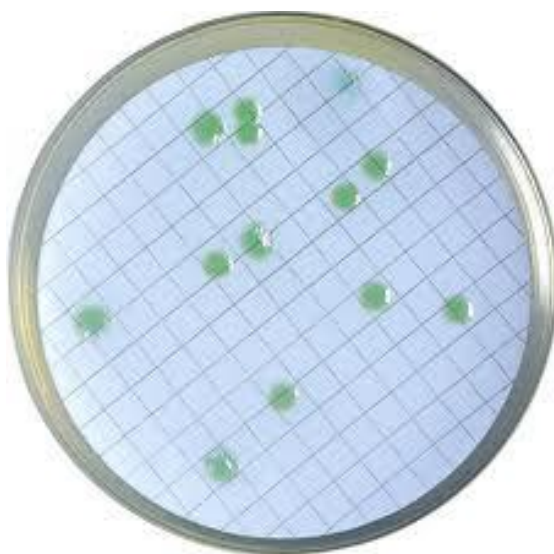
4.1 Ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της *P. aeruginosa*

Αρχικά, η πρώτη διεργασία ήταν η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση της *P. aeruginosa* σε δείγματα νερού που λήφθηκαν από δίκτυα ύδρευσης νοσοκομειακών ιδρυμάτων την πενταετία 2017-2022. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας το παραπάνω

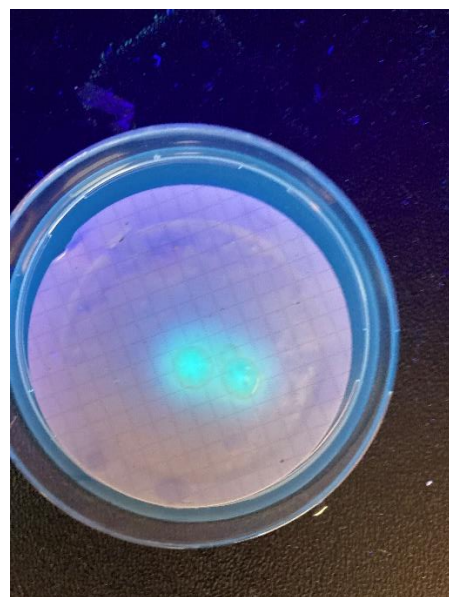
χρονικό διάστημα σύμφωνα με το διεθνές πρότυπο ISO 16266 (βλ. Νομοθεσία). Παρακάτω παρατίθεται ένα διάγραμμα ροής (flow chart):



Από το παραπάνω διάγραμμα ροής γίνεται περισσότερο αντιληπτό ότι υπάρχει πολυμορφισμός στο βακτήριο και πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν 3 κατηγορίες αποικιών για την *P. aeruginosa*. Υπάρχουν οι τυπικές μπλε-πράσινες αποικίες (**Εικόνα 28**), οι φθορίζουσες αποικίες (**Εικόνα 29**) και οι καστανέρυθρες αποικίες.



Εικόνα 28: Τυπικές μπλε-πράσινες αποικίες



Εικόνα 29: Φθορίζουσες αποικίες

4.2 Ανακαλλιέργεια στελεχών *P. aeruginosa*

Τα στελέχη *P. aeruginosa* που απομονώθηκαν, διατηρήθηκαν στην κατάψυξη στους -80°C, σε θρεπτικό ζωμό Brain Heart Infusion broth, με προσθήκη γλυκερόλης 20%..

Η κωδικοποίηση των στελεχών είναι της μορφής:

κωδικός φύλαξης/κωδικός δείγματος	828/6551
βακτήριο/μέρος απομόνωσης δείγματος	P. aer/ΔN
ημερομηνία	10-12-21

Για την αναζωογόνηση των στελεχών, ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Έγινε καλή ανάδευση με vortex και στην συνέχεια, ποσότητα μιας κρικήας ενοφθαλμίστηκε από το erppendorf σε τρυβλίο με αιματούχο άγαρ. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανακαλλιέργεια σε nutrient agar. Και στις δύο περιπτώσεις, τα τρυβλία επώαστηκαν σε κλίβανο επώασης στους 37°C για 24h.

4.3 Vitek

Στην **Εικόνα 30**, απεικονίζεται το μηχάνημα Vitek που χρησιμοποιήθηκε για τις δοκιμές ελέγχου ευαισθησίας των στελεχών *Pseudomonas aeruginosa*. Για κάθε στέλεχος παρασκευάστηκαν 2 εναιωρήματα 0,9% NaCl όγκου 3ml. Με αποστειρωμένο βαμβακοφόρο στυλεό λήφθηκε ποσότητα φρέσκιας αποικίας και διαλύθηκε πλήρως στο πρώτο εναιώρημα. Έπειτα, μετρήθηκε η θολερότητα του διαλύματος αυτού στο ειδικό θολωσίμετρο. Η θολερότητα θα έπρεπε να βρισκόταν μεταξύ 0,5-0,64 της κλίμακας Mcfarland. Εάν το αποτέλεσμα ήταν αποδεκτό, η διαδικασία συνεχίζοταν, ειδάλως, είτε γίνονταν αραίωση με 0,9% NaCl είτε προστίθονταν επιπλέον ποσότητα της ίδιας αποικίας. Στη συνέχεια ποσότητα 145μl από το πρώτο εναιώρημα ενοφθαλμίστηκε στο δεύτερο εναιώρημα με πλέον συνολικό όγκο 3,145ml. Πάντα ανάμεσα από τις αναμίξεις πραγματοποιούνταν Vortex. Τέλος, το εναιώρημα και η κάρτα Vitek με τα αντιβιοτικά εφαρμόζονταν σε κατάλληλο στατό και τοποθετούνταν στην θύρα εισόδου. Με το πέρας των 10-14 ωρών, λαμβάνονταν τα αποτελέσματα για το κάθε δείγμα-στέλεχος.



Εικόνα 30: Μηχάνημα mini-Vitek. (BioMerieux)

Το αποτέλεσμα που λαμβάνεται σε κάθε ανάλυση που πραγματοποιείται είναι της μορφής που φαίνεται στην **Εικόνα 31**. Το Interpretation είναι η επεξήγηση της ανάλυσης του κάθε δείγματος και τα αποτελέσματα μπορεί να είναι R (Resistant), δηλαδή ανθεκτικό, I (Intermediate), το οποίο είναι ευαίσθητο αλλά με αυξημένη έκθεση και S (Susceptible), δηλαδή ευαίσθητο. Το MIC (Minimal Inhibitory Concentration) είναι η Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση του βακτηρίου και καθορίζει in vitro τα επίπεδα ευαισθησίας ή αντοχής βακτηριακών στελεχών έναντι σε αντιβιοτικό. (Beata K. et al., 2021)

bioMérieux Customer:		Laboratory Report		Printed by: System	
System #:					
Isolate: test-1 (To be reviewed)					
Card Type: AST-N215 Bar Code: 6152369403164541 Testing Instrument: 000015F23E1A (11996)					
Setup Technologist: Laboratory Administrator(Labadmin)					
Organism Quantity:					
Selected Organism: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>					
Comments:					
Identification Information					
Organism Origin					
Technologist					
Selected Organism					
Entered: Jun 9, 2023 11:38 EEST By: Labadmin					
Analysis Messages:					
Susceptibility Information		Card: AST-N215	Lot Number: 6152369403	Expires: May 22, 2024 13:00 EEST	
Status: Final		Analysis Time: 10.95 hours	Completed: Jun 9, 2023 22:27 EEST		
Antimicrobial	MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation
Ampicillin	(-)	(-)	Imipenem	1	I
Amoxicillin/Clavulanic Acid	(-)	(-)	Meropenem	<= 0.25	S
Piperacillin/Tazobactam	<= 4	I	Gentamicin	<= 1	IE
Cefalotin	>= 64	R	Tobramycin	<= 1	S
Cefuroxime	(-)	(-)	Ciprofloxacin	<= 0.25	I
Cefuroxime Axetil	(-)	(-)	Norfloxacin	(-)	(-)
Cefoxitin	(-)	(-)	Tetracycline	(-)	(-)
Cefpodoxime	(-)	(-)	Nitrofurantoin	(-)	(-)
Cefotaxime	(-)	(-)	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	(-)	(-)
Ceftazidime	2	I			

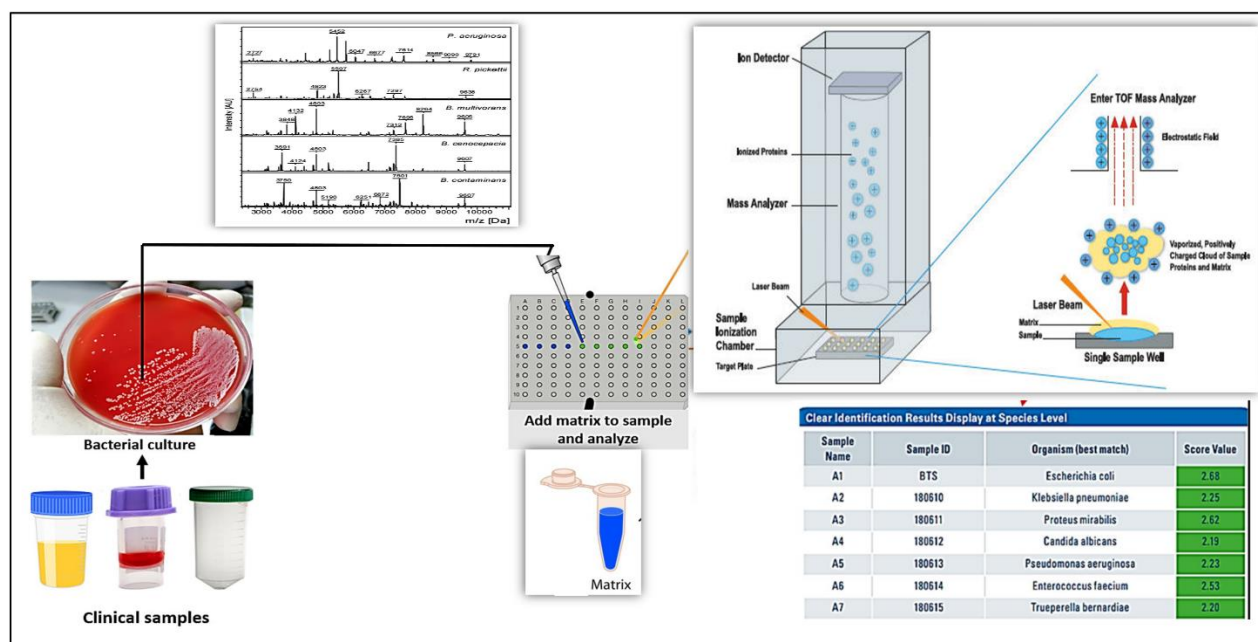
Εικόνα 31: Αποτέλεσμα από ανάλυση Vitek

Μετά το πέρας της διαδικασίας του Vitek, ελέγχθηκε η καθαρότητα κάθε εναιωρήματος κάθε δείγματος σε υπόστρωμα με Nutrient Agar. Μετά από 20-24 ώρες πραγματοποιούνταν ταυτοποίηση των στελεχών, εφόσον ήταν μονοκαλλιέργειες, με τη μέθοδο το Maldi-TOF, έτσι ώστε να υπάρχει απόλυτη βεβαιότητα ότι το στέλεχος ήταν *Pseudomonas aeruginosa*.

4.4 Maldi ToF MS

Στην συγκεκριμένη έρευνα, πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση των στελεχών με τη μέθοδο Maldi ToF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight – Mass Spectrometry). Η τεχνική αυτή είναι για την ταυτοποίηση μικροοργανισμών και έγινε έτσι ώστε να αποφευχθούν πιθανά λάθη στο πείραμα. Η τεχνική βασίζεται σε έναν ανιχνευτή ο οποίος διαχωρίζει τις πρωτεΐνες των μικροοργανισμών με βάση τον χρόνο που απαιτείται να φτάσουν σε αυτόν. Στην ουσία δημιουργείται ένα «αποτύπωμα» μάζας κάποιων συγκεκριμένων πεπτιδίων του βακτηρίου που εξετάζεται και συγκρίνεται σε βάση δεδομένων που υπάρχει στο λογισμικό του μηχανήματος και έτσι, ταυτοποιείται το βακτήριο. Το αποτέλεσμα βγαίνει σε διάγραμμα και υπάρχει και ένα σκορ, το οποίο δείχνει την πιθανότητα να είναι αληθές το αποτέλεσμα (συνήθως

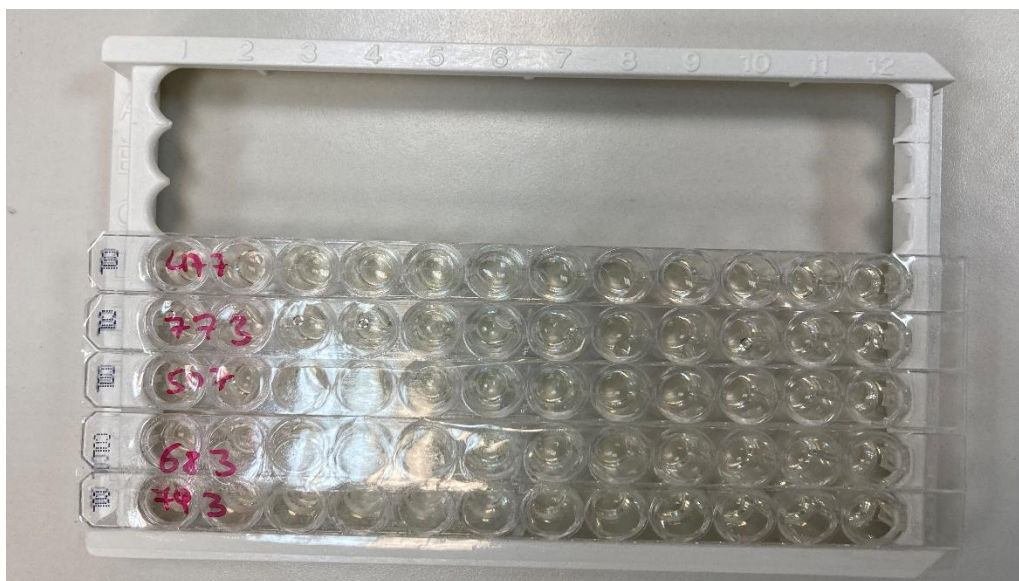
πάνω από 2 είναι έγκυρο). Στην **Εικόνα 32** παρατηρείται η συνολική διαδικασία του Maldi ToF MS. (Elbehiry A., et al., 2022)



Εικόνα 32: Διαδικασία Maldi ToF MS. (Elbehiry A., et al., 2022)

4.5 Colistin test

Μια ακόμη μέθοδος που πραγματοποιήθηκε στην συγκεκριμένη έρευνα είναι τα τεστ κολιστίνης. Συγκεκριμένα, με την μέθοδο αυτή ανιχνεύεται φαινοτυπικά η αντοχή στην κολιστίνη. Σε ένα strip, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 33**, υπάρχει στον πάτο από κάθε πηγαδάκι (well) συγκεκριμένη ποσότητα κολιστίνης, διαδοχικά υποδιπλάσιας αραιώσης (0, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 mg/L) σύμφωνα με την EUCAST. Προετοιμάζεται σε NaCl 0,9% ένα εναιώρημα 0,5 McFarland, που μετρίεται σε θολωσίμετρο και στην συνέχεια, μεταφέρονται 50μl σε υγρό θρεπτικό υλικό Mueller-Hinton. Έπειτα, μετά από έντονη ανάδευση σε vortex, ποσότητα 100 μl μεταφέρεται από το θρεπτικό-εναιώρημα σε κάθε πηγαδάκι. Τέλος, το strip επωάζεται για 18-24 ώρες στους 37°C. Η MIC του στελέχους προκύπτει από την έλλειψη θολερότητας στο αντίστοιχο πηγαδάκι, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 34**.



Εικόνα 33: Strip κολιστίνης πριν την επώαση

Στην έρευνα αυτή πραγματοποιήθηκε το τεστ κολιστίνης περίπου στο 50% των ανθεκτικών δειγμάτων (13 στελέχη) και περίπου στο 10% των ευαίσθητων στελεχών (20 στελέχη).

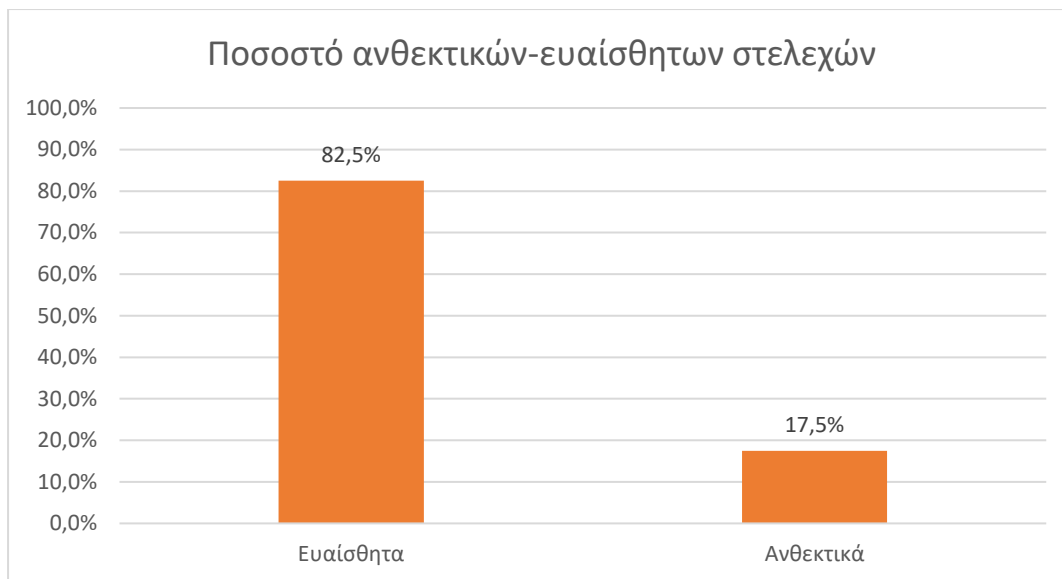
5. Αποτελέσματα

5.1 Αποτελέσματα ανακαλλιέργειών

Οι συνολικές ανακαλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν ήταν 238. Με το πέρας του πρώτου 24ωρου είχε φυτρώσει η πλειοψηφία των στελεχών και στα υπόλοιπα συνεχίστηκε η επώαση για ένα επιπλέον 24ωρο. Έτσι, μετά από 2 ημέρες αναζωογονήθηκαν τελικά 198 στελέχη *P. aeruginosa*.

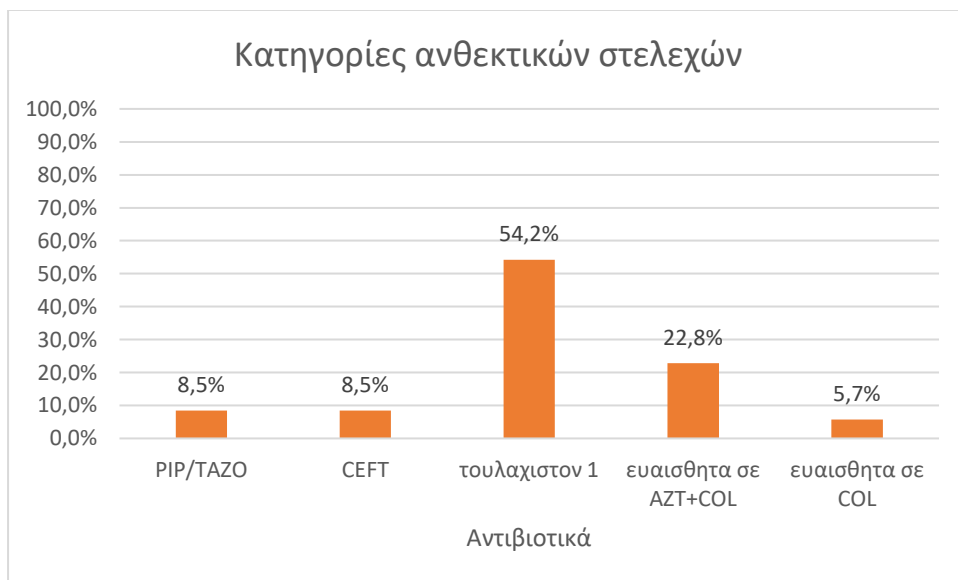
5.2 Αποτελέσματα Vitek

Από τα 198 στελέχη *P. aeruginosa* πραγματοποιήθηκαν 211 δοκιμές Vitek με την κάρτα AST-N215. Από αυτά αναλύθηκαν και βγήκε αποτέλεσμα για τα 201, εκ των οποίων θα ληφθούν υπόψιν τα 200 (βλ. 5.3). Αυτό αντανακλά σε ποσοστό της τάξης του **94,8%**. Από τα 200 που λαμβάνονται υπόψιν υπήρχαν 165 ευαίσθητα (**82,5%**) και 35 ανθεκτικά σε τουλάχιστον 1 αντιβιοτικό (**17,5%**). Στο **Διάγραμμα 1** παρίστανται τα αποτελέσματα αυτά.



Διάγραμμα 1: Ποσοστό ανθεκτικών στελεχών

Στο **Διάγραμμα 2** φαίνονται οι κατηγορίες των ανθεκτικών στελεχών. Το 54,2% των 35 ανθεκτικών στελεχών εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε παραπάνω από 1 αντιβιοτικά, από 8,5% έχουν τα στελέχη που είναι ανθεκτικά είτε μόνο σε πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη είτε μόνο σε κεφταζιδίμη. Το υπόλοιπο 28,5% ανήκει στα στελέχη που είναι ανθεκτικά σε πολλά αντιβιοτικά, και από αυτά το 22,8% μπορεί να αντιμετωπιστεί με αζτρεονάμη ή κολιστίνη, διότι είναι ευαίσθητα σε αυτά, ενώ το 5,7% είναι ευαίσθητο μόνο στην κολιστίνη.



Διάγραμμα 2: Κατηγορίες ανθεκτικών στελεχών

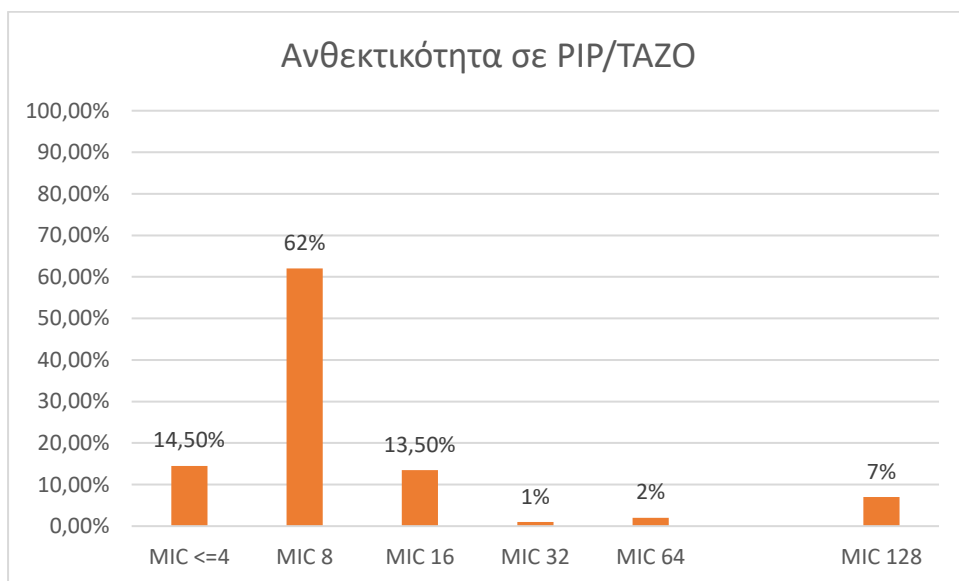
5.2.1 Αποτελέσματα ανά αντιβιοτικά κάρτας AST-N215

Πιπερακιλλίνη/Ταζομπακτάμη

Σύμφωνα με την EUCAST, για να είναι ένα στέλεχος:

- ανθεκτικό θα πρέπει η MIC του να είναι μεγαλύτερη από 16 mg/L,
- ευαίσθητο θα πρέπει η MIC του να είναι μικρότερη ή ίση από 0,001 mg/L και
- οι ενδιάμεσες τιμές τους ορίζονται ως ευαίσθητα με αυξημένη έκθεση (I).

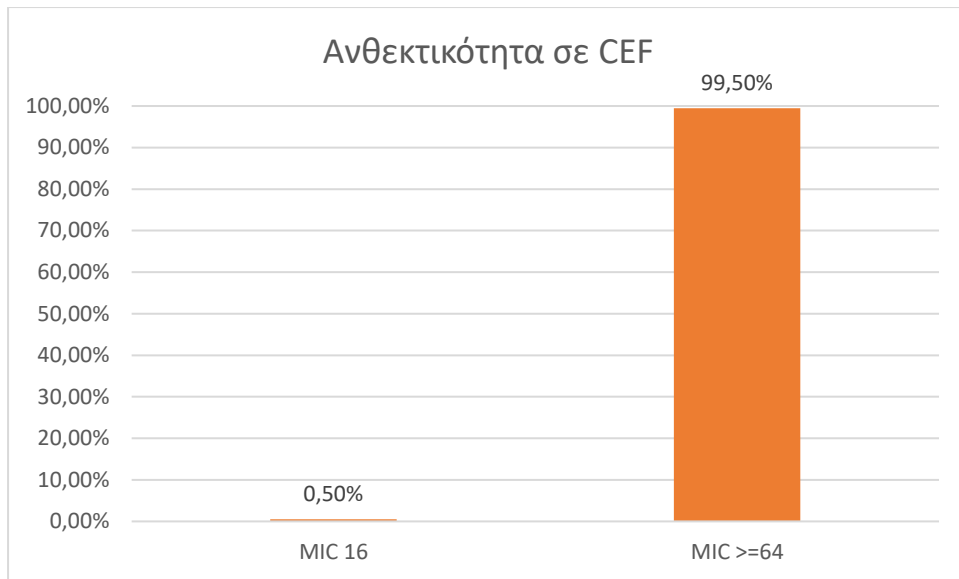
Από το σύνολο των 200 στελεχών, τα 20 είναι ανθεκτικά σε πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη (10%), ενώ τα υπόλοιπα 180 είναι ευαίσθητα με αυξημένη έκθεση (90%). Στο **Διάγραμμα 3** παρουσιάζονται αναλυτικά τα ποσοστά των στελεχών με τις αντίστοιχες MIC.



Διάγραμμα 3: MIC και ανθεκτικότητα σε PIP/TAZO

Κεφαλοθίνη

Η κεφαλοθίνη είναι ένα αντιβιοτικό στο οποίο η *P. aeruginosa* παρουσιάζει ενδογενή αντοχή. Συνεπώς, και τα 200 στελέχη θεωρούνται ανθεκτικά (100%). Ωστόσο, 1 στέλεχος παρουσίασε χαμηλότερη MIC από το αναμενόμενο. Στο **Διάγραμμα 4** παρουσιάζεται αυτή η ποσοστιαία διαφορά.



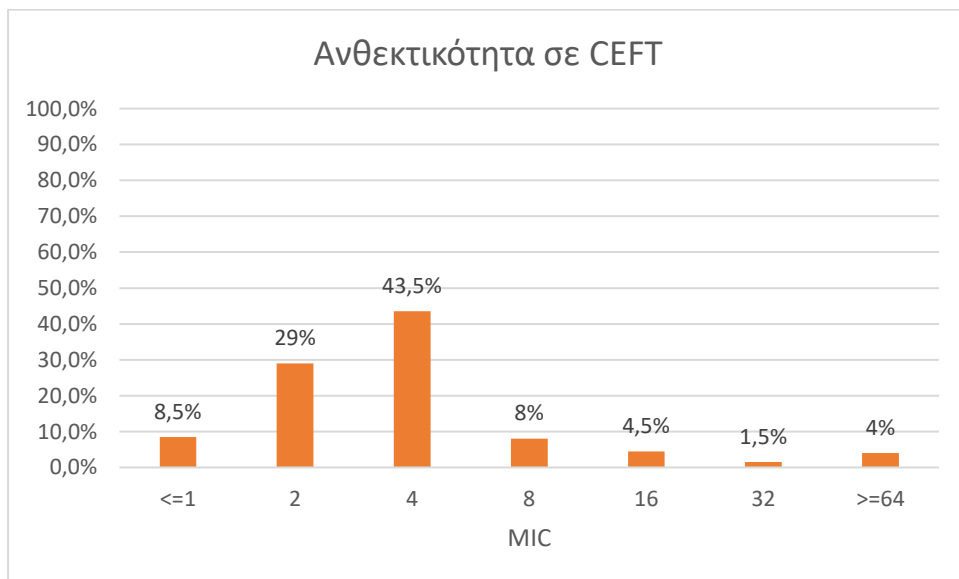
Διάγραμμα 4: MIC και ανθεκτικότητα σε CEF

Κεφαζιδίμη

Σύμφωνα με την EUCAST, για να είναι ένα στέλεχος:

- ανθεκτικό θα πρέπει η MIC του να είναι μεγαλύτερη από 8 mg/L,
- ευαίσθητο θα πρέπει η MIC του να είναι μικρότερη ή ίση από 0,001 mg/L και
- οι ενδιάμεσες τιμές τους ορίζονται ως ευαίσθητα με αυξημένη έκθεση (I).

Από το σύνολο των 200 στελεχών, τα 20 είναι ανθεκτικά σε κεφαζιδίμη (**10%**), ενώ τα υπόλοιπα 180 είναι ευαίσθητα με αυξημένη έκθεση (**90%**). Στο **Διάγραμμα 5** παρουσιάζονται αναλυτικά τα ποσοστά των στελεχών με τις αντίστοιχες MIC.



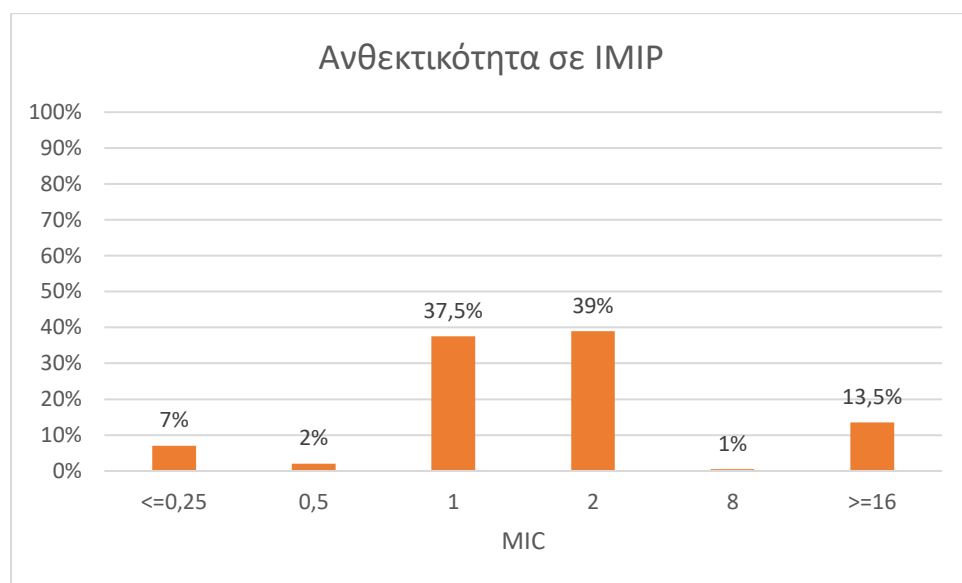
Διάγραμμα 5: MIC και ανθεκτικότητα σε CEFT

Ιμιπενέμη

Σύμφωνα με την EUCAST, για να είναι ένα στέλεχος:

- ανθεκτικό θα πρέπει η MIC του να είναι μεγαλύτερη από 4 mg/L,
- ευαίσθητο θα πρέπει η MIC του να είναι μικρότερη ή ίση από 0,001 mg/L και
- οι ενδιάμεσες τιμές τους ορίζονται ως ευαίσθητα με αυξημένη έκθεση (I).

Από το σύνολο των 200 στελεχών, τα 29 είναι ανθεκτικά σε ιμιπενέμη (**14,5%**), ενώ τα υπόλοιπα 170 είναι ευαίσθητα με αυξημένη έκθεση (**85,5%**). Στο **Διάγραμμα 6** παρουσιάζονται αναλυτικά τα ποσοστά των στελεχών με τις αντίστοιχες MIC.



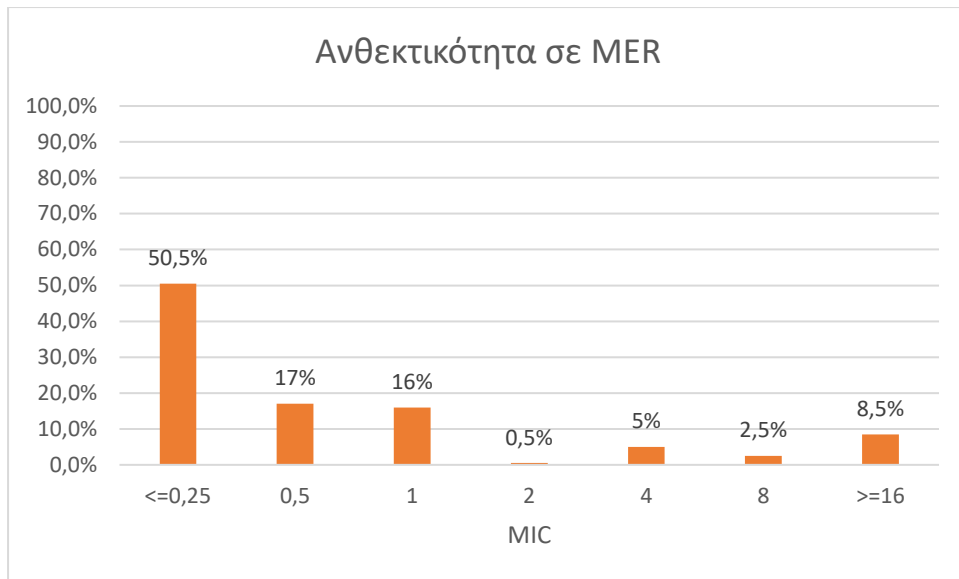
Διάγραμμα 6: MIC και ανθεκτικότητα σε IMIP

Μεροπενέμη

Σύμφωνα με την EUCAST, για να είναι ένα στέλεχος:

- ανθεκτικό θα πρέπει η MIC του να είναι μεγαλύτερη από 8 mg/L,
- ευαίσθητο θα πρέπει η MIC του να είναι μικρότερη ή ίση από 2 mg/L και
- οι ενδιάμεσες τιμές τους ορίζονται ως ευαίσθητα με αυξημένη έκθεση (I).

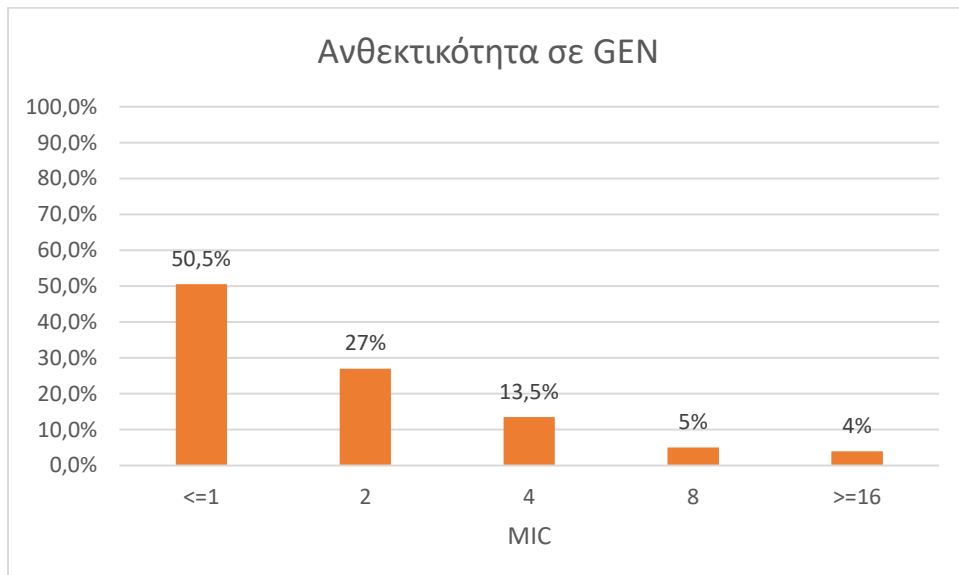
Από το σύνολο των 200 στελεχών, τα 17 είναι ανθεκτικά σε μεροπενέμη (**8,5%**), τα 15 είναι ευαίσθητα με αυξημένη έκθεση (**7,5%**), ενώ τα υπόλοιπα 168 είναι ευαίσθητα (**84%**). Στο **Διάγραμμα 7** παρουσιάζονται αναλυτικά τα ποσοστά των στελεχών με τις αντίστοιχες MIC.



Διάγραμμα 7: MIC και ανθεκτικότητα σε MER

Γενταμικίνη

Στην περίπτωση αυτή, σε όλα τα στελέχη του βακτηρίου αυτού βγήκε το αποτέλεσμα ότι δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για την ερμηνεία των MIC. Παρ' ολ' αυτά, οι τιμές των MIC ποικίλλουν και στο **Διάγραμμα 8** παρουσιάζονται αναλυτικά τα ποσοστά των στελεχών με τις αντίστοιχες MIC. Ωστόσο, η MIC με τιμές ≥ 16 (**4%**) καθιστούν την γενταμικίνη μη αποδεκτή ως θεραπευτική επιλογή. Επίσης, σύμφωνα με πρόσφατη ανακοίνωση του CLSI, η γενταμικίνη δεν ενδείκνυται πλέον καθόλου ως αντιβιοτικό για την καταπολέμηση της *Pseudomonas aeruginosa*, μιας και υπάρχει πιθανότητα ενδογενούς αντοχής.



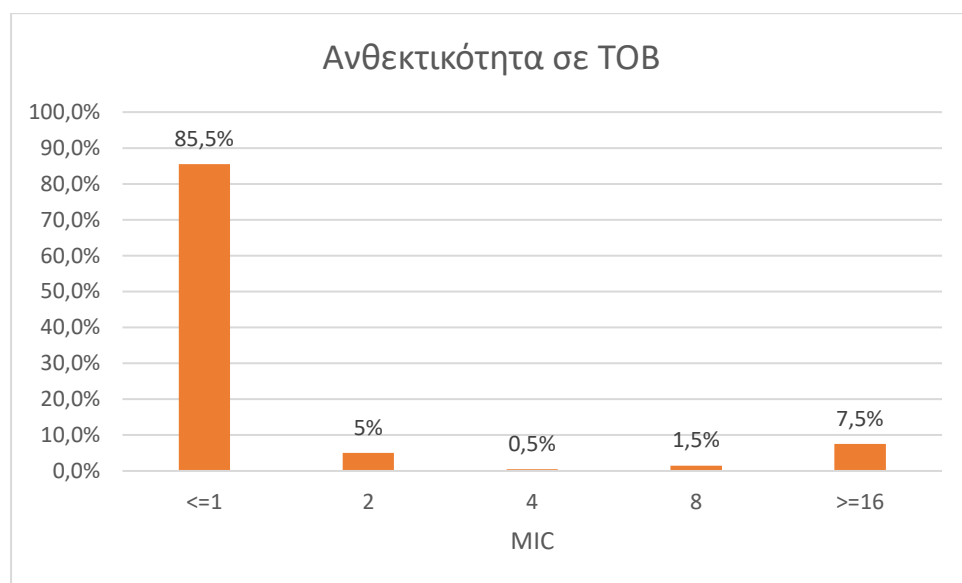
Διάγραμμα 8: MIC και ανθεκτικότητα σε GEN

Τομπραμυκίνη

Σύμφωνα με την EUCAST, για να είναι ένα στέλεχος:

- ανθεκτικό θα πρέπει η MIC του να είναι μεγαλύτερη από 2 mg/L,
- ευαίσθητο θα πρέπει η MIC του να είναι μικρότερη ή ίση από 2 mg/L

Από το σύνολο των 200 στελεχών, τα 19 είναι ανθεκτικά σε τομπραμυκίνη (**9,5%**), ενώ τα υπόλοιπα 181 είναι ευαίσθητα (**90,5%**). Στο **Διάγραμμα 9** παρουσιάζονται αναλυτικά τα ποσοστά των στελεχών με τις αντίστοιχες MIC.



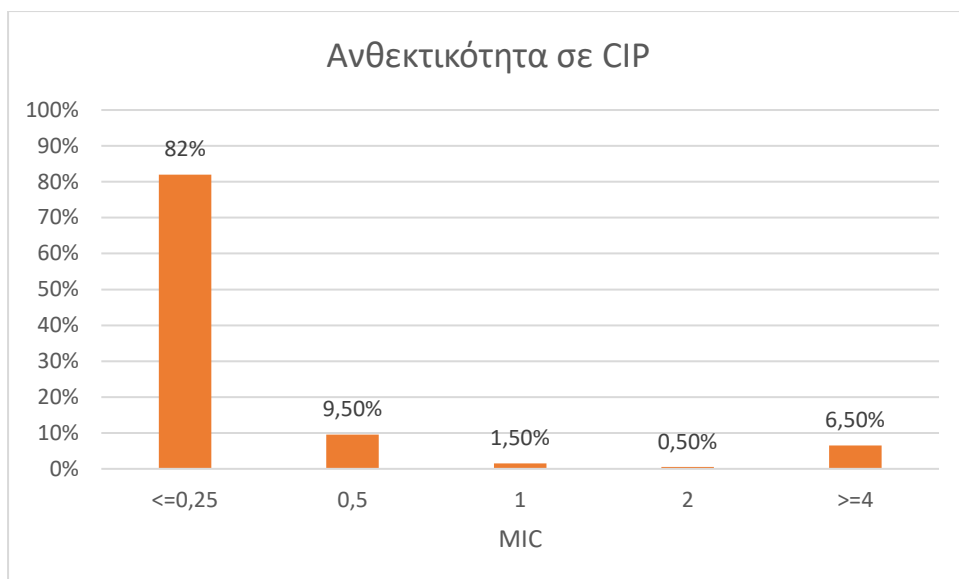
Διάγραμμα 9: MIC και ανθεκτικότητα σε TOB

Σιπροφλοξασίνη

Σύμφωνα με την EUCAST, για να είναι ένα στέλεχος:

- ανθεκτικό θα πρέπει η MIC του να είναι μεγαλύτερη από 0,5 mg/L,
- ευαίσθητο θα πρέπει η MIC του να είναι μικρότερη ή ίση από 0,001 mg/L

Από το σύνολο των 200 στελεχών, τα 17 είναι ανθεκτικά σε σιπροφλοξασίνη (**8,5%**), ενώ τα υπόλοιπα 183 είναι ευαίσθητα (**91,5%**). Στο **Διάγραμμα 10** παρουσιάζονται αναλυτικά τα ποσοστά των στελεχών με τις αντίστοιχες MIC.



Διάγραμμα 10: MIC και ανθεκτικότητα σε CIP

5.2.2 Αποτελέσματα των ανθεκτικών στελεχών

Όπως προαναφέρθηκε, από τα 35 στελέχη τα 2 είναι ανθεκτικά σε όλα εκτός από την κολιστίνη (**5,7%**), τα 3 είναι ανθεκτικά μόνο σε πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη (**8,5%**), τα 3 είναι ανθεκτικά μόνο σε κεφαζιδίκη (**8,5%**), τα 8 είναι ανθεκτικά σε όλα εκτός από αζτρεονάμη και κολιστίνη (**22,8%**) και τα υπόλοιπα 19 είναι ανθεκτικά σε τουλάχιστον 1 αντιβιοτικό (**54,2%**). Οι επιπλέον κάρτες Vitek, δηλαδή τα υπόλοιπα αντιβιοτικά χρησιμοποιήθηκαν για 29 στελέχη.

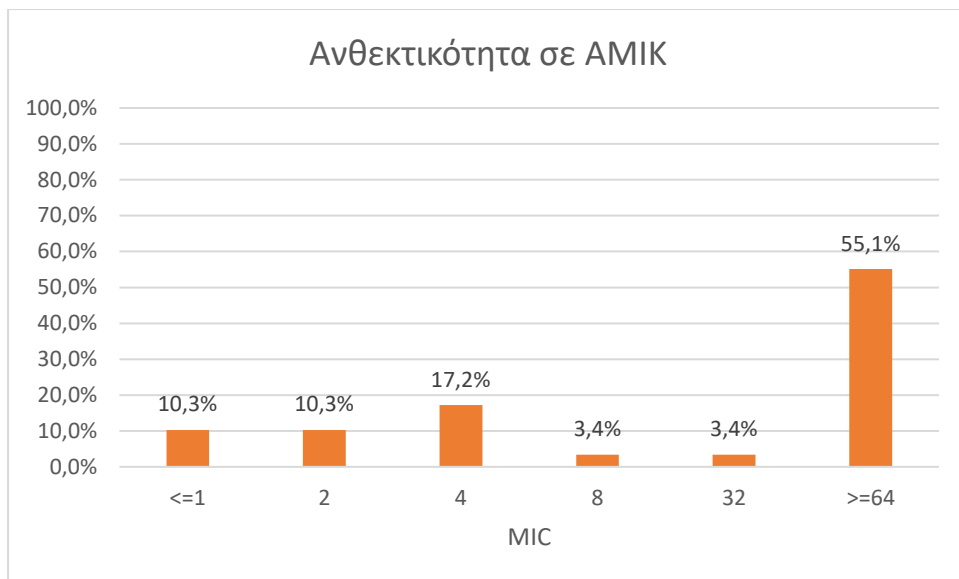
5.2.2.1 Αποτελέσματα των AST-N376 και XN10

Αμικασίνη

Σύμφωνα με την EUCAST, για να είναι ένα στέλεχος:

- ανθεκτικό θα πρέπει η MIC του να είναι μεγαλύτερη από 16 mg/L,
- ευαίσθητο θα πρέπει η MIC του να είναι μικρότερη ή ίση από 16 mg/L

Από το σύνολο των 29 ανθεκτικών στελεχών που ελέγχθηκαν, τα 17 είναι ανθεκτικά σε αμικασίνη (**58,5%**), ενώ τα υπόλοιπα 12 είναι ευαίσθητα (**41,5%**). Στο **Διάγραμμα 11** παρουσιάζονται αναλυτικά τα ποσοστά των στελεχών με τις αντίστοιχες MIC.



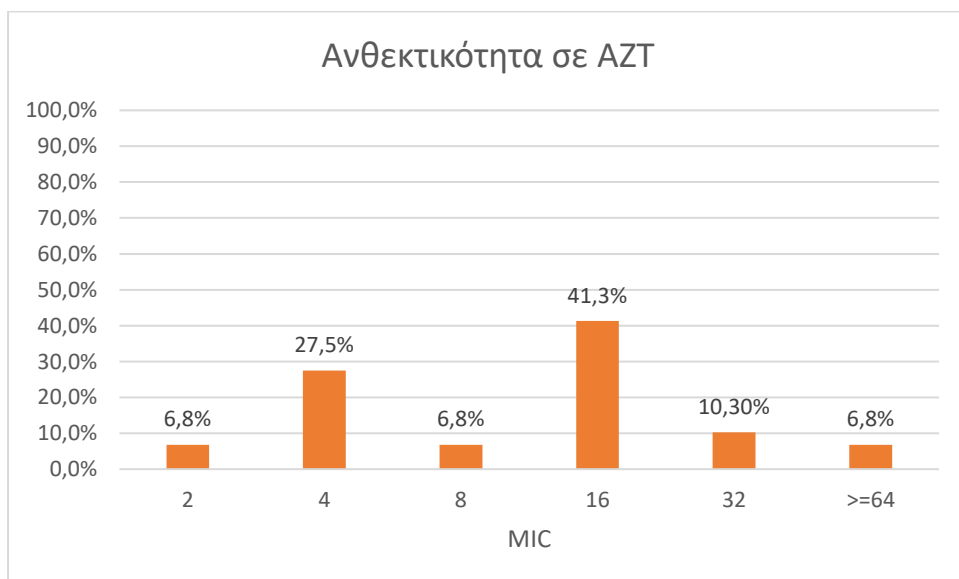
Διάγραμμα 11: MIC και ανθεκτικότητα σε AMIK

Αζτρεονάμη

Σύμφωνα με την EUCAST, για να είναι ένα στέλεχος:

- ανθεκτικό θα πρέπει η MIC του να είναι μεγαλύτερη από 16 mg/L,
- ευαίσθητο θα πρέπει η MIC του να είναι μικρότερη ή ίση από 0,001 mg/L
- οι ενδιάμεσες τιμές τους ορίζονται ως ευαίσθητα με αυξημένη έκθεση (I).

Από το σύνολο των 29 ανθεκτικών στελεχών, τα 5 είναι ανθεκτικά σε αζτρεονάμη (17,1%), ενώ τα υπόλοιπα 24 είναι ευαίσθητα με αυξημένη έκθεση (86,9%). Στο **Διάγραμμα 12** παρουσιάζονται αναλυτικά τα ποσοστά των στελεχών με τις αντίστοιχες MIC.



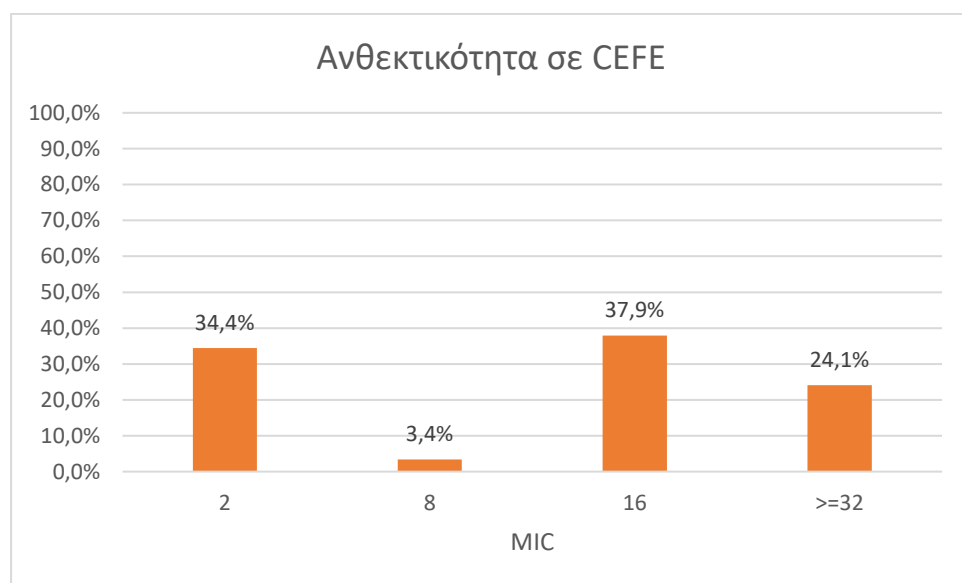
Διάγραμμα 12: MIC και ανθεκτικότητα σε AZT

Κεφεπίμη

Σύμφωνα με την EUCAST, για να είναι ένα στέλεχος:

- ανθεκτικό θα πρέπει η MIC του να είναι μεγαλύτερη από 8 mg/L,
- ευαίσθητο θα πρέπει η MIC του να είναι μικρότερη ή ίση από 0,001 mg/L
- οι ενδιάμεσες τιμές τους ορίζονται ως ευαίσθητα με αυξημένη έκθεση (I).

Από το σύνολο των 29 ανθεκτικών στελεχών, τα 18 είναι ανθεκτικά σε κεφεπίμη (62%), ενώ τα υπόλοιπα 11 είναι ευαίσθητα με αυξημένη έκθεση (38%). Στο **Διάγραμμα 13** παρουσιάζονται αναλυτικά τα ποσοστά των στελεχών με τις αντίστοιχες MIC.



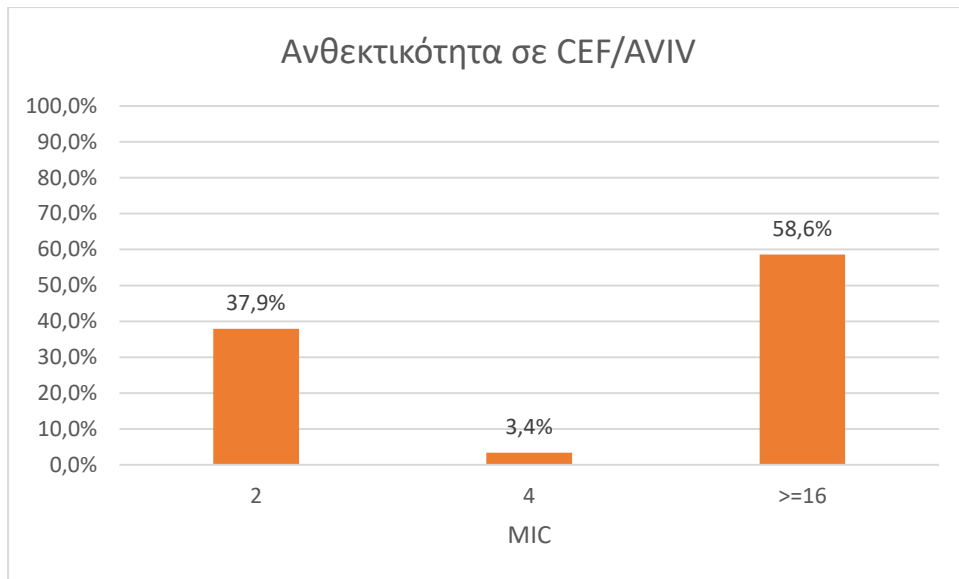
Διάγραμμα 13: MIC και ανθεκτικότητα σε CEFEP

Κεφταζιδίμη/Αβιβακτάμη

Σύμφωνα με την EUCAST, για να είναι ένα στέλεχος:

- ανθεκτικό θα πρέπει η MIC του να είναι μεγαλύτερη από 8 mg/L,
- ευαίσθητο θα πρέπει η MIC του να είναι μικρότερη ή ίση από 8 mg/L

Από το σύνολο των 29 ανθεκτικών στελεχών, τα 17 είναι ανθεκτικά σε κεφταζιδίμη/αβιβακτάμη (58,6%), ενώ τα υπόλοιπα 12 είναι ευαίσθητα (41,4%). Στο **Διάγραμμα 13** παρουσιάζονται αναλυτικά τα ποσοστά των στελεχών με τις αντίστοιχες MIC.



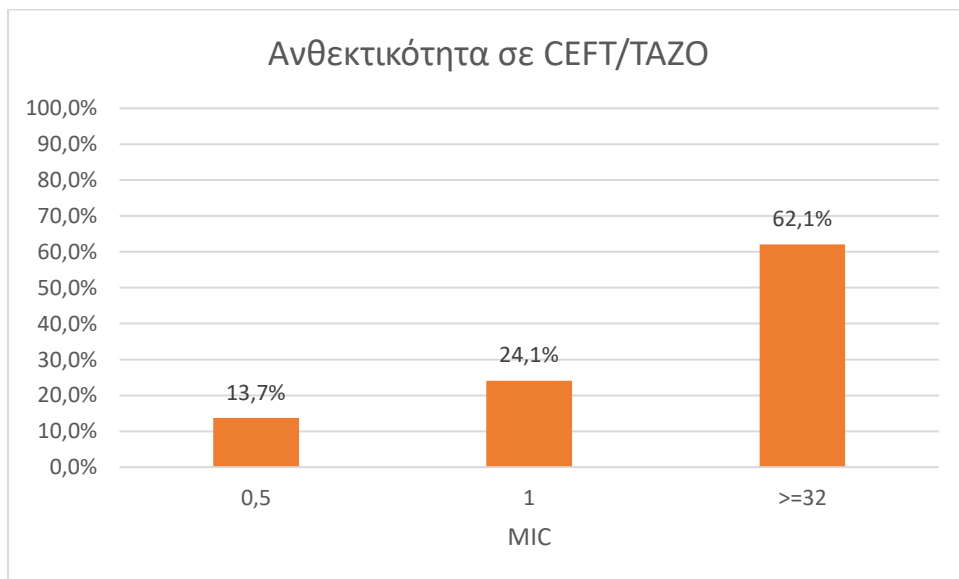
Διάγραμμα 13: MIC και ανθεκτικότητα σε CEF/AVIV.

Κεφτολοζάνη/Ταζομπακτάμη

Σύμφωνα με την EUCAST, για να είναι ένα στέλεχος:

- ανθεκτικό θα πρέπει η MIC του να είναι μεγαλύτερη από 4 mg/L,
- ευαίσθητο θα πρέπει η MIC του να είναι μικρότερη ή ίση από 4 mg/L

Από το σύνολο των 29 ανθεκτικών στελεχών, τα 18 είναι ανθεκτικά σε κεφτολοζάνη/ταζομπακτάμη (**62,1%**), ενώ τα υπόλοιπα 11 είναι ευαίσθητα (**37,9%**). Στο **Διάγραμμα 14** παρουσιάζονται αναλυτικά τα ποσοστά των στελεχών με τις αντίστοιχες MIC.



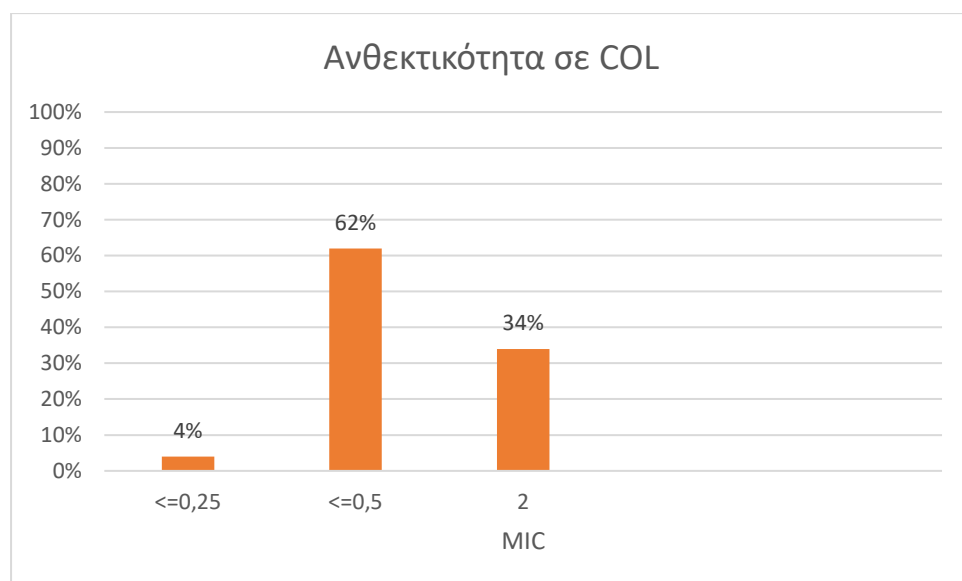
Διάγραμμα 14: MIC και ανθεκτικότητα σε CEFT/TAZO.

Κολιστίνη

Σύμφωνα με την EUCAST, για να είναι ένα στέλεχος:

- ανθεκτικό θα πρέπει η MIC του να είναι μεγαλύτερη ή ίση από 4 mg/L,
- ευαίσθητο θα πρέπει η MIC του να είναι μικρότερη από 4 mg/L

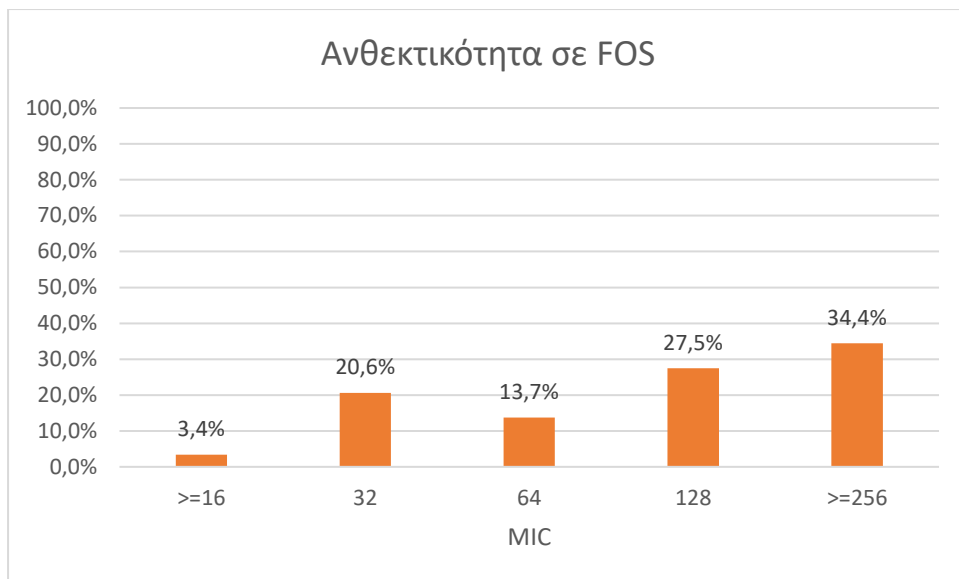
Από το σύνολο των 29 ανθεκτικών στελεχών, και τα 29 είναι ευαίσθητα στην κολιστίνη (**100%**). Στο **Διάγραμμα 15** παρουσιάζονται αναλυτικά τα ποσοστά των στελεχών με τις αντίστοιχες MIC.



Διάγραμμα 15: MIC και ανθεκτικότητα σε COL.

Φωσφομυκίνη

Η *Pseudomonas aeruginosa* έχει ενδογενή αντιβιοαντοχή στην φωσφομυκίνη. Αυτό το επιβεβαιώνει και η ανάλυση του Vitek, καθώς από το σύνολο των 29 ανθεκτικών στελεχών και τα 29 είναι ανθεκτικά στην φωσφομυκίνη (**100%**), αλλά έχουν διαφορετικές MIC. Στο **Διάγραμμα 16** παρουσιάζονται αναλυτικά τα ποσοστά των στελεχών με τις αντίστοιχες MIC.



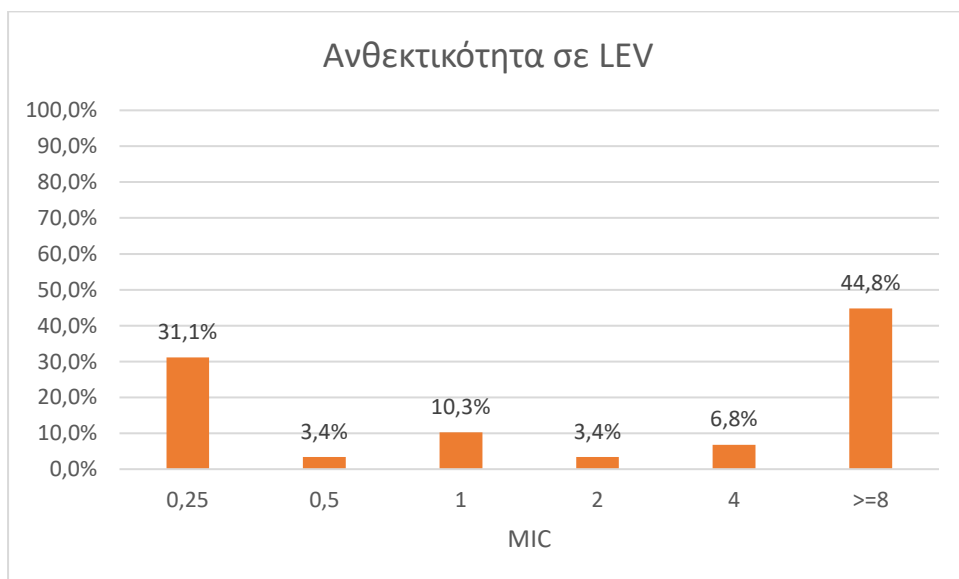
Διάγραμμα 16: MIC και ανθεκτικότητα σε FOS.

Λεβοφλοξασίνη

Σύμφωνα με την EUCAST, για να είναι ένα στέλεχος:

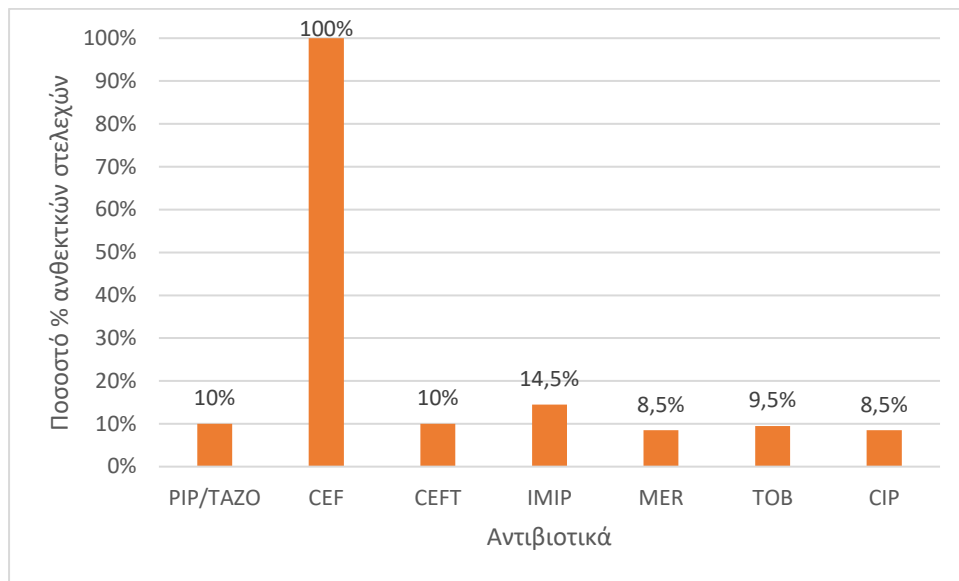
- ανθεκτικό θα πρέπει η MIC του να είναι μεγαλύτερη από 2 mg/L,
- ευαίσθητο θα πρέπει η MIC του να είναι μικρότερη ή ίση από 0,001 mg/L
- οι ενδιάμεσες τιμές τους ορίζονται ως ευαίσθητα με αυξημένη έκθεση (I).

Από το σύνολο των 29 ανθεκτικών στελεχών, τα 15 είναι ανθεκτικά σε λεβοφλοξασίνη (**51,6%**), ενώ τα υπόλοιπα 14 είναι ευαίσθητα με αυξημένη έκθεση (**48,4%**). Στο **Διάγραμμα 17** παρουσιάζονται αναλυτικά τα ποσοστά των στελεχών με τις αντίστοιχες MIC.



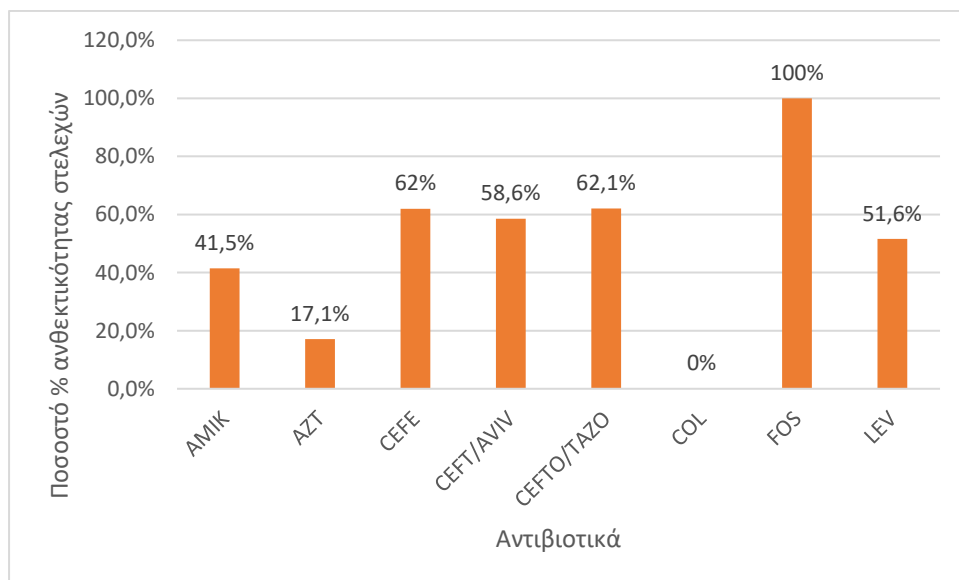
Διάγραμμα 17: MIC και ανθεκτικότητα σε CEF/AVIV.

Στο **Διάγραμμα 18** παρατηρούνται συνολικά όλα τα αντιβιοτικά της κάρτας Vitek AST-N215 και τα ποσοστά % ανθεκτικότητας όλων των στελεχών (200).



Διάγραμμα 18: Συνολικό διάγραμμα ανθεκτικότητας-αντιβιοτικών.

Στο **Διάγραμμα 19** παρατηρούνται συνολικά όλα τα αντιβιοτικά των καρτών Vitek AST-N376 και XN10 που χρησιμοποιήθηκαν στα ανθεκτικά στην ιμιπενέμη - τουλάχιστον- και τα ποσοστά % ανθεκτικότητας των στελεχών αυτών (29).



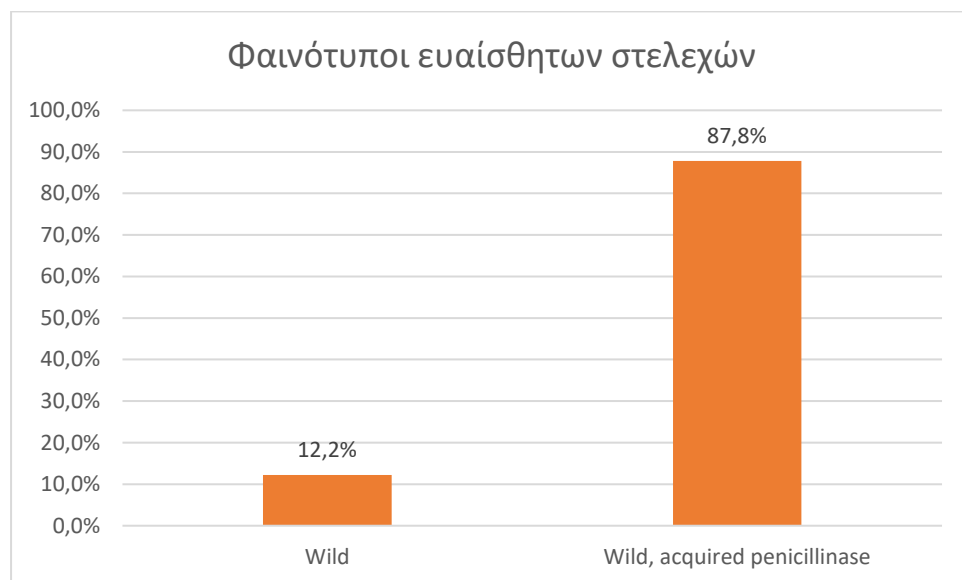
Διάγραμμα 19: Συνολικό διάγραμμα ανθεκτικότητας-αντιβιοτικών.

5.2.3 Ανιχνευμένοι φαινότυποι

Το Vitek έδωσε μια ακόμα χρήσιμη πληροφορία, τους πιθανούς φαινότυπους που έχουν ή απέκτησαν τα στελέχη που δουλεύτηκαν. Στην ουσία δείχνει τους πιθανούς μηχανισμούς αντοχής που μπορεί να έχει ή να απέκτησε το κάθε δείγμα. Από τα 200

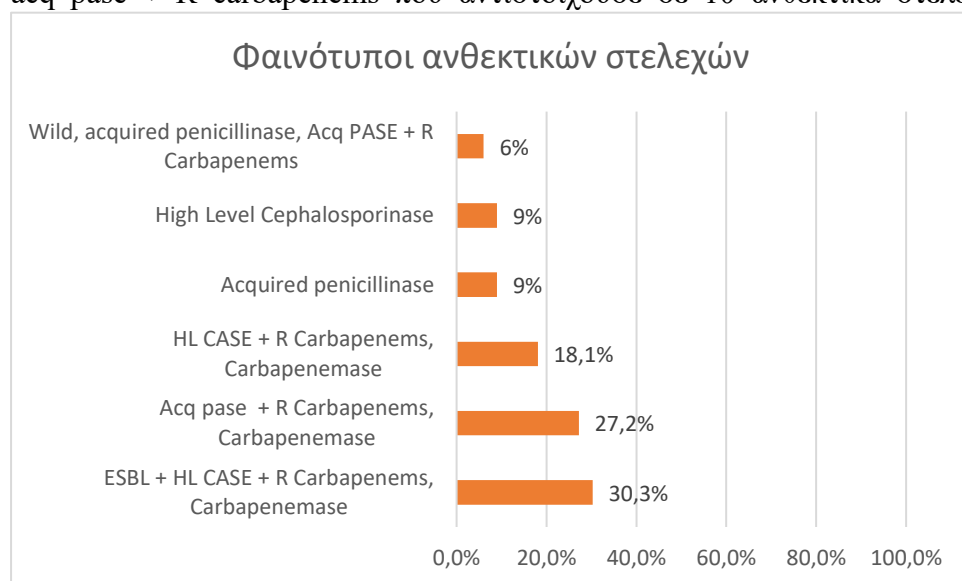
στελέχη που δουλεύτηκαν, το Vitek έδωσε τους πιθανούς φαινότυπους για τα 198 (2 ανθεκτικών δεν δόθηκε ο φαινότυπος).

Στο **Διάγραμμα 20** παρατηρούνται τα 2 είδη φαινοτύπων που έδωσε η ανάλυση: τον wild που αντιστοιχούσε σε 20 ευαίσθητα στελέχη (12,2%) και τον wild, acquired penicillinase που αντιστοιχούσε σε 145 ευαίσθητα στελέχη (87,8%).



Διάγραμμα 20: Φαινότυποι ευαίσθητων στελεχών

Αντίστοιχα, στο **Διάγραμμα 21** υπάρχουν τα 6 είδη φαινοτύπων που έδωσε η ανάλυση: τον wild, acquired penicillinase, acq PASE + R carbapenems που αντιστοιχούσε σε 2 ανθεκτικά στελέχη (6%), τον high level cephalosporinase που αντιστοιχούσε σε 3 ανθεκτικά στελέχη (9%), τον acquired penicillinase που αντιστοιχούσε σε 3 ανθεκτικά στελέχη (9%), τον HL CASE + R carbapenems, carbapenemase που αντιστοιχούσε σε 6 ανθεκτικά στελέχη (18.1%), τον acq pase + R carbapenems, carbapenemase που αντιστοιχούσε σε 9 ανθεκτικά στελέχη (27.2%) και τον wild, acquired penicillinase, acq pase + R carbapenems που αντιστοιχούσε σε 10 ανθεκτικά στελέχη (30.3%)



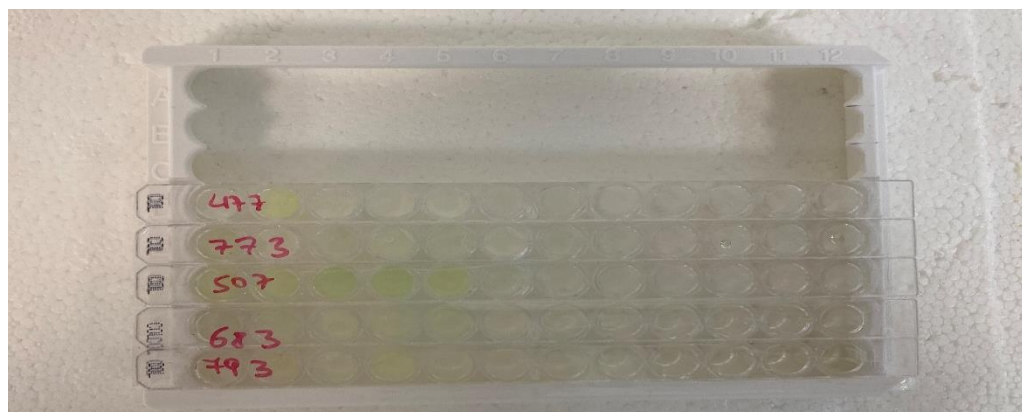
Διάγραμμα 21: Φαινότυποι ανθεκτικών στελεχών

5.3 Αποτελέσματα Maldi-Tof

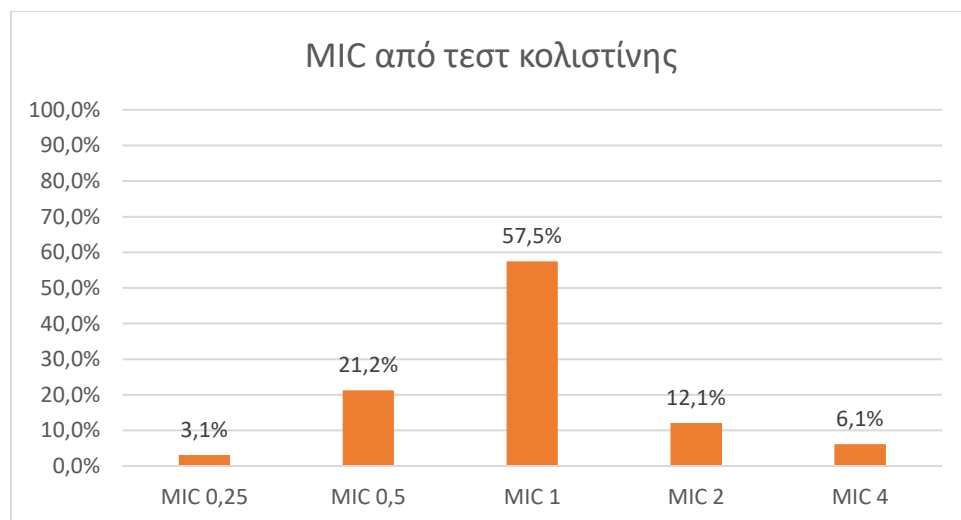
Στην συγκεκριμένη έρευνα, όπως προαναφέρθηκε (βλ. 5.1) φύτρωσαν και μπήκαν για ανάλυση με το Vitek 211 στελέχη *Pseudomonas aeruginosa*. Για τα 10 δεν βγήκε αποτέλεσμα, οπότε υπήρχαν 201 στελέχη τα οποία έπρεπε να ξανά-ταυτοποιηθούν με την τεχνική Maldi-Tof, έτσι ώστε να υπάρχει απόλυτη βεβαιότητα ότι τα στελέχη που αναλύθηκαν ήταν *Pseudomonas aeruginosa*. Ωστόσο, από τα 201 μόνο ένα δεν ήταν. Αυτό το συγκεκριμένο, μετά και από αρκετές επαναλήψεις της διαδικασίας, ήταν *Stenotrophomonas*, το οποίο παρουσίαζε, μάλιστα, και ανθεκτικότητα σε πολλά αντιβιοτικά. Τελικά, όμως, προφανώς δεν συνυπολογίστηκε στα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν.

5.4 Αποτελέσματα colistin test

Από τα 33 στελέχη που δουλεύτηκαν συνολικά με το τεστ κολιστίνης, και τα 33 είναι ευαίσθητα σε αυτήν (**100%**). Παρ' ολ' αυτά, οι MIC τους ποικίλλουν και πιο συγκεκριμένα, αυτές φαίνονται στο **Διάγραμμα 22**. Στην **Εικόνα 34** φαίνεται μια φωτογραφία από την διαδικασία αυτή μετά από επώαση 24 ωρών. Φαίνεται ξεκάθαρα η θολερότητα στα πηγαδάκια και αυτό υποδεικνύει την ύπαρξη του βακτηρίου. Το πρώτο πηγαδάκι που δεν είναι θολό-κίτρινο, η τιμή του αντιστοιχεί στην τιμή MIC σύμφωνα με την EUCAST.



Εικόνα 34: Strip κολιστίνης μετά την επώαση



Διάγραμμα 22: Αποτελέσματα από το τεστ κολιστίνης

6. Συμπεράσματα

6.1 Γενικά συμπεράσματα

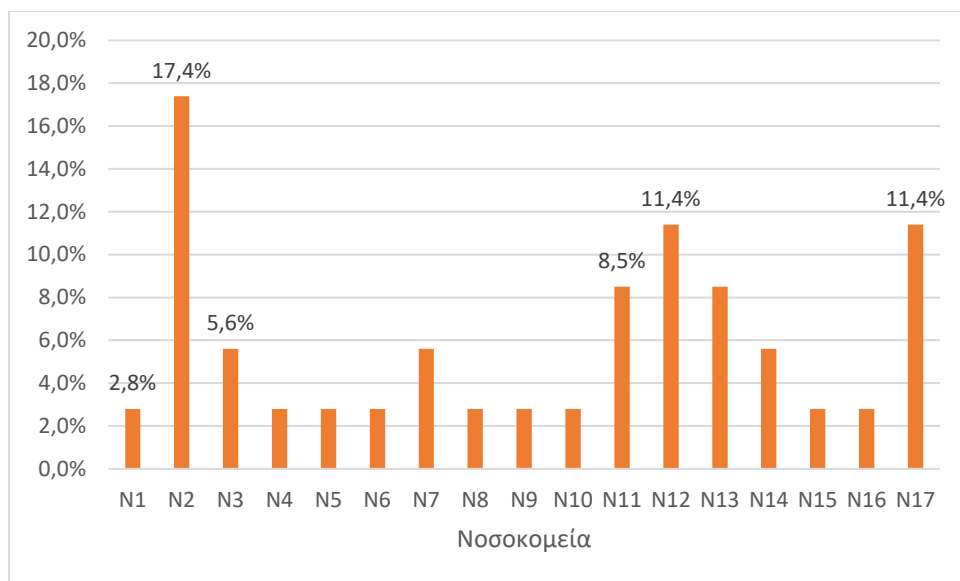
Αρχικά, τα απομονωμένα και μελετημένα στελέχη *Pseudomonas aeruginosa* της περιόδου 2017-2022 τα οποία αναλύθηκαν με το Vitek για να βρεθεί η ευαισθησία-αντοχή σε αντιβιοτικά ήταν σε αριθμό 200. Από αυτά, τα 165 (**82,5%**) είναι ευαίσθητα σε όλα τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται κατά του βακτηρίου αυτού, ενώ τα υπόλοιπα 35 (**17,5%**) είναι ανθεκτικά σε τουλάχιστον 1 αντιβιοτικό.

Το αντιβιοτικό στο οποίο εμφανίζεται η μεγαλύτερη αντοχή από το σύνολο των 200 στελεχών είναι η ιμιπενέμη (**14,5%**), μια καρβαπενέμη που ανήκει στην ευρύτερη κατηγορία των β-λακταμών. Από την άλλη, αυτό με την χαμηλότερη αντοχή είναι η μεροπενέμη (**8,5%**) και η σιπροφλοξασίνη (**8,5%**), που ανήκουν στις καρβαπενέμες (β-λακτάμες) και φλοροκινολόνες αντίστοιχα. Επίσης, όπως προαναφέρθηκε, στα στελέχη που η γενταμικίνη έχει MIC ≥ 16 , την καθιστούν μη αποδεκτή ως θεραπευτική επιλογή. Τέλος, η πλειοψηφία των στελεχών με ανθεκτικότητα στην ιμιπενέμη παρουσιάζουν ευαισθησία στην μεροπενέμη (ανήκουν στην ίδια κατηγορία). Αυτό ίσως να μην οφείλεται σε καρβαπενεμάση, καθώς θα κατέστρεφε και τα 2 αντιβιοτικά. Οπότε η πιο λογική εξήγηση είναι ότι υπάρχουν πορίνες ή αντλίες εκκροής αντιβιοτικών ειδικές για την ιμιπενέμη, κάτι το οποίο έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα για τους πιθανούς φαινότυπους του Vitek. Σε κάθε περίπτωση, προτού βγει τελικό συμπέρασμα, θα πρέπει να υπάρχει κάποια μοριακή προσέγγιση.

Το 14,5% των στελεχών που ήταν ανθεκτικά στην ιμιπενέμη (29) αναλύθηκαν περαιτέρω με άλλα αντιβιοτικά και συνδυασμούς αντιβιοτικών. Από αυτά, το αντιβιοτικό στο οποίο εμφανίζεται η μεγαλύτερη αντοχή είναι ο συνδυασμός κεφτολοζάνης και ταζομπακτάμης με **62,1%** και η κεφεπίμη με **62%**. Το αντιβιοτικό με την χαμηλότερη αντοχή ήταν η κολιστίνη με **0%**, δηλαδή και τα 29 είναι ευαίσθητα σε αυτήν.

6.2 Προέλευση ανθεκτικών στελεχών

Στην συγκεκριμένη έρευνα συμμετείχαν πάνω από 30 νοσοκομεία της Ελλάδας, αλλά τα 35 ανθεκτικά στελέχη βρέθηκαν στα 17 από αυτά. Τα νοσοκομεία αυτά αριθμούνται από το 1-17 (N1-N17) και στο **Διάγραμμα 23** παρίστανται τα ποσοστά εμφάνισης των ανθεκτικών σε κάθε νοσοκομείο.



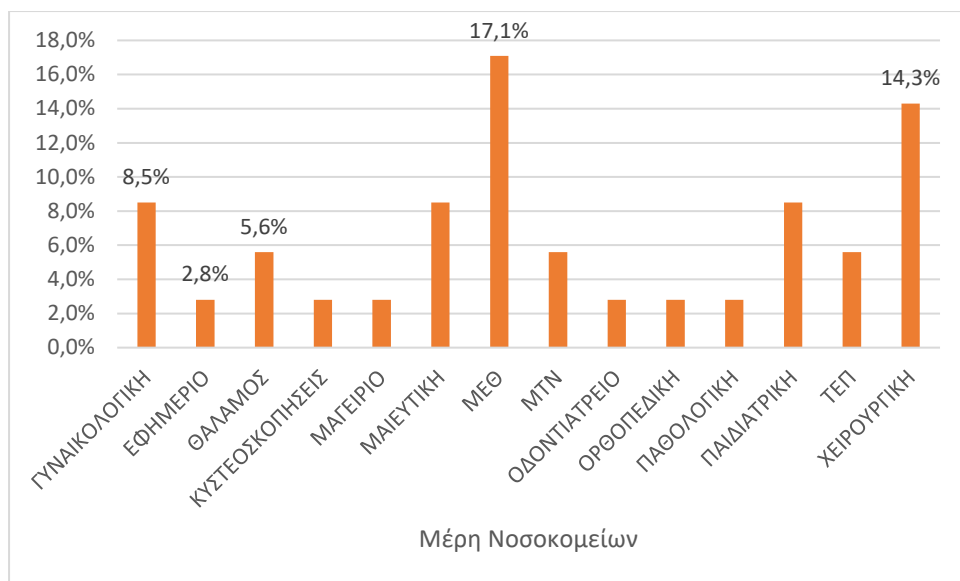
Διάγραμμα 23: Ποσοστά ανθεκτικών στελεχών ανά νοσοκομείο

Παρατηρούμε πως η πλειοψηφία των νοσοκομείων έχουν από 1 καταγεγραμμένο ανθεκτικό στέλεχος. Το ανησυχητικό είναι για τα νοσοκομεία με παραπάνω από 1 στέλεχος (N2, N3, N7, N11, N12, N13, N14, N17), οπότε θα εστιάσουμε σε αυτά.

Για τα Νοσοκομεία N7 (5,6%), N11(8,5%) και N17 (11,4%) έχουν γίνει οι αναλύσεις Vitek για στελέχη που απομονώθηκαν από νερά από τις ίδιες κλινικές και ίδια σημεία κάθε φορά, οπότε το πιο πιθανό είναι να πρόκειται για το ίδιο ανθεκτικό στέλεχος.

Για τα άλλα 5 Νοσοκομεία δεν ισχύει κάτι ανάλογο. Στο N2 (17,4%) έχουν αναλυθεί και ανιχνευθεί 6 ανθεκτικά στελέχη, εκ των οποίων τα 2 απομονώθηκαν από νερά στην Γυναικολογική Κλινική, 2 από θαλάμους ασθενών, 1 από το εφημερείο και 1 από την Αίθουσα Κυστεοσκοπήσεων. Για τα μέρη που έχουν 2 στελέχη ισχύει ο, τι ίσχυε για τα N7, 11, 17. Ωστόσο, το γεγονός ότι υπάρχουν 4 μέρη μέσα στο Νοσοκομείο 2 που υπάρχουν ανθεκτικά στελέχη υποδεικνύει ότι είτε υπάρχουν το πολύ 4 διαφορετικά ανθεκτικά στελέχη -λίγες πιθανότητες να ισχύει το σενάριο αυτό- είτε πρόκειται για τουλάχιστον 1 ανθεκτικό στέλεχος το οποίο έχει εξαπλωθεί μέσω του δικτύου ύδρευσης σε πολλές Κλινικές. Κάτι αντίστοιχο ισχύει και στα υπόλοιπα Νοσοκομεία (N3, N12, N13, N14) με ανθεκτικά στελέχη σε παραπάνω από 1 σημείο δειγματοληψίας.

Στο **Διάγραμμα 24** παρίστανται οι διάφορες κλινικές-μέρη από τα οποία έχουν απομονωθεί τα ανθεκτικά στελέχη στα 17 Νοσοκομεία της Ελληνικής Επικράτειας. Τα μέρη αυτά είναι: Γυναικολογική Κλινική, Εφημερείο, Θάλαμοι, Αίθουσα Κυστεοσκοπήσεων, Μαγειρείο, Μαιευτική, Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ), Μονάδα Τεχνητού Νεφρού (MTN), Οδοντιατρείο, Ορθοπαιδική Κλινική, Παθολογική Κλινική, Παιδιατρική Κλινική, Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών (ΤΕΠ) και Χειρουργική Κλινική.



Διάγραμμα 24: Ποσοστά ανθεκτικών στελεχών ανά μέρη όλων των νοσοκομείων.

Από το διάγραμμα αυτό γίνεται εύκολα κατανοητό πως η Χειρουργική Κλινική και η ΜΕΘ είναι τα μέρη στα οποία απομονώθηκαν τα περισσότερα ανθεκτικά στελέχη της *Pseudomonas aeruginosa*. Το γεγονός αυτό οφείλει να προβληματίσει τις Διοικήσεις των Νοσοκομείων και τον ευρύ επιστημονικό κόσμο, καθώς οι κλινικές αυτές οφείλουν να έχουν απόλυτα άσπρη συνθήκες λόγω των διεργασιών που υλοποιούνται σε αυτά τα σημεία. Συναφώς, σε αυτά τα σημεία απαντώνται συνήθως άτομα ανοσοκατεσταλμένα ή προς χειρουργείο, και η ύπαρξη του βακτηρίου αυτού μπορεί να αποβεί μοιραία.

6.3 Επανάληψη διάφορων στελεχών

Από το σύνολο των 200 στελεχών που αναλύθηκαν, υπήρχαν κάποια τα οποία ελέγχθηκαν 2 φορές. Τα περισσότερα υποβλήθηκαν 2 φορές σε ανακαλλιέργεια και λήφθηκε από 1 αποικία ανά ανακαλλιέργεια, ενώ σε 1 ανακαλλιέργεια πάρθηκαν 2 αποικίες που φύτρωσαν σε διαφορετικά σημεία (δείγμα 8). Στον **Πίνακα 12** φαίνονται αναλυτικά τα δείγματα (αριθμούνται με 1, 2,...) και οι MIC τους.

	PIP/TAZO		CEFT		IMIP		MER		TOB		CIP	
1	16	I	4	I	2	I	1	S	<=1	S	<=0.25	S
	8	I	4	I	2	I	1	S	<=1	S	<=0.25	S
2	16	I	4	I	2	I	<=0.25	S	<=1	S	<=0.25	S
	8	I	4	I	2	I	1	S	<=1	S	<=0.25	S
3	8	I	2	I	1	I	<=0.25	S	<=1	S	<=0.25	S
	8	I	2	I	1	I	<=0.25	S	<=1	S	<=0.25	S
4	16	I	4	I	1	I	<=0.25	S	<=1	S	<=0.25	S
	8	I	8	I	2	I	<=0.25	S	<=1	S	<=0.25	S
5	8	I	4	I	1	I	<=0.25	S	<=1	S	<=0.25	S
	8	I	<=1	I	1	I	0.5	S	<=1	S	<=0.25	S
6	8	I	4	I	1	I	<=0.25	S	<=1	S	<=0.25	S
	8	I	4	I	1	I	<=0.25	S	2	S	<=0.25	S

7	8	I	8	I	1	I	1	S	<=1	S	<=0.25	S
	8	I	8	I	1	I	1	S	<=1	S	<=0.25	S
8	8	I	<=1	I	1	I	4	S	2	S	<=0.25	S
	8	I	4	I	2	I	<=0.25	S	<=1	S	<=0.25	S

	PIP/TAZO		CEFT		IMIP		MER		TOB		CIP			
9	>=128	I	16	R	>=16	R	>=16	R	>=16	R	>=4	R		
	>=128	I	16	R	>=16	R	>=16	R	>=16	R	>=4	R		
	AMIK		AZT		CEFE		CEFT/AV		CEFTO/TAZO		COL		LEV	
9	>=64	R	16	R	>=32	R	>=16	R	>=32	R	2	S	>=8	R
	>=64	R	16	R	>=32	R	>=16	R	>=32	R	2	S	>=8	R

Πίνακας 12: Στελέχη που αναλύθηκαν παραπάνω φορές

Τα δείγματα 1-7 αφορούν δείγματα τα οποία έγιναν 2 φορές ανακαλλιέργεια και πάρθηκε από 1 αποικία ανά ανακαλλιέργεια (1^η κατηγορία). Το δείγμα 8 αφορά δείγμα το οποίο έγινε 1 ανακαλλιέργεια και πάρθηκαν 2 αποικίες σε διαφορετικά σημεία του τρυβλίου (2^η κατηγορία). Το δείγμα 9 είναι το ίδιο με τα 1-7, αλλά είναι από την κατηγορία των ανθεκτικών.

Η πρώτη παρατήρηση είναι ότι από την ανάλυση τις MIC των «διπλών» στελεχών δεν υπάρχουν διαφορές, δηλαδή η ερμηνεία είναι ίδια.

Από την πρώτη κατηγορία, το 2, 7 και το 9 έχουν πανομοιότυπες τιμές MIC, ενώ τα υπόλοιπα (1, 3, 4, 5, 6) έχουν σε κάποια αντιβιοτικά μικρές διαφορές που θεωρούνται αμελητέες. Αυτές οι διαφορές το πιο πιθανό είναι να οφείλονται στον τρόπο χειρισμού των δειγμάτων και στον τρόπο που πραγματοποιήθηκε η διαδικασία. Με άλλα λόγια, μπορεί στο ένα δείγμα τις στελέχους να υπήρχε άλλη τιμή θολερότητας στο ελαιώρημα που φτιάχτηκε και στο άλλο δείγμα του ίδιου στελέχους η τιμή να ήταν λίγο μεγαλύτερη ή μικρότερη, αλλά πάντα μέσα στα όρια που απαιτεί η διαδικασία.

Όσον αφορά την δεύτερη κατηγορία, δηλαδή το δείγμα 8 στο οποίο έγιναν 2 αναλύσεις με το Vitek από την ίδια ανακαλλιέργεια, οι τιμές των MIC διαφόρων αντιβιοτικών ποικίλλουν και άλλων είναι ίδιες. Και πάλι αυτές οι διαφορές θεωρούνται αμελητέες και οφείλονται πάλι στον ίδιο λόγο με αυτό που προαναφέρθηκε παραπάνω.

6.4 Μη αναλυμένα δείγματα

Τα δείγματα για τα οποία δεν βγήκε αποτέλεσμα από το Vitek οφείλονται κυρίως στα ελαιώρημα που χρησιμοποιήθηκαν για το μηχάνημα. Ο κατασκευαστής προτείνει ότι το ελαιώρημα που παρασκευάζεται πρέπει να είναι 0,5-0,64 McFarland. Κατά την παρασκευή του ελαιωρήματος τηρήθηκε απαρέγκλιτα αυτό το όριο τιμών. Ωστόσο, η *Pseudomonas aeruginosa* είναι ένα βακτήριο με περίεργο φαινότυπο καθώς μπορεί να προσκολληθεί στα τοιχώματα του δοκιμαστικού σωλήνα και να μη γίνει σωστή ανάδευση και διαλυτοποίηση με το Vortex και έτσι, να έχουμε σφάλμα στην μέτρηση. Τέλος, σε όσα δείγματα δεν βγήκε αποτέλεσμα, η διαδικασία επαναλήφθηκε.

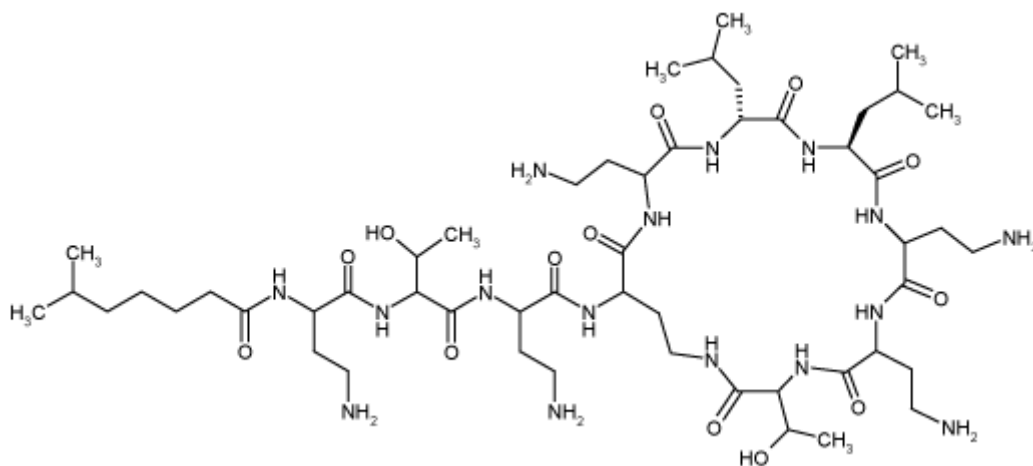
6.5 Φαινότυποι

Το μηχάνημα Vitek, όπως παρουσιάζεται στα Διαγράμματα 20 και 21, μπορεί να προτείνει πιθανό μηχανισμό αντοχής του στελέχους με βάση το αντιβιογράμμα. Τα ποσοστά των φαινότυπων παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 20 και 21. Τα wild είναι

τα ευαίσθητα στελέχη με καμία ανθεκτικότητα. Έπειτα, υπάρχουν αρκετές κατηγορίες καρβαπενεμασών που ουσιαστικά είναι παρεμφερή ένζυμα που απενεργοποιούν τις β-λακτάμες και για τον λόγο αυτό προσδίδεται ανθεκτικότητα στο βακτήριο.

6.6 Κολιστίνη

Η κολιστίνη αποτελεί ένα από τα πιο καινούρια αντιβιοτικά και ανήκει στις πολυμυξίνες. Το οξύ αυτό (**Εικόνα 35**) προσδένεται στο λιπίδιο A του λιποπολυσακχαρίτη του βακτηρίου και μεταβάλλει τα ιόντα ασβεστίου και μαγνησίου, κάνοντας ασταθές την δομή του λιποπολυσακχαρίτη. Έπειτα, η κολιστίνη εισάγει την υδροφοβική ακυλομάδα της αλυσίδας των λιπαρών οξέων και προκαλεί επέκταση της εξωτερικής μεμβράνης (OM) και τελικά, λύση του κυττάρου. (Andrade F. F., et al., 2020)



Εικόνα 35: Χημική δομή κολιστίνης (Enzo Life Sciences)

Από τα αποτελέσματα διακρίνουμε 4 (**11,4%**) στελέχη ανθεκτικά σε όλα τα αντιβιοτικά εκτός της κολιστίνης. Αυτό υποδηλώνει πως εφόσον πρέπει να εξαλειφθεί βάσει νόμου το βακτήριο από τα δίκτυα ύδρευσης των νοσοκομείων, ο μόνος τρόπος είναι η καταπολέμηση της με κολιστίνη. Σε τέτοιες περιπτώσεις φαίνεται πραγματικά το πρόβλημα που μαστίζει τα νοσοκομεία καθώς και την ανάγκη ανακάλυψης νέων αντιβιοτικών.

7. Συζήτηση

7.1 Σύγκριση με κλινικά δείγματα

Οι Olga Pappa et al. σε άρθρο που δημοσιεύτηκε το 2020 με τίτλο «Molecular Epidemiology of Multi-Drug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Hospitalized Patients in Greece» πραγματοποίησαν μοριακή ανάλυση για εύρεση γονιδίων ανθεκτικότητας και έτσι, εύρεση ανθεκτικότητας σε στελέχη *Pseudomonas aeruginosa* από 75 κλινικά δείγματα από 2 νοσοκομεία της Ελληνικής Επικράτειας. (Pappa O., 2020)

Σε σύγκριση με τα αντιβιοτικά αυτής της έρευνας, αυτά που χρησιμοποιήθηκαν και στις 2 ήταν: αμικασίνη, τομπραμυκίνη, κεφεπίμη, κεφταζιδίμη, ιμιπενέμη, μεροπενέμη και σιπροφλοξασίνη. Στον **Πίνακα 13** γίνεται σύγκριση των ποσοστών ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά αυτά. (Pappa O., 2020)

Αντιβιοτικά	Δείγματα νερού	Κλινικά δείγματα
Αμικασίνη	41,5%	57,3%
Τομπραμυκίνη	9,5%	49,3%
Κεφεπίμη	62%	72%
Κεφταζιδίμη	10%	52%
Ιμιπενέμη	14,5%	52%
Μεροπενέμη	8,5%	52%
Σιπροφλοξασίνη	8,5%	64%

Πίνακας 13: Σύγκριση ποσοστών ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά από δείγματα νερού (200) και κλινικά δείγματα (75) (Pappa O., 2020)

Όπως έχει ήδη προαναφερθεί, η *Pseudomonas aeruginosa* μπορεί να προκαλέσει διάφορα συμπτώματα ή/και νοσήματα ή ακόμα και να επιβαρύνει κατά πολύ την κατάσταση του ασθενή, φτάνοντας ακόμα και στον θάνατο. Ένας τρόπος να πραγματοποιηθεί αυτό είναι μέσω του δικτύου ύδρευσης των νοσοκομείων, καθώς είναι αποδεδειγμένο ότι το βακτήριο αυτό μπορεί να επιβιώσει με μεγάλη ευκολία εκεί.

Από τον **Πίνακα 13** παρατηρούμε μεγάλες διαφορές στα ποσοστά ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά τομπραμυκίνη, κεφταζιδίμη, ιμιπενέμη, μεροπενέμη και σιπροφλοξασίνη, ενώ αυτά για την αμικασίνη και κεφεπίμη είναι παρόμοια.

Αυτό ίσως να υποδεικνύει ότι σε καθημερινή κλινική πρακτική (κλινικά δείγματα) γίνεται αλόγιστη και άφθονη -ή τουλάχιστον μεγαλύτερη σε σχέση με τα δείγματα νερού- χρήση των αντιβιοτικών αυτών με σκοπό την καταπολέμηση ασθενειών και συμπτωμάτων, που αυτό, όμως, έχει και την σοβαρή επίπτωση εμφάνισης αντιβιοαντοχής.

Εν αντιθέσει, τα δείγματα νερού παρουσίασαν αρκετά μικρότερα ποσοστά αντοχής σε σχέση με τα κλινικά δείγματα. Αυτό ίσως υποδεικνύει ότι για τα στελέχη που βρίσκονται στα δίκτυα ύδρευσης νοσοκομείων, χρησιμοποιούνται άλλοι τρόποι καταπολέμησης, δηλαδή φυσικοί (θέρμανση) ή χημικοί (χλωρίωση). Από την άλλη, τα κλινικά δείγματα αντιμετωπίζονται με αντιβιοτικά ως γνωστόν. Επιπροσθέτως, τα μικρά αυτά ποσοστά σε σχέση με των κλινικών δειγμάτων μπορεί να οφείλεται και στο γεγονός ότι τα στελέχη που εντοπίζονται σε σχέση με τα κλινικά, που εντοπίζονται καθημερινά, να είναι λιγότερα, οπότε και να χρησιμοποιούνται αναλογικά λιγότερα αντιβιοτικά.

7.2 Έπαρξη άλλων βακτηρίων στα δίκτυα ύδρευσης νοσοκομείων

Όπως είναι γνωστό, η *Pseudomonas aeruginosa* δημιουργεί βιοφίλμ κατά την επίθεση της σε ξενιστές, αλλά και για να προστατευτεί στα διάφορα περιβάλλοντα που αποικεί. Παρ' ολ' αυτά, δεν είναι το μόνο βακτήριο που δρα με αυτόν τον τρόπο. Άλλα τέτοια βακτήρια είναι *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella spp.*, *Acinetobacter baumannii* και *Enterobacter spp.*, δημιουργώντας έτσι μια ομάδα που ονομάζεται «ESKAPE». Το ακρωνύμιο αυτό προκύπτει από την ικανότητα της ομάδας των βακτηρίων αυτών να διαφεύγουν της αντιμικροβιακής θεραπείας και των αμυντικών συστημάτων του ξενιστή και υπάρχουν πολλές αναφορές για συνεργασία τους με σκοπό την επιβίωση. Τα πιο κοινά χαρακτηριστικά τους είναι ότι προκαλούν ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις και ότι μπορούν να αποικίσουν σε διάφορες επιφάνειες και μέρη, λόγω του σχηματισμού

βιοφίλμ. Στην ίδια κατηγορία συγκαταλέγεται και η *Legionella*. (Sionov R. V. et al., 2022)

Όλα τα βακτήρια που προαναφέρθηκαν, συνεργάζονται για την απόκτηση αντοχής στα αντιβιοτικά και μακροπρόθεσμα για την επιβίωση. Ως γνωστόν, η ανθεκτικότητα αποκτάται κατά βάση με οριζόντια μεταφορά γονιδίων. Επίσης, αρκετές έρευνες και ακόμα και στην καθημερινή κλινική πρακτική εργαστηρίων, βρίσκουν σε δείγματα νερού συνδυασμούς των παραπάνω βακτηρίων, με κυριότερο τα *Pseudomonas aeruginosa*-*Legionella*.

Επιπροσθέτως, η συνεργασία και τα κοινά στοιχεία που παρατηρούνται στον σχηματισμό βιοφίλμ και τους τρόπους επίθεσης μαρτυρούνται και από τον τρόπο για προσπάθεια εξάλειψής τους. Με άλλα λόγια, οι διορθωτικές ενέργειες που λαμβάνουν χώρα στα δίκτυα ύδρευσης νοσοκομείων -και όχι μόνο- είναι σε πολύ μεγάλο βαθμό ίδιες για όλα τα βακτήρια ESKAPE, αλλά και της *Legionella*.

7.3 Άλλες χώρες

Τσεχία

Το 2022 μια ομάδα ερευνητών στην Τσεχία, έκανε παρόμοια έρευνα με στόχο την εύρεση και τον χαρακτηρισμό προφίλ ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά από νερά και λύματα νοσοκομείων (96 στο σύνολο). Για την δημιουργία αυτών των προφίλ χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιβιοτικά: πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη, κεφταζιδίμη, σιπροφλοξασίνη, μεροπενέμη, αμικασίνη και αζτρεονάμη. Στον **Πίνακα 14** παρατηρούνται τα ποσοστά ανθεκτικότητας της έρευνας αυτής με αυτής στην Τσεχία. (Rouloná N., et al., 2022)

Αντιβιοτικά	Ελλάδα	Τσεχία
Αμικασίνη	41,5%	11,9%
Πιπερακιλλίνη/Ταζομπακτάμη	10%	11,9%
Κεφταζιδίμη	10%	11,9%
Αζτρεονάμη	17,1%	5%
Μεροπενέμη	8,5%	27,1%
Σιπροφλοξασίνη	8,5%	30,5%

Πίνακας 14: Ποσοστά ανθεκτικότητας σε στελέχη στην Τσεχία (Rouloná N., et al., 2022)

Παρατηρούμε, λοιπόν, από τον παραπάνω πίνακα ότι τα ποσοστά ανθεκτικότητας των στελεχών σε πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη και κεφταζιδίμη είναι παρεμφερή. Για αμικασίνη και αζτρεονάμη τα ποσοστά είναι αρκετά μεγαλύτερα στην Ελλάδα απ' ότι στην Τσεχία, ενώ τα ποσοστά για μεροπενέμη και σιπροφλοξασίνη είναι πολύ μικρότερα στην χώρα μας.

Ωστόσο, είναι φανερό ότι το πρόβλημα αυτό της ανθεκτικότητας βακτηρίων *Pseudomonas aeruginosa* που απομονώθηκαν από νερά νοσοκομείων σε αντιβιοτικά, υπάρχει και σε άλλη χώρα της Ευρώπης.

Τέλος, ίσως είναι ανάγκη για μελέτη του ίδιου προβλήματος και σε άλλες χώρες της Ευρώπης και του κόσμου.

Ρουμανία και COVID

Σε έρευνα του 2022 στην Ρουμανία, με βάση τα αποτελέσματα τους βγήκαν κάποια πολύ σημαντικά αποτελέσματα. Οι ερευνητές έδειξαν τα προφίλ αντιβιοαντοχής κλινικών δειγμάτων (για τα αντιβιοτικά λεβοφλοξασίνη, ιμιπενέμη, μεροπενέμη, πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη, κεφταζιδίμη και αμικασίνη) την πενταετία 2017-2022 σε ετήσια βάση. Στα περισσότερα από αυτά παρατηρήθηκε μείωση του ποσοστού ανθεκτικότητας από το 2020 και μετά, δηλαδή από την εμφάνιση της πανδημίας COVID. (Coseriu R.L., et al., 2022)

Αυτό μπορεί να οφείλεται στην μείωση της χρήσης των αντιβιοτικών την περίοδο της πανδημίας λόγω των έκτακτων μέτρων που λήφθηκαν ή ακόμα και στην σχολαστική καθαρότητα των νοσοκομείων -και ειδικά των ΜΕΘ-, την αντικατάσταση και δημιουργία νέων νοσοκομειακών μονάδων. (Coseriu R.L., et al., 2022)

Κάτι ανάλογο θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί σε μελλοντικές μελέτες, δηλαδή να γίνει συσχέτιση των ποσοστών ανθεκτικότητας των στελεχών σε αντιβιοτικά -τόσο σε δείγματα νερού, όσο και σε κλινικά δείγματα-, πριν την πανδημία COVID-19 και μετά.

7.4 Μελλοντικές προσεγγίσεις

Εφόσον πλέον γνωρίζουμε τα προφίλ ανθεκτικότητας των 200 αυτών στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* που απομονώθηκαν από τα δίκτυα ύδρευσης νοσοκομείων της Ελλάδας την πενταετία 2017-2022, είναι δυνατό να πραγματοποιηθούν στο μέλλον νέες πειραματικές προσεγγίσεις για την διεύρυνση του σημαντικού θέματος αυτού.

Μια προοπτική είναι η εύρεση γονιδίων ανθεκτικότητας που προσέδωσαν την αντοχή των βακτηρίων στα αντιβιοτικά που παρουσιάστηκε η αντοχή. Αυτό θα βοηθήσει ιδιαίτερα στην γενετική και γονιδιωματική εξέλιξη των γνώσεων μας πάνω στο βακτήριο αυτό.

Μια ακόμη μελλοντική προοπτική είναι η εύρεση και η εξακρίβωση του αν τα ανθεκτικά αυτά στελέχη που βρίσκονται στα δίκτυα ύδρευσης νοσοκομείων, ευθύνονται για τις μολύνσεις των ασθενών. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω σύγκρισης με μοριακές τεχνικές των δειγμάτων νερού και των κλινικών δειγμάτων. Με τον ίδιο τρόπο μπορεί να εξακριβωθεί και αν τα ανθεκτικά στελέχη ενός Νοσοκομείου με απομόνωση τους σε παραπάνω από 1 μέρος, είναι το ίδιο ή πρόκειται για άλλο ανθεκτικό στέλεχος.

Επιπλέον, η πλήρης κατανόηση των μηχανισμών και γονιδίων ανθεκτικότητας που προσδίδουν την αντιβιοαντοχή θα μπορούσε να οδηγήσει στην θεωρητική αλλά και πειραματική διερεύνηση της κατασκευής και στην συνέχεια παραγωγής συνθετικών αντιβιοτικών. Αυτό θα βοηθούσε αρκετά αυτήν την εποχή, καθώς όπως έχει γίνει αντιληπτό, η αντοχή στα κοινά και γνωστά αντιβιοτικά έχει αυξηθεί κατακόρυφα. Γι' αυτό και πρέπει να εκδοθούν νέα αντιβιοτικά άγνωστα προς τα βακτήρια.

Ακόμη, εκτός από την παραγωγή νέων και συνθετικών αντιβιοτικών θα μπορούσε να γίνουν πειραματικές μελέτες για να βρεθούν οι πιο ισχυροί συνδυασμοί αντιβιοτικών που να καταπολεμούσαν αποτελεσματικά το παθογόνο αυτό βακτήριο. Στο πλαίσιο αυτό, μια άλλη μελλοντική προσέγγιση θα μπορούσε να είναι η νομιμοποίηση κάποιων

εναλλακτικών θεραπειών (βλ. Εναλλακτικές Θεραπείες), όπως για παράδειγμα τα κοκτέιλ φάγων.

Επιπροσθέτως, γνωρίζοντας γενικά ότι στις β-λακτάμες υπάρχουν οι μεγαλύτερες αντοχές από τα βακτήρια αυτά εξαιτίας στην πλειοψηφία των περιπτώσεων των β-λακταμασών, θα μπορούσε να αποτελεί μελλοντική έρευνα ο σχεδιασμός και η παρασκευή αναστολέων των β-λακταμασών, οι οποίοι θα συγχωρηγούνται με τις β-λακτάμες.

Τέλος, μια άλλη οπτική είναι αυτή της «ανακύκλωσης» των αντιβιοτικών. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, οι μεταλλάξεις που προκαλούν αντιβιοαντοχή μπορεί να μειωθούν υπό το φάσμα της εξέλιξης. Με άλλα λόγια, η απουσία χορήγησης των κοινών αντιβιοτικών θα μπορούσε να βοηθήσει στην εξάλειψη των στελεχών με μεταλλάξεις που δίνουν αντοχή και στην αντικατάσταση τους -εξελικτικά, λόγω φυσικής επιλογής- από στελέχη που δεν έχουν στο γονιδίωμα τους τέτοια μεταλλάγματα. (Glen K. A. et al., 2021)

8. Σύνοψη

Κλείνοντας αυτήν την ερευνητική εργασία, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η *Pseudomonas aeruginosa* αποτελεί μια από τις σημαντικότερες απειλές για την υγεία και την ζωή ασθενών σε νοσοκομεία. Το βακτήριο αυτό είναι πανταχού παρόν και δεν μπορεί να λείπει από το νερό και τα δίκτυα ύδρευσης των νοσοκομείων. Αναντίρρητα, για τον λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η ανίχνευση της, η δημιουργία προφίλ ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά και η καταπολέμηση της με παραδοσιακούς και εναλλακτικούς νέους τρόπους.

9. Βιβλιογραφία

- Abutaleb A., Kottiril S., Hepatitis A: Epidemiology, Natural History, Unusual Clinical Manifestations, and Prevention. *Gastroenterol Clin North Am.* 2020 Jun;49(2):191-199. doi: 10.1016/j.gtc.2020.01.002.
- Aislinn D. R.-N., Benjamin J. K., Mylonakis E., Belenky P., Phage Therapy: a Step Forward in the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections, 2023, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, doi: 10.1128/MMBR.00044-18
- Alcorn J. L., Chapter 4 - Pulmonary Surfactant Trafficking and Homeostasis, *Lung Epithelial Biology in the Pathogenesis of Pulmonary Disease*, Academic Press, 2017, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803809-3.00004-X>.
- Anantharajah A., Mingeot-Leclercq, M.-P., & Van Bambeke, F. (2016). *Targeting the Type Three Secretion System in Pseudomonas aeruginosa*. *Trends in Pharmacological Sciences*, 37(9), 734–749. doi: 10.1016/j.tips.2016.05.011
- Andrade F. F., et al. “Colistin Update on Its Mechanism of Action and Resistance, Present and Future Challenges.” *Microorganisms*, vol. 8, no. 11, 2 Nov. 2020, p. 1716, <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111716>.

- Babič N. M., Gostinčar C, Gunde-Cimerman N. Microorganisms populating the water-related indoor biome. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020 Aug;104(15):6443-6462. doi: 10.1007/s00253-020-10719-4.
- Beata K. and Dudek-Wicher R. “The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance.” *Pathogens*, vol. 10, no. 2, 4 Feb. 2021, p. 165, <https://doi.org/10.3390/pathogens10020165>.
- Brown A. N., Smith K., Samuels T. A., Lu J., O. Obare S., Scott M. E., Nanoparticles Functionalized with Ampicillin Destroy Multiple-Antibiotic-Resistant Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter aerogenes* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, 2012, American Society for Microbiology DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.06513-11>
- Carek P. J., et al. “Diagnosis and Management of Osteomyelitis.” *American Family Physician*, vol. 63, no. 12, 15 June 2001, pp. 2413–2421, www.aafp.org/pubs/afp/issues/2001/0615/p2413.html.
- CDC. “Centers for Disease Control and Prevention.” *Centers for Disease Control and Prevention*, U.S. Department of Health & Human Services, 2022, www.cdc.gov/.
- CDC. “What You Should Know about Antibiotics.” *Centers for Disease Control and Prevention*, 14 Apr. 2021, www.cdc.gov/antibiotic-use/q-a.html#:~:text=What%20is%20an%20antibiotic%3F.
- Chen H, Yang L, Cheng L, Hu XH, Shen YM. Distribution and drug resistance of pathogens in burn patients in China from 2006 to 2019. *World J Clin Cases.* 2021 Apr 6;9(10):2228-2237. doi: 10.12998/wjcc. v9.i10.2228.
- Chen X, Cheng F, Liu Y, Zhang L, Song L, Cai X, You T, Fan X, Wang D, Gong A, Zhu H. Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 exhibit distinct regulation of cancer cell stemness mediated by cell death-induced high-mobility group box 1. *EBioMedicine.* 2019 Feb; 40:135-150. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.12.016
- Chitambar CR. Medical Applications and Toxicities of Gallium Compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 2010; 7(5):2337-2361. <https://doi.org/10.3390/ijerph7052337>
- Cissé G. Food-borne and water-borne diseases under climate change in low- and middle-income countries: Further efforts needed for reducing environmental health exposure risks. *Acta Trop.* 2019 Jun; 194:181-188. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.03.012.
- CM0003, Nutrient Agar | Oxoid - Product Detail. *Oxoid.com*, 2019, www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0003.
- Colistin. Sulfate - Alx-380-272 - Enzo Life Sciences. *Www.enzolifesciences.com*, www.enzolifesciences.com/alx-380-272/colistin--sulfate/. Accessed 26 June 2023.
- Coseriu, R.L.; Vintilă, C.; Mare, A.D.; Ciurea, C.N.; Toghianel, R.O.; Cighir, A.; Simion, A.; Man, A. Epidemiology, Evolution of Antimicrobial Profile and Genomic Fingerprints of *Pseudomonas aeruginosa* before and during COVID-19: Transition from Resistance to Susceptibility. *Life* 2022. <https://doi.org/10.3390/>

- Dauner M, Skerra A. Scavenging Bacterial Siderophores with Engineered Lipocalin Proteins as an Alternative Antimicrobial Strategy. *Chembiochem*. 2020 Mar 2;21(5):601-606. doi: 10.1002/cbic.201900564
- de Sousa T., Hébraud M, Dapkevicius MLNE, Maltez L, Pereira JE, Capita R, Alonso-Calleja C, Igrejas G, Poeta P. Genomic and Metabolic Characteristics of the Pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 29;22(23):12892. doi: 10.3390/ijms222312892.
- de Zoete MR, Palm NW, Zhu S, Flavell RA. Inflammasomes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014 Oct 16;6(12): a016287. doi: 10.1101/cshperspect. a016287.
- Decker B., Palmore T. Hospital water and opportunities for infection prevention. *Curr Infect Dis Rep*. 2014 Oct;16(10):432. doi: 10.1007/s11908-014-0432-y.
- Elbehiry A, Aldubaib M, Abalkhail A, Marzouk E, ALbeloushi A, Moussa I, Ibrahim M, Albazie H, Alqarni A, Anagreyah S, Alghamdi S, Rawway M. How MALDI-TOF Mass Spectrometry Technology Contributes to Microbial Infection Control in Healthcare Settings. *Vaccines*. 2022; 10(11):1881. <https://doi.org/10.3390/vaccines10111881>
- Eucast: New S, I and R Definitions. *Www.eucast.org*, www.eucast.org/newsiandr.
- Feeley J., “Details - Public Health Image Library (PHIL).” *Phil.cdc.gov*, 1978, phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=2137.
- Fiorillo L., Zucker M, Sawyer D., Lin A.N., The *Pseudomonas* Hot-Foot Syndrome, *N. Engl. J. Med.*, 2001, DOI: 10.1056/NEJM200108023450504
- Florez C, Raab JE, Cooke AC, Schertzer JW. Membrane Distribution of the *Pseudomonas* Quinolone Signal Modulates Outer Membrane Vesicle Production in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*. 2017 Aug 8;8(4):e01034-17. doi: 10.1128/mBio.01034-17.
- Gellatly S. L., Hancock R. E.W., *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses, *Pathogens and Disease*, Volume 67, Issue 3, April 2013, Pages 159–173, <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12033>
- George T, Brady MF. Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA) [Updated 2022 Jun 27]. 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK565883/>
- Glen K. A. and Iain L. L. “ β -Lactam Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Current Status, Future Prospects.” *Pathogens*, vol. 10, no. 12, 18 Dec. 2021, p. 1638, <https://doi.org/10.3390/pathogens10121638>.
- Grace A, Sahu R, Owen DR, Dennis VA. *Pseudomonas aeruginosa* reference strains PAO1 and PA14: A genomic, phenotypic, and therapeutic review. *Front Microbiol*. 2022 Oct 13; 13:1023523. doi: 10.3389/fmicb.2022.1023523.
- Great Ormond Street Hospital, and Great North Children’s Hospital. “Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS).” *GOSH Hospital Site*, Apr. 2018, [www.gosh.nhs.uk/conditions-and-treatments/conditions-we-treat/autoimmune-lymphoproliferative-syndrome-alps/#:~:text=Autoimmune%20lymphoproliferative%20syndrome%20\(ALPS\)%20is.](http://www.gosh.nhs.uk/conditions-and-treatments/conditions-we-treat/autoimmune-lymphoproliferative-syndrome-alps/#:~:text=Autoimmune%20lymphoproliferative%20syndrome%20(ALPS)%20is.)

- Habboush Y, Guzman N. Antibiotic Resistance. [Updated 2022 Jun 23]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513277/>
- Irrera N, Russo M, Pallio G, Bitto A, Mannino F, Minutoli L, Altavilla D, Squadrito F. The Role of NLRP3 Inflammasome in the Pathogenesis of Traumatic Brain Injury. *Int J Mol Sci*. 2020 Aug 27;21(17):6204. doi: 10.3390/ijms21176204.
- Jiang X., Zhang H., Wang X., Zhang X., Ding K. Comprehensive Analysis of the Association between Human Diseases and Water Pollutants. *Int J Environ Res Public Health*. 2022 Dec 8;19(24):16475. doi: 10.3390/ijerph192416475.
- Jurado-Martín I, Sainz-Mejías M, McClean S. *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 18;22(6):3128. doi: 10.3390/ijms22063128
- Jurado-Martín I, Sainz-Mejías M, McClean S. *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 18;22(6):3128. doi: 10.3390/ijms22063128.
- Kerr K. G., Snelling A. M., *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *Journal of Hospital Infection*, 2009, doi: 10.1016/j.jhin.2009.04.020
- Khasheii B., Mahmoodi P., Mohammadzadeh A., Siderophores: Importance in bacterial pathogenesis and applications in medicine and industry, *Microbiological Research*, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126790>.
- Kon K. “Nanoparticles in Drug Delivery, Conceptual Illustration - Stock Image - F036/7189.” *Science Photo Library*, www.sciencephoto.com/media/1275701/view/nanoparticles-in-drug-delivery-conceptual-illustration.
- Kristensen J.H., Karsdal M.A., Chapter 30 - Elastin, *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin*, Academic Press, 2016, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809847-9.00030-1>.
- Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell*. 2015 Jan;6(1):26-41. doi: 10.1007/s13238-014-0100-x.
- Ma L, Conover M, Lu H, Parsek MR, Bayles K, Wozniak DJ. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathog*. 2009 et al., Mar;5(3):e1000354. doi: 10.1371/journal.ppat.1000354.
- Mann EE, Wozniak DJ. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol Rev*. 2012 Jul;36(4):893-916. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00322.x
- Mehtar, S. “Hospital Water - ISID.” *International Society for Infectious Diseases*, 27 June 2019, isid.org/guide/infectionprevention/hospital-water/.
- Melvin A. C., “Eravacycline.” *New Drug Approvals*, 1 Aug. 2017, newdrugapprovals.org/2017/08/01/eravacycline/.
- Mena K. D., Gerba C. P., (2009). *Risk Assessment of Pseudomonas aeruginosa in Water. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 71–115. doi:10.1007/978-1-4419-0032-6_3

- Microbe Notes, 2019
- Momodu II, Savaliya V. Septic Arthritis. [Updated 2022 Jul 4]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538176/>
- NIAID Primary Immune Deficiency Clinic. “Primary Immune Deficiency Diseases (PIDDs) | NIH: National Institute of Allergy and Infectious Diseases.” *Www.niaid.nih.gov*, 21 June 2016, www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/primary-immune-deficiency-diseases
- Pandey P., Kass P., Soupir M., Biswas S., Singh V. Contamination of water resources by pathogenic bacteria. *AMB Express*. 2014 Jun 28; 4:51. doi: 10.1186/s13568-014-0051-x.
- Pang Z., Raudonis R., Glick B. R., Lin T. J., Cheng Z., Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies, *Biotechnology Advances*, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>
- Pappa O., et al. “Molecular Epidemiology of Multi-Drug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Hospitalized Patients in Greece.” *Microorganisms*, vol. 8, no. 11, 24 Oct. 2020, p. 1652, <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111652>. Accessed 7 Dec. 2020.
- Parry C. M., Hien T. T., Dougan G., White N. J., and Farrar J. J., Typhoid Fever. *N. Engl. J. Med.*, 2002. DOI: 10.1056/NEJMra020201
- Poirel L., Lambert T., Türkoglu S., Ronco E., Gaillard J.-L., Nordmann P., Characterization of Class 1 Integrons from *Pseudomonas aeruginosa* That contain the blaVIM-2Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase Gene and of Two Novel Aminoglycoside Resistance Gene Cassettes, 2001, American Society for Microbiology, <https://doi.org/10.1128/aac.45.2.546-552.2001>
- Pruthi S., “Endocarditis - Symptoms and Causes.” *Mayo Clinic*, 25 June 2022, www.mayoclinic.org/diseases-conditions/endocarditis/symptoms-causes/syc-20352576#:~:text=Endocarditis%20occurs%20when%20bacteria%20or.
- *Pseudomonas aeruginosa* Was Growth in Ceftrimide Agar. *IStock*, 11 Sept. 2019, www.istockphoto.com/photo/pseudomonas-aeruginosa-was-growth-in-ceftrimide-agar-gm1173815939-326191329. Accessed 25 June 2023.
- Ramírez-Castillo, Loera-Muro A., Jacques M., Garneau P., Avelar-González J., Harel J., Guerrero-Barrera A. Waterborne pathogens: detection methods and challenges. *Pathogens*. 2015 May 21;4(2):307-34. doi: 10.3390/pathogens4020307.
- Reuter et al. interfering with Bacterial Quorum sensing. *Perspectives in Medicinal Chemistry* 2016;8 1–15 doi: 10.4137/PMc.s13209
- Reynolds D, Kollef M. The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: An Update. *Drugs*. 2021 Dec;81(18):2117-2131. doi: 10.1007/s40265-021-01635-6.
- Reznikoff W.S., Transposable Elements, *Encyclopedia of Microbiology* (Third Edition), Academic Press, 2009, <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00017-1>.

- Roulová N., et al. “Antibiotic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Hospital Wastewater in the Czech Republic.” *Journal of Water and Health*, vol. 20, no. 4, 1 Apr. 2022, pp. 692–701, <https://doi.org/10.2166/wh.2022.101>.
- Sagar A. “Blood Agar- Composition, Preparation, Uses and Pictures.” *Microbiology Info.com*, 10 Aug. 2022, microbiologyinfo.com/blood-agar-composition-preparation-uses-and-pictures/.
- Sana TG, Berni B, Bleves S. The T6SSs of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PAO1 and Their Effectors: Beyond Bacterial-Cell Targeting. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016 Jun 9; 6:61. doi: 10.3389/fcimb.2016.00061.
- Sara T. L., “Keratitis.” *Www.hopkinsmedicine.org*, 2020 www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/keratitis#:~:text=Keratitis%2C%20also%20known%20as%20a.
- Sarges E., Rodrigues Y., Furlaneto I., de Melo M., Brabo G., Lopes K., Quaresma A., Lima L., Lima K. *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion System Virulotypes and Their Association with Clinical Features of Cystic Fibrosis Patients. *Infect Drug Resist*. 2020 Oct 22;13:3771-3781. doi: 10.2147/IDR.S273759.
- Sausseureau E., Debarbieux L., Chapter 4 - Bacteriophages in the Experimental Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Mice, Academic Press, 2012, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394438-2.00004-9>.
- Sionov R. V. and Doron S. “Targeting the Holy Triangle of Quorum Sensing, Biofilm Formation, and Antibiotic Resistance in Pathogenic Bacteria.” *Microorganisms*, vol. 10, no. 6, 16 June 2022, p. 1239, <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061239>.
- Sjöberg T., S. Mzezewa, K. Jönsson, L. Salemark, Immune response in burn patients in relation to HIV infection and sepsis, *Burns*, 2004, <https://doi.org/10.1016/j.burns.2004.03.014>.
- Sommer LM, Johansen HK, Molin S. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and adaptation to complex dynamic environments. *Microb Genom*. 2020 May;6(5): e000370. doi: 10.1099/mgen.0.000370.
- Stock J.B., and Baker M.D. “Chemotaxis - an Overview | ScienceDirect Topics.” *Www.sciencedirect.com*, 2009, www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/chemotaxis.
- Stover C., Pham, X., Erwin, A. *et al*. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406, 959–964 (2000). <https://doi.org/10.1038/35023079>
- Surveillance Atlas of Infectious Diseases. *Atlas.ecdc.europa.eu*, atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx.
- Tan RM, Kuang Z, Hao Y, Lau GW. Type IV pilus of *Pseudomonas aeruginosa* confers resistance to antimicrobial activities of the pulmonary surfactant protein-A. *J Innate Immun*. 2014;6(2):227-39. doi: 10.1159/000354304.
- Thermofisher, <https://www.thermofisher.com>

- Tumbarello M., et al. “Clinical Outcomes of *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia in Intensive Care Unit Patients.” *Intensive Care Medicine*, vol. 39, no. 4, 1 Feb. 2013, pp. 682–692, <https://doi.org/10.1007/s00134-013-2828-9>.
- UniProt. *Www.uniprot.org*, www.uniprot.org/uniprotkb/O08498/entry#structure. Accessed 25 June 2023.
- Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T*. 2015 Apr;40(4):277-83.
- VITEK® 2 COMPACT | Pioneering Diagnostics. *Www.biomerieux.com*, www.biomerieux.com/corp/en/our-offer/industry-products/vitek-2-compact-automated-microbial-identification.html. Accessed 25 June 2023.
- Vorobjeva NV, Chernyak BV. NETosis: Molecular Mechanisms, Role in Physiology and Pathology. *Biochemistry (Mosc)*. 2020 Oct;85(10):1178-1190. doi: 10.1134/S0006297920100065.
- Vuksanaj K., “Phage Therapy Starts Realizing Its Long-Deferred Potential.” *GEN - Genetic Engineering and Biotechnology News*, 9 Aug. 2022, www.genengnews.com/topics/translational-medicine/infectious-diseases/phage-therapy-starts-realizing-its-long-deferred-potential/.
- Warren D., Laxmikanthan G., Landy A., *Integrase Family of Site-Specific Recombinases*, *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)*, Academic Press, 2013, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00801-9>.
- Wei Q, Ma LZ. Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci*. 2013 Oct 18;14(10):20983-1005. doi: 10.3390/ijms141020983.
- Wei Q, Ma LZ. Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci*. 2013 Oct 18;14(10):20983-1005. doi: 10.3390/ijms141020983.
- Williams M., “Details - Public Health Image Library (PHIL).” *Phil.cdc.gov*, 2009, phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=11122.
- Wilson, Mina G., and Shivlal Pandey. “[Figure, Microscopic Image of Gram-Negative *Pseudomonas*...].”, 28 Aug. 2022, www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557831/figure/article-27947.image.f1/?report=objectonly. Accessed 25 June 2023.
- Wood S., Goldufsky J., Seu M., Dorafshar A., Shafikhani S. *Pseudomonas aeruginosa* Cytotoxins: Mechanisms of Cytotoxicity and Impact on Inflammatory et al., Responses. *Cells*. 2023 Jan 3;12(1):195. doi: 10.3390/cells12010195.
- Wood S., Kuzel T., Shafikhani S. *Pseudomonas aeruginosa*: Infections, Animal Modeling, and Therapeutics. *Cells*. 2023 Jan 3;12(1):199. doi: 10.3390/cells12010199.
- Wright G. D., Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.002>.
- Zhang S, McCormack FX, Levesque RC, O'Toole GA, Lau GW. The flagellum of *Pseudomonas aeruginosa* is required for resistance to clearance by surfactant protein A. *PLoS One*. 2007 Jun 27;2(6): e564. doi: 10.1371/journal.pone.0000564.