



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθύντρια: Καθηγήτρια Πετεινάκη Ευθυμία

Διδακτορική Διατριβή

**«*bla*_{NDM} Gram αρνητικά βακτήρια σε ανθρώπους
και ζώα στην Κεντρική Ελλάδα»**

Υπό

ΤΣΙΑΠΟΥΝΙΔΑΚΗ ΚΑΤΕΡΙΝΑΣ

Βιοχημικός-Βιοτεχνολόγος

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση του Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2024

© 2024 ΤΣΙΛΙΠΟΥΝΙΔΑΚΗ ΚΑΤΕΡΙΝΑ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932).

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

- | | |
|---|--|
| 1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπουσα) | Πετεινάκη Ευθυμία
Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας-Κλινικής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας |
| 2^{ος} Εξεταστής | Μπιλλίνης Χαράλαμπος
Καθηγητής Ιολογίας-Ιογενών Νοσημάτων, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας |
| 3^{ος} Εξεταστής | Νταλέκος Ν. Γεώργιος
Καθηγητής Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας |
| 4^{ος} Εξεταστής | Μυριαγκού Παρασκευή
Ερευνήτρια Α-Διευθύντρια Ερευνών, Εργαστήριο Βακτηριολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ |
| 5^{ος} Εξεταστής | Παπαγιαννίτης Κωνσταντίνος
Μόνιμος επίκουρος καθηγητής Ιατρικής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας |
| 6^{ος} Εξεταστής | Κώτση Παρασκευή
Επίκουρος καθηγήτρια Ιατρική των Μεταγγίσεων, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας |
| 7^{ος} Εξεταστής | Φθενάκης Χ. Γεώργιος
Καθηγητής Φυσιοπαθολογίας της Αναπαραγωγής των Ζώων, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας |

Η μελέτη που περιγράφεται στην εξής διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας του Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η παρούσα μελέτη συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση και τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Καινοτομίας, Υπουργείο Ανάπτυξης & Επενδύσεων, στα πλαίσια του έργου «Εφαρμογή καινοτόμων τεχνολογιών για την διερεύνηση και χαρακτηρισμό Εντεροβακτηριοειδών που παράγουν ευρέως φάσματος β-λακταμάσες και καρβαπενεμάσες σε ανθρώπους και ζώα (CARBATECH)», του Προγράμματος Διμερούς Συνεργασίας E&T Ελλάδας-Γερμανίας 2017.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή αποτελεί μία προσπάθεια περιγραφής και ανάλυσης πειραμάτων που διεξήχθησαν στο Εργαστήριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Κατά την διάρκεια της εκπόνησης της μελέτης αυτής βρήκα καθοδηγητές, συνεργάτες και φίλους του οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα της διατριβής μου Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας και Κλινικής Μικροβιολογίας κυρία Πετεινάκη Ευθυμία και να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου που με δέχτηκε στο Εργαστήριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας πριν μερικά χρόνια στα πλαίσια των μεταπτυχιακών μου σπουδών. Με την εμπιστοσύνη που μου έδειξε μου έδωσε την ευκαιρία να έρθω σε επαφή με ένα αντικείμενο που δεν γνώριζα και δεν φανταζόμουν ότι θα το αγαπούσα τόσο πολύ σήμερα. Θέλω να την ευχαριστήσω για όλες τις ευκαιρίες που μου έδωσε αλλά και γιατί με την συνεχή στήριξη, καθοδήγηση, την υπομονή και την έμπρακτη παρουσία της όλα αυτά τα χρόνια μου έδειξε ότι πρέπει να προβληματίζομαι, να προσπαθώ και να εξελίσσομαι.

Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Ιολογίας και Ιογενών Νοσημάτων του Τμήματος Κτηνιατρικής κύριο Μπιλλίνη Χαράλαμπο για την άψογη και αποδοτική συνεργασία όλα αυτά τα χρόνια, για την ουσιαστική βοήθεια του στην συλλογή και χειρισμό δειγμάτων ζωικής προέλευσης, τις χρήσιμες παρατηρήσεις και τον χρόνο που διέθεσε.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Παθολογίας κύριο Νταλέκο Ν. Γεώργιο, για την βοήθεια του και τον χρόνο που διέθεσε ως μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής καθώς και για την αποδοτική συνεργασία.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, την Διευθύντρια Ερευνών του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ κυρία Μυριαγκού Παρασκευή, τον Μόνιμο Επίκουρο Καθηγητή Ιατρικής Μικροβιολογίας κύριο Παπαγιαννίτη Κωνσταντίνο, την Επίκουρο Καθηγήτρια Ιατρικής των Μεταγγίσεων κυρία Κώτη Παρασκευή και τον Καθηγητή Φυσιοπαθολογίας της Αναπαραγωγής των Ζώων του Τμήματος Κτηνιατρικής κύριο Φθενάκη Γεώργιο.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να αναφερθώ στην Ερευνήτρια Α-Διευθύντρια Ερευνών του Ινστιτούτου Παστέρ κυρία Μυριαγκού Παρασκευή και να την ευχαριστήσω θερμά για την σημαντική βοήθεια της, τον χρόνο που αφιέρωσε για την ανάλυση των ευρημάτων αλλά και για όλες τις γνώσεις που μου μετέδωσε και συμβουλές της. Ξεχωριστά θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κύριο Φθενάκη Γεώργιο για την εποικοδομητική συνεργασία όλα αυτά τα χρόνια αλλά και για την πολύτιμη βοήθεια του και τον χρόνο του.

Θα ήταν μεγάλη παράλειψη αν δεν ευχαριστούσα θερμά την Ιατρό Μάλλη Εργίνα για την καθοδήγηση της, τις γνώσεις που μου παρείχε και την αμέριστη υποστήριξη της. Με τον χρόνο που μου διέθεσε με βοήθησε να δω και να κατανοήσω καλύτερα αυτόν τον νέο για μένα επιστημονικό κόσμο, συμβάλλοντας σημαντικά στην εξέλιξή μου.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω την Ζωή Φλώρου για την άψογη συνεργασία που είχαμε όλα αυτά τα χρόνια αλλά και για τις γνώσεις που μου παρείχε. Την ευχαριστώ για όλη την βοήθεια της και την υποστήριξη της τόσο στο εγχείρημα αυτό αλλά και σε όλα τα αντικείμενα στα οποία συνεργαστήκαμε.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ξεχωριστά τους φίλους και συνεργάτες Λεπιντάτου Δήμητρα, Αρκούδα Αμαλία, Γκουντινούδη Χρήστο και Ιμβριώτη Κώστα με τους οποίους συνεργαστήκαμε αμέτρητες ώρες στα χρόνια της καραντίνας, που με βοήθησαν και με στήριξαν και συνεχίζουν μέχρι και σήμερα.

Φυσικά δεν μπορώ να παραλείψω την αγάπη και συμπαράσταση όλα αυτά τα χρόνια από τις φίλες και συμφοιτήτριες μου Κωνσταντίνα, Χριστίνα, Ράνια, Βίκυ και Μαρία, οι οποίες με υποστήριζαν και συνεχίζουν να το κάνουν. Τις ευχαριστώ για τις όμορφες στιγμές και για τις ατελείωτες (επιστημονικές και μη-) συζητήσεις.

Ξεχωριστά θέλω να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου τον σύζυγό μου Κωνσταντίνο, όπου με την αμέριστη αγάπη του, την υπομονή του και την κατανόηση του με βοήθησε και με στήριξε στην προσπάθεια μου όλα αυτά τα χρόνια. Τον ευχαριστώ για όλες τις υπέροχες στιγμές αλλά και για την συμπαράσταση του σε όλες τις δύσκολες στιγμές.

Τίποτα όμως από όλα αυτά δεν θα είχε πραγματοποιηθεί χωρίς την αγάπη και την υποστήριξη από την οικογένεια μου. Οφείλω αμέριστη ευγνωμοσύνη στους γονείς μου και τον αδελφό μου που με στήριξαν όλα αυτά τα χρόνια με κάθε δυνατό τρόπο και συνεχίζουν να το κάνουν και στους οποίους οφείλω την μέχρι τώρα πορεία μου.

Τσιλιπουνιδάκη Κατερίνα

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

ΤΣΙΛΙΠΟΥΝΙΔΑΚΗ ΚΑΤΕΡΙΝΑ

Ημερομηνία Γέννησης ***
Τόπος Γέννησης ***
Τηλέφωνο επικοινωνίας ***
e-mail tsilipoukat@gmail.com

Αφαίρεση προσωπικών δεδομένων
(Υπηρεσία Βιβλιοθήκης &
Πληροφόρησης Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας)

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

- 02/11/2018–Σήμερα Υποψήφια Διδάκτωρ, Εργαστήριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα (Ελλάδα). Τίτλος Ερευνητικής Διατριβής: “ *blaNDM Gram αρνητικά βακτήρια σε ανθρώπους και ζώα στην Κεντρική Ελλάδα* ”
- 2016–2017 Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης του ΜΠΣ “ Κλινικές εφαρμογές της Μοριακής Ιατρικής ” Εργαστήριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα (Ελλάδα). Τίτλος διπλωματικής εργασίας: “ *Επιδημιολογική μελέτη στελεχών χρυσίζοντα σταφυλόκοκκου που απομονώθηκαν από υποκλινική μαστίτιδα στα πρόβατα* ”. Βαθμός αποφοίτησης: 9.47
- 2010–2016 Πτυχίο Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Τίτλος διπλωματικής Εργασίας: “ *Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες σε ασθενείς με πολλαπλά τραύματα και συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση* ”. Βαθμός αποφοίτησης: 6.89

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

- 12/2018-04/2021 Τίτλος Πρότασης: «Εφαρμογή καινοτόμων τεχνολογιών για τη διερεύνηση και χαρακτηρισμό Εντεροβακτηριοειδών που παράγουν ευρέως φάσματος β-λακταμάσες και καρβαπενεμάσες σε ανθρώπους και ζώα (CARBATECH)» T2DGE-0944, του Διμερούς και Πολυμερούς Προγράμματος Συνεργασίας E & T Ελλάδος-Γερμανίας 2017.
- 05/2021-09/2021

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΈΡΓΑ ΜΕ ΣΥΜΒΑΣΗ

- 30/10/2023-31/12/2023 Τίτλος έργου: Επίπτωση της φυματίωσης σε άτομα υψηλού επιδημιολογικού κινδύνου στην Θεσσαλία. Αντικείμενο έργου: Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων, καλλιέργεια και μοριακή ανίχνευση-ταυτοποίηση Μυκοβακτηριδίου φυματίωσης
- 08/11/2022-16/10/2023 Τίτλος έργου: Εργαστήριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας. Αντικείμενο έργου: Ανίχνευση ιών του αναπνευστικού με μοριακές τεχνικές.
- 9/2/2022-31/08/2022 Τίτλος έργου: Μοριακή Διάγνωση του νέου κορονοϊού. Αντικείμενο έργου: Εργαστηριακή διερεύνηση και επιτήρηση κρουσμάτων λοίμωξης τον ιό SARS-CoV-2
- 27/10/2021-31/12/2021 Τίτλος έργου: Εργαστήριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας. Αντικείμενο έργου: Μοριακή διάγνωση του νέου κορονοϊού.
- 01/10/2020-31/12/2020 Τίτλος έργου: Μοριακή Διάγνωση του νέου κορονοϊού. Αντικείμενο έργου: Εργαστηριακή διερεύνηση και επιτήρηση κρουσμάτων λοίμωξης τον ιό SARS-CoV-2
- 08/04/2020-30/06/2020 Τίτλος έργου: Εργαστήριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας. Αντικείμενο έργου: Μοριακή διάγνωση του νέου κορονοϊού.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Longitudinal Study of Antibiotic Resistance of Staphylococci from Cases of Subclinical Mastitis in Sheep in Greece: Incidence and Risk Factors Charalambia K. Michael, Daphne T. Lianou, Katerina Tsilipounidaki, Zoe Florou, Natalia G. C. Vasileiou, Vasia S. Mavrogianni, Efthymia Petinaki and George C. Fthenakis PMID: 38136737 PMCID: PMC10741230 DOI: 10.3390/antibiotics12121703
2. The Molecular Characterization of *bla*_{NDM-1}-Positive *Acinetobacter baumannii* Isolated in Central Greece. Tsilipounidaki K, Gkoutinoudis CG, Florou Z, Fthenakis GC, Miriagou V, Petinaki E. Microorganisms. 2023 Oct 19;11(10):2588. doi: 10.3390/microorganisms11102588. PMID: 37894246
3. First Detection and Molecular Characterization of *Pseudomonas aeruginosa bla*_{NDM-1} ST308 in Greece. Tsilipounidaki K, Gkoutinoudis CG, Florou Z, Fthenakis GC, Miriagou V, Petinaki E. Microorganisms. 2023 Aug 26;11(9):2159. doi: 10.3390/microorganisms11092159. PMID: 37764003

4. Diversity of Bacterial Clones and Plasmids of NDM-1 Producing *Escherichia coli* Clinical Isolates in Central Greece. Katerina Tsilipounidaki, Zoi Florou, Anargyros Skoulakis, George C Fthenakis, Vivi Miriagou, Efthymia Petinaki *Microorganisms*. 2023 Feb 17;11(2):516. doi: 10.3390/microorganisms11020516. PMID: 36838481
5. Recovery of Staphylococci from Teatcups in Milking Parlours in Goat Herds in Greece: Prevalence, Identification, Biofilm Formation, Patterns of Antibiotic Susceptibility, Predictors for Isolation. Michael CK, Lianou DT, Tsilipounidaki K, Gougoulis DA, Giannoulis T, Vasileiou NGC, Mavrogianni VS, Petinaki E, Fthenakis GC. *Antibiotics (Basel)*. 2023 Sep 10;12(9):1428. doi: 10.3390/antibiotics12091428. PMID: 37760724
6. Isolation of *Listeria ivanovii* from Bulk-Tank Milk of Sheep and Goat Farms-From Clinical Work to Bioinformatics Studies: Prevalence, Association with Milk Quality, Antibiotic Susceptibility, Predictors, Whole Genome Sequence and Phylogenetic Relationships. Lianou DT, Skoulakis A, Michael CK, Katsarou EI, Chatzopoulos DC, Solomakos N, Tsilipounidaki K, Florou Z, Cripps PJ, Katsafadou AI, Vasileiou NGC, Dimoveli KS, Bourganou MV, Liagka DV, Papatsiros VG, Kontou PI, Mavrogianni VS, Caroprese M, Petinaki E, Fthenakis GC. *Biology (Basel)*. 2022 Jun 6;11(6):871. doi: 10.3390/biology11060871. PMID: 35741392
7. Detection of Zoonotic Gastrointestinal Pathogens in Dairy Sheep and Goats by Using FilmArray® Multiplex-PCR Technology. Tsilipounidaki K, Florou Z, Lianou DT, Michael CK, Katsarou EI, Skoulakis A, Fthenakis GC, Petinaki E. *Microorganisms*. 2022 Mar 25;10(4):714. doi: 10.3390/microorganisms10040714. PMID: 35456765
8. Plethora of Resistance Genes in Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacteria in Greece: No End to a Continuous Genetic Evolution. Tsilipounidaki K, Athanasakopoulou Z, Müller E, Burgold-Voigt S, Florou Z, Braun SD, Monecke S, Gatselis NK, Zachou K, Stefanos A, Tsagalas I, Sofia M, Spyrou V, Billinis C, Dalekos GN, Ehrlich R, Petinaki E. *Microorganisms*. 2022 Jan 13;10(1):159. doi: 10.3390/microorganisms10010159. PMID: 35056608
9. *Letter to the Editor*: Importation of the First Bovine ST361 New Delhi Metallo-5 Positive *Escherichia coli* in Greece. Tsilipounidaki K, Athanasakopoulou Z, Billinis C, Miriagou V, Petinaki E. *Microb Drug Resist*. 2021 Dec 17. doi: 10.1089/mdr.2021.0243. Online ahead of print. PMID: 34935518
10. Antibiotic Resistance of Staphylococci from Bulk-Tank Milk of Sheep Flocks: Prevalence, Patterns, Association with Biofilm Formation, Effects on Milk Quality, and Risk Factors. Lianou DT, Petinaki E, Cripps PJ, Gougoulis DA, Michael CK, Tsilipounidaki K, Skoulakis A, Katsafadou AI, Vasileiou NGC, Giannoulis T, Voidarou C, Mavrogianni VS, Caroprese M, Fthenakis GC. *Biology (Basel)*. 2021 Oct 9;10(10):1016. doi: 10.3390/biology10101016. PMID: 34681114
11. Prevalence, Patterns, Association with Biofilm Formation, Effects on Milk Quality and Risk Factors for Antibiotic Resistance of Staphylococci from Bulk-Tank Milk of Goat Herds. Lianou DT, Petinaki E, Cripps PJ, Gougoulis DA, Michael CK, Tsilipounidaki K, Skoulakis A, Katsafadou AI, Vasileiou NGC, Giannoulis T, Katsarou EI, Voidarou C, Mavrogianni VS, Caroprese M, Fthenakis GC. *Antibiotics (Basel)*. 2021 Oct 8;10(10):1225. doi: 10.3390/antibiotics10101225. PMID: 34680806
12. Extensive countrywide field investigation of somatic cell counts and total bacterial counts in bulk tank raw milk in goat herds in Greece. Lianou DT, Michael CK, Vasileiou NGC, Petinaki E, Cripps PJ, Tsilipounidaki K, Katsafadou AI, Politis AP, Kordalis NG, Ioannidis KS, Gougoulis DA, Trikalinou C, Orfanou DC, Fragkou IA, Liagka DV, Tzora A, Albenzio M, Mavrogianni VS, Caroprese MC, Fthenakis GC. *J Dairy Res*. 2021 Aug;88(3):307-313. doi: 10.1017/S0022029921000674. Epub 2021 Aug 16. PMID: 34392841
13. Emergence of a mupirocin-resistant, methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* clone associated with skin and soft tissue infections in Greece. Giormezis N, Doudoulakakis A, Tsilipounidaki K, Militopoulou M, Kalogeras G, Stamouli V, Kolonitsiou F, Petinaki E, Lebesse E, Spiliopoulou I. *BMC Microbiol*. 2021 Jul 3;21(1):203. doi: 10.1186/s12866-021-02272-5. PMID: 34215177
14. *Clostridioides difficile* as a Dynamic Vehicle for the Dissemination of Antimicrobial-Resistance Determinants: Review and In Silico Analysis. Kartalidis P, Skoulakis A, Tsilipounidaki K, Florou Z, Petinaki E, Fthenakis GC. *Microorganisms*. 2021 Jun 25;9(7):1383. doi: 10.3390/microorganisms9071383. PMID: 34202117
15. Combination of rRT-PCR and Anti-Nucleocapsid/Anti-Spike Antibodies to Characterize Specimens with Very Low Viral SARS-CoV-2 Load: A Real-Life Experience. Florou Z, Zigra M, Kartalidis P, Tsilipounidaki K, Papadamou G, Belia A, Fthenakis GC, Petinaki E. *Microorganisms*. 2021 Jun 10;9(6):1263. doi: 10.3390/microorganisms9061263. PMID: 34200837
16. Antimicrobial Resistance Genes in ESBL-Producing *Escherichia coli* Isolates from Animals in Greece. Athanasakopoulou Z, Reinicke M, Diezel C, Sofia M, Chatzopoulos DC, Braun SD, Reissig A, Spyrou V, Monecke S, Ehrlich R, Tsilipounidaki K, Giannakopoulos A, Petinaki E, Billinis C. *Antibiotics (Basel)*. 2021 Apr 4;10(4):389. doi: 10.3390/antibiotics10040389. PMID: 33916633
17. Association of Staphylococcal Populations on Teatcups of Milking Parlours with Vaccination against Staphylococcal Mastitis in Sheep and Goat Farms. Michael CK, Lianou DT, Vasileiou NGC, Tsilipounidaki K, Katsafadou AI, Politis AP, Kordalis NG, Ioannidis KS, Gougoulis DA, Trikalinou C, Orfanou DC, Fragkou IA, Kontou PI, Liagka DV, Mavrogianni VS, Petinaki E, Fthenakis GC. *Pathogens*. 2021 Mar 24;10(4):385. doi: 10.3390/pathogens10040385. PMID: 33804878
18. Poultry and Wild Birds as a Reservoir of CMY-2 Producing *Escherichia coli*: The First Large-Scale Study in Greece. Athanasakopoulou Z, Tsilipounidaki K, Sofia M, Chatzopoulos DC, Giannakopoulos A, Karakousis I, Giannakis V, Spyrou V, Touloudi A, Satra M, Galamatis D, Diamantopoulos V, Mpellou S, Petinaki E, Billinis C. *Antibiotics (Basel)*. 2021 Feb 26;10(3):235. doi:10.3390/antibiotics10030235. PMID: 33652621

19. Extensive Countrywide Field Investigation of Somatic Cell Counts and Total Bacterial Counts in Bulk-Tank Raw Milk in Sheep Flocks in Greece. Lianou DT, Michael CK, Vasileiou NGC, Petinaki E, Cripps PJ, [Tsilipounidaki K](#), Katsafadou AI, Politis AP, Kordalis NG, Ioannidi KS, Gougoulis DA, Trikalinou C, Orfanou DC, Fragkou IA, Angelidou E, Katsarou EI, Tzora A, Albenzio M, Mavrogianni VS, Caroprese M, Fthenakis GC. *Foods*. 2021 Jan 28;10(2):268. doi: 10.3390/foods10020268. PMID: 33525696
20. *emm* Types and clusters and macrolide resistance of pediatric group A streptococcal isolates in Central Greece during 2011-2017. Grivea IN, Syrogiannopoulos GA, Michoula AN, Gazeti G, Malli E, [Tsilipounidaki K](#), Fouzas S, Anthracopoulos MB, Petinaki E. *PLoS One*. 2020 May 7;15(5):e0232777. doi: 10.1371/journal.pone.0232777. eCollection 2020. PMID: 32379802
21. Molecular characteristics and predictors of mortality among Gram-positive bacteria isolated from bloodstream infections in critically ill patients during a 5-year period (2012-2016). Papadimitriou-Olivgeris M, Kolonitsiou F, Karamouzou V, [Tsilipounidaki K](#), Nikolopoulou A, Fligou F, Marangos M, Petinaki E, Spiliopoulou I. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020 May;39(5):863-869. doi: 10.1007/s10096-019-03803-9. Epub 2020 Jan 2. PMID: 31898796
22. Implementation of the Rapid Polymyxin™ NP test directly to positive blood cultures bottles. Malli E, Papagiannitsis CC, Xitsas S, [Tsilipounidaki K](#), Petinaki E. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2019 Dec;95(4):114889. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2019.114889. Epub 2019 Aug 23. PMID: 31630911
23. *Letter to the Editor*: Implementation of the Rapid Polymyxin Acinetobacter Test to Detect Colistin-Resistant *Acinetobacter baumannii*. Malli E, [Tsilipounidaki K](#), Xitsas S, Pyridou P, Papagiannitsis CC, Petinaki E. *Microb Drug Resist*. 2021 Jan;27(1):134-135. doi: 10.1089/mdr.2019.0221. Epub 2019 Aug 12. PMID: 31403371
24. IncC *bla*_{KPC-2}-positive plasmid characterized from ST648 *Escherichia coli*. Papagiannitsis CC, Bitar I, Malli E, [Tsilipounidaki K](#), Hrabak J, Petinaki E. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019 May 8. pii: S2213-7165(19)30108-0. doi: 10.1016/j.jgar.2019.05.001.
25. Detection in Greece of a clinical *Enterococcus faecium* isolate carrying the novel oxazolidinone resistance gene *poxtA*. Papagiannitsis CC, [Tsilipounidaki K](#), Malli E, Petinaki E. *J Antimicrob Chemother*. 2019 Aug 1;74(8):2461-2462. doi: 10.1093/jac/dkz155. PMID: 31009054
26. First detection of an *optrA*-positive, linezolid-resistant ST16 *Enterococcus faecalis* from human in Greece. [K. Tsilipounidaki](#), A. Gerontopoulos, C. Papagiannitsis and E. Petinaki *New Microbe and New Infect* 2019; 29: 100515 <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.01.010>
27. MLSB-Resistant *Staphylococcus aureus* in Central Greece: Rate of Resistance and Molecular Characterization. Stela Sarrou, Ergina Malli, Katerina [Tsilipounidaki](#), Zoi Florou, Matej Medvecký, Anargyros Skoulakis, Jaroslav Hrabak, Costas C. Papagiannitsis, and Efi Petinaki. *Microb Drug Resist*. 2018 Nov 7. doi: 10.1089/mdr.2018.0259.
28. Evaluation of rapid polymyxin NP test to detect colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated in a tertiary Greek hospital. Ergina Malli, Zoi Florou, [Katerina Tsilipounidaki](#), Ioanna Voulgaridi, Aggelos Stefanos, Stelios Xitsas, Costas C. Papagiannitsis, Efthymia Petinaki. *J Microbiol Methods*. 2018 Oct;153:35-39. doi: 10.1016/j.mimet.2018.08.010.
29. Characterisation of a ST100 *Staphylococcus epidermidis* producing an *LnuB* nucleotidyltransferase: Evidence for interspecies spread of an *lnuB*-carrying transposon. Papagiannitsis CC, Sarrou S, [Tsilipounidaki K](#), Malli E, Medvecký M, Hrabak J, Fthenakis GC, Petinaki E., *J Glob Antimicrob Resist*. 2018 Jun;13:9-10. doi: 10.1016/j.jgar.2018.02.017.
30. First Description in Greece of *mphC*-Positive *Staphylococci* Causing Subclinical Mastitis in Ewes. Papagiannitsis CC, Malli E, [Tsilipounidaki K](#), Sarrou S, Medvecký M, Hrabak J, Fthenakis GC, Petinaki E.. *Microb Drug Resist*. 2018 Feb 28. doi: 10.1089/mdr.2017.0425.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Poster: [K. Tsilipounidaki](#) Zoi Florou, Anargyros Skoulakis, Georgios Fthenakis, Vivi Miriagou, Efthymia Petinaki Diversity of clones and plasmids of NDM-1 positive *Escherichia coli* clinical isolates in Central Greece. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Απρίλιος 2023, Κοπεγχάγη

[K. Τσιλιπουνιδάκη](#), Z. Φλώρου, X. Γκουντέλα, E. Πετεινάκη. Χαρακτηρισμός των NDM-πλασμιδίων σε στελέχη *Klebsiella pneumoniae* στην Θεσσαλία 11^ο Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Μάρτιος 2023, Αθήνα

Poster: [K. Tsilipounidaki](#), Zoi Florou, Zoi Athanasakopoulou, Charalampos Billinis, Efi Petinaki. NDM-positive *Escherichia coli* in central Greece. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Απρίλιος 2021, Λισαβόνα

[K. Τσιλιπουνιδάκη](#) , Z. Φλώρου, Z. Αθανασακοπούλου, X. Μπιλλίνης, E. Πετεινάκη. NDM-θετικά στελέχη *Escherichia*

coli στην περιοχή της Θεσσαλίας. 11^ο Πανελλήνιο συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Οκτώβριος 2021, Αθήνα

Poster: Κ. Tsilipounidaki, E. Malli, S. Sarrou, Z. Florou, C. Papagiannitsis, E. Petinaki. Characterization of an *Inu(B)*-positive ST100 *Staphylococcus epidermidis* isolated in Greece from samples of animal origin. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Απρίλιος 2018, Μαδρίτη.

Poster: Κ. Τσιλιπουνιδάκη, Ε. Μάλλη, Σ. Σάρρου, Ζ. Φλώρου, Κ. Παπαγιαννίτσης, Ε. Πετεινάκη Χαρακτηρισμός ενός *Inu(B)*-θετικού ST100 *Staphylococcus epidermidis* που απομονώθηκε στην Ελλάδα από δείγμα ζωικής προέλευσης. 10^ο Πανελλήνιο συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Απρίλιος 2018, Αθήνα.

ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ/ΣΥΝΕΔΡΙΑ

33rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Απρίλιος 2023, Κοπεγχάγη

11^ο Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Μάρτιος 2023, Αθήνα

11^ο Πανελλήνιο συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Οκτώβριος 2021, Αθήνα (*Online*)

31st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Ιούλιος 2021 (*Online*)

1^ο Πανελλήνιο διαδικτυακό συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Δεκέμβριος 2020

Conference on Coronavirus Disease by European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Σεπτέμβριος 2020 (*Online*)

29th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Απρίλιος 2019, Άμστερνταμ

10^ο Πανελλήνιο συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Απρίλιος 2018, Αθήνα

28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Απρίλιος 2018, Μαδρίτη

65^ο Πανελλήνιο συνέδριο Ελληνικής Εταιρίας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Νοέμβριος 2014, Θεσσαλονίκη

64^ο Πανελλήνιο συνέδριο Ελληνικής Εταιρίας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Δεκέμβριος 2013, Αθήνα

ΑΤΟΜΙΚΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

Μητρική γλώσσα Ελληνικά

Λοιπές γλώσσες Αγγλικά

ΚΑΤΑΝΟΗΣΗ		ΟΜΙΛΙΑ		ΓΡΑΦΗ
Προφορική	Γραπτή (ανάγνωση)	Επικοινωνία	Προφορική έκφραση	
C2	C2	C2	C2	C2
Certificate of Competency in English, University of Michigan				

Επίπεδα: A1 και A2: Βασικός χρήστης - B1 και B2: Ανεξάρτητος χρήστης - C1 και C2: Έμπειρος χρήστης
[Κοινό Ευρωπαϊκό Πλαίσιο Αναφοράς για Γλώσσες](#)

«*bla*_{NDM} Gram αρνητικά βακτήρια σε ανθρώπους και ζώα στην Κεντρική Ελλάδα»

Τσιλιπουνιδάκη Κατερίνα

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2024

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Πετεινάκη Ευθυμία**, Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας-Κλινικής Μικροβιολογίας Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (**Επιβλέπουσα**)
2. **Μπιλλίνης Χαράλαμπος**, Καθηγητής Ιολογίας-Ιογενών Νοσημάτων, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Νταλέκος Ν. Γεώργιος** Καθηγητής Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	15
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	16
Ιστορική αναδρομή-Ταξινόμηση των βακτηρίων.....	16
<i>Escherichia coli</i>	17
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
<i>Acinetobacter baumannii</i>	20
Λοιμογόννοι παράγοντες.....	21
Επιδημιολογία-Λοιμώξεις	25
Αντιμικροβιακοί παράγοντες	32
B-λακτάμες	32
Αντιμικροβιακή αντοχή.....	40
Καρβαπενέμη ανθεκτικά στελέχη στα ζώα.....	53
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	55
ΣΤΟΧΟΣ.....	56
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	57
Χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών της μελέτης	57
Συλλογή στελεχών από ανθρώπους	57
Συλλογή στελεχών από ζώα με στόχο την απομόνωση Gram-αρνητικών βακτηριδίων με αντοχή σε καρβαπενέμες.....	58
Ταυτοποίηση στελεχών.....	58
Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιμικροβιακούς παράγοντες	59
ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	62

Απομόνωση γενετικού υλικού	62
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)	63
Ανίχνευση γονιδίων αντοχής	67
Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	68
Καθαρισμός προϊόντων PCR	69
Ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου <i>bla_{NDM}</i> με αλληλούχιση κατά Sanger.....	70
Αλληλούχιση Ολικού Γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing) - Χαρακτηρισμός του γενετικού περιβάλλοντος του γονιδίου <i>bla_{NDM}</i>	72
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	78
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	98
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	108
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	109
ABSTRACT.....	111
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	113
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ-ABBREVIATIONS.....	133

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ιστορική αναδρομή-Ταξινόμηση των βακτηρίων

Η περιγραφή των βακτηρίων χρονολογείται αρκετούς αιώνες στο παρελθόν, με την πρώτη αναφορά να τοποθετείται γύρω στην δεκαετία του 1540, όταν έγινε η πρώτη αναφορά του πιθανού αιτιολογικού παράγοντα της σύφιλης. Η παρουσία των βακτηρίων έγινε αποδεκτή έναν αιώνα αργότερα, όταν παρατηρήθηκαν τα πρώτα βακτήρια με χρήση του μικροσκοπίου (1). Ένας από τους πρώτους πρωτοπόρους στην βακτηριακή ταξινόμηση αποτέλεσε ο Γερμανός βοτανολόγος Ferdinand Cohn, καθώς προσπάθησε να ταξινομήσει τα βακτήρια σύμφωνα με την μορφολογία και την φυσιολογία τους και ο οποίος λόγω του έργου του συχνά αποκαλείται «πατέρας της βακτηριολογίας» (2). Την ίδια χρονική περίοδο, άλλοι ερευνητές όπως ο Robert Koch και ο Louis Pasteur συνέβαλαν σημαντικά στην μελέτη των βακτηρίων καθώς ανέπτυξαν τεχνικές για την απομόνωση και την καλλιέργεια αυτών, συμβάλλοντας στην ταξινόμηση των βακτηρίων με βάση τα βιοχημικά τους χαρακτηριστικά.

Ένα από τα πιο σημαντικά βήματα που πραγματοποιήθηκε, επήλθε μερικά χρόνια αργότερα, το 1884, όταν κατά την διάρκεια προσπάθειας διάκρισης των αιτιολογικών παραγόντων (ή αλλιώς μικρόκοκκων) που προκαλούσαν πνευμονία, ο Δανός βιολόγος Hans Christian Joachim Gram, χρησιμοποιώντας αντιδραστήρια σε δείγματα ιστών του πνεύμονα, παρατήρησε διαφορά στον χρωματισμό των μικρόκοκκων. Συγκεκριμένα παρατήρησε ότι μετά την χρήση των αντιδραστηρίων, το ένα είδος έφερε χρώμα ενώ το άλλο αποχρωματιζόταν. Αφότου συνειδητοποίησε ότι αυτό αποτελούσε ένα επαναλαμβανόμενο φαινόμενο, ο Gram άρχισε να το χρησιμοποιεί για



Εικόνα 1 Hans Christian Joachim Gram (1853-1938)

την κατηγοριοποίηση των βακτηρίων και συγκεκριμένα ονομάτισε, Gram θετικά αυτά που διατηρούσαν τον χρωματισμό ενώ Gram αρνητικά αυτά που δεν έφεραν κανένα χρώμα (3). Μερικά χρόνια αργότερα, ο Γερμανός παθολόγος Carl Weigert χρησιμοποίησε μία επιπλέον χρωστική (γνωστή ως σαφρανίνη) ώστε να βοηθήσει στην απεικόνιση των, μέχρι τότε, μη χρωματισμένων βακτηρίων (4). Παρόλο που από την ανακάλυψη της μέχρι σήμερα η εν λόγω

τεχνική έχει διαφοροποιηθεί πολλές φορές, με στόχο την εύρεση πιο σταθερών και καλύτερων στην απεικόνιση αντιδραστηρίων, παραμένει η πρώτη τεχνική που εφαρμόζεται στα εργαστήρια για την πρωταρχική ταυτοποίηση των βακτηρίων και χωρίς αυτήν η βακτηριολογία δεν θα είχε αναπτυχθεί τόσο γρήγορα.

Από τις επόμενες δεκαετίες μέχρι και σήμερα, εκτός της χρώσης κατά Gram, η ικανότητα μελέτης των βιοχημικών και μεταβολικών μονοπατιών των βακτηρίων, η εξελικτική συσχέτιση των διαφορετικών ειδών μέσω της ανάλυσης και σύγκρισης του γενετικού κώδικα καθώς και η ανάπτυξη νέων τεχνολογιών όπως η μεταγενωματική και πρωτεομική ανάλυση, συμβάλλουν σημαντικά στον πολύπλοκο και συνεχώς εξελισσόμενο τομέα της ταξινόμησης.

Escherichia coli

Ιστορία

Το 1885 ο Γερμανός παιδίατρος Theodor Escherich περιέγραψε έναν βακτηριακό πληθυσμό που βρήκε στο χαμηλότερο σημείο του στομάχου σε νεογνά, δίνοντάς του την ονομασία *Bacterium coli commune* (εικ.2) (5,6). Αρκετά χρόνια αργότερα, το 1919, οι Castellani και Chalmers κατά την ταξινόμηση των βακτηρίων ονόμασαν εκ νέου τον μικροοργανισμό ως *Escherichia coli*, μία ονομασία που δόθηκε από τον άνθρωπο που το ανακάλυψε. Σήμερα το βακτήριο *E.coli* ανήκει στο γένος *Escherichia*, στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*, στο είδος *Enterobacterales*, στην κλάση *Gammaproteobacteria*, στο φύλο *Pseudomonadota* (7).



Εικόνα 2 Theodor Escherich (1857-1911)

Δομικά χαρακτηριστικά

Η *E. coli* αποτελεί ένα Gram αρνητικό ραβδοειδές βακτήριο, με μήκος 1 έως 2 μm (8). Είναι ένα μη σπορογόνο, αερόβιο και προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο το οποίο συνήθως έχει την δυνατότητα κίνησης (εικ.3) (9).



Εικόνα 3 Εικόνα *E.coli* από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Είναι ένα μη απαιτητικό βακτήριο καθώς μπορεί να αναπτυχθεί σε διάφορα θρεπτικά μέσα σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 10 έως 40°

C, με ιδανική θερμοκρασία τους 37°C (10). Ένα από τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιείται ευρέως είναι το MacConkey άγαρ το οποίο περιλαμβάνει εκτός των άλλων και λακτόζη, ένα χαρακτηριστικό που επιτρέπει στον διαχωρισμό ορισμένων Gram αρνητικών βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένης και της *E.coli* η οποία έχει την δυνατότητα να ζυμώνει τη λακτόζη και να σχηματίζει ροζ αποικίες (11). Οι αποικίες χαρακτηρίζονται συνήθως είτε ως τραχιές, επίπεδες και ακανόνιστες είτε λείες, ψηλές και κυκλικές καθιστώντας εύκολη την διάκριση τους (12).

Επιπρόσθετα, λόγω της ικανότητας του να αποικεί στην γαστρεντερική οδό του ανθρώπου έχει την δυνατότητα να αναπτύσσεται σε pH από 4,5 έως 9, με ιδανικές τις τιμές 6,5-7,5 (13,14). Έχει θετική δοκιμασία καταλάσης και αρνητική δοκιμασία οξειδάσης, χαρακτηριστικά τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την διάκριση από άλλα Εντεροβακτηριακά (15). Είναι ένα από τα πρώτα βακτήρια που αποικίζουν στα νεογνά, λίγες ώρες μετά την γέννηση τους και αποτελεί ένα από τα πιο πολυπληθή αναερόβια βακτήρια του ανθρώπινου μικροβιώματος (16).

Όπως αναφέρθηκε, τα στελέχη έχουν την δυνατότητα κίνησης, λόγω παρουσίας βλεφαρίδων (flagella). Έχει περίπου 5 έως 10 βλεφαρίδες ανά κύτταρο με μήκος 5-10 μm και είναι τοποθετημένες τυχαία την κυτταρική επιφάνεια (περίτριχες βλεφαρίδες) (17). Είναι ιδιαίτερα αντιγονικές, αποτελούμενες από έναν μεγάλο αριθμό από Η αντιγόνα (flagellin) με τις αμινοτελικές και καρβοξυτελικές περιοχές πολλών Η αντιγόνων να είναι ιδιαίτερα συντηρημένες. Το αντιγόνο Η αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα αντιγόνα επιφανείας που χρησιμοποιούνται για την οροτυπία της *E.coli*. Εκτός της κίνησης, έχει παρατηρηθεί ότι οι βλεφαρίδες συμμετέχουν παράλληλα στην προσκόλληση στα κύτταρα του ξενιστή, στον σχηματισμό βιομάζας, στην έκκριση πρωτεϊνών καθώς επίσης επηρεάζουν την προ-φλεγμονώδη απόκριση του ξενιστή (18).

Klebsiella pneumoniae

Ιστορία

Ο Γερμανός Carl Friedländer, το 1882, στην προσπάθεια ανίχνευσης του αιτιολογικού παράγοντα που προκαλούσε πνευμονία, χαρακτήρισε ένα περικλειόμενο από κάψα βάκιλο ο οποίος



Εικόνα 4 Carl Friedländer
(1847-1887)

απομονώθηκε από τους πνεύμονες ατόμων που κατέληξαν λόγω πνευμονίας. Στην αρχή η ονομασία που του δόθηκε προέκυψε από τον άνθρωπο που τον ανακάλυψε αλλά πολύ σύντομα, το 1886, απέκτησε το όνομα *Klebsiella* (19).



Εικόνα 5 Εικόνα *K.pneumoniae* από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Το βακτήριο *Klebsiella pneumoniae* ανήκει στο γένος *Klebsiella* και κατηγοριοποιείται, όπως η *E.coli*, στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*, στο είδος *Enterobacterales* (20).

Δομικά χαρακτηριστικά

Το εν λόγω βακτήριο αποτελεί ένα μη απαιτητικό, μη κινητό Gram αρνητικό ραβδοειδές βακτήριο, το οποίο δεν σχηματίζει σπόρια και έχει μήκος 1 έως 3 μm (εικ. 6). Είναι αερόβιο και προαιρετικά αναερόβιο, οξειδάση αρνητικό και καταλάση θετικό το οποίο, ομοίως με η *E.coli*, έχει την δυνατότητα να ζυμώνει την λακτόζη όταν αναπτύσσεται σε MacConkey άγαρ, με ιδανική θερμοκρασία τους 37° C (21). Οι αποικίες χαρακτηρίζονται ως ψηλές και βλεννώδεις, λόγω της παρουσίας ελύτρου. Αποτελεί βακτήριο το οποίο μπορεί να αναπτυχθεί σε αλκαλικό περιβάλλον (εύρος τιμών pH 6-10), με βέλτιστες συνθήκες να παρατηρούνται σε pH 7.

Pseudomonas aeruginosa

Ιστορία

Το 1882 ο Γάλλος φαρμακοποιός Carle Gessard απομόνωσε για πρώτη φορά ένα βακτήριο από τραύματα στρατιωτών δίνοντας του την ονομασία *Pseudomonas aeruginosa* εκ των οποίων η λέξη *Pseudomonas* προήλθε από τις ελληνικές λέξεις «ψευδό» και «μονάδα» λόγω της ικανότητας διάταξής της σε ζεύγη τα οποία όμως μοιάζουν ως ένα μοναδικό κύτταρο, ενώ η λέξη *aeruginosa* προέκυψε από την λατινική λέξη «aerūgō» λόγω της ιδιαιτερότητας να σχηματίζει πυοκυανικές αποικίες στην καλλιέργεια (22). Σήμερα το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa* ανήκει στο γένος *Pseudomonas*, στην οικογένεια *Pseudomonadaceae*, στο είδος *Pseudomonadales*, στην κλάση



Εικόνα 6 Carle Gessard (1850-1925)

Gammaproteobacteria, στο φύλο Pseudomonadota (23).

Δομικά χαρακτηριστικά

Το ως άνω βακτήριο είναι ένα ραβδοειδές, μη σπορογόνο Gram αρνητικό βακτήριο με μήκος 1-5 μm . Έχει την ικανότητα κίνησης λόγω παρουσίας μίας ή περισσοτέρων βλεφαρίδων που είναι τοποθετημένες πολικά (24) (εικ. 7). Θεωρείται υποχρεωτικά αερόβιο καθώς αναπτύσσεται μέσω του αναπνευστικού μεταβολισμού. Παρόλα αυτά έχει την ικανότητα να αναπτυχθεί και σε αναερόβιες συνθήκες παρουσία αργινίνης ή νιτρικών, τα οποία αποτελούν εναλλακτικό δέκτη ηλεκτρονίων απουσία οξυγόνου (25).



Εικόνα 7 Εικόνα *P.aeruginosa* από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Η παρουσία πολλαπλών οξειδάσεων για την πραγματοποίηση του αναπνευστικού μεταβολισμού αποτελεί σημαντικό χαρακτηριστικό καθώς μία εξ αυτών, η οξειδάση c του κυτοχρώματος, αποτελεί χαρακτηριστικό διάκρισης στην εργαστηριακή ρουτίνα με εφαρμογή απλής βιοχημικής εξέτασης (εικ. 9). Βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης αποτελούν οι 37° C, αν και έχει την ικανότητα να επιβιώνει σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 4-42° C. Μπορεί να αναπτύσσεται εύκολα και σε ποικιλία θρεπτικών υλικών, ενώ χαρακτηριστική αποτελεί η ανάπτυξη του στο MacConkey άγαρ λόγω της αδυναμίας να ζυμώνει την λακτόζη και παράλληλα λόγω παραγωγής χρωστικών, δίνοντας χαρακτηριστική μπλε/πράσινη ή καστανοκόκκινη εμφάνιση στην καλλιέργεια. Είναι ένα καταλάση θετικό βακτηρίδιο το οποίο σχηματίζει συνήθως επίπεδες αποικίες.

Acinetobacter baumannii

Ιστορία

Το γένος *Acinetobacter* χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά το 1911, όταν ένας Δανός μικροβιολόγος περιέγραψε έναν μικροοργανισμό που απομονώθηκε από υλικό παρουσία οξικού ασβεστίου, δίνοντας του την ονομασία *Micrococcus calco-aceticus*. Αρκετές δεκαετίες αργότερα, το 1954 οι Brisou και Prénos στην προσπάθεια τους να διαχωρίσουν τα κινητά από μη κινητά βακτήρια που είχαν συμπεριληφθεί μέχρι τότε στην ίδια κατηγορία, πρότειναν την

δημιουργία ενός νέου γένους, δίνοντας του την ονομασία *Acinetobacter* η οποία προήλθε από την ελληνική λέξη «ακίνητος». Η δημιουργία αυτού έγινε αποδεκτή μερικά χρόνια αργότερα, όταν ο Baumann (από τον οποίο δόθηκε το όνομα στο είδος *A.baumannii*) μαζί με τους συνεργάτες του δημοσίευσαν μια μελέτη, τα αποτελέσματα της οποίας οδήγησαν στην αποδοχή της δημιουργίας αυτού του νέου γένους από την επιτροπή ταξινόμησης το 1971 (26). Έτσι σήμερα, το βακτήριο *A.baumannii* ανήκει στο γένος *Acinetobacter*, στην οικογένεια *Moraxellaceae*, στο είδος *Moraxellales*, στην κλάση *Gammaproteobacteria*, στο φύλο *Pseudomonadota*. Εκτός αυτής της ταξινόμησης, ορισμένα στελέχη που ανήκουν στο γένος *Acinetobacter* (συμπεριλαμβανομένων των *A.calcoaceticus* και *A.baumannii*) λόγω της ιδιαίτερης δυσκολίας διαχωρισμού με τις τρέχουσες φαινοτυπικές διαδικασίες, έχει προταθεί να γίνεται αναφορά αυτών των βακτηρίων ως σύμπλεγμα *A.calcoaceticus*-*A.baumannii* (27).

Δομικά χαρακτηριστικά

Το βακτήριο *A.baumannii* είναι ένας μη απαιτητικός, αερόβιος Gram αρνητικός κοκκοβάκιλος, με μήκος 1.5-2.5 μm (εικ. 8). Όπως αναφέρθηκε, δεν έχει την ικανότητα κίνησης, ενώ ταυτόχρονα δεν μπορεί να ζυμώσει την λακτόζη κατά την ανάπτυξη του σε MacConkey άγαρ. Είναι καταλάση θετικό και οξειδάση αρνητικό, μία διαδικασία που χρησιμοποιείται για την άμεση διαφοροποίηση του από τα στελέχη *P.aeruginosa* κατά την εργαστηριακή ρουτίνα. Τα κλινικά στελέχη αναπτύσσονται



Εικόνα 8 Εικόνα *A.baumannii* από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

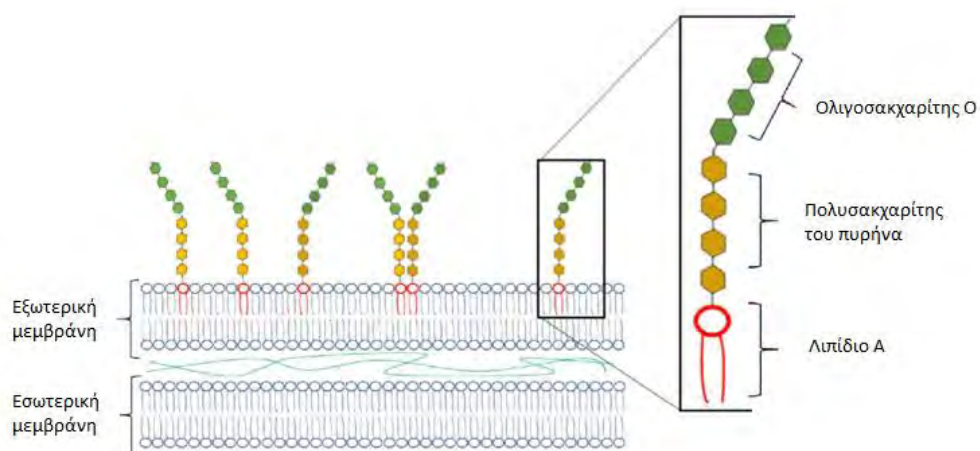
στους 37° C, αν και το μήκος κύματος που μπορεί να αναπτυχθεί περιλαμβάνει θερμοκρασίες από 25° C έως 42° C, ενώ συχνά προτείνεται ως βέλτιστη θερμοκρασία οι 30° C (28). Παρόλο που το κυτταρικό τοίχωμα που διαθέτει είναι το ίδιο που χαρακτηρίζει όλα τα Gram αρνητικά βακτήρια, εμφανίζονται δυσκολίες κατά τον αποχρωματισμό του στην χρώση κατά Gram με αποτέλεσμα πολλές φορές να χαρακτηρίζεται λανθασμένα ως Gram θετικός κόκκος (29).

Λοιμογόνοι παράγοντες

Καθένα από τα προαναφερθέντα Gram αρνητικά βακτήρια χαρακτηρίζεται από ένα εύρος λοιμογόνων παραγόντων, προσδίδοντας τους μοναδικά χαρακτηριστικά για τον διαχωρισμό τους ως διαφορετικά βακτηριακά είδη. Στις επόμενες παραγράφους αναλύονται τα

δομικά χαρακτηριστικά και οι λοιμογόνοι παράγοντες που εντοπίζονται στα στελέχη *E.coli*, *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa* και *A.baumannii*.

Ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά του κυτταρικού τοιχώματος γενικότερα των Gram αρνητικών βακτηρίων, και το οποίο έχει προστατευτικό ρόλο είναι ο λιποπολυσακχαρίτης. Αποτελείται από τρία συστατικά: τον εξωτερικό σωματικό ολιγοσακχαρίτη O, έναν πολυσακχαρίτη του πυρήνα και το υδρόφοβο λιπίδιο A (εικ. 9).



Εικόνα 9 Εικόνα του λιποπολυσακχαρίτη που απεικονίζει τα βασικά στοιχεία από τα οποία αποτελείται.

Ο πολυσακχαρίτης του πυρήνα παίζει ρόλο στην ταξινόμηση ενός βακτηρίου ως Εντεροβακτηριακό ή όχι, συνδέοντας το λιπίδιο Α με τον O-ολιγοσακχαρίτη. Ο ολιγοσακχαρίτης O, γνωστός και ως αντιγόνο O είναι ένα ιδιαίτερα μεταβλητό τμήμα του λιποπολυσακχαρίτη σημαντικός σε διάφορα στάδια της λοίμωξης καθώς μπορεί να επάγει την προσκόλληση στον ξενιστή και ταυτόχρονα έχει την ικανότητα να αποφεύγει τους αμυντικούς μηχανισμούς αυτού. Η μεταβλητότητα αυτού παίζει σημαντικό ρόλο και στην οροτυπία με στόχο την επιδημιολογική ταξινόμηση των στελεχών εντός του είδους. Το λιπίδιο Α αποτελεί λοιμογόνο παράγοντα καθώς λειτουργεί ως ενδοτοξίνη και απελευθερώνεται με την λύση του κυττάρου, επάγοντας την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή και συγκεκριμένα οδηγεί σε ενεργοποίηση του συμπληρώματος, σε απελευθέρωση κυταρροκινών, λευκοκυττάρωση, πυρετό, καταπληξία και θάνατο. Παρόλο που είναι συντηρημένο, η δομή του διαφέρει ανάμεσα στα στελέχη του ίδιου είδους ή διαφορετικών ειδών. Η θέση του στην κυτταρική μεμβράνη του βακτηρίου εξαρτάται από την παρουσία ή όχι του ελύτρου, καθώς απουσία αυτού βρίσκεται

εκτεθειμένος στην κυτταρική επιφάνεια ενώ παρουσία αυτού εντοπίζεται εντός του καψιδίου. Αξιοσημείωτο αποτελεί το γεγονός ότι η παρουσία του λιποπολυσακχαρίτη δεν είναι απαραίτητη για όλα τα Gram αρνητικά βακτήρια καθώς έχουν απομονωθεί στελέχη τα οποία στερούνται την παρουσία του. Η σημαντικότητα αυτού εξαρτάται όχι μόνο από το είδος αλλά πιθανά και από το κάθε στέλεχος ξεχωριστά (30).

Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό των 4 αυτών βακτηρίων είναι οι προσκολλητίνες τα οποία αποτελούν πρωτεϊνικά πολυμερή και εντοπίζονται στην επιφάνεια πολλών στελεχών. Αποτελούν σημαντικό παράγοντα παθογονικότητας καθώς προσδίδουν την ικανότητα στα στελέχη να προσκολλώνται σε ειδικούς υποδοχείς του κυττάρου ξενιστή, να διευκολύνουν τη μεταφορά γενετικού υλικού μεταξύ των βακτηριδίων και να αποφεύγουν το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή, επάγοντας τον αποικισμό (31). Υπάρχουν διάφοροι τύποι προσκολλητινών, κάθε μία από τις οποίες έχει διακριτή λειτουργία. Κάποιες εξ αυτών είναι χαρακτηριστικές για κάθε είδος, ενώ ορισμένες είναι κοινές μεταξύ των διαφορετικών ειδών. Παράλληλα προσδίδουν την δυνατότητα σχηματισμού βιομάζας (biofilm), δηλαδή την δημιουργία μίας οργανωμένης δομής που περικλείεται από πλέγμα (matrix), προσφέροντας αντοχή έναντι της δράσης τόσο των αντιβιοτικών όσο και του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή. (32). Ορισμένοι τύποι προσκολλητινών έχουν μελετηθεί σε μεγάλη έκταση, καθώς η αντιμετώπιση τους με φάρμακα ή εμβόλια αποτελεί πιθανή λύση για την πρόληψη και αντιμετώπιση λοιμώξεων.

Ένα επίσης σημαντικό χαρακτηριστικό των στελεχών είναι το έλυτρο (κάψα, capsule). Αποτελεί μια πρωτεϊνική δομή, αποτελούμενη από πολυσακχαρίτες, η οποία περιβάλλει τα στελέχη προσδίδοντας προστασία από την φαγοκυττάρωση και σε πολλές περιπτώσεις τα αντιβιοτικά, ενώ ταυτόχρονα δίνει την δυνατότητα προσκόλλησης των στελεχών στα κύτταρα του ξενιστή. Η σύσταση του ελύτρου ποικίλει ανάμεσα στα στελέχη του ίδιου είδους αλλά και διαφορετικών ειδών και οι πολυσακχαρίτες από τους οποίους αποτελείται είναι σημαντικά επιφανειακά αντιγόνα (33). Μέχρι σήμερα κάθε είδος έχει χαρακτηριστεί από πληθώρα τέτοιου είδους αντιγόνων, με ορισμένα εξ αυτών να αποτελούν υπέρ λοιμογόνους παράγοντες, καθιστώντας την ταυτοποίησή τους αναγκαία (34).

Ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας ο οποίος απαιτείται για την επιβίωση και την εξάπλωση των Gram αρνητικών βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων και των 4

προαναφερθέντων, είναι ο σίδηρος, ο οποίος όμως είναι περιορισμένος στο περιβάλλον του ξενιστή καθώς είναι δεσμευμένος σε πρωτεΐνες της αίμης ή χηλωτικές πρωτεΐνες. Για αυτό το λόγο τα βακτήρια έχουν αναπτύξει διάφορα συστήματα πρόσληψης σιδήρου όπως παραγωγή ανταγωνιστικών σιδηροφόρων μορίων (χηλικοί παράγοντες με χαμηλό μοριακό βάρος) τα οποία δεσμεύονται με υψηλότερη συγγένεια από τις πρωτεΐνες του ξενιστή, αφήνοντας ελεύθερα τα μόρια σιδήρου στο περιβάλλον, διαθέσιμα για συλλογή από τα βακτήρια. Επιπλέον έχουν την ικανότητα να παράγουν αιμολυσίνες για λύση των ερυθροκυττάρων και απελευθέρωση της αιμοσφαιρίνης και κατ' επέκταση του σιδήρου (35). Στα στελέχη *P.aeruginosa* οι χρωστικές (πυοκυανίνη, πυοπρασίνη) που παράγουν, αποτελούν τα σιδηροφόρα συστήματα του βακτηρίου, οι οποίες εκτός της δέσμευσης σιδήρου έχουν την ικανότητα πρόκλησης ιστικών βλαβών αλλά και ρύθμισης έκκρισης άλλων τοξινών (36).

Εξίσου σημαντικές και πολύπλοκές δομές, οι οποίες συμβάλλουν στην παθογονικότητα των στελεχών, είναι τα εκκριτικά συστήματα. Κάθε βακτηριακό είδος χαρακτηρίζεται από πολλαπλά εκκριτικά συστήματα κάθε ένα από τα οποία έχει διακριτό ρόλο. Είναι εξειδικευμένα συστήματα παραγωγής τοξινών και εξαγωγής πρωτεϊνών, που επιτρέπουν στα βακτήρια να εισάγουν τους λοιμογόνους παράγοντες μέσα στα κύτταρα του ξενιστή, επιτρέποντας τους να αλλάζουν την λειτουργία των κυττάρων αυτών διευκολύνοντας την επιβίωση και την αναπαραγωγή των βακτηρίων εντός του ξενιστή και την πρόκληση λοίμωξης (37,38).

Τέλος, ένα σημαντικό χαρακτηριστικό ορισμένων στελεχών το οποίο συμβάλλει στην παθογένεια τους είναι και η παραγωγή τοξινών. Από τα βακτήρια που μελετώνται, τα στελέχη *E.coli* και *P.aeruginosa* είναι πιο γνωστά για την παραγωγή πληθώρας τοξινών, το είδος των οποίων μπορεί να αποτελέσει βάση στην κατηγοριοποίηση των στελεχών καθώς μπορεί να παρέχει πληροφορίες για την ικανότητα τους να προκαλούν ασθένειες. Αντιθέτως στα στελέχη *K.pneumoniae* και *A.baumannii* δεν έχουν χαρακτηριστεί τοξίνες και η λοιμογόνος δύναμή τους χαρακτηρίζεται από τους μηχανισμούς μέσω των οποίων αποικίζουν στον ξενιστή και διαφεύγουν του ανοσοποιητικού συστήματος και της δράσης των αντιβιοτικών. Αξιοσημείωτο είναι ότι διαφορετικά στελέχη έχουν την δυνατότητα να παράγουν διαφορετικούς συνδυασμούς λοιμογόνων παραγόντων και το είδος της λοίμωξης εξαρτάται από την έκφραση αυτών.

Επιδημιολογία-Λοιμώξεις

Escherichia coli

Παρόλο που την εποχή της ανακάλυψης της, θεωρούσαν ότι ένα είδος είτε ήταν παθογόνο είτε όχι, το 1893 ένας Δανός κτηνίατρος υπέθεσε ότι το είδος *E.coli* αποτελείται από στελέχη εκ των οποίων κάποια είναι παθογόνα ενώ άλλα όχι. Η εκτίμηση αυτή αποδείχθηκε σωστή με αποτέλεσμα σήμερα τα στελέχη *E.coli* να κατηγοριοποιούνται σε ομάδες ανάλογα με τις επιπτώσεις τις οποίες προκαλούν τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ζώα (39). Κάθε ένας από τους παρακάτω παθοτύπους έχει ως αποτέλεσμα ένα από τρία γενικά κλινικά σύνδρομα τα οποία είναι 1) λοίμωξη του γαστρεντερικού συστήματος, 2) λοίμωξη του ουροποιητικού συστήματος και 3) σήψη/μηνιγγίτιδα (40). Οι περισσότερες λοιμώξεις που προκαλούνται από τα στελέχη *E.coli* είναι ενδογενείς καθώς ως μέλος της φυσιολογικής χλωρίδας του ανθρώπου και των ζώων έχει την ικανότητα να δημιουργήσει λοίμωξη όταν οι αμυντικοί μηχανισμοί του ξενιστή εξασθενίσουν. Παρόλα αυτά προκαλεί και εξωγενείς λοιμώξεις συμπεριλαμβανομένων της βακτηριαιμίας, της νεογνικής μηνιγγίτιδας και της γαστρεντερίτιδας (41).

Κάθε χρόνο καταγράφονται παγκοσμίως περίπου 1,7 δισεκατομμύρια παθογόνες διαρροϊκές καταστάσεις, με διάφορα στελέχη *E.coli* να εμπλέκονται σε αυτές (42). Ορισμένοι από αυτούς τους τύπους είναι υπεύθυνοι για επιδημίες και λόγω αυτού υπάρχουν πληροφορίες για την μετάδοση καθώς και οδηγίες για την αντιμετώπιση και την πρόληψη από διεθνείς οργανισμούς υγείας (CDC/WHO). Τα παθογόνα στελέχη *E.coli* κατηγοριοποιούνται σε επτά τύπους:

1. Εντεροπαθογόνα στελέχη *E. coli* (Enteropathogenic EC-EPEC)

Το εντεροπαθογόνο στέλεχος *E.coli* είναι το πρώτο που συσχετίστηκε με διαρροϊκή νόσο και αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα βρεφικών διαρροϊών στις αναπτυσσόμενες χώρες (43). Είναι ιδιαίτερης σημασίας καθώς, λόγω της ανάγκης διαφοροποίησης της εντεροπαθογόνου *E.coli* από αυτή της φυσιολογικής χλωρίδας, αποτέλεσε ένα από τα πρώτα στελέχη που βασίστηκε η οροτυπία με βάση τα σωματικά (O), βλεφαριδικά (H) και τα αντιγόνα του ελύτρου (K), αναπτύσσοντας μια μέθοδο που χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα (44). Αποτελεί τροφιμογενές παθογόνο καθώς μπορεί να μεταφερθεί μέσω της κοπρανοστοματικής οδού με την κατανάλωση

μη σωστά επεξεργασμένων ή μολυσμένων τροφών (45). Έχει την δυνατότητα να μεταφέρεται σε υγιείς ανθρώπους μέσω επαφής με άτομα ή αντικείμενα τα οποία φέρουν το συγκεκριμένο παθογόνο ενώ παράλληλα έχει ενοχοποιηθεί και για πρόκληση χρόνιων διαρροιών σε νεογνά (46,47). Ο συγκεκριμένος τύπος έχει την ικανότητα προσκόλλησης στα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου με επακόλουθη καταστροφή του πάχους των μικρολαχνών. Τα στελέχη αυτά δεν παράγουν τοξίνες προκαλώντας διχογνωμία για την παθογένεια των στελεχών EPEC. Παρόλα αυτά μελέτες που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν ότι τα εν λόγω στελέχη έχουν την ικανότητα να προκαλέσουν διάρροιες (48).

2. Εντεροπροσκολλητικά στελέχη *E.coli* (Enteroadhesive EC-EAEC)

Χαρακτηρίστηκαν για πρώτη φορά το 1985 λόγω της ιδιαιτερότητας τους να προσκολλώνται σε κύτταρα HEp-2 καθώς και λόγω ιδιαίτερου σχηματισμού «στοιβών τούβλων» (brick-like) που αποτελεί ένα από τα χαρακτηριστικά διάκρισης των εντεροπροσκολλητικών στελεχών *E.coli* από τα υπόλοιπα. (49,50). Τα στελέχη EAEC σχετίζονται με την εντεροπροσκολλητική θερμοανθεκτική τοξίνη (EAST) και με την τοξίνη που κωδικοποιείται στο πλασμίδιο (PET) (51,52). Τα στελέχη αυτά έχουν ενοχοποιηθεί για πρόκληση επίμονης διάρροιας με αφυδάτωση σε παιδιά και οροθετικούς ασθενείς σε αναπτυγμένες και αναπτυσσόμενες χώρες, ενώ παράλληλα αποτελεί την δεύτερη πιο συχνή αιτία διαρροϊκών καταστάσεων στους ταξιδιώτες (53,54). Εκτός αυτού έχει βρεθεί ότι η παρατεταμένη παρουσία του εν λόγω βακτηρίου έχει συσχετισθεί με καθυστέρηση της ανάπτυξης στα παιδιά (55).

3. Εντεροδιδειδυτικά στελέχη *E.coli* (Enteroinvasive EC-EIEC)

Η πρώτη αναφορά για τα εντεροδιδειδυτικά στελέχη *E.coli* έγινε το 1947 σε μία μελέτη κατά την οποία γινόταν χαρακτηρισμός στελεχών *Shigella* και τα οποία χαρακτηρίστηκαν αργότερα χρονικά ως *E.coli* (36, 37). Τα πρώτα ξεσπάσματα από στελέχη EIEC χαρακτηρίστηκαν την δεκαετία του 70 και εμφανίζονται κυρίως σε αναπτυσσόμενες χώρες (58). Έχουν χαρακτηριστεί ότι προσβάλλουν μόνο τον άνθρωπο προκαλώντας υδαρείς διάρροιες λόγω διείσδυσης στα επιθηλιακά κύτταρα του ορθού οδηγώντας σε φλεγμονή και έλκωση του βλεννογόνου (59). Η φλεγμονώδης αντίδραση που προκαλεί οδηγεί στη αναφερόμενη βακτηριακή δυσεντερία η οποία χαρακτηρίζεται από αίμα, βλέννα και λευκοκύτταρα στα κόπρανα (60). Δεν παράγει τοξίνες, αλλά τα στελέχη χαρακτηρίζονται από παραγωγή

αιμολυσίνης.

4. Εντεροτοξινογόνα στελέχη *E.coli* (Enterotoxigenic EC-ETEC)

Χαρακτηρίστηκαν για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1950 όταν ο De et al. απομόνωσαν στελέχη *E.coli* από ασθενείς με ασθένεια που έμοιαζε με χολέρα και από τους οποίους δεν απομονώθηκε ο γνωστός ως τότε αιτιολογικός παράγοντας *Vibrio cholerae*. Αργότερα, το 1968, ο Sack et al σε μια παρόμοια μελέτη κατέληξε στο ίδιο συμπέρασμα καθώς βρήκε ότι αίτιο της παθολογικής κατάστασης αποτελεί ένα είδος *E.coli* και στο οποίο βρέθηκαν τοξίνες παρόμοιες με αυτές του *Vibrio cholerae* και από τότε έχει βρεθεί σε διάφορες μελέτες παγκοσμίως σε αναφορές τόσο για ανθρώπους όσο και για ζώα. (61–64).

Έχει εμφανιστεί σε ολόκληρο τον κόσμο, με τα υψηλότερα ποσοστά να καταγράφονται στις αναπτυσσόμενες χώρες, συμπεριλαμβανομένης της υποσαχάριας Αφρικής, της νότιας Ασίας και της λατινικής Αμερικής (65). Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας προκαλεί περίπου 220 εκατομμύρια διαρροϊκά επεισόδια ετησίως (χωρίς να παρατηρείται μετάδοση από άτομο σε άτομο) με το ένα τρίτο αυτών να αφορά παιδιά ηλικίας κάτω των 5 ετών και οδηγώντας σε περισσότερους από 40.000 θανάτους παγκοσμίως (66). Εκτός από τα παιδιά έχει βρεθεί ότι προσβάλλει και ταξιδιώτες στις περιοχές αυτές και η προσβολή είναι κυρίως αποτέλεσμα της κατανάλωσης τροφίμων ή νερού με κοπρανώδη ρύπανση (67). Η παθογονικότητα τους οφείλεται στην ικανότητα των στελεχών να παράγουν δύο είδη εντεροτοξινών: τις θερμοευαίσθητες (heat-labile, LT) και τις θερμοανθεκτικές (heat-stable, ST).

5. Εντεροαιμορραγικά στελέχη *E.coli* (Enterohemorrhagic EC-EHEC)

Χαρακτηρίστηκαν για πρώτη φορά την δεκαετία του 1980 στις Ηνωμένες Πολιτείες, όταν βρέθηκε ότι αποτελούν αίτιο για ένα ξέσπασμα αιμορραγικής κολίτιδας μετά από κατανάλωση ατελώς ψημένου ή ωμού κρέατος (68). Τα στελέχη EHEC (ή αλλιώς STEC-Shiga toxin-producing *Escherichia coli*) είναι αυτά που προκαλούν συχνότερα νόσο στις αναπτυγμένες χώρες, με τον ορότυπο O157:H7 να αποτελεί τον πιο γνωστό αντιπρόσωπο αυτής της κατηγορίας καθώς ήταν ο πρώτος που χαρακτηρίστηκε (69). Τα στελέχη χαρακτηρίζονται από την παραγωγή της Shiga τοξίνης, η οποία αποτελεί τον κύριο λοιμογόνο παράγοντα της νόσου και στην οποία οφείλεται η έντονη συμπτωματολογία (70). Έχει ζωική προέλευση καθώς η κατανάλωση ατελώς ψημένου κρέατος, απαστερίωτου γάλακτος και ωμών φρούτων και

λαχανικών που έχουν ρυπανθεί με κόπρανα βοοειδών είναι υπεύθυνη για τα περισσότερα ξεσπάσματα που έχουν καταγραφεί, ενώ παράλληλα υψηλότερη επίπτωση εμφανίζεται κατά τους θερμούς μήνες και κυρίως σε παιδιά κάτω των 5 ετών (71,72).

Η βαρύτητα της νόσου κυμαίνεται από ήπια διάρροια χωρίς επιπλοκές έως αιμορραγική κολίτιδα με έντονες κοιλιακές κράμπες και αιματηρή διάρροια. Επιπλέον μπορεί να οδηγήσει στην πρόκληση του αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου, μία απειλητική για τη ζωή πάθηση που χαρακτηρίζεται από οξεία νεφρική ανεπάρκεια, θρομβοκυτταροπενία και μικροαγγειοπαθητική αιμολυτική αναιμία, επιπλοκές που εμφανίζονται κυρίως σε παιδιά ηλικίας κάτω των 10 ετών (73). Δεν είναι απαραίτητη η χορήγηση αγωγής για την αντιμετώπιση της νόσου, ενώ παράλληλα έχει παρατηρηθεί σε μελέτες ότι η χρήση αντιβιοτικών για την αντιμετώπιση της λοίμωξης από EHEC μπορεί να οδηγήσει στην επαγωγή της παραγωγής της Shiga τοξίνης και στην ανάπτυξη του αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου (74).

6. Διάχυτα προσκολλητικά στελέχη *E.coli* (Diffusely Adherent EC-DAEC)

Η κατηγορία αυτή χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά την δεκαετία του 1980, η ονομασία της οποίας προήλθε από την ικανότητα των στελεχών να προσκολλώνται διάχυτα στην επιφάνεια των κυττάρων του ξενιστή *in vitro* (75). Έχει βρεθεί ότι αποτελεί συχνό αίτιο πρόκλησης διαρροιών τόσο στις αναπτυσσόμενες όσο και στις ανεπτυγμένες χώρες σε παιδιά νεαρής ηλικίας ενώ ταυτόχρονα υπάρχουν μελέτες που υποδεικνύουν ότι τα στελέχη αυτά μπορούν να αποτελέσουν και μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας υγιών ατόμων (76). Υψηλότερα ποσοστά εμφανίζονται σε περιοχές με κακές συνθήκες υγιεινής ενώ παράλληλα έχει βρεθεί ότι σχετίζεται και με τον υποσιτισμό στις αναπτυσσόμενες χώρες και ότι προσβάλλει και ταξιδιώτες αυτών των περιοχών.

7. Στελέχη *E.coli* που προκαλούν εξωεντερικές λοιμώξεις (Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*, ExPEC)

Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν στελέχη που ενοχοποιούνται για την πρόκληση λοιμώξεων εκτός της εντερικής οδού, μεταξύ των οποίων λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος (UroPathogenic *E.coli*, UPEC), μηνιγγίτιδας σε νεογνά (Neonatal Meningitis-causing *E.coli*, NMEC) και σήψης (Septicemia-associated *E.coli*, SEPEC) (77–79). Κάθε μία από τις κατηγορίες αυτές φέρει διαφορετικό συνδυασμό λοιμογόνων παραγόντων, η

έκφραση των οποίων αποτελεί χαρακτηριστικό για την κάθε κατηγορία. Αξιοσημείωτο αποτελεί το γεγονός ότι τα στελέχη αυτά δεν διαθέτουν μοναδικά γονοτυπικά χαρακτηριστικά που να διευκολύνουν την διαφοροποίηση τους από τους προηγούμενους παθοτύπους και κατ' επέκταση υπάρχει δυσκολία στην κατηγοριοποίηση τους ως εξωεντερικά παθογόνα.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, το είδος *E.coli* αποτελεί μέλος τόσο της χλωρίδας του ανθρώπου όσο και των ζώων. Όπως και στους ανθρώπους, έτσι και στα ζώα, τα περισσότερα στελέχη *E.coli* είναι μη παθογόνα. Παρόλα αυτά, στελέχη που εμπίπτουν στις προαναφερθέντες κατηγορίες και χαρακτηρίζονται από την παραγωγή προσκολλητινών και τοξινών έχουν την δυνατότητα να προκαλέσουν λοιμώξεις στα ζώα (80). Μία κατηγορία στελεχών *E.coli* που δεν εμφανίζεται στον άνθρωπο και χαρακτηρίζεται μόνο στα ζώα, αφορά στελέχη *E.coli* που προσβάλλουν τα πτηνά (Avian Pathogenic *E.coli*, APEC). Προκαλεί πλήθος λοιμώξεων, οι οποίες οδηγούν σε υψηλά ποσοστά θνησιμότητας και αναφέρονται με τον γενικότερο όρο κολοβακίλλωση (81). Τα στελέχη αυτής της κατηγορίας εμφανίζουν κοινούς λοιμογόνους παράγοντες με στελέχη που προκαλούν εξωεντερικές λοιμώξεις στον άνθρωπο, ο συνδυασμός και τα επίπεδα έκφρασης των οποίων όμως συνηγορούν στην δημιουργία αυτής της νέας κατηγορίας. Οι πιο σημαντικές παθογόνες καταστάσεις που παρατηρούνται στα ζώα περιλαμβάνουν μαστίτιδα, διάρροιες, λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, πνευμονία και λοιμώξεις του αίματος που μπορεί να οδηγήσουν σε σήψη.

Klebsiella pneumoniae

Εντοπίζεται ως μέρος της χλωρίδας του ανθρώπου κυρίως στην ρινοφαρυγγική και γαστρεντερική οδό. Αποτελεί ένα από τους συχνότερους παράγοντες πρόκλησης πρωτοπαθούς λοβώδους πνευμονίας επιφέροντας νέκρωση των κυψελίδων, σχηματισμό σπηλαίων και παραγωγή αιματηρών πτυέλων. Αποτελεί αυξημένο παράγοντα κινδύνου κυρίως για αλκοολικούς και για άτομα με διαταραγμένη πνευμονική λειτουργία (82). Η πνευμονία προκαλούμενη από στελέχη *K.pneumoniae* μπορεί να είναι είτε πνευμονία σχετιζόμενη με χώρους υγείας (Hospital-acquired) είτε πνευμονία της κοινότητας (Community-acquired), τα ποσοστά των οποίων εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την χώρα. Εκτός της πνευμονίας, αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα για πρόκληση βακτηριαιμίας ακόμη και σε νεογνά (83). Παράλληλα έχει βρεθεί ως αίτιο για λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος καθώς και λοιμώξεις ιστών και μαλακών μορίων (84).

Παρόλο που αποτελεί κύριο ανθρώπινο παθογόνο έχει απομονωθεί και από τα ζώα καθώς μελέτες έχουν χαρακτηρίσει το συγκεκριμένο βακτήριο σε ζώα συντροφιάς, κτηνοτροφίας αλλά και πληθώρα άγριων ζώων. Αν και έχει βρεθεί ως αποικιστής στα ζώα, οι περισσότερες αναφορές αφορούν ειδικές περιπτώσεις ή ξεσπάσματα και επικεντρώνονται στο πλήθος λοιμώξεων που προκαλεί (85). Συγκεκριμένα έχει χαρακτηριστεί ως αιτιολογικός παράγοντας λοιμώξεων συμπεριλαμβανομένων μαστίτιδας, λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος, του αναπνευστικού (πνευμονία), του αίματος (σηψαιμία) και του εγκεφάλου (μηνιγγίτιδα), ενώ παράλληλα σε κάποιες περιπτώσεις αποτέλεσε και αίτιο αυξημένης θνησιμότητας των ζώων (86,87).

Pseudomonas aeruginosa

Αποτελεί κοινό βακτήριο που εντοπίζεται συχνότερα σε υγρό περιβάλλον και το έδαφος ενώ παράλληλα είναι ευκαιριακό παθογόνο των φυτών, των ζώων και του ανθρώπου. Έχει την δυνατότητα να προκαλεί πλήθος λοιμώξεων τόσο στην κοινότητα όσο και στο περιβάλλον του νοσοκομείου, κυρίως σε ασθενείς με μειωμένο ανοσοποιητικό σύστημα. Συγκεκριμένα προκαλεί πνευμονικές λοιμώξεις που κυμαίνονται από τραχειοβρογχίτιδα έως νεκρωτική βρογχοπνευμονία. Χαρακτηριστική είναι η ανίχνευσή του σε μεγαλύτερο βαθμό σε ασθενείς με κυστική ίνωση καθώς και σε άτομα συνδεδεμένα με μηχανικό αναπνευστήρα (88). Επιπλέον μπορεί να προκαλέσει πρωτοπαθείς δερματικές λοιμώξεις με πιο γνωστές τις μολύνσεις εγκαυμάτων και την θυλακίτιδα. Έχει την ικανότητα να προκαλεί ωτικές και οφθαλμικές λοιμώξεις με σημαντικότερο παράγοντα κινδύνου την έκθεση σε μολυσμένο νερό ενώ παράλληλα μπορεί να προκαλέσει και ουρολοιμώξεις κυρίως σε άτομα με μόνιμο καθετήρα τα οποία έχουν εκτεθεί σε ευρέος φάσματος αντιβιοτικά (89). Τέλος, έχει χαρακτηριστεί και ως αίτιο βακτηριαιμίας, η οποία συνήθως εμφανίζεται σε άτομα με ουδετεροπενία, εκτεταμένα εγκαύματα και αιματολογικές κακοήθειες και προέρχονται κατά κύριο λόγο από διασπορά των βακτηριδίων από πρωτογενή λοίμωξη αλλά και ενδοκαρδίτιδας κυρίως σε χρόνιους χρήστες ναρκωτικών κυρίως λόγω επαφής με μολυσμένο νερό.

Οι αναφορές του είδους *P.aeruginosa* στα ζώα είναι λίγες, σε σύγκριση με τα προηγούμενα βακτηριακά είδη. Όπως και στον άνθρωπο, έτσι και στα ζώα χαρακτηριστική είναι η πρόκληση λοιμώξεων σε ζώα με μειωμένο ανοσοποιητικό σύστημα (90). Οι λοιμώξεις στις οποίες έχει χαρακτηριστεί είναι ωτίτιδα, δερματικές και οφθαλμικές λοιμώξεις και λοιμώξεις του

αναπνευστικού και ουροποιητικού συστήματος (91). Οι διαθέσιμες ερευνητικές μελέτες αναφέρουν την παρουσία του βακτηρίου κυρίως σε ζώα συντροφιάς, με μεγαλύτερη εμφάνιση σε σκύλους, και σε λιγότερες περιπτώσεις σε κτηνοτροφικά και άγρια ζώα (92).

Acinetobacter baumannii

Το γένος *Acinetobacter baumannii* απαντάται στην φύση καθώς έχει απομονωθεί από το έδαφος, το νερό, τα τρόφιμα, τα ζώα αλλά και στο περιβάλλον του νοσοκομείου. Έχει την ικανότητα να επιβιώνει σε υγρές και ξηρές επιφάνειες για μεγάλα χρονικά διαστήματα ενώ παράλληλα αποτελεί μέρος της χλωρίδας ορισμένων υγιών ατόμων. Μελέτες έχουν επιβεβαιώσει την ικανότητα του να επιβιώνει στο περιβάλλον για μεγάλα χρονικά διαστήματα και να μην απομακρύνεται με χρήση απολυμαντικών.

Αποτελεί το πιο γνωστό είδος του γένους *Acinetobacter* spp από κλινική άποψη. Θεωρείται ότι έχει σχετική μικρή λοιμογόνο δύναμη και η κλινική του σημασία έγκειται στην ικανότητα πρόκλησης λοιμώξεων σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς με παράλληλη ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι πληθώρας αντιβιοτικών. Οι περισσότερες λοιμώξεις για τις οποίες είναι υπεύθυνο είναι ενδονοσοκομειακές και αφορά ασθενείς με παρατεταμένη παραμονή σε μονάδες εντατικής θεραπείας, που λαμβάνουν αντιβιοτικά ευρέως φάσματος ή σε ασθενείς που έχουν μηχανική αναπνευστική υποστήριξη ή κεντρικό φλεβικό καθετήρα. Είναι υπεύθυνο για πρόκληση πνευμονίας στο περιβάλλον του νοσοκομείου ενώ σε ορισμένες χώρες έχει βρεθεί και ως αίτιο πνευμονίας της κοινότητας, πιθανά λόγω αποικισμού της στοματοφαρυγγικής κοιλότητας. Εκτός αυτών, έχει βρεθεί ότι προκαλεί μικροβιαμία ενώ έχει απομονωθεί και από τραύματα σε νοσηλευόμενους στρατιώτες (26). Οι λοιμώξεις από *A.baumannii* συνήθως συνδέονται με ξεσπάσματα στους χώρους υγείας ενώ η μεμονωμένη απομόνωση αυτών ως αίτιο λοίμωξης είναι σπάνια.

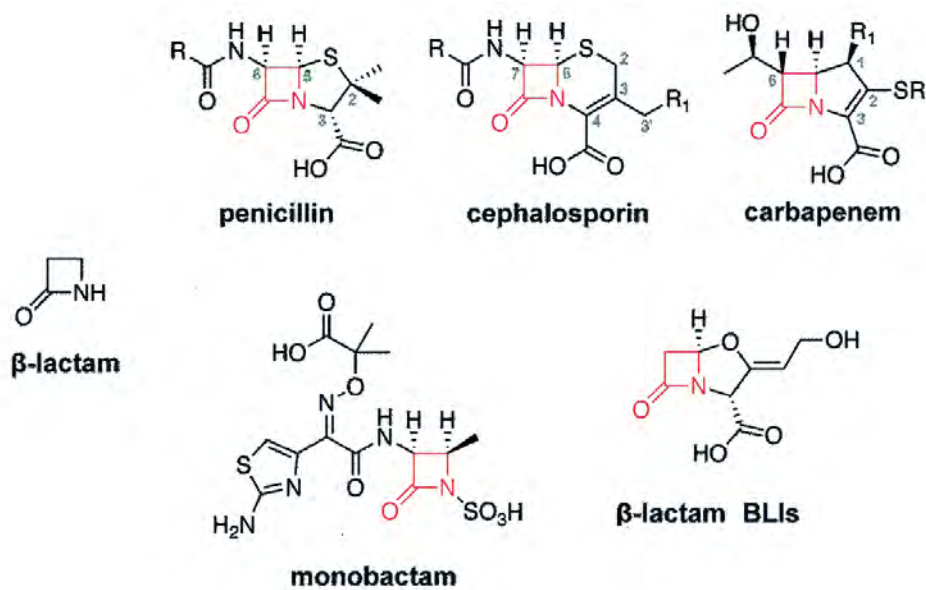
Χαρακτηρισμός των στελεχών έχει γίνει και στα ζώα, παρόλο που τα δεδομένα είναι περιορισμένα. Ως είδος έχει απομονωθεί από ζώα συντροφιάς και κτηνοτροφικά ζώα όπου μελετήθηκε ως αίτιο πρόκλησης λοιμώξεων όπως μαστίτιδα, πνευμονία, σηψαιμία, εγκεφαλοπάθεια, λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, οφθαλμικές λοιμώξεις και λοιμώξεις τραυμάτων (93).

Αντιμικροβιακοί παράγοντες

Με τον όρο αντιβιοτικά εννοούνται ουσίες παραγόμενες από μικροοργανισμούς που δρουν έναντι άλλων μικροοργανισμών. Τα τελευταία χρόνια, η ορολογία αυτή τείνει να αντικατασταθεί από τον ορθότερο όρο «αντιμικροβιακό φάρμακο», ο οποίος περιλαμβάνει, εκτός από τα φυσικά παράγωγα, τα ημι-συνθετικά και συνθετικά αντιβιοτικά, με στόχο την αντιμετώπιση λοιμώξεων από βακτήρια, μύκητες, παράσιτα και ιούς. Τα αντιβιοτικά δρουν σε διάφορα κύρια σημεία του μικροβιακού κυττάρου (κυτταρικό τοίχωμα, γενετικό υλικό, κυτταροπλασματική μεμβράνη, ριβοσώματα) και ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους χωρίζονται σε μικροβιοκτόνα (λύση και κατ' επέκταση θάνατος του μικροβιακού κυττάρου) και σε μικροβιοστατικά (αναστολή του πολλαπλασιασμού). Σε ορισμένες περιπτώσεις όμως είναι δυνατόν ένα αντιβιοτικό άλλοτε να δρα ως μικροβιοκτόνο και άλλοτε ως μικροβιοστατικό, καθώς η δράση ενός αντιβιοτικού εξαρτάται από την συγκέντρωσή του.

Β-λακτάμες

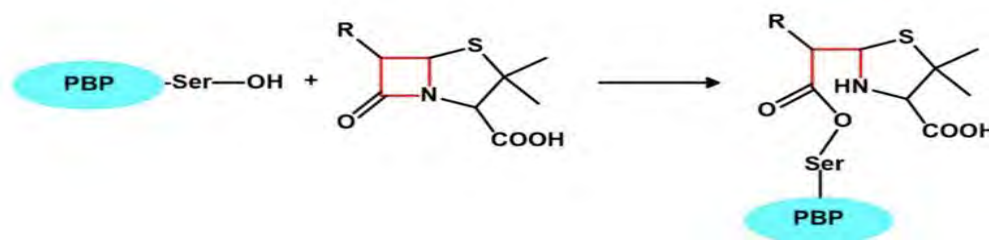
Το 1928 ο σκωτσέζος ιατρός Alexander Fleming, κατά την εκτέλεση πειραμάτων με σταφυλόκοκκους, άφησε επίτηδες τρυβλία εκτεθειμένα, το οποίο είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ενός μύκητα, διαπιστώνοντας ότι τα βακτηριακά στελέχη που βρίσκονταν κοντά του πέθαιναν. Κατά την απομόνωση του διαπίστωσε ότι ο μύκητας αυτός αποτελούσε μέλος του γένους *Penicillium* (94). Παρόλο που η ανακάλυψη αυτή έγινε ευρέως γνωστή την επόμενη χρονιά, η μαζική απομόνωση και χρήση του πραγματοποιήθηκε από το 1940 και έπειτα, από τους επιστήμονες Howard Florey και Ernst Chain (95). Τις επόμενες δεκαετίες ακολούθησε η ανάπτυξη επιπλέον αντιμικροβιακών παραγόντων. Σήμερα η τάξη των β-λακταμών αποτελείται από πέντε κατηγορίες αντιβιοτικών: α) πενικιλίνες, β) αναστολείς β-λακταμασών, γ) κεφαλοσπορίνες, δ) καρβαπενέμες και ε) μονοβακτάμες. Κοινό χαρακτηριστικό αυτών αποτελεί η παρουσία ενός β-λακταμικού δακτυλίου, συνδεδεμένο με διαφορετικές χημικές αλυσίδες και η ακεραιότητα του οποίου σχετίζεται με την βιολογική δράση των αντιβιοτικών. Στις πενικιλίνες και στις καρβαπενέμες ο β-λακταμικός δακτύλιος είναι συνδεδεμένος με έναν πενταμελή δακτύλιο θειαζολιδίνης, στις κεφαλοσπορίνες είναι συνδεδεμένος με έναν εξαμελή δακτύλιο διυδροθειαζίνης, και τέλος οι μονοβακτάμες φέρουν μόνο του τον β-λακταμικό δακτύλιο (χωρίς σύνδεση με άλλο δακτύλιο) (96) (εικ. 10).



Εικόνα 10 Αντιπροσωπευτική εικόνα της δομής των πέντε κατηγοριών της τάξης των Β-λακταμών.

Δράση των β-λακταμικών: Το κύριο συστατικό του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος είναι η πεπτιδογλυκάνη, η βασική δομή της οποίας είναι πολλαπλές αλυσίδες αποτελούμενες από εναλλασσόμενα μόρια Ν-ακετυλογλυκοζαμίνης και Ν-ακετυλομουραμικού οξέος συνδεδεμένα μεταξύ τους με β-1,4 γλυκοσιδικό δεσμό, δημιουργώντας αλυσίδες οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς σχηματίζοντας το άκαμπτο κάλυμμα των βακτηρίων. Ρόλος της είναι να προστατεύει τα βακτήρια από στρεσογόνες συνθήκες και να βοηθά στην διατήρηση της μορφολογίας των κατά την διάρκεια ζωής τους (97). Τα ένζυμα που καταλύουν την δομή και την σύνδεση των αλυσίδων αποτελούν μέλη μιας οικογένειας σερινών πρωτεασών (πχ τρανσπεπτιδάσες, καρβοξυπεπτιδάσες, τρανσγλυκοσυλάσες) τα οποία είναι ευρέως γνωστά ως πενικίλινο-δεσμευτικές πρωτεΐνες (Penicillin-Binding Proteins, PBPs). Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά δρουν αναστέλλοντας την λειτουργία των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για την σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης και για αυτό το λόγο χαρακτηρίζονται ως βακτηριοκτόνα (98). Συγκεκριμένα ο β-λακταμικός δακτύλιος μιμείται την αλληλουχία D-ala-d-ala (δομή στην οποία συνδέονται τα ένζυμα της τρανσπεπτιδάσης για τον σχηματισμό της πεπτιδογλυκάνης, απουσία αντιβιοτικού) λειτουργώντας ως ψευδό υπόστρωμα, με αποτέλεσμα να συνδέεται στο ενεργό κέντρο των ενζύμων (εικ. 11). Η σύνδεση αυτή εμποδίζει τον περαιτέρω μηχανισμό του μονοπατιού με αποτέλεσμα να μην γίνεται η σύνδεση των αλυσίδων της πεπτιδογλυκάνης και

κατ' επέκταση να επέρχεται η λύση του κυττάρου και ο θάνατος του (99).



Εικόνα 11 Μηχανισμός δράσης των β-λακταμικών αντιβιοτικών (σύνδεση στις PBPs).

Όπως αναφέρθηκε, η ανακάλυψη της πενικιλίνης έγινε την δεκαετία του 1930, ενώ η χρήση της ξεκίνησε περίπου μία δεκαετία αργότερα. Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει τις φυσικές πενικιλίνες και τις ημισυνθετικές πενικιλίνες, δηλαδή παράγωγα προερχόμενα από τη χημική μετατροπή των φυσικών πενικιλινών και περιλαμβάνουν τις αντισταφυλοκοκκικές (ή αλλιώς πενικιλίνες ανθεκτικές στην δράση πενικιλινασών), τις αμινοπενικιλίνες, τις καρβοξυπενικιλίνες και τις ουρειδοπενικιλίνες. Παράλληλα, για την καλύτερη αντιμετώπιση των ανθεκτικών-στις-πενικιλίνες βακτηρίων, δημιουργήθηκαν και συνδυασμοί αμινοπενικιλίνης/καρβοξυπενικιλίνης με κάποιον αναστολέα β-λακταμάσης. Η δράση τους περιλαμβάνει τόσο Gram θετικά όσο και Gram αρνητικά (100).

Η πρώτη αναφορά στις κεφαλοσπορίνες έγινε το 1945, όταν ο φαρμακοποιός Giuseppe Brotzu απομόνωσε τον μύκητα *Cephalosporium acremonium*, η απομόνωση και ανάλυση του οποίου μέσα στα επόμενα χρόνια από διάφορους ερευνητές οδήγησε στην ανακάλυψη της πρώτης κεφαλοσπορίνης, της Cephalosporin C (101,102). Βασιζόμενες όλες στην δομή της πρώτης απομονωθείσας κεφαλοσπορίνης, η χημική δομή των κεφαλοσπορινών έχει εξελιχθεί κατά την διάρκεια των χρόνων με στόχο την καλύτερη και πιο διεγερμένη δράση τους και την μείωση των παρενεργειών. Έτσι σήμερα οι κεφαλοσπορίνες κατηγοριοποιούνται σε 5 γενιές ανάλογα με την δράση τους, με την 1η γενιά να δρα πιο αποτελεσματικά έναντι Gram θετικών και με τις επόμενες γενιές (έως και την 4η) προχωρώντας προς την 4η να αυξάνεται η δράση έναντι και των Gram αρνητικών. Εξαιρεση αποτελεί η πέμπτη και τελευταία γενιά που έχει δράση έναντι ορισμένων Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων (103,104).

Η πρώτη αναφορά στις καρβαπενέμες έγινε το 1976 όταν από τον μύκητα *Streptomyces cattleya* απομονώθηκε ένα συστατικό γνωστό ως θειεναμυκίνη, η οποία είχε δράση έναντι Gram

θετικών και Gram αρνητικών. Παρά την ασταθή δομή της, λόγω της δράσης της έναντι βακτηρίων αποτέλεσε μοντέλο για την δημιουργία σταθερότερων παραγώγων, με πρώτη την ιμιπενέμη η οποία έγινε αποδεκτή για κλινική χρήση το 1985.

Άλλος ένα παράγοντας που χαρακτηρίστηκε το 1976 ήταν και οι μονοβακτάμες. Το μόριο αυτό, η νοκαρδισίνη, που απομονώθηκε από τον μικροοργανισμό *Nocardia uniformis* αποτελούνταν μόνο από έναν β-λακταμικό δακτύλιο, στο οποίο οφείλεται και η ονομασία του (monobactam, **monocyclic bacterial-produced beta-lactam**) (106,107). Λόγω του ότι δεν παρουσίαζε ιδιαίτερη αντιμικροβιακή δράση, μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε ενώσεις με όμοια δομή, μεταξύ άλλων και η αζτρεονάμη, οι οποίες οδήγησαν στην ανακάλυψη της υψηλής της δράσης έναντι των Gram αρνητικών βακτηρίων και κατ' επέκταση στην αποδοχή για κλινική χρήση το 1984 (108,109). Αξιοσημείωτο αποτελεί το γεγονός ότι το προϊόν που χορηγείται είναι εξ ολοκλήρου κατασκευασμένο εργαστηριακά, παρόλο που η αζτρεονάμη έχει βρεθεί ως παράγωγο του βακτηρίου *Chromobacterium violaceum* (110,111).

Την ίδια χρονιά με την ανακάλυψη των καρβαπενεμών και μονοβακταμών, το 1976, έγινε και ο χαρακτηρισμός του πρώτου αναστολέα β-λακταμάσης, γνωστό ως κλαβουλανικό οξύ, το οποίο απομονώθηκε από τον μύκητα *Streptomyces clavuligerus*. Κατά τον χαρακτηρισμό του βρέθηκε ότι αποτελεί ένα ασταθές μόριο και λόγω αυτού διακόπηκε η μελέτη του εκείνη την χρονιά (112). Παρόλα αυτά μέσα στην επόμενη δεκαετία, κατά τη διάρκεια μελέτης του παρατηρήθηκε η ισχνή δράση του έναντι των βακτηρίων αλλά και η ισχυρή δράση του όταν συνδυαζόταν με κάποιο άλλο β-λακταμικό αντιβιοτικό (αμοξικιλίνη), δημιουργώντας έτσι το Augmentin το οποίο έγινε αποδεκτό για κλινική χρήση το 1981 για πρώτη φορά στην Αγγλία, ενώ λίγα χρόνια αργότερα, το 1984, έγινε αποδεκτό και στις Ηνωμένες Πολιτείες (113,114). Έτσι λοιπόν σήμερα υπάρχουν 6 αναστολείς β-λακταμασών, εκ των οποίων οι 3 (Avibactam, Vaborbactam, Relebactam) έγιναν αποδεκτοί για κλινική χρήση την τελευταία δεκαετία (115,116).

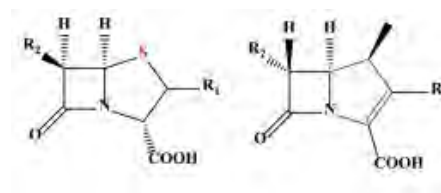
Καρβαπενέμες

Οι καρβαπενέμες δρουν στο κυτταρικό τοίχωμα των Gram αρνητικών βακτηρίων μέσω διείσδυσης από τις πόρινες. Όταν βρεθούν στο περιπλασμικό χώρο των βακτηρίων, συνδέονται με πολλαπλές πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες, εμποδίζοντας τη δράση τους για τον

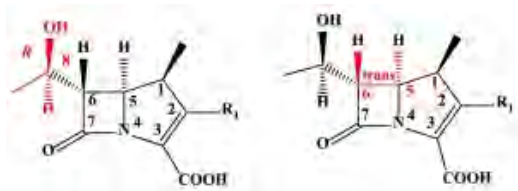
σχηματισμό της πεπτιδογλυκάνης, με αποτέλεσμα να επέρχεται η λύση του κυττάρου λόγω της οσμωτικής πίεσης (117).

Αποτελούν από τις πρώτες κατηγορίες αντιβιοτικών που χορηγούνται σε περιπτώσεις λοίμωξης από ανθεκτικά βακτήρια καθώς λόγω της χημικής τους δομής εμφανίζουν ανθεκτικότητα στην δράση ορισμένων β-λακταμασών (118). Θεωρείται ένας καλός αντιμικροβιακός παράγοντας για την σημερινή ιατρική καθώς δεν επηρεάζεται από την δράση πολλών β-λακταμασών και έχει την δυνατότητα να εισέρχεται μέσω των πορινών. Μελέτες έχουν δείξει ότι η χημική δομή των καρβαπενεμών περιλαμβάνει στοιχεία στα οποία οφείλονται σημαντικά χαρακτηριστικά των καρβαπενεμών (112,119). Ορισμένα σημαντικά στοιχεία είναι τα εξής:

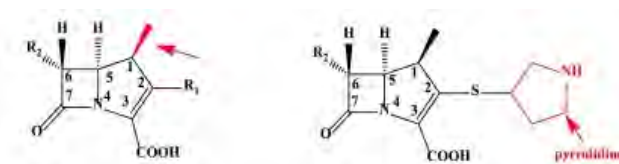
- Ένα άτομο άνθρακα στην θέση C-1, αντί για ένα άτομο θείου (πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες) το οποίο συμβάλλει στο εύρος δράσης και στην σταθερότητα έναντι των β-λακταμασών.



- Ένα υδροξυαιθύλιο στην πλάγια αλυσίδα, καθώς και η trans διαμόρφωση των ανθράκων 5 και 6 του β-λακταμικού δακτυλίου προσδίδει ανθεκτικότητα έναντι στην υδρόλυση από τις β-λακταμάσες.

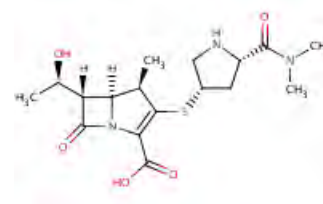


- Ο δακτύλιος πυρολιδίνης και η μεθυλ-ομάδα που εμφανίζονται σε ορισμένες από τις καρβαπενέμες αυξάνουν την δράση και την σταθερότητα αυτών των ενώσεων.



Ιμιπενέμη (Imipenem)

Όπως αναφέρθηκε, η πρώτη καρβαπενέμη που έγινε διαθέσιμη για κλινική χρήση είναι η ιμιπενέμη (εικ. 12). Εμφανίζει δράση τόσο έναντι των Gram θετικών όσο και των Gram αρνητικών. Λόγω της παρουσίας ενζύμων στον οργανισμό (νεφρική διυδροπεπτιδάση I)



Εικόνα 12 Χημική δομή της Ιμιπενέμης (Imipenem).

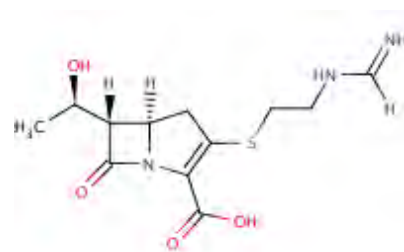
που μεταβολίζουν την ιμιπενέμη, συνήθως χορηγείται με κάποιον επιπλέον παράγοντα (Cilastatin) για καλύτερη δράση.

Η αντοχή στην ιμιπενέμη έχει περιγραφεί από πολύ νωρίς, όταν το 1986 χαρακτηρίστηκαν στελέχη τα οποία είτε είχαν αντοχή είτε ανέπτυξαν αντοχή κατά τη διάρκεια της θεραπείας, η αποτυχία της οποίας οφειλόταν σε αλλαγές των μεμβρανικών πρωτεϊνών και κατά συνέπεια μειωμένης εισόδου του αντιμικροβιακού παράγοντα στα βακτηριακά κύτταρα (120).

Στην σημερινή θεραπευτική σύμφωνα με την EUCAST υπάρχουν διαφορετικά όρια ευαισθησίας για την ιμιπενέμη, ανάλογα τον στόχο. Συγκεκριμένα για την αντιμετώπιση Εντεροβακτηριακών και στελεχών *A.baumannii* τα στελέχη εμφανίζουν ευαισθησία με Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ≤ 2 , ενώ έναντι των στελεχών *Morganella morganii*, *Proteus* spp και *Providencia* spp παρόλο που το όριο ευαισθησίας ορίζεται $<0,001$ mg/L, στα στελέχη αυτά εμφανίζει χαμηλή δραστικότητα οπότε και απαιτείται υψηλή συγκέντρωση ιμιπενέμης για την αντιμετώπιση (121).

Μεροπενέμη (Meropenem)

Έγινε αποδεκτή για χρήση το 1996 στο γενικό πληθυσμό, συμπεριλαμβανομένων και παιδιών μεγαλύτερα των τριών μηνών για αντιμετώπιση λοιμώξεων του δέρματος και της βακτηριακής μηνιγγίτιδας ενώ μετά από μελέτες κατέστη



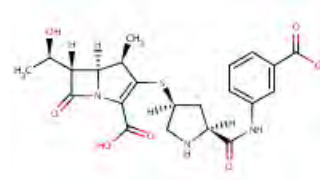
Εικόνα 13 Χημική δομή της Μεροπενέμης (Meropenem),

δυνατή η χρήση της και σε παιδιά ηλικίας μικρότερη των τριών μηνών, αυξάνοντας παράλληλα το εύρος των λοιμώξεων στο οποίο χορηγείται (122).

Η μεροπενέμη εμφανίζει πολλές ομοιότητες με την ιμιπενέμη με εξαίρεση ότι έχει την δυνατότητα να δρα μόνη της (χωρίς επιπρόσθετους παράγοντες), γρηγορότερα, χωρίς να προκαλεί νεφροτοξικότητα ενώ ταυτόχρονα εμφανίζει μικρότερη δράση έναντι των Gram θετικών και μεγαλύτερη δράση έναντι των Gram αρνητικών σε σχέση με την ιμιπενέμη (123,124).

Ερταπενέμη (Ertapenem)

Αποτελεί μια ευρέως δράσης καρβαπενέμη, με μικρότερο όμως εύρος συγκριτικά με την ιμιπενέμη. Η χρήση της επιτράπηκε στην Αμερική το 2001 ενώ ένα χρόνο αργότερα έγινε αποδεκτή και στην Ευρώπη. Χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση λοιμώξεων από Εντεροβακτηριακά και ορισμένα Gram θετικά, ενώ φαίνεται ότι δεν έχει δράση έναντι της *P.aeruginosa* και *Acinetobacter* spp (125). Το

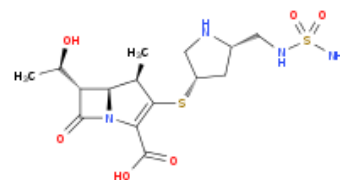


Εικόνα 14 Χημική δομή της Ερταπενέμης (Ertapenem).

χαρακτηριστικό της χημικής της δομής που την περιορίζει έναντι των προαναφερθέντων βακτηρίων της δίνει το πλεονέκτημα να συνδέεται σε μεγαλύτερο βαθμό με τις πρωτεΐνες του πλάσματος, αυξάνοντας έτσι τον χρόνο ημιζωής της. Παρά την σημαντική δράση της έναντι βακτηριακών λοιμώξεων, κατά την κλινική της χρήση έχει παρατηρηθεί ότι έχει την δυνατότητα να διαπερνά τον εγκεφαλικό φραγμό με αποτέλεσμα να προκαλεί νευρολογικές διαταραχές και εγκεφαλοπάθεια (126).

Δοριπενέμη (Doripenem)

Έγινε αποδεκτή για κλινική χρήση στις Ηνωμένες Πολιτείες το 2007 για την αντιμετώπιση σοβαρών ενδοκοιλιακών λοιμώξεων και λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος, ενώ ταυτόχρονα άρχισε να έχει κλινική εφαρμογή και στην Ευρώπη για αντιμετώπιση της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας (127). Στα στελέχη *E.coli* εμφανίζει υψηλή συγγένεια με τη PBP2, επηρεάζοντας το σχήμα του



Εικόνα 15 Χημική δομή της Δοριπενέμης (Doripenem).

βακτηριακού κυττάρου καθώς και τις PBP3 και 4 (128). Όπως και οι υπόλοιπες καρβαπενέμες έτσι και δοριπενέμη δεν εμφανίζει αντοχή έναντι των μεθικιλίνη ανθεκτικών στελεχών *S.aureus* (MRSA), *Enterococcus faecium* και βανκομυκίνη-ανθεκτικών Εντεροκόκκων, ενώ χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση λοιμώξεων κατά των Στρεπτόκοκκων, συμπεριλαμβανομένου και του *Str.pneumoniae*. Για την αντιμετώπιση των Gram αρνητικών η MIC του προσαρμόζεται σε υψηλότερα ή χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τις υπόλοιπες καρβαπενέμες, ανάλογα το βακτήριο (129).

Άλλες καρβαπενέμες

Πανιπενέμη (Panipenem)

Είναι μια από τις πρώτες καρβαπενέμες, μαζί με την ιμιπενέμη που βρέθηκαν στην

κυκλοφορία το 1993. Δεν κυκλοφορεί στην Ευρώπη και τις Ηνωμένες Πολιτείες, ενώ χρήση της γίνεται μόνο στην Ιαπωνία, την Κορέα και την Κίνα. Όπως και η ιμιπενέμη, συγχορηγείται με έναν επιπλέον παράγοντα (Betamipron) για αποφυγή ή/ και για πρόληψη νεφροτοξικότητας (130). Χαρακτηρίζεται από μεγάλο εύρος δράσης έναντι αερόβιων και αναερόβιων Gram θετικών και Gram αρνητικών. Μελέτες έχουν δείξει ότι έχει δράση έναντι του *Str.pneumoniae* αλλά και Gram αρνητικών στελεχών που παράγουν β-λακταμάσες, ενώ εμφανίζει αμφιλεγόμενη δραστικότητα έναντι στελεχών *P.aeruginosa* (131).

Βιαπενέμη (Biapenem)

Παρόλο που οι μελέτες για την δράση της ξεκίνησαν την δεκαετία του 1990, το αντιβιοτικό αυτό αναπτύχθηκε και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στην Ιαπωνία το 2002 και δεν διατίθεται στην Αμερική και την Ευρώπη. Έχει ευρέως φάσματος δράση έναντι Gram θετικών και Gram αρνητικών αερόβιων και αναερόβιων βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων και στελεχών που παράγουν β-λακταμάσες. Έχει σταθερή χημική δομή η οποία δεν υδρολύεται από την νεφρική διωδροπεπτιδάση I, με αποτέλεσμα να μπορεί να χορηγηθεί χωρίς παρουσία επιπρόσθετων παραγόντων (132).

Τεμπιπενέμη (Tebipenem)

Είναι η μοναδική χορηγούμενη από το στόμα καρβαπενέμη η οποία αναπτύχθηκε στην Ιαπωνία την δεκαετία του 1990 και βρίσκεται στην κυκλοφορία μόνο σε ορισμένες χώρες της Ασίας. Μελέτες έχουν αποδείξει την δράση της έναντι Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων ανθεκτικών και μη στελεχών *Str.pneumoniae* και Εντεροβακτηριακών, ενώ όπως και οι περισσότερες καρβαπενέμες δεν εμφανίζει δράση έναντι στελεχών MRSA και *P.aeruginosa* (112,133).

Τομοπενέμη (Tomopenem)

Εμφανίζει σταθερότητα έναντι της δράσης της νεφρικής διωδροπεπτιδάσης I και έναν αυξημένο χρόνο ημιζωής στο πλάσμα σε σχέση με την Ιμιπενέμη και την Μεροπενέμη (134). Έχει ευρέως φάσματος δράση για την αντιμετώπιση λοιμώξεων από Gram αρνητικά και Gram θετικά βακτήρια, ενώ ταυτόχρονα μελέτες έχουν δείξει ότι εμφανίζει δράση έναντι στελεχών MRSA και κεφταζιδίμη ανθεκτικών στελεχών *P.aeruginosa* (135,136). Σύμφωνα με την

βιβλιογραφία οι κλινικές δοκιμές σταμάτησαν λόγω έλλειψης χρηματοδοτήσεων (137).

Καρβαπενέμες και Αναστολείς β-λακταμασών

Η ολοένα και μεγαλύτερη εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών και η δυσκολία αντιμετώπισης αυτών λόγω περιορισμένων θεραπευτικών επιλογών έχει εδώ και χρόνια υποχρεώσει τον ερευνητικό κλάδο στην εύρεση νέων ενώσεων για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων. Ανάμεσα σε αυτές τις ενώσεις βρίσκονται και 2 μόρια, η ρελεμπακτάμη (Relebactam) και η βαμπορμπακτάμη (Vaborbactam), τα οποία συνδυαστικά με τις καρβαπενέμες χρησιμοποιούνται στην σημερινή ιατρική. Παρόλο που εμφανίζουν δομικές και χημικές διαφορές, τα δύο μόρια αποτελούν αναστολέα β-λακταμασών, χωρίς να εμφανίζουν από μόνες τους αντιμικροβιακή δράση, και στοχεύουν στελέχη που παράγουν τις καρβαπενεμάσες των κλάσεων A και C. Το φάρμακο μεροπενέμη-βαμπορμπακτάμη έγινε αποδεκτό για κλινική χρήση το 2017 και στόχος της δημιουργίας του ήταν η αποτελεσματική αντιμετώπιση καρβαπενέμη ανθεκτικών Εντεροβακτηριακών, συμπεριλαμβανομένων και των KPC (+) στελεχών, επαναφέροντας με αυτό τον τρόπο τη δράση της μεροπενέμης έναντι των στελεχών (138). Το φάρμακο ιμιπενέμη-ρελεμπακτάμη έγινε αποδεκτό το 2019 και χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση λοιμώξεων που προκαλούνται από ιμιπενέμη-ανθεκτικά βακτήρια, όπως Εντεροβακτηριακών και στελεχών *P.aeruginosa* συμπεριλαμβανομένων και ορισμένων που παράγουν β-λακταμάσες ευρέως φάσματος (139,140).

Αντιμικροβιακή αντοχή

Οι μικροοργανισμοί, μέσα από την πίεση της αντιμικροβιακής θεραπείας αναπτύσσουν αρχικά απλούστερους και στη συνέχεια πολυπλοκότερους μηχανισμούς αντοχής. Οι κυριότεροι μηχανισμοί μέσω των οποίων τα βακτήρια καθίστανται ανθεκτικά στα αντιβιοτικά είναι οι εξής:

- 1) η ενζυμική αδρανοποίηση του αντιβιοτικού μέσω παραγωγής ενζύμων,
- 2) ο μηχανισμός αντλίας, όπου το μικροβιακό κύτταρο με κατανάλωση ενέργειας μεταφέρει το αντιβιοτικό έξω από το κύτταρο,
- 3) η τροποποίηση του στόχου δράσης, όπου ο μικροοργανισμός μέσω γενετικών αλλαγών τροποποιεί το στόχο σύνδεσης του αντιβιοτικού πάνω στον μικροβιακό στόχο και έτσι το

αντιβιοτικό δεν μπορεί να δράσει.

Η αντοχή στα αντιβιοτικά μπορεί να είναι εγγενής ή επίκτητη. Η πρώτη αναφέρεται σε κάποια αντοχή η οποία είτε προϋπήρχε είτε μπορεί να δημιουργήθηκε κατά την εξέλιξη των μικροοργανισμών μέσω αλλαγής της δομής τους, ενώ η επίκτητη αντοχή αναφέρεται στη αλλαγή του γενετικού κώδικα του μικροοργανισμού ή στην απόκτηση ενός γονιδίου αντοχής από ένα ανθεκτικό μικροοργανισμό (141). Ένας από τους πιο ευρέως διαδεδομένους τρόπους απόκτησης μηχανισμού επίκτητης αντοχής είναι η οριζόντια μεταφορά (Horizontal Gene Transfer- HGT), μέσω της οποίας γίνεται μεταφορά γενετικού υλικού (γονίδια ανθεκτικότητας ή/και γονίδια που κωδικοποιούν για λοιμογόνους παράγοντες) μεταξύ στελεχών τόσο του ίδιου είδους αλλά και διαφορετικών ειδών.

Η αντιμικροβιακή αντοχή έχει γίνει γνωστή από την δεκαετία του 1940, λίγο καιρό μετά την ανακάλυψη και χρήση της πενικιλίνης, όταν εμφανίστηκε το πρώτο στέλεχος *S.aureus* με αντοχή στην πενικιλίνη (142). Στην σημερινή εποχή τα περισσότερα βακτήρια εμφανίζουν επίκτητη αντοχή σε πλήθος αντιμικροβιακών παραγόντων και σε περισσότερους από έναν ταυτόχρονα, λαμβάνοντας την ονομασία υπερβακτηρίδια ή αλλιώς superbugs. Η λανθασμένη χρήση, η κατάχρηση των αντιβιοτικών αλλά και ο λανθασμένος ή μη επαρκής έλεγχος της διάδοσης των λοιμώξεων έχουν θορυβήσει όλους τους οργανισμούς Υγείας παγκοσμίως λόγω της διάδοσης πολυανθεκτικών στελεχών με αποτέλεσμα να απειλείται ακόμη και η ικανότητα αντιμετώπισης απλών λοιμώξεων καθώς υπάρχει αδυναμία αντιμετώπισης τους με τις σημερινές θεραπευτικές επιλογές αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο την θνησιμότητα αλλά και το κόστος λόγω της παρατεταμένης ιατροφαρμακευτικής περίθαλψης (143–145).

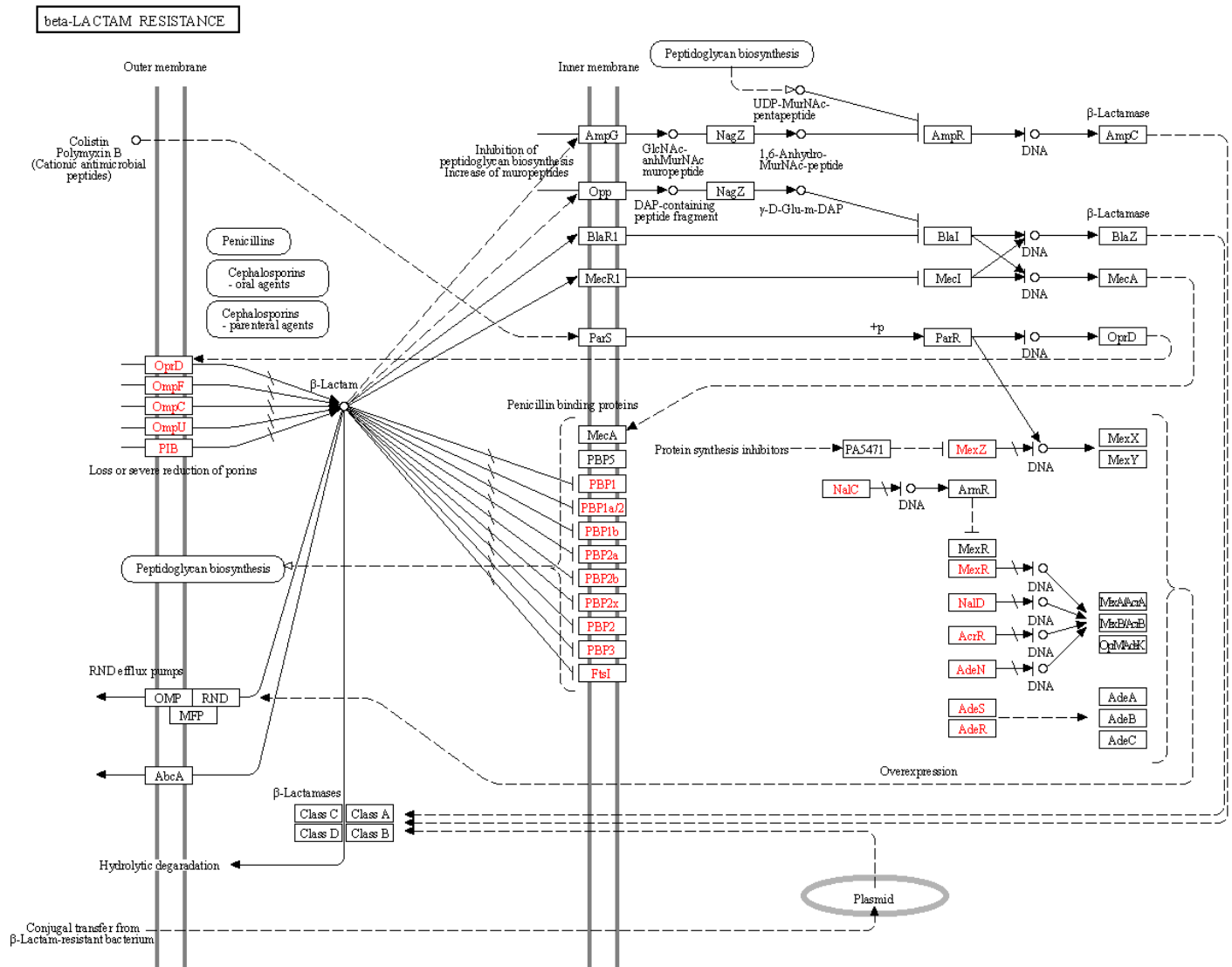
Πιο συγκεκριμένα, η ολοένα και αυξανόμενη αντοχή στις καρβαπενέμες έχει οδηγήσει τους ερευνητές στην εκτεταμένη μελέτη των μηχανισμών μέσω των οποίων προσδίδεται η ανθεκτικότητα στα στελέχη και οφείλεται κατά κύριο λόγο στους εξής μηχανισμούς (εικ. 16):

1. **Παρουσία αντλίας** μέσω της οποίας η καρβαπενέμη τείνει να εξάγεται από το κύτταρο. Έχουν χαρακτηριστεί διάφορες οικογένειες αντλιών στα Εντεροβακτηριακά και Αζυμωτικά Gram αρνητικά βακτήρια, που συμβάλλουν στην εμφάνιση αντοχής προς αυτή την τάξη αντιβιοτικών (146,147).
2. **Ενζυμική αδρανοποίηση**, δηλαδή παραγωγή ενζύμων που υδρολύουν τις καρβαπενέμες και

ονομάζονται καρβαπενεμάσες. Αποτελεί και τον πιο σημαντικό μηχανισμό μέσω του οποίου προσδίδεται αντοχή όχι μόνο στις καρβαπενέμες αλλά και γενικότερα στις β-λακτάμες (και για αυτό τα ένζυμα αναφέρονται γενικότερα με τον ορισμό β-λακταμάσες). Η σημαντικότητα αυτού του μηχανισμού οφείλεται στην ικανότητα των βακτηρίων να μεταφέρουν τα γονίδια που κωδικοποιούν για καρβαπενεμάσες (οριζόντια μεταφορά) το οποίο έχει ως συνέπεια τη δημιουργία πολυανθεκτικών στελεχών.

3. **Μεταλλάξεις**, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα αλλαγή στην έκφραση ή και ολική απώλεια των πορινών και κατ' επέκταση μειωμένη διαπερατότητα, υπερέκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν καρβαπενεμάσες καθώς και γονιδίων που κωδικοποιούν τα πρωτεϊνικά μονοπάτια λειτουργίας των αντλιών. Πρόκληση αυτών μπορεί να επέλθει και από παρατεταμένη έκθεση στα αντιβιοτικά (148). Η υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων μπορεί να οδηγήσει και σε διπλασιασμό του γονιδίου αντοχής (149).

Εκτός των παραπάνω βασικών μηχανισμών που αναφέρθηκαν, μελέτες έχουν χαρακτηρίσει και άλλους μηχανισμούς μέσω των οποίων μπορεί να προσδοθεί αντοχή στις καρβαπενέμες. Για παράδειγμα, έχουν χαρακτηριστεί στελέχη ανθεκτικά στις καρβαπενέμες τα οποία έφεραν AmpC μαζί με ένζυμα ESBL. Επιπρόσθετα, μελέτες έχουν δείξει ότι σε περίπτωση απουσίας του αμυντικού συστήματος CRISPR-Cas, τα βακτήρια εμφανίζουν επίσης υψηλά επίπεδα αντοχής προς τις καρβαπενέμες, χωρίς να έχει διευκρινιστεί η συσχέτιση επαρκώς (149). Ο κάθε ένας μηχανισμός έχει την δυνατότητα να προσδίδει αντοχή στο βακτήριο αλλά μελέτες δείχνουν ότι συχνά η αντιμικροβιακή αντοχή έναντι των καρβαπενεμών οφείλεται σε συνδυασμό μηχανισμών. Σπανιότερη αποτελεί και η περίπτωση ενδογενούς αντοχής (πχ *St.maltophilia*) λόγω παρουσίας γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα που υδρολύουν τις καρβαπενέμες.



Εικόνα 16 Στην εικόνα απεικονίζεται το μονοπάτι δράσης των β -λακταμικών αντιβιοτικών αλλά και των διαφόρων στοιχείων των βακτηρίων που μπορούν να αναστείλουν την δράση αυτή, προσφέροντας ανθεκτικότητα στα βακτήρια. (KEGG 2023)

B-λακταμάσες και Καρβαπενεμάσες

Οι β-λακταμάσες αποτελούν μία μεγάλη κατηγορία ένζυμων που έχουν την δυνατότητα να υδρολύουν τον β-λακταμικό δακτύλιο, και κατ' επέκταση εμποδίζουν την δράση των β-λακταμικών αντιβιοτικών. Έχουν κατηγοριοποιηθεί με βάση δύο συστήματα, με το ένα να αποτελεί το σύστημα Bush–Jacoby–Medeiros όπου κατηγοριοποιούνται με βάση τη λειτουργία τους σε 4 βασικές κατηγορίες κάθε μία από τις οποίες περιλαμβάνει αρκετές υποομάδες και το δεύτερο να αποτελεί το σύστημα Ambler με το οποίο τα ένζυμα κατηγοριοποιούνται σύμφωνα με την νουκλεοτιδική αλληλουχία τους αλλά όχι την ενζυμική τους δράση (150,151). Από τα 2 αυτά συστήματα, το σύστημα Ambler συναντάται συχνότερα σε μελέτες, ενώ παράλληλα υπάρχει βάση δεδομένων στην οποία αναφέρεται ότι υπάρχουν 7842 ένζυμα κατηγοριοποιημένα με βάση το σύστημα αυτό, εκ των οποίων τα 1540 είναι εκτενώς χαρακτηρισμένα (152).

Οι καρβαπενεμάσες αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια β-λακταμασών. Παρόλο που ονομάζονται έτσι λόγω της ικανότητας υδρόλυσης των καρβαπενεμών, έχουν την δυνατότητα να αναστέλλουν την δράση πληθώρας β-λακταμικών αντιβιοτικών. Τα ένζυμα αυτά, σύμφωνα με το σύστημα Ambler, κατηγοριοποιούνται σε 3 μεγάλες κατηγορίες:

- **Κλάση A:** τα ένζυμα της κατηγορίας αυτής έχουν στο ενεργό τους κέντρο σερίνη, προσφέροντας τους τη δυνατότητα να υδρολύουν όλες τις β-λακτάμες. Αποτελεί μια από τις πιο ποικιλόμορφες και ευρέως διαδεδομένες κατηγορίες ενζύμων και περιλαμβάνει γονίδια που εντοπίζονται τόσο στο χρωμόσωμα όσο και σε πλασμίδια. Αποτελούν ένζυμα τα οποία αναστέλλονται από τον παράγοντα βορονικό οξύ (Boronic acid). Σημαντικότερο όλων αυτών αποτελεί το ένζυμο KPC (*Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase), το οποίο εντοπίζεται σε πλήθος στελεχών που αποτελούν αίτιο πρόκλησης ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων, ενώ ταυτόχρονα έχει βρεθεί και σε ξεσπάσματα σε διάφορες χώρες παγκοσμίως (153).
- **Κλάση B:** είναι γνωστές και ως μέταλλο-β-λακταμάσες καθώς έχουν στο ενεργό τους κέντρο ιόντα μετάλλου. Κατηγοριοποιούνται σε 3 ομάδες (B1, B2, B3) ανάλογα με τον αριθμό ιόντων ψευδαργύρου που περιέχουν στο ενεργό τους κέντρο. Οι ομάδες B1 και B3 και έχουν την δυνατότητα να υδρολύουν τις καρβαπενέμες προσφέροντας αντοχή σε όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, με εξαίρεση τις μονοβακτάμες, ενώ η λιγότερο διαδεδομένη ομάδα B2 έχει περιορισμένο εύρος δράσης αναστέλλοντας μόνο τις καρβαπενέμες.

Χαρακτηρίστηκαν για πρώτη φορά σε στελέχη προερχόμενα από το περιβάλλον, (π.χ. *Stenotrophomonas maltophilia*). Εμφανίζουν αναστολή στον παράγοντα Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), ένας χηλικός παράγοντας του ψευδαργύρου (Zn^{2+}). Οι πιο συχνές μέταλλο-β-λακταμάσες που συναντάμε στους χώρους υγείας ανήκουν στην ομάδα B1 και περιλαμβάνει τα ένζυμα IMP (Imipenemase), VIM (Verona integron-encoded metallo-β-lactamase) και NDM (New Delhi metallo-β-lactamase).

- **Κλάση D:** είναι γνωστές και ως οξασιλινάσες (Oxacillinases) λόγω της ικανότητας υδρόλυσης ορισμένων πενικιλινών όπως η οξασιλλίνη. Όπως και στην κλάση A, τα ένζυμα αυτής της κατηγορίας περιέχουν σερίνη στο ενεργό τους κέντρο και ανιχνεύονται κατά κύριο λόγο σε Αζυμωτικά στελέχη (πχ. *A.baumannii*) και σπανιότερα σε στελέχη της κατηγορίας των Εντεροβακτηριακών. Η πρώτη οξασιλινάση χαρακτηρίστηκε την δεκαετία του 1980 σε ένα στέλεχος *A.baumannii* και μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί περισσότερα από 900 ένζυμα αυτής της κατηγορίας (154). Στα Εντεροβακτηριακά συναντάται συχνότερα το γονίδιο *bla_{OXA-48}* και έχει ταυτοποιηθεί όχι μόνο σε κλινικά στελέχη αλλά και σε στελέχη απομονωμένα από πληθώρα οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων ζώων τόσο της άγριας φύσης όσο και οικόσιτων. Λόγω της μειωμένης ικανότητας υδρόλυσης των καρβαπενεμών σε συνδυασμό με ότι δεν αναστέλλεται από παράγοντες όπως το βορονικό οξύ και το EDTA, και κατ' επέκταση υπάρχει δυσκολία στην ταυτοποίηση του συγκεκριμένου μηχανισμού αντοχής, τα αληθή ποσοστά ύπαρξης στελεχών που φέρουν το γονίδιο αυτό προσδιορίζονται με μεγάλη δυσκολία (155).

Εκτός των 3 αυτών κατηγοριών, υπάρχει και μία τέταρτη κατηγορία, η κλάση C, γνωστή και ως AmpC κεφαλοσπορινάσες, μέσα στην οποία τοποθετούνται ορισμένα ένζυμα που εμφανίζουν δράση έναντι των καρβαπενεμών (156).

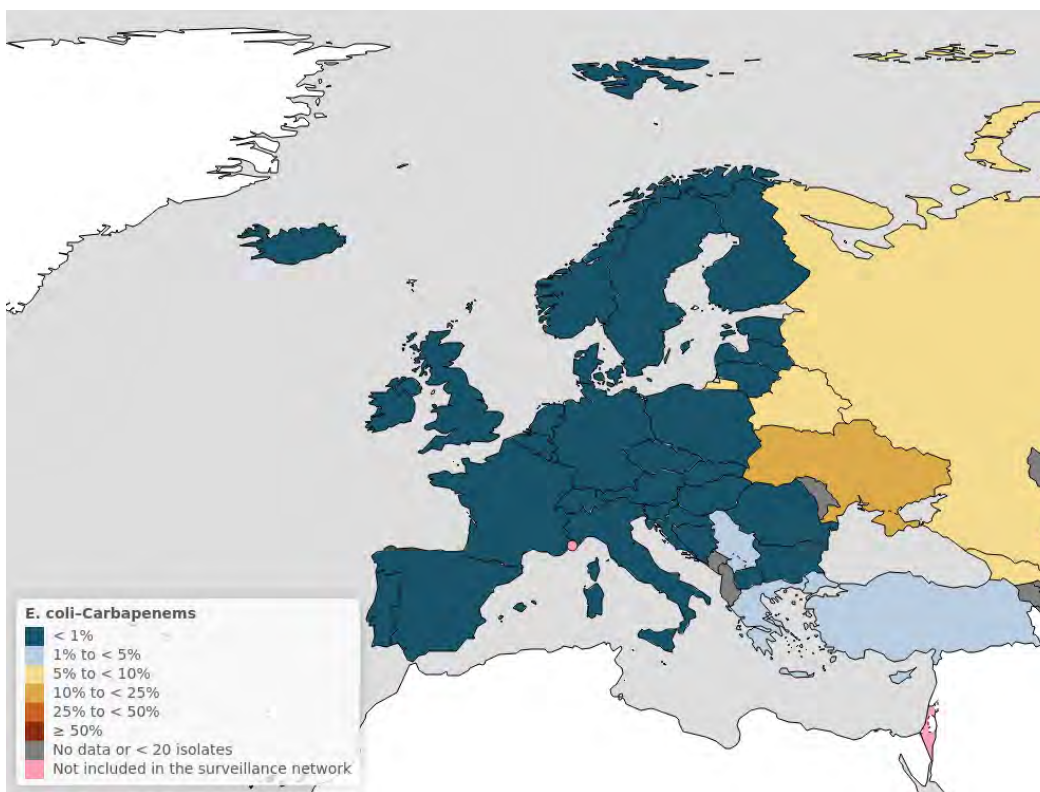
Αντιμικροβιακή αντοχή *E.coli*, *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa* και *A.baumannii*

Καθένα από τα τέσσερα αυτά βακτήρια, εμφανίζει αντοχή προς διάφορες τάξεις αντιβιοτικών είτε ενδογενή είτε επίκτητη. Μια τάξη αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνταν χρόνια και εξακολουθεί να χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση αυτών των ειδών αποτελούν οι καρβαπενέμες. Ωστόσο, μέσα στις τελευταίες δύο δεκαετίες έχει καταγραφεί η ολοένα και αυξανόμενη απομόνωση καρβαπενέμη-ανθεκτικών στελεχών η οποία έχει θορυβήσει την επιστημονική κοινότητα με τους μεγάλους οργανισμούς υγείας (WHO/CDC/ECDC) να τα

τοποθετούν σε επίπεδο απειλής «κρίσιμο» και με καθένα από αυτά να αποτελεί πρόκληση κατά την θεραπευτική αντιμετώπιση (157,158).

Ανθεκτικότητα στελεχών *E.coli*

Σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, το 20% των στελεχών *E.coli* εμφανίζουν αντοχή στα αντιβιοτικά πρώτης και δεύτερης γραμμής. Ο παγκόσμιος μέσος όρος γενικά ανθεκτικών στελεχών *E.coli* υπολογίζεται περίπου στο 42%, ένα ποσοστό το οποίο στην πραγματικότητα βρίσκεται σε χαμηλότερα επίπεδα καθώς επηρεάζεται από την συμμετοχή των χωρών στην επιτήρηση (159). Η αντοχή των στελεχών προς τις καρβαπενέμες που καταγράφεται στην Ευρώπη παραμένει κάτω από 1% στην πλειοψηφία των ευρωπαϊκών χωρών ενώ για την Ελλάδα εμφανίζεται περίπου 1,1% για το 2021 (εικ. 17).



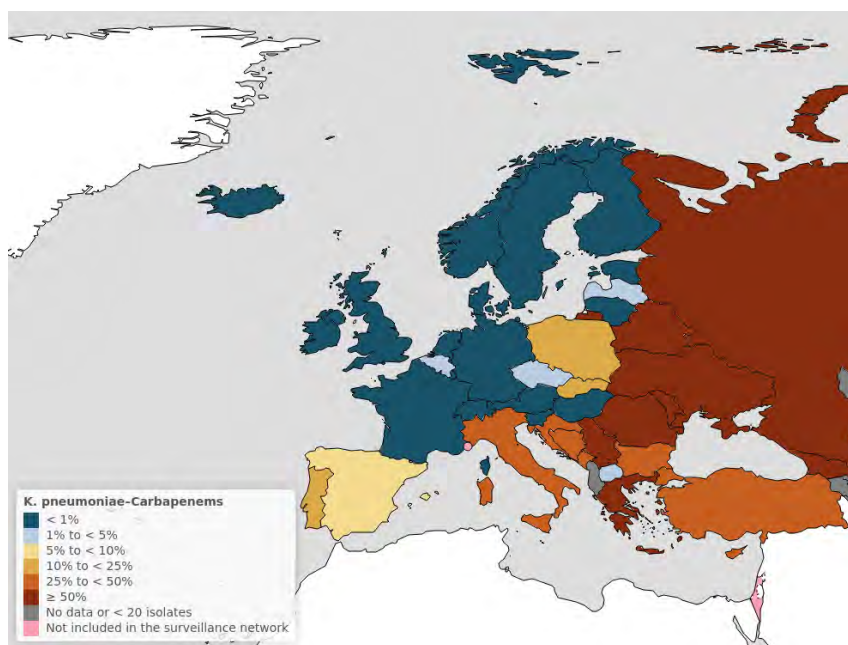
Εικόνα 17 Απεικόνιση των ποσοστών αντοχής του *E.coli* στις καρβαπενέμες στην Ευρώπη, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας για το έτος 2021 (δεδομένα 2023).

Τα χαμηλά αυτά ποσοστά δεν έχουν καταστήσει την αναγκαιότητα επιτήρησης των καρβαπενέμη ανθεκτικών στελεχών *E.coli* με αποτέλεσμα το Ελληνικό σύστημα υγείας να μην έχει διαθέσιμα δεδομένα.

Τα στελέχη *E.coli* έχουν χαρακτηριστεί από την παρουσία καρβαπενεμασών των κλάσεων A, B και D παγκοσμίως με κύριους αντιπροσώπους τα γονίδια *bla_{KPC}*, *bla_{VIM}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48-like}* και *bla_{IMP}*. Επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι η κατανομή των γονιδίων εξαρτάται από την γεωγραφική περιοχή απομόνωσης των στελεχών (160). Στην Ελλάδα το πρώτο *bla_{VIM}* θετικό στέλεχος απομονώθηκε το 2001 (161). Μία δεκαετία αργότερα, έγινε αναφορά του πρώτου ξεσπάσματος από *bla_{KPC}* θετικά στελέχη *E.coli* και το γονίδιο *bla_{NDM}* ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά σε στέλεχος *E.coli* το 2017 (162,163). Αντιθέτως, από όσο μπορούμε να γνωρίζουμε, το γονίδιο *bla_{OXA-48}* δεν έχει απομονωθεί από στέλεχος *E.coli* στην Ελλάδα. Σύμφωνα με μελέτες, υπάρχουν σποραδικές περιπτώσεις στελεχών που φέρουν τα γονίδια *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}* χωρίς όμως να καταγράφεται η πραγματική εικόνα της επιδημιολογίας των στελεχών, γιατί λόγω της εμφάνισης του βακτηρίου ως μέλος της φυσιολογικής χλωρίδας του ανθρώπου πολλές φορές «περνάει απαρατήρητο».

Ανθεκτικότητα στελεχών *K.pneumoniae*

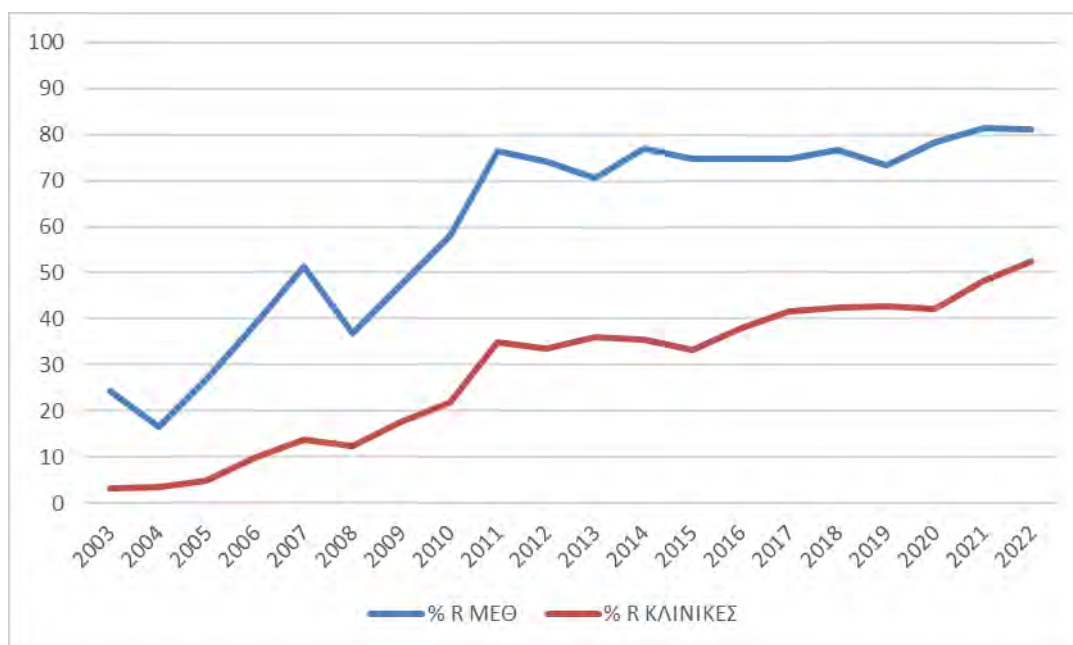
Τα τελευταία επιδημιολογικά δεδομένα, τα οποία είναι του έτους 2021, δείχνουν ότι τα ποσοστά των καρβαπενέμη ανθεκτικών στελεχών *K.pneumoniae* κυμαίνονται από λιγότερο από 1% για αρκετές χώρες της δυτικής και βόρειας Ευρώπης μέχρι 50% για χώρες κυρίως της ανατολικής Ευρώπης. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο



Εικόνα 18 Απεικόνιση των ποσοστών αντοχής του βακτηρίου *Kl.pneumoniae* στις καρβαπενέμες στην Ευρώπη, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας και το Ευρωπαϊκό Κέντρο Πρόληψης και Ελέγχου Νόσων για το έτος 2021 (δεδομένα 2023).

Οργανισμό Υγείας και το ECDC, στην Ελλάδα το 2020 το ποσοστό των καρβαπενέμη ανθεκτικών στελεχών ήταν 66,3% ενώ μέσα στον επόμενο χρόνο καταγράφηκε αύξηση κατά 7,4% κατατάσσοντας την τρίτη στην Ευρώπη (εικ. 18).

Σύμφωνα με το Ελληνικό σύστημα επιτήρησης το ποσοστό ανθεκτικών στελεχών *K.pneumoniae* που απομονώνονται στην χώρα βρίσκεται γύρω στο 80% τόσο για το έτος 2021 και 2022 για τις Μονάδες εντατικής Θεραπείας ενώ αντίστοιχα γύρω στο 50% για τις κλινικές των νοσοκομείων που συμμετέχουν στην επιτήρηση (εικ. 19).



Εικόνα 19 Καταγραφή των στελεχών *Kl.pneumoniae* με αντοχή στις καρβαπενέμες από τον Εθνικό Οργανισμό Δημόσιας Υγείας της Ελλάδος από το 2003 έως έτος 2022. Στις «ΚΛΙΝΙΚΕΣ» δεν συμπεριλαμβάνεται η Χειρουργική, για την οποία υπάρχουν διαθέσιμα ξεχωριστά δεδομένα. (Ιούλιος 2023)

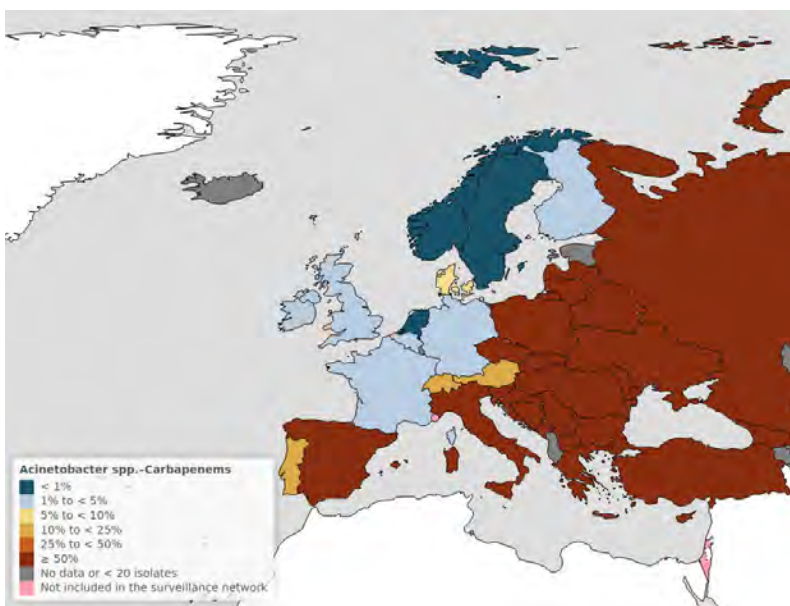
Αποτελεί βακτήριο το οποίο έχει χαρακτηριστεί με όλους τους προαναφερθέντες μηχανισμούς, προσφέροντας τους ανθεκτικότητα έναντι των καρβαπενεμών. Ένας από τους συχνότερους μηχανισμούς είναι η παραγωγή καρβαπενεμασών με πρώτο να ανιχνεύεται το γονίδιο *bla_{KPC}*, που βρέθηκε σε ένα ξέσπασμα οφειλόμενο σε καρβαπενέμη ανθεκτικά στελέχη *K.pneumoniae* που καταγράφηκε στις Ηνωμένες Πολιτείες το 2000 (162). Το γονίδιο *bla_{OXA-48}* βρέθηκε το 2003 σε στέλεχος που απομονώθηκε στην Τουρκία και έκτοτε έχει χαρακτηριστεί σε αρκετές χώρες της Ευρώπης και της Ασίας ενώ αξιοσημείωτο αποτελεί το γεγονός ότι δεν ανιχνεύεται σχεδόν καθόλου στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής και την Λατινική Αμερική. Ωστόσο, λόγω των πολλαπλών αλληλίων που συγκαταλέγονται στην οικογένεια των

οξασιλλινασών μελέτες έχουν δείξει την διασπορά διαφόρων *bla*_{OXA} γονιδίων σε παγκόσμιο επίπεδο στα στελέχη *K.pneumoniae* (164). Το 2008 χαρακτηρίστηκε το πρώτο στέλεχος που έφερε το γονίδιο *bla*_{NDM} στην Σουηδία και μέσα στα επόμενα δύο χρόνια χαρακτηρίστηκαν στελέχη σε πολλές χώρες παγκοσμίως.

Στην Ελλάδα τα πρώτα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη εμφανίστηκαν το 2002 φέροντας γονίδιο της οικογένειας των μετάλλο-β-λακταμασών (*bla*_{VIM}), το οποίο και παρέμεινε ο κύριος μηχανισμός αντοχής για αρκετά χρόνια (165). Η πρώτη περίπτωση *bla*_{KPC}-θετικών στελεχών *K.pneumoniae* περιεγράφηκε το 2007 με την Ελλάδα να αποτελεί μία από τις πρώτες χώρες στην οποία περιεγράφηκε ενδημική εξάπλωση στελεχών που έφεραν το εν λόγω γονίδιο (166). Το 2011 εμφανίστηκαν και τα πρώτα θετικά *bla*_{NDM} στελέχη και έναν χρόνο αργότερα καταγράφηκε το πρώτο ξέσπασμα από *bla*_{OXA-48} θετικά στελέχη (167). Με το πέρασμα των ετών, ο κύριος μηχανισμός αντοχής που χαρακτηρίζει τα στελέχη είναι η παρουσία του γονιδίου *bla*_{KPC}, ακολουθούμενο από το γονίδιο *bla*_{NDM} και έπειτα το γονίδιο *bla*_{VIM}, ενώ ταυτόχρονα εμφανίζονται και πολλές περιπτώσεις στελεχών που φέρουν γονίδια και από τις δύο κλάσεις A και B. Αντιθέτως, το γονίδιο *bla*_{OXA-48} αποτελεί έναν μηχανισμό που εμφανίζεται μόνο σε σποραδικές περιπτώσεις.

Ανθεκτικότητα στελεχών *A.baumannii*

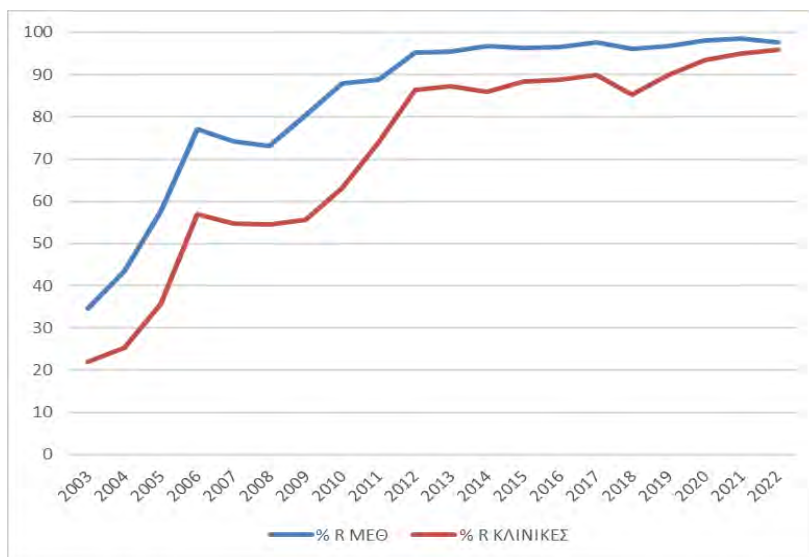
Για αρκετά χρόνια πρώτη θεραπευτική επιλογή για την αντιμετώπιση στελεχών *A.baumannii* ήταν οι καρβαπενέμες. Ωστόσο, πολύ σύντομα με την πρώτη χρήση ως θεραπευτική επιλογή, άρχισαν να εμφανίζονται τα πρώτα ανθεκτικά στελέχη. Παρόλο που τα ποσοστά εμφάνισης καρβαπενέμη ανθεκτικών στελεχών *A.baumannii* σε ορισμένες χώρες εμφανίζονται



Εικόνα 20 Απεικόνιση των ποσοστών αντοχής του βακτηρίου *A.baumannii* στις καρβαπενέμες στην Ευρώπη, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας και το Ευρωπαϊκό Κέντρο Πρόληψης και Ελέγχου Νόσων για το έτος 2021 (δεδομένα 2023).

μικρότερα από 25%, η ανθεκτικότητα έναντι της Ιμιπενέμης και μεροπενέμης καταγράφεται μεγαλύτερη από 90% για πολλές χώρες της ανατολικής Ευρώπης (εικ. 20).

Στην Ελλάδα το ποσοστό είναι μεγαλύτερο του 98% για το έτος 2021, αν και μια μικρή μείωση, της τάξης του 1%, σημειώνεται για το ποσοστό των ανθεκτικών στελεχών που απομονώθηκαν από τις μονάδες εντατικής θεραπείας το έτος 2022 (εικ. 21).



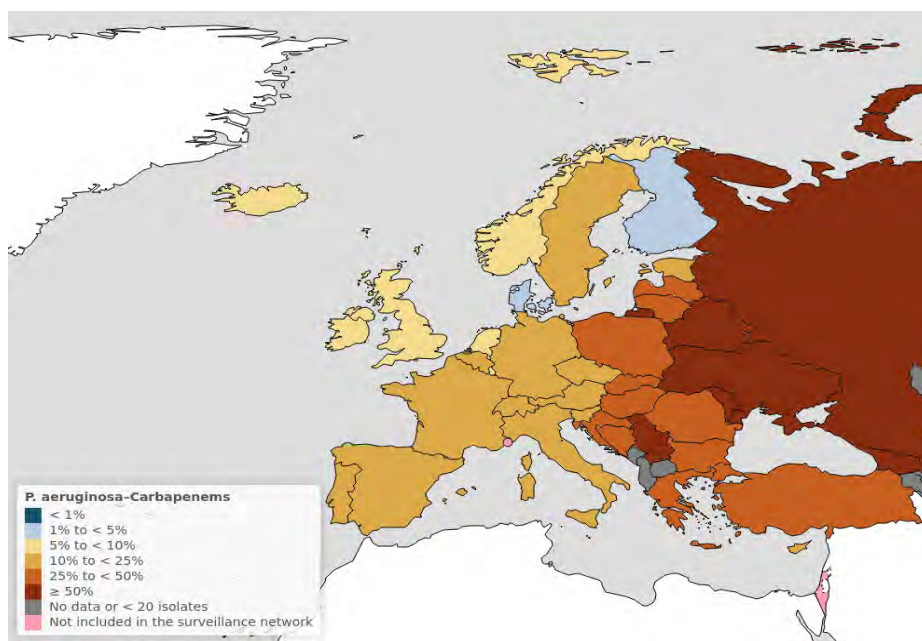
Εικόνα 21 Καταγραφή των στελεχών *A.baumannii* με αντοχή στις καρβαπενέμες από τον Εθνικό Οργανισμό Δημόσιας Υγείας της Ελλάδος από το 2003 έως έτος 2022. Στις «ΚΛΙΝΙΚΕΣ» δεν συμπεριλαμβάνεται η Χειρουργική, για την οποία υπάρχουν διαθέσιμα ξεχωριστά δεδομένα. (Ιούλιος 2023)

Ο κύριος μηχανισμός αντοχής των στελεχών *A.baumannii* που περιγράφεται είναι η παρουσία γονιδίων που κωδικοποιούν καρβαπενεμάσες, με τα περισσότερα γονίδια να ανήκουν στην κλάση D. Συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι τα στελέχη *A.baumannii* παράγουν ενδογενώς μια β-λακταμάση που κωδικοποιείται από την οικογένεια γονιδίων *bla_{OXA-51}*-like προσφέροντας παρόλα αυτά χαμηλού επιπέδου αντοχή προς τις β-λακτάμες. Ωστόσο, κάποια αλλήλια αυτής της οικογένειας έχουν χαρακτηριστεί από την ικανότητα τους να προσφέρουν υψηλή αντοχή έναντι των β-λακταμών, συμπεριλαμβανομένων και των καρβαπενεμών. Εκτός των φυσικών αυτών γονιδίων που φέρει, στο είδος *A.baumannii* μέχρι σήμερα έχει βρεθεί πληθώρα γονιδίων που κωδικοποιούν για β-λακταμάσες που παράλληλα προσφέρουν αντοχή προς τις καρβαπενέμες. Το πρώτο στέλεχος με αντοχή στην Ιμιπενέμη βρέθηκε το 1985 σε έναν ασθενή του Ηνωμένου Βασιλείου, για την αντοχή του οποίου υπεύθυνο ήταν το γονίδιο *bla_{OXA-23}*. Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί πολλά ξεσπάσματα από στελέχη *A.baumannii* που φέρουν το εν λόγω γονίδιο. Το δεύτερο συχνότερο γονίδιο που απομονώνεται στα στελέχη *A.baumannii* είναι το *bla_{OXA-58}*, το οποίο χαρακτηρίστηκε πρώτη φορά το 2003 στην Γαλλία (168). Εκτός των γονιδίων αυτών, στα στελέχη *A.baumannii* έχουν βρεθεί και γονίδια της κλάσης A και B των

β-λακταμασών. Συγκεκριμένα, γονιδιακοί έλεγχοι έχουν δείξει ότι έχουν την ικανότητα να παράγουν KPC και GES αλλά και μετάλλο-β-λακταμάσες των οικογενειών IMP, VIM, SIM, και NDM, με ορισμένα εξ αυτών να είναι ακόμη σε χαμηλά επίπεδα (169). Η αντοχή των στελεχών προς τις καρβαπενέμες οφείλεται εκτός των άλλων και σε άλλους μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένης της τροποποίησης στόχου ή την απώλειας πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης, ενώ σε πολλές περιπτώσεις συμβάλλουν περισσότεροι από έναν μηχανισμοί για την επαγωγή της ανθεκτικότητας των στελεχών (170). Στην Ελλάδα τα πρώτα στελέχη με αντοχή στην Ιμιπενέμη άρχισαν να εμφανίζονται το 2000 χωρίς όμως να έχει βρεθεί ο παράγοντας που τους πρόσδιδε αντοχή. Μέσα στα επόμενα χρόνια έγινε καταγραφή των πρώτων ξεσπασμάτων από στελέχη *A.baumannii* που έφεραν το γονίδιο *bla_{OXA}-58*, ενώ με το πέρασμα του χρόνου εμφανίστηκε σε μεγαλύτερη συχνότητα το γονίδιο *bla_{OXA}-23*, αντικαθιστώντας το *bla_{OXA}-58*.

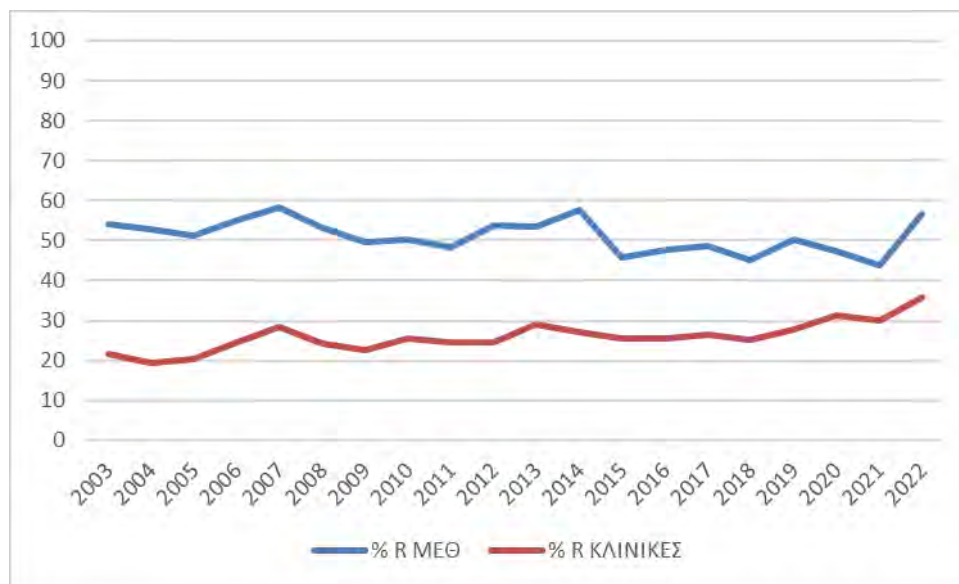
Ανθεκτικότητα στελεχών *P.aeruginosa*

Σύμφωνα με τα τελευταία διαθέσιμα επιδημιολογικά δεδομένα (έτος 2021), τα ποσοστά που καταγράφονται στις περισσότερες χώρες της Ευρώπης κυμαίνονται από 3,5% μέχρι 45,9% με την Ελλάδα να εμφανίζει ένα ποσοστό περίπου 33%, ενώ σε ορισμένες χώρες της ανατολικής Ευρώπης τα ποσοστά ξεπερνούν το 50% (εικ. 22). Σύμφωνα με το ελληνικό σύστημα υγείας για το ίδιο έτος τα ποσοστά αντοχής των στελεχών προς τις καρβαπενέμες στην Ελλάδα αγγίζουν το 30% στις κλινικές των νοσοκομείων ενώ 44% στις μονάδες εντατικής



θεραπείας ενώ εν έτη 2022 καταγράφεται αύξηση των ανθεκτικών στελεχών κατά 5,7% και 12,5% αντίστοιχα (εικ. 23).

Εικόνα 22 Απεικόνιση των ποσοστών αντοχής του βακτηρίου *Ps.aeruginosa* στις καρβαπενέμες στην Ευρώπη, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας και το Ευρωπαϊκό Κέντρο Πρόληψης και Ελέγχου Νόσων για το έτος 2021 (δεδομένα 2023).



Εικόνα 23 Καταγραφή των στελεχών *Ps.aeruginosa* με αντοχή στις καρβαπενέμες από τον Εθνικό Οργανισμό Δημόσιας Υγείας της Ελλάδος από το 2003 έως έτος 2022. Στις «ΚΛΙΝΙΚΕΣ» δεν συμπεριλαμβάνεται η Χειρουργική, για την οποία υπάρχουν διαθέσιμα ξεχωριστά δεδομένα. (Ιούλιος 2023)

Η επιλογή αντιμικροβιακής θεραπείας για την αντιμετώπιση λοιμώξεων από *P.aeruginosa* αποτελεί μια δύσκολη διαδικασία λόγω των πολλαπλών μηχανισμών, μέσω των οποίων εμφανίζει αντοχή προς τις διάφορες τάξεις αντιβιοτικών ακόμη και κατά τη διάρκεια θεραπείας. Συγκεκριμένα, αποτελεί βακτήριο το οποίο εμφανίζει αντοχή λόγω απώλειας πορινών της εξωτερικής μεμβράνης (*oprD*), της υπερέκφρασης αντλιών, παραγωγής ενζύμων ή/και παρουσίας μεταλλάξεων (171). Τα στελέχη χαρακτηρίζονται από την παραγωγή κυρίως μέταλλο-β-λακταμασών παγκοσμίως με τις οικογένειες IMP, VIM, SPM και GIM να ανιχνεύονται συχνότερα. Το 2007 έγινε η πρώτη αναφορά στελέχους που κωδικοποιούσε το ένζυμο KPC, ένα χρόνο αργότερα χαρακτηρίστηκε στέλεχος που έφερε γονίδιο της οικογένειας των οξασιλλινών, ενώ το 2011 έγινε χαρακτηρισμός στελεχών που έφεραν και το γονίδιο *blaNDM* στην Ευρώπη, με καθένα από τα γονίδια αυτά να εμφανίζονται σε χαμηλά ποσοστά (172).

Στην Ελλάδα τα πρώτα στελέχη που έφεραν το γονίδιο *blaVIM* έκαναν την εμφάνισή τους το 1996, το οποίο γονίδιο αποτελεί έναν από τους συχνότερους μηχανισμούς αντοχής των στελεχών της χώρας (173). Ωστόσο, σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί φαίνεται ότι η αντοχή δεν οφείλεται εξ ολοκλήρου στην παραγωγή καρβαπενεμασών αλλά στην παρουσία αντλιών ή/και απώλεια πορινών.

Καρβαπενέμη ανθεκτικά στελέχη στα ζώα

Καρβαπενέμη ανθεκτικά στελέχη και των τεσσάρων ειδών έχουν χαρακτηρισθεί και στα ζώα παγκοσμίως. Μελέτες έχουν αναδείξει πολλούς από του προαναφερθέντες μηχανισμούς αντοχής στα είδη αυτά, με τις περισσότερες αναφορές να παρουσιάζουν τα γονίδια *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}* και μέλη της οικογένειας των οξασιλλινών ως κύριους μηχανισμούς ανθεκτικότητας, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις γίνεται αναφορά και σε υπερέκφραση αντλιών και απώλεια πορινών (174,175). Στην Ελλάδα αναφορά των στελεχών αυτών στα ζώα γίνεται σε ελάχιστες περιπτώσεις, με ορισμένα είδη (*A.baumannii*) να μην αναφέρονται σε καμία μελέτη. Παράλληλα, ο έλεγχος ευαισθησίας και γονοτυπικός έλεγχος των στελεχών είναι περιορισμένος με τις έρευνες να επικεντρώνονται σε μοναδικές περιπτώσεις ή ξεσπάσματα.

Η προσβολή των ζώων και η ανάπτυξη ασθενειών μπορεί να οδηγήσει σε μεγάλες οικονομικές απώλειες που αφορούν τόσο τους αγρότες όσο και τους παραγωγούς, ενώ ταυτόχρονα αυξάνονται οι πιθανότητες μεταφοράς τυχόν ανθεκτικών στελεχών και προς τον άνθρωπο (176). Η προφύλαξη των ζώων από λοιμώξεις προκαλούμενες από τα τέσσερα αυτά είδη επιτυγχάνεται με εφαρμογή κανόνων υγιεινής και πρακτικές διαχείρισης, στα οποία συμπεριλαμβάνεται η παρακολούθηση της υγείας των ζώων, ο εμβολιασμός τους καθώς και η συνετή χρήση των αντιβιοτικών μόνο όταν είναι απαραίτητη.

Η χρήση των αντιβιοτικών και συγκεκριμένα των καρβαπενεμών στην κτηνιατρική εμπίπτει σε διαφορετικούς κανονισμούς παγκοσμίως. Στην πλειοψηφία, οι Οργανισμοί Υγείας που αφορούν την χρήση αντιβιοτικών στα ζώα απαγορεύουν την χρήση καρβαπενεμών, με εξαίρεση ειδικές κλινικές περιπτώσεις και συνήθως σε ζώα συντροφιάς (177). Σύμφωνα με μελέτες, είναι εμφανής η παρουσία καρβαπενέμη ανθεκτικών στελεχών και στα ζώα, αν και τα ποσοστά διατηρούνται σε χαμηλά επίπεδα (178). Παρόλα αυτά, τα πραγματικά επιδημιολογικά δεδομένα που αφορούν τα στελέχη με αντοχή έναντι των καρβαπενεμών παραμένουν άγνωστα, καθώς δεν εφαρμόζονται μέτρα επιτήρησης ή δεν χρησιμοποιούνται σωστές πρακτικές για την ανίχνευση των στελεχών, ενώ ταυτόχρονα υπάρχει έλλειψη πληροφοριών που να απευθύνονται στους κτηνιάτρους (179). Παράλληλα, λόγω της μη χορήγησης καρβαπενεμών στον τομέα της κτηνιατρικής, οι περισσότερες μελέτες που είναι διαθέσιμες επικεντρώνονται στον εντοπισμό μηχανισμών αντοχής έναντι των αντιμικροβιακών παραγόντων που χρησιμοποιούνται στον

τομέα αυτό, με αποτέλεσμα οι μηχανισμοί που προσφέρουν αντοχή έναντι των καρβαπενεμών να παραμένουν απροσδιόριστοι-να περνούν απαρατήρητοι.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΤΟΧΟΣ

Η Ελλάδα εμφανίζει υψηλά ποσοστά αντοχής σε καρβαπενέμες Gram-αρνητικών βακτηρίων (Εντεροβακτηριακών και Αζυμωτικών). Στην Ελλάδα η πρώτη καρβαπενεμάση που ανιχνεύθηκε ήταν η *bla_{blm}* σε στέλεχος *P. aeruginosa* το 2000 και ακολούθησε η ανάδυση και η διασπορά στελεχών *K. pneumoniae* που έφεραν το *bla_{KPC}* γονίδιο. Πολύ αργότερα εμφανίστηκαν άλλες δύο καρβαπενεμάσεις, οι οποίες κωδικοποιούνται από τα γονίδια *bla_{OXA-48}* και *bla_{NDM}*. Το τελευταίο γονίδιο εμφανίστηκε αρχικά στην Νοτιοανατολική Ασία και την Κίνα και στη συνέχεια είχε μια επιτυχή πορεία παγκόσμια. Το κλινικό πρόβλημα των στελεχών που φέρουν το εν λόγω γονίδιο είναι η παραγωγή μιας καρβαπενεμάσης της τάξης B, η οποία δεν αναστέλλεται από τους νέους αναστολείς των β-λακταμασών (αβιμπακτάμη, βαμπορμπακτάμη, ρελεμπακτάμη) με αποτέλεσμα η μόνη θεραπευτική επιλογή να είναι η νέα κεφαλοσπορίνη, η κεφιντεροκόλη. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της διασποράς του γονιδίου *bla_{NDM}* σε διάφορα Gram-αρνητικά βακτηρίδια τα οποία απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα ανθρώπων και ζώων κατά την περίοδο 2017-2023 στην Θεσσαλία. Παράλληλα, μελετήθηκε η δυνατότητα μεταφοράς του συγκεκριμένου γονιδίου μεταξύ στελεχών τόσο του ίδιου γένους και είδους όσο και μεταξύ διαφορετικών γενών μέσω χαρακτηρισμού γενετικών στοιχείων που έφεραν το εν λόγω γονίδιο.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας σε συνεργασία με το τμήμα Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών της μελέτης

Τα στελέχη που μελετήθηκαν ήταν όλα Gram-αρνητικά βακτηρίδια τα οποία είχαν αντοχή στις καρβαπενέμες (MIC_{imipenem}: Εντεροβακτηριακά > 2 mg/L, *A.baumannii* > 2 mg/L, *P.aeruginosa* > 0.001 mg/L, MIC_{meropenem}: Εντεροβακτηριακά > 2 mg/L, *A.baumannii* > 2 mg/L, *P.aeruginosa* > 2 mg/L) σύμφωνα με τα όρια ευαισθησίας της Ευρωπαϊκής Επιτροπής Ελέγχου της Αντιμικροβιακής Ευαισθησίας (European Committee in Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST). Απομονώθηκαν κυρίως από κλινικά δείγματα ασθενών του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας κατά το χρονικό διάστημα 2017-2023, τα οποία επιλέχτηκαν τυχαία, και τα οποία περιγράφονται παρακάτω. Παράλληλα συλλέχτηκαν ορθοπρωκτικά δείγματα ζώων τα οποία ελέγχθηκαν για παρουσία Gram-αρνητικών βακτηριδίων με αντοχή σε καρβαπενέμες στα πλαίσια διερεύνησης της διασποράς τους στα ζώα. Οι μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη.

Συλλογή στελεχών από ανθρώπους

Η συλλογή των στελεχών από ανθρώπους περιλάμβανε 270 βακτήρια διαφορετικών ασθενών, τα οποία επιλέχτηκαν τυχαία και ισοδύναμα καταναμενημένα, το χρονικό διάστημα 2017-2023 εκ των οποίων:

- 22 στελέχη *E.coli* (2017-2022) (Μέσος όρος ποσοστού καρβαπενέμη-ανθεκτικών στελεχών *E.coli* ανά έτος: 0,73%)
- 69 στελέχη *K.pneumoniae* (2021-2023) (Μέσος όρος ποσοστού καρβαπενέμη-ανθεκτικών στελεχών *K.pneumoniae* ανά έτος: 66,3%)
- 76 στελέχη *P.aeruginosa* (2021-2023) (Μέσος όρος ποσοστού καρβαπενέμη-ανθεκτικών στελεχών *P.aeruginosa* ανά έτος: 38.6%)
- 103 στελέχη *A. baumannii* (2020-2023) (Μέσος όρος ποσοστού καρβαπενέμη-ανθεκτικών στελεχών *A. baumannii* ανά έτος: 96,71%)

Μοναδικό κριτήριο για την επιλογή των στελεχών είναι η αντοχή τους έναντι των καρβαπενεμών. Ο πρωταρχικός έλεγχος ευαισθησίας που οδήγησε στην επιλογή των στελεχών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο ελέγχου αντιμικροβιακής αντοχής του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου.

Συλλογή στελεχών από ζώα με στόχο την απομόνωση Gram-αρνητικών βακτηριδίων με αντοχή σε καρβαπενέμες

Με στόχο να γίνει ένας προκαταρκτικός έλεγχος για παρουσία Gram-αρνητικών βακτηρίων με αντοχή σε καρβαπενέμες, συνολικά συλλέχθηκαν 756 δείγματα ζώων εκ των οποίων

- 331 δείγματα βοοειδών
- 314 δείγματα ορνιθοειδών
- 111 δείγματα χοίρων,

Για κάθε ζώο συλλέχθηκαν 2 ορθοπρωκτικά δείγματα σε στυλεό μεταφοράς (Transwab® Amies, Corsham) τα οποία μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο την ίδια μέρα της δειγματοληψίας. Κάθε ένα από τα δείγματα εμβαπτίστηκε σε θρεπτικό ζωμό (Tryptone Soy Broth, Bioprepare) και τοποθετήθηκε στους 37°C για 24 ώρες. Ύστερα από το πέρας αυτών, 10μL του ζωμού ενοφθαλμίστηκαν σε χρωμογόνο εκλεκτικό υλικό, ειδικό για την ανίχνευση στελεχών που εμφανίζουν αντοχή στις καρβαπενέμες (chromID™ CARBA, BioMérieux). Τα θρεπτικά υλικά επώσθησαν στους 37°C για 18-24 ώρες, μετά το πέρας των οποίων έγινε επισκόπηση των αποικιών. Διακριτές αποικίες που αναπτύχθηκαν στα χρωμογόνα υλικά ενοφθαλμίστηκαν σε MacConkey άγαρ για περαιτέρω διερεύνηση (ταυτοποίηση και έλεγχος ευαισθησίας).

Ταυτοποίηση στελεχών

Η ταυτοποίηση των στελεχών πραγματοποιήθηκε με χρήση του αυτοματοποιημένου συστήματος Vitek II (bioMérieux). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η κάρτα ταυτοποίησης Gram αρνητικών βακτηρίων GN, η οποία βασίζεται σε έλεγχο 47 διαφορετικών βιοχημικών

αντιδράσεων για την ταυτοποίηση τους. Στα στελέχη που ταυτοποιήθηκαν ως *E.coli*, *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa* και *A.baumannii* πραγματοποιήθηκε έλεγχος ευαισθησίας, όπως περιγράφεται παρακάτω.

Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιμικροβιακούς παράγοντες

Έλεγχος ευαισθησίας με το αυτοματοποιημένο σύστημα Vitek II

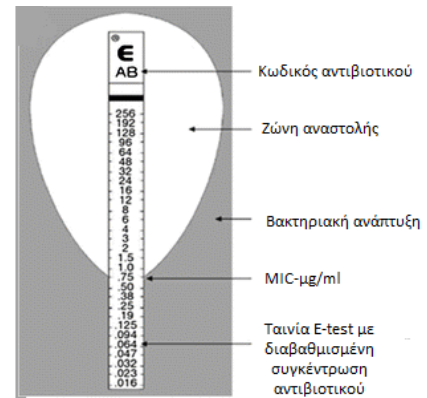
Ο πρωταρχικός έλεγχος ευαισθησίας για διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες των στελεχών που προήλθαν από τα ανθρώπινα δείγματα και των στελεχών που αναπτύχθηκαν από τα ζωικά δείγματα πραγματοποιήθηκε με το αυτοματοποιημένο σύστημα Vitek II, όπου χρησιμοποιήθηκαν δύο ειδικές κασέτες που περιέχουν αντιβιοτικά έναντι των Gram αρνητικών βακτηρίων. Συγκεκριμένα, κάθε κασέτα περιέχει έναν καθορισμένο αριθμό αντιβιοτικών σε αυξανόμενη συγκέντρωση καθώς και έναν θετικό μάρτυρα που ανιχνεύει την ανάπτυξη του βακτηρίου απουσία αντιβιοτικού. Το σύστημα κατά τη διάρκεια της ανάλυσης ελέγχει σε τακτά χρονικά διαστήματα την ανάπτυξη του βακτηρίου σε κάθε θέση μέχρις ότου να ολοκληρωθεί ο έλεγχος, τα αποτελέσματα του οποίου εξάγονται μετά από 18 έως 24 ώρες και η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση για κάθε αντιβιοτικό καθορίζεται σύμφωνα με τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Επιτροπής Ελέγχου της Αντιμικροβιακής Ευαισθησίας (European Committee in Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST).

Στα στελέχη *P.aeruginosa* με Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) στην Ιμιπενέμη μεγαλύτερη από 0,001 mg/L και στα υπόλοιπα είδη με MIC στην Ιμιπενέμη ή/ και Μεροπενέμη μεγαλύτερη από 2 mg/L πραγματοποιήθηκε επιβεβαίωση για τις τιμές της MIC και προκαταρκτικός φαινοτυπικός έλεγχος για παραγωγή καρβαπενεμασών με χρήση E-test (όπου υφίσταται) και γονοτυπικός έλεγχος με την μέθοδο της PCR για χαρακτηρισμό γονιδίων αντοχής σε καρβαπενέμες.

Επιβεβαίωση της MIC με ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιβιοτικού (E-test)

Αποτελεί μία από τις πιο ευρέως διαδεδομένες μεθόδους καθορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης αντιβιοτικού που χρησιμοποιείται παγκοσμίως.

Σύμφωνα με την μέθοδο χρησιμοποιούνται ειδικές ταινίες (πλαστικές ή χάρτινες) που περιέχουν το κάθε αντιβιοτικό σε αυξανόμενη συγκέντρωση, οι οποίες τοποθετούνται σε θρεπτικό υπόστρωμα που έχει ενοφθαλμιστεί εναιώρημα του υπό εξέταση βακτηρίου (εικ. 24). Η ορθότητα της μεθόδου καθορίζεται από την ακρίβεια και την επαναληψιμότητα και λόγω αυτού ακολουθούνται κάποιοι κανόνες όσον αφορά τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιούνται, το εναιώρημα του βακτηρίου, τον τρόπο ενοφθαλμισμού, τον χρόνο και τρόπο επώασης και την ανάγνωση των αποτελεσμάτων. Συγκεκριμένα, ως θρεπτικό υλικό συνιστάται η χρήση του Mueller-Hinton Agar (MHA), το οποίο μπορεί να υποστηρίξει τη σωστή ανάπτυξη πολλών μη απαιτητικών βακτηρίων, το pH του δεν μεταβάλλεται σημαντικά κατά την ανάπτυξη του βακτηρίου, ενώ ταυτόχρονα περιέχει μικρή ποσότητα σε αναστολές σουλφοναμιδών, τετρακυκλινών και τριμεθοπρίμης. Παράλληλα, η χρήση αυτού εδώ και δεκαετίες έχει καταστήσει σημαντική την εμπειρία για την καλύτερη δυνατή εφαρμογή της μεθόδου.



Εικόνα 24 Επεξήγηση της χρήσης και ερμηνείας της ταινίας διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιβιοτικού.

Η ταινία E-test περιέχει αντιβιοτικό σε αυξανόμενη συγκέντρωση, η οποία όταν τοποθετηθεί επάνω στο θρεπτικό μέσο διαχέεται προς τρεις κατευθύνσεις. Για την σωστή κατανομή του αντιβιοτικού σημαντικό ρόλο παίζει το πάχος του θρεπτικού υλικού, καθώς αν είναι μικρό ή μεγάλο δεν διαχέεται ισόποσα προς όλες τις κατευθύνσεις. Ταυτόχρονα με την διάχυση, πολύ σημαντικό ρόλο για την επαναληψιμότητα της μεθόδου έχει η συγκέντρωση του βακτηρίου η οποία είναι καθορισμένη για κάθε βακτήριο έναντι κάθε αντιβιοτικού και ο τρόπος με τον οποίον έχει ενοφθαλμιστεί στο θρεπτικό μέσο καθώς ίση ποσότητα βακτηρίου πρέπει να είναι κατανεμημένη σε όλο το υλικό. Μεγαλύτερη ή μικρότερη ποσότητα εναιωρήματος έχει ως συνέπεια χαμηλότερες ή υψηλότερες MIC αντίστοιχα.

Στην παρούσα μελέτη κατά τον έλεγχο των υπό μελέτη στελεχών δόθηκε έμφαση στην αντοχή στα αντιβιοτικά Ιμιπενέμη και Μεροπενέμη. Συγκεκριμένα, δημιουργήθηκε εναιώρημα συγκέντρωσης 0,5 της κλίμακας McFarland (5×10^5 CFU/ml) σε διάλυμα (suspension medium) (bioMérieux). Με χρήση αποστειρωμένου βαμβακοφόρου στυλεού, το εναιώρημα ενοφθαλμίστηκε ισόποσα σε MHA. Ύστερα από 5 έως 15 λεπτά (ώστε να απορροφηθεί η

υγρασία) με χρήση αποστειρωμένης λαβίδας τοποθετήθηκαν τα E-test Ιμιπενέμης και Μεροπενέμης (Liofilchem) σε κάθε τρυβλίο και πραγματοποιήθηκε επώαση στους 37°C για 16-20 ώρες. Μετά το πέρας της επώασης έγινε ανάγνωση των αποτελεσμάτων και η MIC καθορίστηκε ως η τιμή που αναγράφεται στην ταινία στο σημείο που σταμάτησε η ανάπτυξη του βακτηρίου. Οι τιμές του E-test της Μεροπενέμης κυμαίνονται από 0,002 έως 32 µg/ml και για την Ιμιπενέμη από 0,016 έως 256 µg/ml. Τα στελέχη τα οποία εμφάνισαν MIC μεγαλύτερη από 2 µg/ml στα προαναφερθέντα αντιβιοτικά κρίθηκαν κατάλληλα για περαιτέρω έλεγχο. Όπως και προηγουμένως, εξαίρεση από τον παραπάνω κανόνα αποτέλεσαν τα στελέχη *P.aeruginosa*, στα οποία το όριο ευαισθησίας προς την Ιμιπενέμη καθορίστηκε ως μεγαλύτερο από 0,001 µg/ml (121).

Φαινοτυπικός έλεγχος παραγωγής καρβαπενεμασών με διπλές ταινίες E-test

Ακολουθώντας την διαδικασία της μεθοδολογίας E-test και τις οδηγίες της EUCAST, πραγματοποιήθηκε προκαταρκτικός έλεγχος για την ανίχνευση βακτηρίων που παράγουν καρβαπενεμάσες. Συγκεκριμένα, στα Εντεροβακτηριακά (*E.coli* και *K.pneumoniae*) έγινε χρήση ταινιών E-test (Liofilchem) που περιέχουν Μεροπενέμη (0,125-8 µg/ml) και Μεροπενέμη σε συνδυασμό με Phenylboronic Acid (0,032-2 µg/ml), καθώς και E-test με Μεροπενέμη (0,125-8 µg/ml) και Μεροπενέμη σε συνδυασμό με Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (0,032-2 µg/ml) για τον εντοπισμό στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες κλάσης A και κλάσης B αντίστοιχα (εικ. 25). Για τα στελέχη *P.aeruginosa*, παρόλο που έχουν χαρακτηριστεί μέθοδοι για την ανίχνευση καρβαπενεμασών κλάσης B, δεν συνιστάται η εφαρμογή του φαινοτυπικού ελέγχου μέσω ταινίας λόγω μειωμένης ειδικότητας. Παράλληλα, για τα στελέχη *A.baumannii*, στα οποία εντοπίζονται κατά κύριο λόγο καρβαπενεμάσες κλάσης D, δεν υπάρχει κάποιος αναστολέας για την φαινοτυπική ανίχνευση αυτών των ενζύμων. Συνεπώς σε όλα τα στελέχη *P.aeruginosa* και *A.baumannii* δεν πραγματοποιήθηκε φαινοτυπικός έλεγχος με ταινίες E-test.



Εικόνα 25 Ενδεικτική εικόνα E-test όπου στην μία πλευρά περιλαμβάνει Μεροπενέμη και στην άλλη Μεροπενέμη+ Phenylboronic Acid.

Επαναλαμβάνοντας την προηγούμενη διαδικασία, βακτηριακό εναιώρημα συγκέντρωσης 0,5 της κλίμακας McFarland επιστρώθηκε με χρήση αποστειρωμένου βαμβανοφόρου στυλεού σε MHA και στο οποίο τοποθετήθηκε το E-test. Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 16-20 ώρες, σύμφωνα με τον κατασκευαστή και με το πέρας αυτών έγινε ανάγνωση των αποτελεσμάτων, σύμφωνα με τις οδηγίες της EUCAST. Στα στελέχη όπου ο λόγος MIC μεροπενέμης προς μεροπενέμη + EDTA ή/και μεροπενέμης προς μεροπενέμη + phenylboronic acid ήταν ≥ 8 κρίθηκαν ύποπτα για παραγωγή καρβαπενεμάσης και ακολούθησε γονοτυπικός έλεγχος.

ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

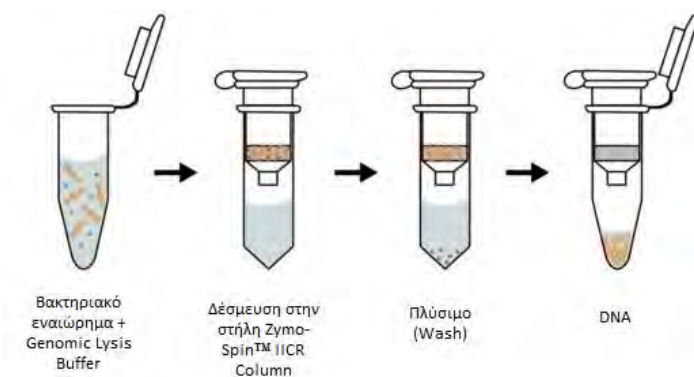
Κατά την παρούσα μελέτη, έγινε αρχικά απομόνωση του γενετικού υλικού (DNA) των στελεχών και στην συνέχεια με χρήση της μεθόδου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) πραγματοποιήθηκε μοριακός έλεγχος για την ανίχνευση γονιδίων που προσδίδουν αντοχή στις καρβαπενέμες, με έμφαση στα γονίδια *bla_{KPC}*, *bla_{VIM}*, *bla_{NDM}* και *bla_{OXA-48}*, γονίδια που εντοπίζονται συχνότερα στα ελληνικά νοσοκομεία. Στα στελέχη που ανιχνεύθηκε το γονίδιο *bla_{NDM}* πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση κατά Sanger του γονιδίου για επιβεβαίωση και χαρακτηρισμό του αλληλίου. Τέλος, έγινε επιλογή *bla_{NDM}* θετικών στελεχών, στα οποία εφαρμόστηκε αλληλούχιση ολικού γονιδιώματος με την τεχνολογία Ion Torrent και εφαρμογή ειδικών προγραμμάτων πληροφορικής με στόχο τον χαρακτηρισμό του γενετικού περιβάλλοντος του γονιδίου αντοχής *bla_{NDM}*, όπως περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

Απομόνωση γενετικού υλικού

Η απομόνωση του γενετικού υλικού αποτελεί μία από τις σημαντικότερες και αναγκαίες διεργασίες για την πραγματοποίηση πειραμάτων της μοριακής μικροβιολογίας και απαραίτητη προϋπόθεση για την πραγματοποίηση της διαδικασίας αυτής είναι η ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών και των μεμβρανών των υποκυτταρικών οργανιδίων για την απελευθέρωση του DNA. Η λύση των κυττάρων μπορεί να επέλθει με χρήση χημικών, θερμικών, μηχανικών ή ενζυματικών μεθόδων είτε με συνδυασμό αυτών.

Στην παρούσα μελέτη, η εκχύλιση του βακτηριακού DNA έγινε με χρήση του kit

Quick-DNA™ MiniPrep (Zymo Research), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (εικ. 26). Συγκεκριμένα, δημιουργήθηκε εναιώρημα των στελεχών με θολρότητα 2 της κλίμακας McFarland και το πρωτόκολλο



σχεδιάστηκε για μέχρι 200μL δείγματος. Αρχικά έγινε προσθήκη

800μL Genomic Lysis Buffer σε 200μL δείγματος και ακολούθησε σύντομη ανάδευση και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 5-10 λεπτά. Στην συνέχεια έγινε μεταφορά του δείγματος σε μία στήλη Zymo-Spin™ II CR Column η οποία είναι τοποθετημένη σε ένα σωλήνα περισυλλογής (Collection tube) και φυγοκέντρωση αυτού στις 11.000 στροφές για 1 λεπτό. Ακολούθησε απόρριψη του σωλήνα περισυλλογής μαζί με το διήθημα και έγινε μεταφορά της στήλης σε νέο σωλήνα περισυλλογής. Έπειτα έγινε προσθήκη 200μL DNA Pre-Wash Buffer και φυγοκέντρωση στις 11.000 στροφές για 1 λεπτό. Ύστερα ακολούθησε απόρριψη του διηθήματος και προσθήκη 500μL gDNA Wash Buffer στη στήλη και επανάληψη της φυγοκέντρωσης στις 11.000 στροφές για 1 λεπτό. Στην συνέχεια έγινε απόρριψη του σωληνάριου περισυλλογής και μεταφορά της στήλης σε ένα καθαρό σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης (microcentrifuge tube), όπου προστέθηκαν 50μL DNA Elution Buffer και επώασθηκε για 2-5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση στη μέγιστη ταχύτητα για 30 δευτερόλεπτα, ώστε να γίνει έκλυση του DNA και αποθηκεύτηκε στους -20° C για περαιτέρω ανάλυση.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αποτελεί μια τεχνική η οποία επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA, δημιουργώντας έναν μεγάλο αριθμό αντιγράφων επιτρέποντας την ανίχνευση συγκεκριμένων γενετικών τόπων και την περαιτέρω ανάλυση αυτών. Είναι μια μέθοδος που βασίζεται στην ικανότητα ειδικών ενζύμων, που ονομάζονται πολυμεράσες, να συνθέτουν νέες αλυσίδες DNA συμπληρωματικές μητρικών μορίων DNA (180). Παρόλο που οι πρώτες εφαρμογές πολλαπλασιασμού τμημάτων DNA

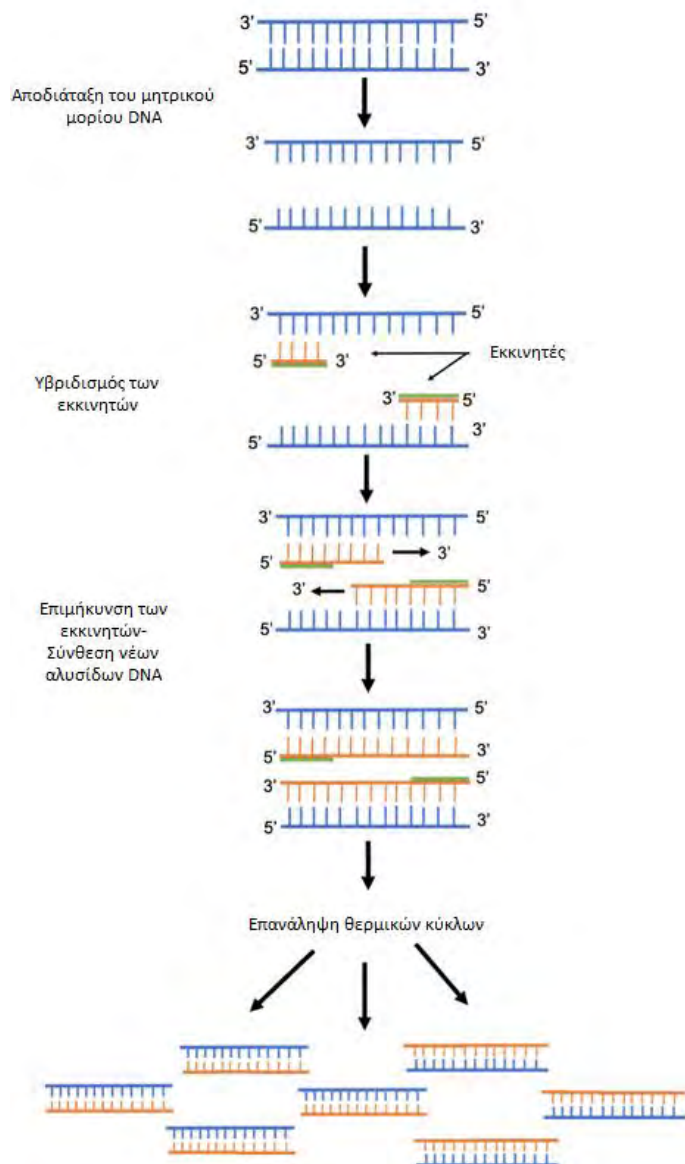
αναφέρθηκαν την δεκαετία 1960-1970, η τεχνική της PCR δημιουργήθηκε την δεκαετία του 1980 από τον Kary Mullis, ο οποίος μία δεκαετία αργότερα τιμήθηκε με το βραβείο Nobel.

Για την εφαρμογή της τεχνικής PCR, η οποία έχει ως στόχο την *in vitro* δημιουργία πολλαπλών αντιγράφων μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας, απαιτείται αρχικά ένα μητρικό μόριο DNA, το οποίο αποτελεί την αλληλουχία-στόχο που πρέπει να ενισχυθεί (πολλαπλασιαστεί) και για αυτό η γνώση του αποτελεί εξαιρετικά σημαντικό σημείο. Επιπλέον, απαραίτητη είναι η παρουσία μίας DNA πολυμεράσης, η οποία αποτελεί το ένζυμο που επιτελεί τον πολυμερισμό των ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) εντός της DNA αλυσίδας δημιουργώντας νέες αλυσίδες DNA συμπληρωματικές προς το μητρικό μόριο. Σημείο κλειδί για την εφαρμογή της τεχνικής της PCR ήταν η απομόνωση αυτού του ενζύμου που έγινε την δεκαετία του 1970 και ήταν η Taq DNA πολυμεράση που απομονώθηκε από θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq). Οι DNA πολυμεράσες είναι ένζυμα γνωστά για τον ρόλο τους στη αντιγραφή του DNA και η δράση τους ασκείται στο 3' άκρο της νέας αλυσίδας επιμηκώνοντας την με κατεύθυνση 5' - 3'. Για να μπορέσει να ξεκινήσει η σύνθεση από την DNA πολυμεράση απαραίτητη είναι η παρουσία μικρών αλληλουχιών που ονομάζονται εκκινητές (primers), δηλαδή ειδικά ολιγονουκλεοτίδια που είναι συμπληρωματικά προς το μητρικό μόριο DNA και λειτουργούν ως σημείο εκκίνησης της σύνθεσης των αντιγραφόμενων κλώνων του DNA. Τέλος, όπως αναφέρθηκε, η δράση της πολυμεράσης περιλαμβάνει τον πολυμερισμό των ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), και συνεπώς είναι απαραίτητη η παρουσία αυτών για πραγματοποίηση της διαδικασίας.

Η τεχνική PCR εξελίσσεται από ειδικούς θερμικούς κυκλοποιητές σε συγκεκριμένους επαναλαμβανόμενους κύκλους αντιδράσεων, αποτελούμενους από τρία στάδια (εικ 27).

Αρχικά είναι το στάδιο της αποδιάταξης (denaturation) του DNA, το οποίο επιτυγχάνεται με θέρμανση του μείγματος μέχρι περίπου στους 95°C, ώστε να δημιουργηθούν μονόκλωνες αλυσίδες που θα λειτουργήσουν ως μητρικά μόρια. Ακολουθεί το στάδιο του υβριδισμού ή αναδιάταξης (annealing) των εκκινητών, κατά το οποίο πραγματοποιείται σύνδεση των εκκινητών στα συμπληρωματικά τμήματα του DNA-στόχου. Κατά τη διάρκεια του σταδίου αυτού το μείγμα της αντίδρασης κυμαίνεται σε θερμοκρασία από 40°C έως 70°C και ο κάθε εκκινητής υβριδοποιείται στο 3'- άκρο της συμπληρωματικής αλληλουχίας-στόχου του αντίστοιχου κλώνου. Τέλος, ακολουθεί το στάδιο της επιμήκυνσης (extension), κατά το οποίο γίνεται προσθήκη των ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs) συμπληρωματικών προς την αλληλουχία-στόχο ως συνέχεια επιμήκυνσης των εκκινητών. Η διαδικασία αυτή επιτελείται από μία DNA

πολυμεράση και η συνήθης θερμοκρασία του σταδίου είναι περίπου 72°C. Μετά από την ολοκλήρωση αυτών των τριών σταδίων, το DNA θερμαίνεται εκ νέου έτσι ώστε να αποδιαταχθεί ξανά και να επαναληφθούν οι κύκλοι της αποδιάταξης, αναδιάταξης και σύνθεσης νέων μορίων DNA. Σε κάθε κύκλο που ολοκληρώνεται, η νεοσυντιθέμενη αλυσίδα DNA λειτουργεί ως πρότυπο για τη σύνθεση επόμενων αλυσίδων και συνεπώς ο πολλαπλασιασμός εξελίσσεται εκθετικά. Μία τυπική αντίδραση PCR περιλαμβάνει 30-40 θερμικούς κύκλους.



Εικόνα 27 Τα τρία στάδια που πραγματοποιούνται κατά την Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

Η τεχνική της PCR αποτελεί μία γρήγορη μοριακή μέθοδο με μεγάλη ευαισθησία καθώς σε ένα χρονικό διάστημα 3-6 ωρών μπορεί να παράγει πολλαπλά αντίγραφα ενός DNA-στόχου ακόμη και όταν υπάρχει ένα μόνο μητρικό μόριο. Παράλληλα εμφανίζει υψηλή ειδικότητα και ισχύ καθώς έχει τη δυνατότητα να πολλαπλασιάζει τμήματα DNA που έχουν υποστεί εκτεταμένη αποικοδόμηση λόγω της επίδρασης του χρόνου ή βρίσκονται σε μη προσπελάσιμες θέσεις ενώ ταυτόχρονα μπορεί να διαχωρίσει τμήματα DNA που διαφέρουν σε ένα μόνο νουκλεοτίδιο. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου την έχουν καταστήσει ως μία από τις βασικότερες μεθόδους που εφαρμόζονται στον τομέα της μοριακής βιολογίας και μικροβιολογίας, της γενετικής ανάλυσης, της εγκληματολογίας βρίσκοντας θέση σε ένα ευρύ φάσμα επιστημονικών εφαρμογών ενώ ταυτόχρονα η ανάπτυξη των αντιδραστηρίων της PCR σε εμπορικά kit, η σύνθεση ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων με χαμηλότερο κόστος, η αύξηση των διαθέσιμων πληροφοριών για αλληλουχίες DNA σε βάσεις δεδομένων επέτρεψε την επίλυση προβλημάτων εφαρμογής της μεθόδου σε διαγνωστικά και ερευνητικά εργαστήρια. Εκτός των πλεονεκτημάτων όμως, η απόδοση της μεθόδου εξαρτάται από την ακριβή γνώση της αλληλουχίας-στόχου για την σύνθεση των εκκινητών και συνεπώς δεν μπορεί να ανιχνεύσει μοναδικές αλληλουχίες. Παράλληλα, η Taq DNA πολυμεράση δεν ασκεί πάντα τη δράση της με απόλυτη ακρίβεια και λόγω έλλειψης μηχανισμού διόρθωσης, αυξάνονται οι πιθανότητες ενίσχυσης μη επιθυμητών-αλληλουχιών καθώς και αλληλουχιών με μεταλλάξεις. Τέλος υπάρχει και περιορισμός στο μέγεθος που μπορεί να ενισχυθεί καθώς όσο αυξάνεται το μέγεθος της προς-ενίσχυση αλληλουχίας μειώνεται η αξιοπιστία του αποτελέσματος.

Στην παρούσα διατριβή, για την εκτέλεση της PCR, σε σωλήνα χωρητικότητας 1,5 mL (eppendorf) παρασκευάστηκε μείγμα πολλαπλάσιο του αριθμού των δειγμάτων (συμπεριλαμβανομένου θετικού και αρνητικού μάρτυρα) για κάθε αντίδραση με τα εξής αντιδραστήρια: στείρο dH₂O, DNA βακτηρίου, Taq DNA πολυμεράση (Metabion), 10x Reaction buffer (without MgCl₂), MgCl₂, εκκινητής 1, εκκινητής 2 και μείγμα dNTPs (Metabion). Η ποσότητα του κάθε αντιδραστηρίου και η σύνθεση του μείγματος για τελικό όγκο αντίδρασης 25μL αναφέρεται στον πίνακα που ακολουθεί:

Πίνακας 1 Σύνθεση μείγματος αντίδρασης PCR.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ (μL)
dH ₂ O	18,43 μL
Buffer	2,5 μL
MgCl ₂ (100mM)	0,37 μL
dNTPs (20mM)	0,5 μL
Primer 1	0,25 μL
Primer 2	0,25 μL
Taq mi-Taq (5 u/μL)	0,2 μL
DNA	2,5 μL
Τελικός όγκος	25 μL

Ανίχνευση γονιδίων αντοχής

Σε όλα τα στελέχη με αντοχή στις καρβαπενέμες πραγματοποιήθηκε PCR για την ανίχνευση των γονιδίων αντοχής *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM} και *bla*_{OXA-48}, ανεξάρτητα από τις φαινοτυπικές διαδικασίες που ακολουθήθηκαν προηγουμένως, καθώς έχουν υπάρξει αναφορές ασυμφωνίας μεταξύ φαινοτύπου και γονοτύπου. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε γονίδιο καθώς και οι συνθήκες ενίσχυσης με την διαδικασία της PCR αναγράφονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 2 Αλληλουχία εκκινητών γονιδίων που κωδικοποιούν καρβαπενεμάσες

Γονίδιο	Εκκινητές	Αλληλουχία νουκλεοτιδίων	Μέγεθος προϊόντος	Βιβλιογραφική αναφορά
<i>bla</i> _{NDM}	NDM F	5' GGTGCATGCCCGGTGAAATC 3'	660bp	(181)
	NDM R	5' ATGCTGGCCTTGGGGAACG 3'		
<i>bla</i> _{VIM}	VIM F	5' GATGGTGTGGTTCGCATA 3'	390bp	(182)
	VIM R	5' CGAATGCGCAGCACCAG 3'		
<i>bla</i> _{KPC}	KPC F	5' TCGCTAAACTCGAACAGG 3'	800bp	(183)
	KPC R	5' TTAAGTCCCGTTGACGCCCAATCC 3'		
<i>bla</i> _{OXA48}	OXA-48 A	5' TTGGTGGCATCGATTATCGG 3'	743bp	(184)
	OXA-48 B	5' GAGCACTTCTTTGTGATGGC 3'		

Πίνακας 3 Συνθήκες PCR γονιδίων κωδικοποίησης καρβαπενεμασών

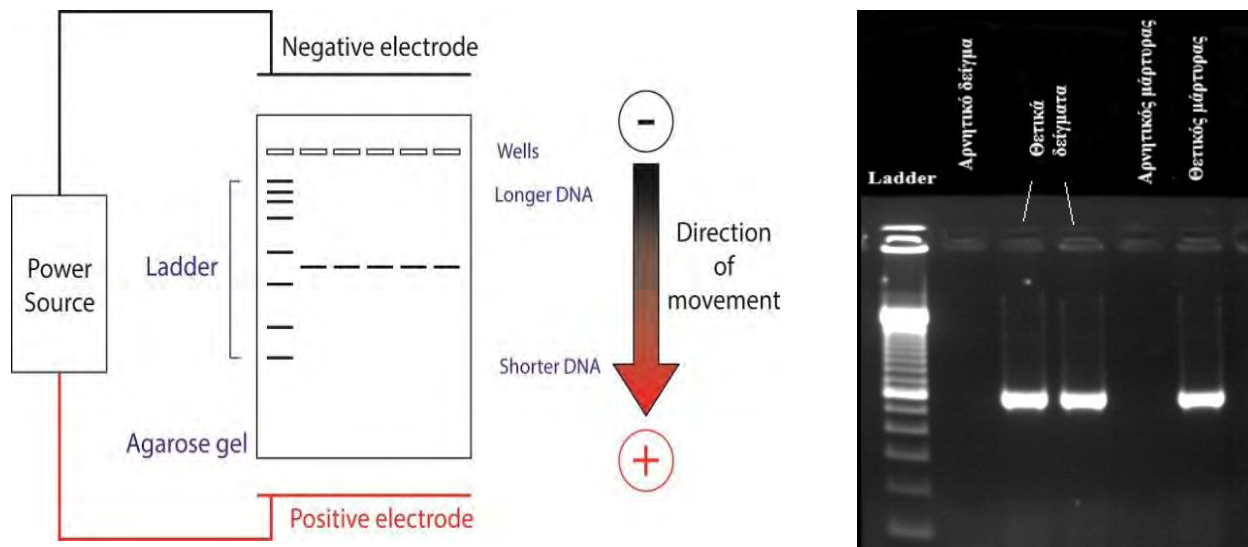
Γονίδιο	Αρχική αποδιάταξη	Αποδιάταξη	Υβριδισμός	Επιμήκυνση	Αριθμός κύκλων	Τελική επιμήκυνση
<i>bla_{NDM}</i>	95°C→5min	95°C→30sec	58°C→30sec	72°C→1min	35	72°C→10min
<i>bla_{VIM}</i>	95°C→5min	95°C→30sec	52°C→40sec	72°C→50sec	35	72°C→10min
<i>bla_{KPC}</i>	95°C→5min	95°C→30sec	55°C→30sec	72°C→1min	30	72°C→10min
<i>bla_{OXA48}</i>	95°C→5min	95°C→30sec	54°C→1min	72°C→2min	35	72°C→10min

Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μέθοδο διαχωρισμού DNA, RNA και πρωτεϊνικών μορίων με βάση το μέγεθος τους υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Πρόκειται για μία απλή και γρήγορη τεχνική, ικανή να διαχωρίζει μείγματα θραυσμάτων DNA διαφορετικών μεγεθών. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο αρνητικά φορτισμένο DNA, το οποίο κατά την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου τείνει να κινείται προς το θετικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA σε πήκτωμα (ή γέλη) εξαρτάται κυρίως από το μέγεθος και τη στερεοδιάταξη του DNA, τη συγκέντρωση του υλικού από το οποίο είναι φτιαγμένη η γέλη και την ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος.

Κατά τη διάρκεια της εργασίας πραγματοποιήθηκαν δύο ηλεκτροφορήσεις σε πήκτωμα αγαρόζης, μία μετά από κάθε αντίδραση PCR και μία μετά τον καθαρισμό των προϊόντων PCR (περιγράφεται παρακάτω). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε οριζόντια συσκευή και η συγκέντρωση του πηκτώματος ήταν 2% (w/v) αγαρόζη σε διάλυμα 1X TBE. Κατά την παρασκευή του πηκτώματος έγινε προσθήκη 8μL βρωμιούχου αιθιδίου (AppliChem, διάλυμα 1%), το οποίο παρεμβάλλεται μεταξύ των αζωτούχων βάσεων του DNA και αποτελεί φθορίζουσα χρωστική απεικονίζοντας τη θέση των θραυσμάτων παρουσία υπεριώδους φωτός. Στα δείγματα της PCR έγινε προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης 10X (κυανό της βρωμοφαινόλης) και στη συνέχεια φορτώθηκαν στα διαμορφωμένα βυθίσματα (πηγαδάκια) του πηκτώματος. Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των προϊόντων της PCR είναι απαραίτητη η προσθήκη στο πήκτωμα ενός μάρτυρα ο οποίος περιέχει θραύσματα DNA γνωστού μοριακού βάρους και για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκε 100bp DNA Ladder. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή τάση 120 Volts για περίπου 40 λεπτά. Τέλος ακολούθησε

παρατήρηση του ηλεκτροφορηθέντος πηκτώματος αγαρόζης σε συσκευή με υπεριώδης ακτινοβολία φωτός και φωτογραφήθηκε με ειδική κάμερα (εικ. 28).



Εικόνα 28 Αριστερά: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου της ηλεκτροφόρησης. Δεξιά: Φωτογραφία ηλεκτροφορηθέντος πηκτώματος αγαρόζης με χρήση ειδικής κάμερας ύστερα από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Καθαρισμός προϊόντων PCR

Για να μπορέσει να πραγματοποιηθεί η αλληλούχιση των γονιδίων *bla_{NDM}* απαραίτητο στάδιο είναι ο καθαρισμός των προϊόντων ενίσχυσης της PCR για την απομάκρυνση τυχόν συστατικών που μπορεί να επηρεάσουν αρνητικά την περαιτέρω ανάλυση των δειγμάτων. Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR έγινε με το PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen, ThermoFisher Scientific), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (εικ 29).

Αρχικά έγινε προσθήκη 100% Ισοπροπανόλης και 96-100% αιθανόλης στα Binding Buffer (B2) και Wash Buffer (W1) αντίστοιχα, σύμφωνα με τις αναγραφόμενες ποσότητες για ανασύσταση των αντιδραστηρίων. Στην συνέχεια έγινε προσθήκη τετραπλάσιου όγκου από το ανασυσταμένο με ισοπροπανόλη Binding



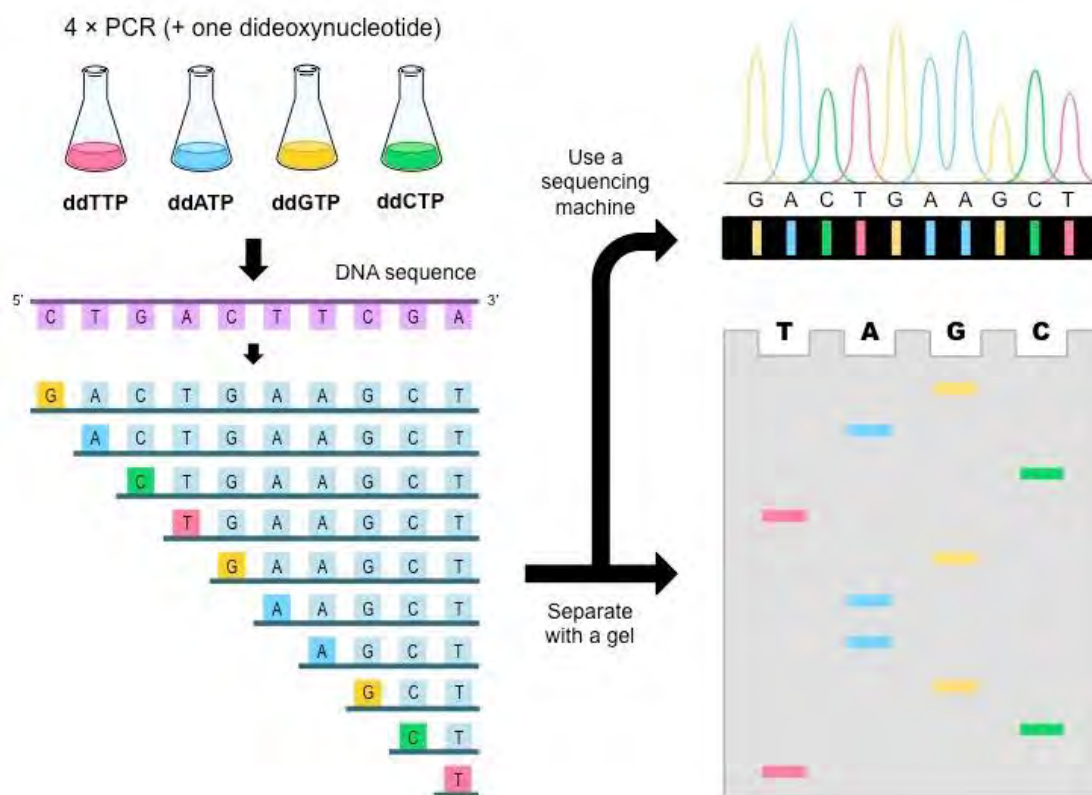
Εικόνα 29 Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου καθαρισμού προϊόντων PCR.

Buffer από τον όγκο του προϊόντος της PCR σε καθένα από τα δείγματα που μας ενδιέφεραν. Κάθε μείγμα Binding Buffer-προϊόν PCR που δημιουργήθηκε, αναδεύτηκε και μεταφέρθηκε σε στήλη φυγοκέντρησης (PureLink® Spin Column). Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές για 1 λεπτό και απόρριψη του διηθήματος. Έπειτα έγινε προσθήκη 650μL του ανασυσταμένου Wash Buffer και φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές για 1 λεπτό. Ακολούθησε απόρριψη του διηθήματος και επαναφυγοκέντρηση της εκάστοτε στήλης για 3 λεπτά στην μέγιστη ταχύτητα. Μετά την φυγοκέντρηση έγινε απόρριψη του σωλήνα περισυλλογής και η κάθε στήλη τοποθετήθηκε σε σωλήνα έκλουσης 1,7 mL (PureLink® Elution Tube). Στο κέντρο κάθε στήλης προστέθηκαν 50μL Elution Buffer και επώαση των στηλών για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στην μέγιστη ταχύτητα. Από το διήθημα που προέκυψε, το οποίο περιέχει το καθαρισμένο PCR προϊόν, 5μL υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2%, όπως περιεγράφηκε προηγουμένως.

Ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου *bla_{NDM}* με αλληλούχιση κατά Sanger

Η αλληλούχιση κατά Sanger είναι η πρώτη μέθοδος αλληλούχισης που αναπτύχθηκε την δεκαετία του 1970 από τον Frederic Sanger και αποτελεί μία μέθοδο προσδιορισμού της αλληλουχίας σε επίπεδο νουκλεοτιδίων. Είναι μία μέθοδος αλληλούχισης «πρώτης γενιάς» που επιτρέπει τον προσδιορισμό μιας στοχευμένης μικρής σχετικά αλληλουχίας (έως 1000bp). Η τεχνική βασίζεται σε τρία στάδια. Αρχικά πραγματοποιείται μία ειδική PCR η οποία έχει ως μητρικό μόριο την αλληλουχία-στόχο. Η διαφορά με την κλασική τεχνική της PCR είναι ότι αντί για την παρουσία μόνο dNTPs, πραγματοποιείται και προσθήκη μίας παραλλαγής αυτών τα οποία ονομάζονται διδεοξυ-ριβονουκλεοτίδια (ddNTPs), η προσθήκη των οποίων σταματά την επέκταση της συμπληρωματικής νεοσυντιθέμενης αλυσίδας καθώς, λόγω έλλειψης του υδροξυλίου στην 3' θέση δεν μπορεί να σχηματίσει φωσφοδιεστερικό δεσμό με το επόμενο νουκλεοτίδιο. Τα ddNTPs αυτά είναι σημασμένα το καθένα με διαφορετική φθορίζουσα ουσία, η οποία εκπέμπει ακτινοβολία σε διαφορετικό μήκος κύματος. Το αποτέλεσμα αυτής της PCR είναι η δημιουργία πολλαπλών αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου με διαφορετικά μεγέθη. Στην συνέχεια ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των θραυσμάτων αυτών, τα οποία λόγω των

διαφορετικών μεγεθών διαχωρίζονται στο πήκτωμα. Τέλος, πραγματοποιείται ανάλυση του πηκτώματος στο οποίο διακρίνονται τα τμήματα με διαφορά ενός νουκλεοτιδίου και λόγω της παρουσίας των φθοριζουσών ουσιών μπορεί να διακριθεί ποιο νουκλεοτίδιο βρίσκεται στο τέλος κάθε κομματιού. Οι φθορίζουσες αυτές ουσίες διεγείρονται από μια ακτίνα laser και το φως που εκπέμπεται συλλέγεται από ανιχνευτή ο οποίος μετατρέπει το σήμα σε ηλεκτρικό δημιουργώντας μία «κορυφή» για κάθε νουκλεοτίδιο. Το αποτέλεσμα που προκύπτει είναι ένα ηλεκτροφερόγραμμα (electropherogram), δηλαδή μία σειρά από κορυφές που αντιστοιχούν σε μια βάση ανάλογα με το χρώμα φθορισμού (εικ 30).

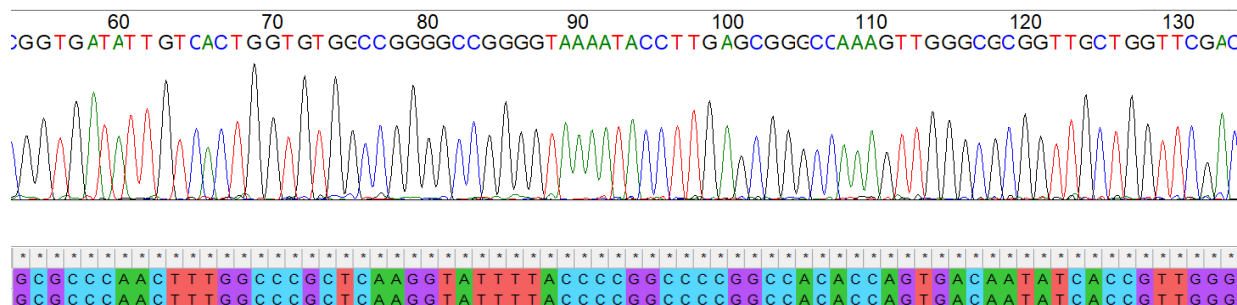


Εικόνα 30 Σχηματική απεικόνιση των διαφόρων σταδίων της μεθόδου αλληλούχισης κατά Sanger.

Στην παρούσα διατριβή η αλληλούχιση του γονιδίου *bla_{NDM}* στα υπό μελέτη στελέχη πραγματοποιήθηκε σε εξωτερικό εργαστήριο όπου στάλθηκαν 40μL του εκάστοτε καθαρισμένου προϊόντος PCR μαζί με 20μL του κάθε εκκινητή σε αραίωση 1:20 (τελική

συγκέντρωση 5 pmol/μL).

Η επεξεργασία των αλληλουχιών και η στοίχιση των αλληλουχιών (alignment) πραγματοποιήθηκαν με χρήση ειδικού λογισμικού προγράμματος (MEGA v.11) (εικ 31). Ακολούθησε σύγκριση της αλληλουχίας με αλληλουχίες τοποθετημένες στην βάση δεδομένων BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, NCBI) για επιβεβαίωση του γονιδίου και εύρεση του αλληλίου που έφερνε κάθε στέλεχος.



Εικόνα 31 Ενδεικτικές εικόνες του προγράμματος MEGA οι οποίες απεικονίζουν ένα τμήμα ηλεκτροφορογράμματος (πάνω) και ένα τμήμα δύο στοιχισμένων αλληλουχιών (κάτω).

Αλληλούχιση Ολικού Γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing, WGS) - Χαρακτηρισμός του γενετικού περιβάλλοντος του γονιδίου *bla_{NDM}*

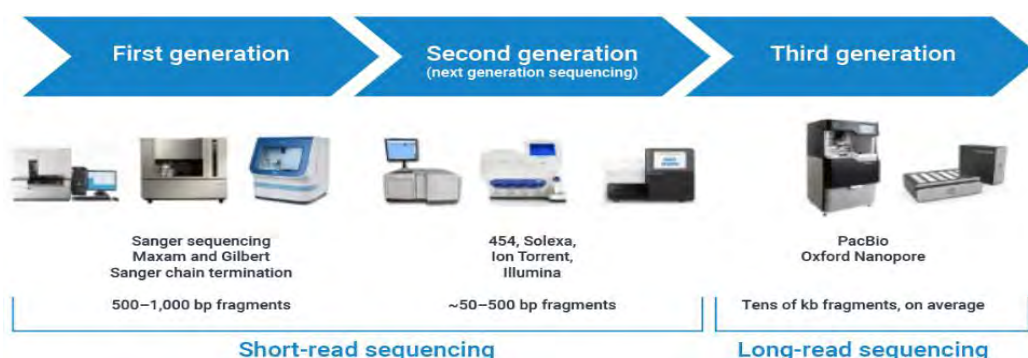
Επιλογή στελεχών για Αλληλούχιση Ολικού Γονιδιώματος

Από τα 70 *bla_{NDM}* θετικά στελέχη που προέκυψαν κατά τον γονοτυπικό έλεγχο και έπειτα από επιβεβαίωση με αλληλούχιση κατά Sanger, έγινε τυχαία επιλογή 35 (50%) στελεχών ζωικής και ανθρώπινης προέλευσης για αλληλούχιση ολικού γονιδιώματος με στόχο τον χαρακτηρισμό του γενετικού περιβάλλοντος του γονιδίου *bla_{NDM}*.

Αλληλούχιση Επόμενης Γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS)

Όπως αναφέρθηκε, η πρώτη μέθοδος αλληλούχισης, η αλληλούχιση κατά Sanger, πραγματοποιήθηκε το 1977, λίγα χρόνια αργότερα από την ανακάλυψη της δομής της διπλής έλικας. Την ίδια χρονιά οι Allan Maxam και Walter Gilbert ανέπτυξαν επίσης μία μέθοδο αλληλούχισης μέσω χημικής επεξεργασίας του DNA (185). Την δεκαετία που ακολούθησε η εισαγωγή αυτοματοποιημένων μηχανημάτων αλληλούχισης έφερε την επανάσταση στη διαδικασία προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, αυτοματοποιώντας όλα τα βήματα που ήταν απαραίτητα για την εφαρμογή της μεθόδου, ενώ παράλληλα αύξησε την ταχύτητα και

την απόδοση αυτής. Κατά την δεκαετία του 1990-2000, ξεκίνησε το πρόγραμμα χαρτογράφησης του γονιδιώματος του ανθρώπου (Human Genome Project), ένα διεθνές πρόγραμμα στο οποίο χρησιμοποιήθηκε ένας συνδυασμός της αλληλούχισης κατά Sanger με τα αυτοματοποιημένα συστήματα, ολοκληρώνοντας το 2003 την αλληλούχιση όλων των γονιδίων του ανθρώπου και σηματοδοτώντας ένα ορόσημο για τη γονιδιωματική (186). Η επίτευξη του προγράμματος αυτού έθεσε τις βάσεις για την εξέλιξη της τεχνολογίας της αλληλούχισης και την επίλυση των προβλημάτων που εμφανίστηκαν κατά την εφαρμογή του. Η λύση των προβλημάτων επιτεύχθηκε με την Αλληλούχιση Επόμενης Γενιάς ή αλληλούχιση «δεύτερης γενιάς» (Next Generation Sequencing, NGS), η οποία επέτρεψε την ανάλυση εκατοντάδων τμημάτων DNA την ίδια χρονική στιγμή, μειώνοντας παράλληλα τον χρόνο και το κόστος, καθιστώντας εφικτή την εφαρμογή πρωτοκόλλων μεγάλης κλίμακας. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί πολλές διαφορετικές μέθοδοι (πλατφόρμες) NGS, με πιο διαδεδομένες τις Illumina/Solexa, 454/Pyrosequencing, Ion Torrent και SOLiD, οι οποίες χαρακτηρίζονται από διαφορετική ταχύτητα, κόστος και ικανότητα αλληλούχισης και ανάλυσης τμημάτων διαφορετικού μήκους. Η επόμενη γενιά αλληλούχισης, γνωστή και ως “τρίτη γενιά αλληλούχισης” ή “αλληλούχιση ενός μορίου” (single-molecule sequencing) πρόσφερε την δυνατότητα αλληλούχισης μεγαλύτερων συνεχόμενων τμημάτων DNA (long reads) χωρίς πολλαπλασιασμό μειώνοντας ταυτόχρονα τον χρόνο προετοιμασίας, άμεση αλληλούχιση περιοχών που είναι μη προσβάσιμες ή δύσκολες στην ανάλυση και μείωση έναντι της ευαισθησίας λόγω της συγκέντρωσης GC, υπερνικώντας προβλήματα των πλατφορμών της δεύτερης γενιάς. Στην παρούσα χρονική στιγμή υπάρχουν δύο τεχνολογίες, η Pacific Biosciences (PacBio) και Oxford Nanopore κάθε μία από τις οποίες έχει διαφορετική προσέγγιση ανάλυσης (187).



Εικόνα 32 Η εξέλιξη των μεθόδων αλληλούχισης.

Η τεχνολογία NGS βρίσκει χρήση σε ευρύ φάσμα εφαρμογών στην Μικροβιολογία:

1. προσδιορισμός του γονιδιώματος ενός μικροοργανισμού μετά από απομόνωση σε καλλιέργημα (Whole Genome Sequencing)
2. χαρακτηρισμός και προσδιορισμός σχετικής αφθονίας όλων των μικροοργανισμών που εμπεριέχονται σε ένα κλινικό δείγμα (16S Metagenomics, Shotgun Metagenomics)

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα πλεονεκτήματα των τεχνολογιών NGS περιλαμβάνουν την γρήγορη ανάλυση ολόκληρου του γενετικού υλικού δίνοντας την δυνατότητα κατανόησης βιολογικών μονοπατιών και εντοπισμού αιτιών πολλών ασθενειών και παθογόνων μεταλλάξεων, αυξάνοντας τις γνώσεις του ανθρώπου, προσφέροντας δυνατότητες βελτίωσης και εφαρμογής μέτρων σε πολλούς τομείς συμπεριλαμβανομένης της φαρμακευτικής και ιατρικής. Εκτός αυτών όμως, οι μέθοδοι NGS εμφανίζουν και μειονεκτήματα, όπως η περιορισμένη κάλυψη πολύπλοκων γενετικών περιοχών που δεν εντοπίζονται από τις μικρού μήκους πλατφόρμες, τα λάθη των αναλύσεων που επηρεάζουν την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, τα μεγάλα σε μέγεθος αποτελέσματα που εξάγονται από τις αναλύσεις απαιτώντας χρήση καλύτερων πληροφορικών συστημάτων και διαχείριση τους από ανθρώπους με εμπειρία στον τομέα της βιοπληροφορικής, ενώ παράλληλα η επαλήθευση των ευρημάτων και η επαναληψιμότητα αυτών, ανάμεσα σε διαφορετικές πλατφόρμες και διαφορετικά εργαστήρια αποτελεί πρόκληση.

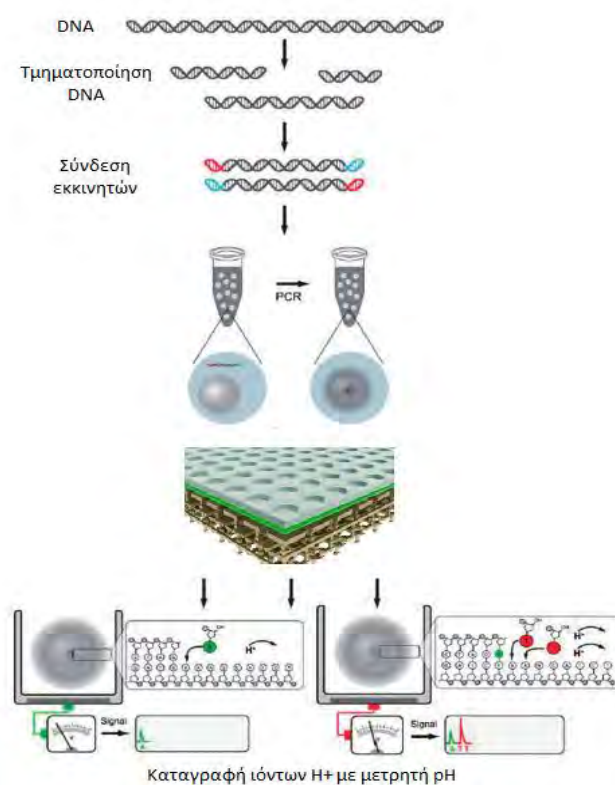
Η τεχνολογία αλληλούχισης επόμενης γενιάς είναι ένα από τα σημαντικότερα βήματα της μοριακής βιολογίας που πραγματοποιήθηκε τα τελευταία χρόνια. Η γενική ροή εργασιών είναι κοινή ανάμεσα στις μεθόδους NGS, περιλαμβάνοντας αρχικά τη δημιουργία βιβλιοθήκης (Library preparation) στην οποία το γενετικό υλικό (DNA ή RNA) τμηματοποιείται σε μικρότερα κομμάτια και προστίθενται ειδικοί εκκινητές στα άκρα των τμημάτων. Στην συνέχεια τα τμήματα αυτά πολλαπλασιάζονται δημιουργώντας επαρκή ποσότητα συμπληρωματικών τμημάτων DNA για την αλληλούχιση. Η ολοκληρωμένη πλέον βιβλιοθήκη τοποθετείται στην αντίστοιχη πλατφόρμα όπου υφίσταται μαζική και παράλληλη αλληλούχιση των τμημάτων δημιουργώντας τα λεγόμενα «διαβάσματα», τα οποία ακολουθώντας τις απαραίτητες διαδικασίες τοποθετούνται στην σωστή σειρά δίνοντας την αλληλουχία του γονιδιώματος για πλήρη ανάλυση. Βασικές διαφορές ανάμεσα στις πλατφόρμες NGS εντοπίζονται στον τρόπο

δέσμευσης, τον πολλαπλασιασμό και αλληλούχιση του γενετικού υλικού, το κόστος και χρόνο ανάλυσης, το μέγεθος των τμημάτων του γενετικού υλικού που μπορεί να αναλύσει και το μέγεθος του αρχείου των αποτελεσμάτων που εξάγει.

Ion Torrent

Μια από τις μεθόδους που αναφέρθηκαν είναι η πλατφόρμα Ion Torrent η οποία ξεκίνησε να εφαρμόζεται το 2010, όταν αναπτύχθηκε το πρώτο μηχάνημα αλληλούχισης αυτής της τεχνολογίας, προσφέροντας την δυνατότητα ταυτόχρονης αλληλούχισης εκατομμυρίων τμημάτων DNA μεγέθους 200bp. Η μέθοδος βασίζεται στην παρουσία ενός πολύ ευαίσθητου μετρητή pH, το οποίο ανιχνεύει τα ιόντα υδρογόνου που απελευθερώνονται κατά την σύνδεση των νουκλεοτιδίων στις νεοσυντιθέμενες αλυσίδες DNA (εικ 33).

Συγκεκριμένα, η διαδικασία αρχίζει με την δημιουργία της βιβλιοθήκης όπου το υπό μελέτη γενετικό υλικό θρυμματίζεται και ειδικοί εκκινητές συνδέονται στα άκρα κάθε τμήματος. Στην συνέχεια η σχηματισμένη βιβλιοθήκη μονιμοποιείται σε σφαιρίδια, κάθε ένα από τα οποία φέρει ένα μόνο τμήμα DNA. Τα σφαιρίδια αυτά μαζί με το τμήμα DNA υπόκεινται σε πολλαπλασιασμό με την διαδικασία της PCR με αποτέλεσμα να δημιουργούνται σφαιρίδια τα οποία καλύπτονται από πολλαπλά αντίγραφα του ίδιου τμήματος DNA και στην συνέχεια τοποθετούνται σε ειδικές επιφάνειες, με κάθε σφαιρίδιο να τοποθετείται σε ειδική υποδοχή. Ακολουθεί η διαδικασία της αλληλούχισης μέσω σύνθεσης (Sequencing by synthesis) όπου διαδοχικά τα νουκλεοτίδια καλύπτουν τις υποδοχές που περιέχουν τα σφαιρίδια και όταν ένα συμπληρωματικό προς την επιμηκυνόμενη αλυσίδα συνδεθεί απελευθερώνεται ένα ιόν H^+ . Τα ιόντα H^+ ανιχνεύονται από μετρητή pH, καταγράφοντας το σήμα, το οποίο με την βοήθεια ειδικών αλγορίθμων μετατρέπεται σε



Εικόνα 33 Η ροή εργασιών της τεχνολογίας Ion Torrent.

αλληλουχία DNA. Οι αλληλουχίες που προκύπτουν, με την χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής, συνδέονται σε σειρά δίνοντας το συνολικό γονιδίωμα, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω ανάλυση.

Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση ολικού γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing, WGS) με την πλατφόρμα Ion Torrent όπου το γενετικό υλικό κάθε δείγματος (συγκέντρωση DNA μεγαλύτερη από 100 ng/μL) στάλθηκε σε εξωτερικό εργαστήριο. Αρχικά πραγματοποιήθηκε δημιουργία βιβλιοθηκών με την τεχνολογία Ion Torrent και την ροή εργασιών Ion Chef (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Οι βιβλιοθήκες αλληλουχήθηκαν με το σύστημα S5XLS και η ανάλυση των πρωταρχικών δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα Ion Torrent Suite (v.5.10.0). Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος ποιότητας των «διαβασμάτων» (reads) με το πρόγραμμα FastQC (v.0.11.9) και σύνδεση αυτών με εφαρμογή του προγράμματος SPAdes genome assembler (v3.15.5) με τις προεπιλεγμένες παραμέτρους. Η ποιότητα του συναρμολογημένου πλέον γονιδιώματος αξιολογήθηκε με το πρόγραμμα Quast (v.5.2.0). Η μέση κάλυψη κάθε γονιδιώματος υπολογίστηκε με χρήση του προγράμματος mapPacBio από το BBTools ενώ τα κενά συμπληρώθηκαν με αλληλούχιση των αλληλεπικαλυπτόμενων παραγόμενων θραυσμάτων PCR.

Τα συναρμολογημένα πλέον γονιδιώματα τοποθετήθηκαν σε ειδικά προγράμματα τα οποία είναι διαθέσιμα στο διαδίκτυο και μέσω των οποίων έγινε:

- 1) τυποποίηση των στελεχών με την μέθοδο Πολυτοπικού προσδιορισμού αλληλουχίας (Multi-Locus Sequence Typing, MLST), με το πρόγραμμα MLST (v.2.0) που βασίζεται στην αλληλουχία επτά γονιδίων του βασικού μεταβολισμού του κάθε είδους (<https://cge.food.dtu.dk/services/MLST/>). Η τυποποίηση των στελεχών *E.coli* και *A.baumannii* βασίστηκε στο σχήμα Achtman και Pasteur αντίστοιχα, ενώ για τα στελέχη *K.pneumoniae* και *P.aeruginosa* υπάρχει μόνο ένα διαθέσιμο σχήμα για κάθε είδος.
- 2) ανίχνευση 1) των γονιδίων αντοχής με χρήση του προγράμματος ResFinder (v.4.1), με όριο ταυτοποίησης (ID threshold) 90% και μήκος των αλληλουχιών 60% (<https://cge.food.dtu.dk/services/ResFinder/>) και 2) λοιμογόνων παραγόντων με χρήση του προγράμματος VirulenceFinder (v.2.0) με όριο ταυτοποίησης (ID threshold) 90% και μήκος κάλυψης των αλληλουχιών 60% για τα στελέχη *E.coli* και με επιλογή της ιστοσελίδας

Virulence Factor Database (v.4.0) (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>) με τις προεπιλεγμένες παραμέτρους για τα στελέχη *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa* και *A.baumannii* (100% μήκος κάλυψης των αλληλουχιών και >90% ομοιότητα αλληλουχιών).

- 3) ανίχνευση των ρεπλικονίων (replicons) που φέρουν με το πρόγραμμα PlasmidFinder (v.2.1) με χρήση της βάσης δεδομένων «Enterobacterales» και με ελάχιστο όριο ταυτοποίησης 95% και ελάχιστο μήκος κάλυψης 60% (<https://cge.food.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) .

Στα αποτελέσματα που προκύπτουν από την ανίχνευση γονιδίων και πλασμιδίων εμφανίζεται η % ομοιότητα, η θέση του κάθε στοιχείου στο γονιδίωμα, ο φαινότυπος για τον οποίο χαρακτηρίζεται (για τα γονίδια αντοχής) και το συγκρινόμενο γονιδίωμα. Παράλληλα, για να γίνει επιβεβαίωση και πλήρης χαρακτηρισμός του γενετικού περιβάλλοντος του γονιδίου *bla_{NDM}*, πραγματοποιήθηκε ανάλυση με το πρόγραμμα BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) όπου λήφθηκαν υπόψιν μόνο τα αποτελέσματα με 100% ομοιότητα και ελάχιστη κάλυψη 90%.

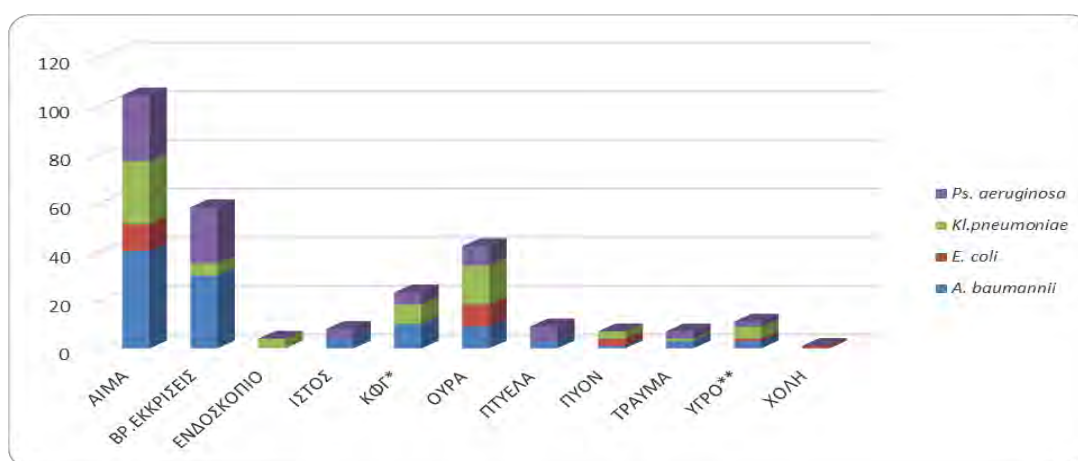
Για τις ανάγκες της απεικόνισης χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα BRIG-0.95 (v.3) και Proksee (<https://proksee.ca/>), με τις προεπιλεγμένες παραμέτρους και σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών (188,189).

Όλα τα γονιδιώματα στα οποία έγινε ανάλυση με Αλληλούχιση Ολικού Γονιδιώματος έχουν κατατεθεί στην βάση δεδομένων GenBank, στα πλαίσια των εξής έργων (Bioproject): *E.coli* και *K.pneumoniae*: PRJNA893175, *P.aeruginosa*: PRJNA993831 και *A.baumannii*: PRJNA1018864 (πίνακας 7, σελ 132).

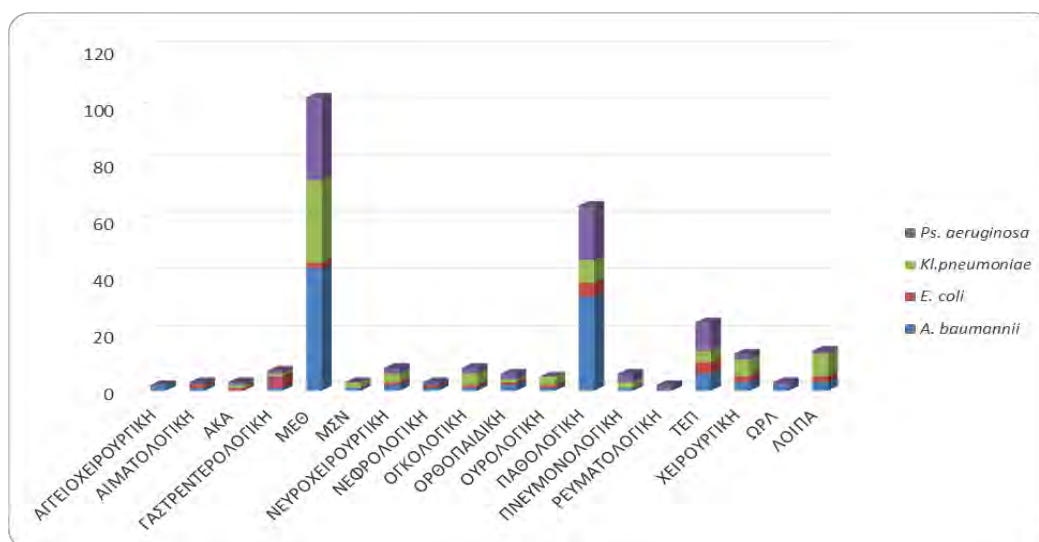
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Επιλογή στελεχών

Από τον Ιανουάριο 2017 μέχρι τον Ιούλιο 2023 μελετήθηκαν συνολικά 270 στελέχη εκ των οποίων τα 103 είναι *A.baumannii*, τα 76 είναι *P.aeruginosa*, τα 69 είναι *K.pneumoniae* και τα 22 είναι *E.coli*. Τα στελέχη προήλθαν από κλινικά δείγματα ασθενών του ΠΓΝΛ. Στα παρακάτω γραφήματα παρουσιάζεται η κατανομή των στελεχών ανάλογα με το υλικό (γράφημα 1) και την κλινική (γράφημα 2).



Γράφημα 1: Κατανομή των στελεχών με βάση το υλικό από το οποίο προήλθαν. *ΚΦΓ: Κεντρική Φλεβική Γραμμή (Κεντρικός φλεβικός καθετήρας), ** Υγρό: Ασцитικό, περιτοναϊκό, πλευριτικό.



Γράφημα 2: Κατανομή των στελεχών με βάση την κλινική από την οποία προήλθαν. Στην κατηγορία "ΛΟΙΠΑ" αντιστοιχούν 1 στέλεχος ανά κλινική (Παιδιατρική, Καρδιολογική, Εξωτερικά Ιατρεία, Χημειοθεραπεία, Άλλο νοσοκομείο).

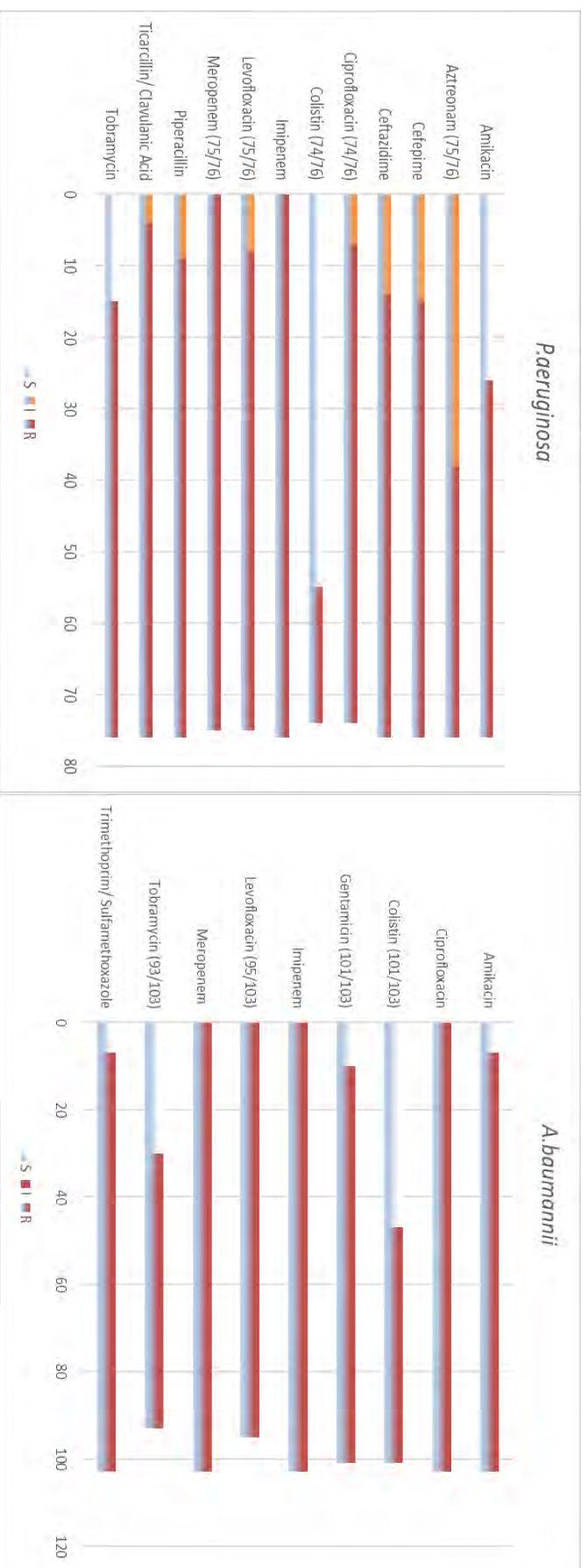
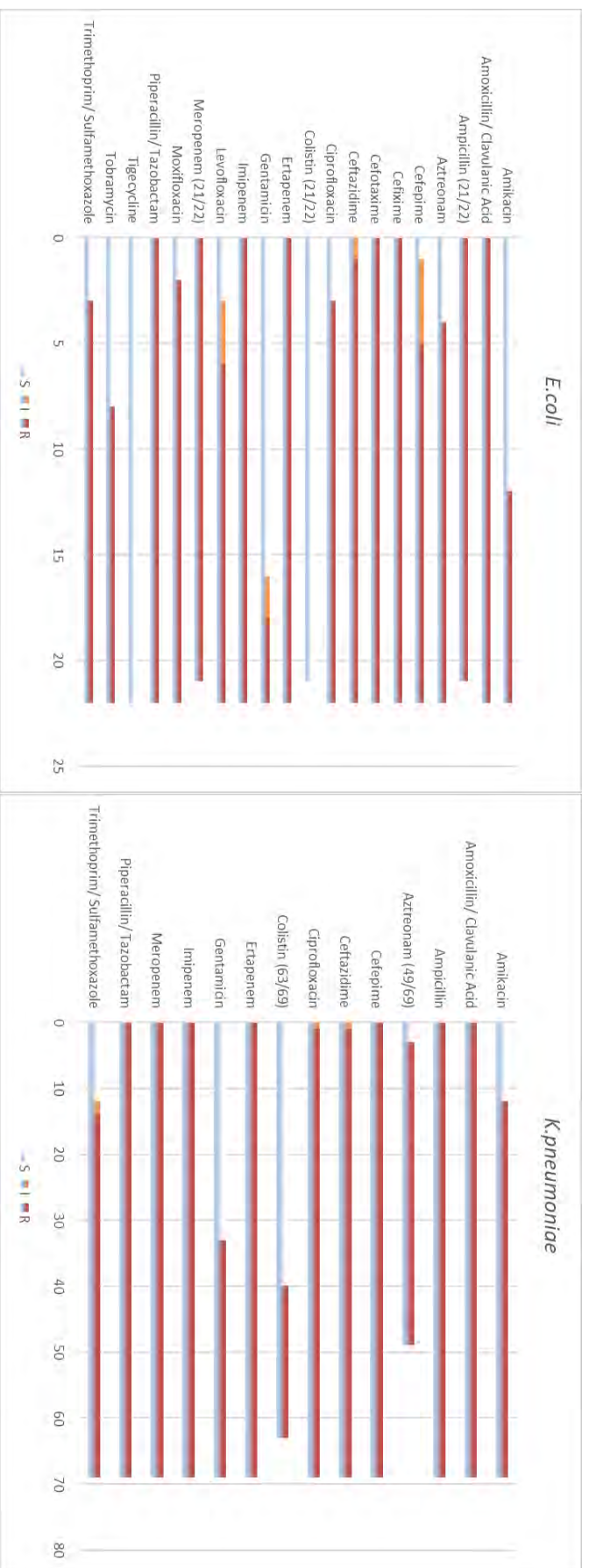
Από τα 756 δείγματα ζωικής προέλευσης, 18 (2,4%) δείγματα είχαν ανάπτυξη ενός Gram αρνητικού βακτηρίου στα εκλεκτικά χρωμογόνα υλικά, ενώ τα εναπομείναντα 738 δεν εμφάνισαν καμία ανάπτυξη. Από τα 18 αυτά στελέχη, τα 17 ταυτοποιήθηκαν ως *Stenotrophomonas maltophilia* (βακτήριο με ενδογενή αντοχή σε καρβαπενέμες) και μόνο ένα ταυτοποιήθηκε ως *E.coli*. Το στέλεχος *E.coli* προήλθε από βοοειδές στον νομό Λάρισας (Βερδικούσια Μαμάλη-Διάσελο).

Έλεγχος ευαισθησίας-Προκαταρκτικός Φαινοτυπικός Έλεγχος

Ο έλεγχος ευαισθησίας με το αυτοματοποιημένο σύστημα Vitek II, με στόχο την επιλογή των στελεχών, έδειξε το επίπεδο αντοχής των τεσσάρων ειδών στις καρβαπενέμες. Με την εφαρμογή της μεθόδου E-test βρέθηκε ότι όλα τα στελέχη που μελετήθηκαν εμφανίζουν MIC στην Ιμιπενέμη και Μεροπενέμη $>4\mu\text{g/ml}$ και $>8\mu\text{g/ml}$ αντίστοιχα για τα στελέχη *E.coli*, *K.pneumoniae* και *A.baumannii* και MIC στην Ιμιπενέμη $>0.001\mu\text{g/ml}$ για τα στελέχη *P.aeruginosa* ($>4\mu\text{g/ml}$), επιβεβαιώνοντας την ανθεκτικότητα προς αυτή την κατηγορία αντιβιοτικών.

Όπως αναφέρεται στην μεθοδολογία, στα στελέχη *E.coli* και *K.pneumoniae*, στα οποία επαληθεύτηκε η αντοχή στις καρβαπενέμες, πραγματοποιήθηκε προκαταρκτικός φαινοτυπικός έλεγχος για παραγωγή καρβαπενεμασών κλάσης A και B. Τα αποτελέσματα του ελέγχου που προκύπτουν δείχνουν ότι στα 15/69 στελέχη *K.pneumoniae* εμφανίστηκε ≥ 8 ο λόγος μεροπενέμη/μεροπενέμη+Phenylboronic Acid (κλάση A) και σε 26/69 στελέχη ≥ 8 ο λόγος μεροπενέμη/μεροπενέμη+EDTA (κλάση B). Σε 27/69 στελέχη ο φαινότυπος έδειξε ≥ 8 στον λόγο μεροπενέμη/μεροπενέμη+Phenylboronic Acid και στον λόγο μεροπενέμη/μεροπενέμη+EDTA (κλάση A + κλάση B), ενώ σε 1/69 δεν υπήρχε διακριτό αποτέλεσμα. Στα στελέχη *E.coli* ο φαινοτυπικός έλεγχος είχε ως αποτέλεσμα σε 10 στελέχη ο λόγος μεροπενέμη/μεροπενέμη+Phenylboronic Acid να είναι ≥ 8 (κλάση A), ενώ στα υπόλοιπα 12 ≥ 8 ήταν ο λόγος μεροπενέμη/μεροπενέμη+EDTA (κλάση B).

Όσον αφορά το στέλεχος *E.coli* που προήλθε από βοοειδές, ο έλεγχος ευαισθησίας έδωσε τιμές $64\mu\text{g/ml}$ για την ιμιπενέμη και $32\mu\text{g/ml}$ για την μεροπενέμη. Ο φαινοτυπικός έλεγχος του στελέχους έδειξε ότι ≥ 8 ήταν ο λόγος μεροπενέμη/μεροπενέμη+EDTA (κλάση B). Επιπρόσθετα, ο έλεγχος ευαισθησίας του εκάστοτε είδους προς τις διάφορες τάξεις αντιβιοτικών, συμπεριλαμβανομένων και των καρβαπενεμών, περιγράφονται στα παρακάτω διαγράμματα:



Διαγράμματα σε μορφή ευκλούς στα οποία απεικονίζονται η ευαισθησία-αντοχή του κάθε είδους αντιβιοτικά. Με λευκό χρώμα απεικονίζονται τα ευαίσθητα στελέχη (S), με πορτοκαλί τα ευαίσθητα-αυξημένης έκθεσης στελέχη (I) και με κόκκινα τα ανθεκτικά στελέχη (R). Ο αριθμός δίπλα από ορισμένα αντιβιοτικά υποδεικνύει τον αριθμό των στελεχών που ελέγχθηκαν έναντι του αντιβιοτικού προς το σύνολο των στελεχών. Απεικονίζονται μόνο τα αντιβιοτικά στα οποία ελέγχθηκε >90% των δειγμάτων. Εξάφραση απορρέει η Aztreonam στα στελέχη *K. pneumoniae*.

Γονοτυπικός έλεγχος

Όλα τα στελέχη, ανεξάρτητα από τον φαινοτυπικό έλεγχο ελέγχθηκαν για τα γονίδια *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}* και *bla_{OXA-48}*. Κατά τον έλεγχο των στελεχών που προήλθαν από ανθρώπινα δείγματα προέκυψε ότι από τα 22 στελέχη *E.coli*, 9 έφεραν το γονίδιο *bla_{NDM}*, 10 το γονίδιο *bla_{KPC}*, 2 το γονίδιο *bla_{VIM}* και 1 τα γονίδια *bla_{NDM}* και *bla_{VIM}*, ενώ δεν βρέθηκε σε κανένα στέλεχος το γονίδιο *bla_{OXA-48}*. Στα στελέχη *K.pneumoniae* ανιχνεύτηκαν και τα 4 γονίδια, με τα περισσότερα στελέχη να φέρουν τουλάχιστον δύο γονίδια που να κωδικοποιούν για καρβαπενεμάσες. Συγκεκριμένα, σε 31 στελέχη ανιχνεύτηκε μόνο ένα γονίδιο και βρέθηκε ότι 15 έφεραν το *bla_{KPC}*, 14 το *bla_{NDM}*, 1 το *bla_{VIM}* και 1 το *bla_{OXA-48}*. Από τα υπόλοιπα 38, τα 19 στελέχη έφεραν ταυτοχρόνως τα γονίδια *bla_{KPC}* και *bla_{VIM}*, 11 τα *bla_{NDM}* και *bla_{OXA-48}* και 8 *bla_{NDM}* και *bla_{KPC}*. Όσον αφορά τα στελέχη *P.aeruginosa* βρέθηκε ότι 30 στελέχη φέρουν το γονίδιο *bla_{VIM}* και 17 το γονίδιο *bla_{NDM}*, ενώ κανένα στέλεχος δεν έφερε τα γονίδια *bla_{KPC}* και *bla_{OXA-48}*. Στα υπόλοιπα 30 στελέχη *P.aeruginosa* δεν βρέθηκε κανένας από αυτούς τους μηχανισμούς αντοχής. Τέλος στα στελέχη *A.baumannii* βρέθηκε μόνο 9 στελέχη να φέρουν το γονίδιο *bla_{NDM}*.

Το ζωικό στέλεχος ήταν θετικό για το γονίδιο *bla_{NDM}* ενώ δεν βρέθηκε κανένα από τα άλλα τρία γονίδια. Στην παρακάτω εικόνα περιλαμβάνονται συνοπτικά τα αποτελέσματα του γονοτυπικού ελέγχου όλων των στελεχών.

		ΓΟΝΙΔΙΑ								Σύνολο
		<i>bla_{NDM}</i>	<i>bla_{KPC}</i>	<i>bla_{VIM}</i>	<i>bla_{OXA-48}</i>	<i>bla_{KPC} + bla_{NDM}</i>	<i>bla_{KPC} + bla_{VIM}</i>	<i>bla_{NDM} + bla_{VIM}</i>	<i>bla_{NDM} + bla_{OXA-48}</i>	
Ανθρώπινα στελέχη	<i>Escherichia coli</i>	9	10	2	0	0	0	1	0	22
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14	15	1	1	8	19	0	11	69
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17	0	30	0	0	0	0	0	76
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	9	0	0	0	0	0	0	0	103
Ζωικό στέλεχος	<i>Escherichia coli</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	1

Σύγκριση φαινοτυπικού και γονοτυπικού ελέγχου στην ανίχνευση καρβαπενεμασών

Σε όλα τα στελέχη *E.coli* και *K.pneumoniae* που βρέθηκε μέσω του φαινοτυπικού ελέγχου να παράγουν καρβαπενεμάση κλάσης A εντοπίστηκε το γονίδιο *bla_{KPC}*, ενώ σε όλα τα στελέχη που ήταν θετικά για παραγωγή καρβαπενεμάσης κλάσης B βρέθηκε είτε το γονίδιο *bla_{VIM}* είτε το γονίδιο *bla_{NDM}*, ενώ στα στελέχη που βρέθηκε παραγωγή καρβαπενεμασών κλάσης A και κλάσης B εντοπίστηκαν οι συνδυασμοί γονιδίων *bla_{KPC}+bla_{VIM}* ή *bla_{KPC}+bla_{NDM}*. Συνεπώς, ο προκαταρκτικός φαινοτυπικός έλεγχος για παρουσία καρβαπενεμασών που πραγματοποιήθηκε στα στελέχη *E.coli* και *K.pneumoniae* είχε απόλυτη ταύτιση με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον γονοτυπικό έλεγχο των στελεχών.

Αποτελέσματα αλληλούχισης ολικού γονιδιώματος

Από τα στελέχη που ήταν *bla_{NDM}* θετικά πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση ολικού γονιδιώματος στο στέλεχος ζωικής προέλευσης. Παράλληλα, στα στελέχη ανθρώπινης προέλευσης έγινε αλληλούχιση ολικού γονιδιώματος σε όλα τα στελέχη *E.coli* και *A.baumannii*, ενώ από τα είδη *P.aeruginosa* επιλέχθηκαν τυχαία 9 (τα πρώτα που απομονώθηκαν Μάιο-Ιούλιο 2023) και *K.pneumoniae* 5 δείγματα με όλους τους γονοτυπικούς συνδυασμούς καρβαπενεμασών. Στον παρακάτω πίνακα περιλαμβάνονται τα στοιχεία των στελεχών στα οποία πραγματοποιήθηκε WGS.

Πίνακας4 Στοιχεία στελεχών στα οποία έγινε ανάλυση με Αλληλούχηση Ολικού Γονιδιώματος

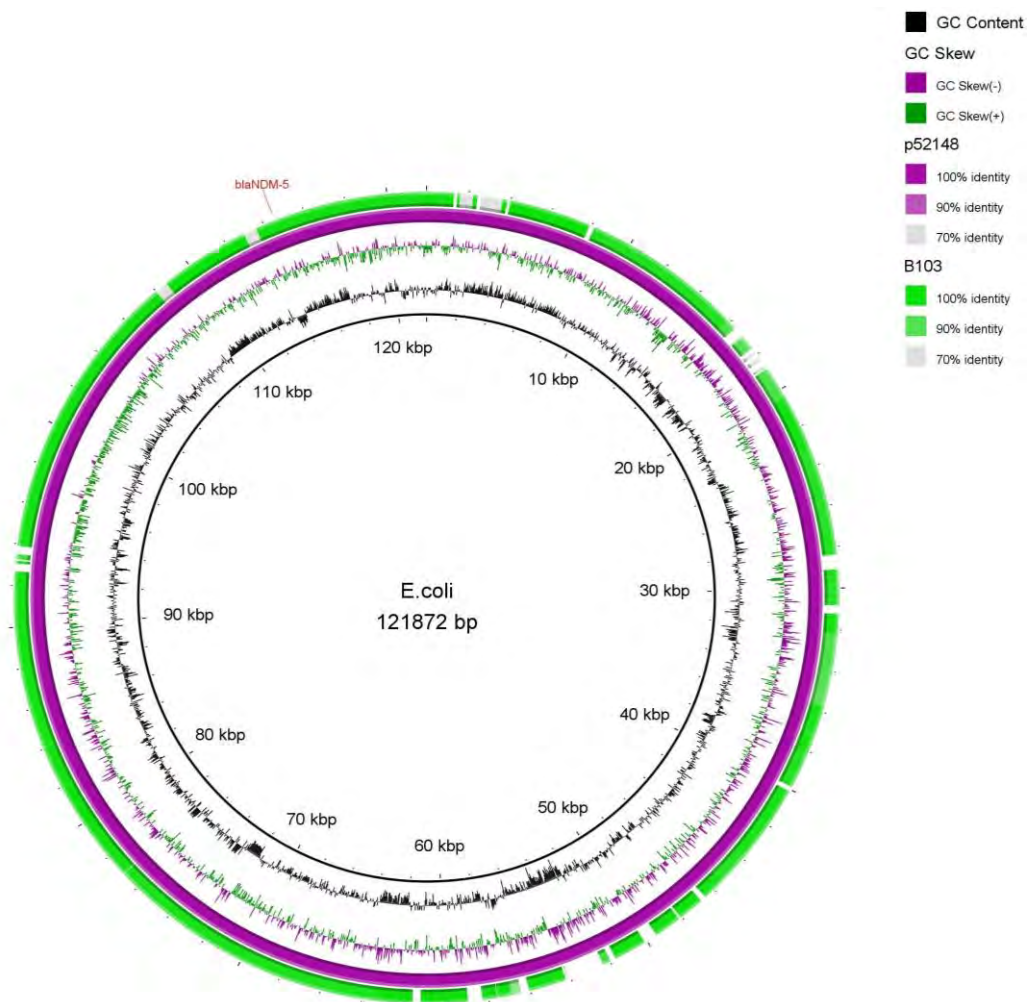
ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ	ΕΤΟΣ	ΥΛΙΚΟ	ΚΛΙΝΙΚΗ
B103	<i>Escherichia coli</i>	2021	ΖΩΙΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ	
9703	<i>Escherichia coli</i>	2017	ΑΙΜΑ	ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ
9793	<i>Escherichia coli</i>	2017	ΠΥΟΝ	ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ
A155	<i>Escherichia coli</i>	2017	ΟΥΡΑ	ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ
A1160	<i>Escherichia coli</i>	2018	ΧΟΛΗ	ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΟΛΟΓΙΚΗ
A1630	<i>Escherichia coli</i>	2018	ΑΙΜΑ	ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ
A2614	<i>Escherichia coli</i>	2019	ΟΥΡΑ	ΟΥΡΟΛΟΓΙΚΗ
A3025	<i>Escherichia coli</i>	2021	ΑΙΜΑ	ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ
A3026	<i>Escherichia coli</i>	2021	ΑΙΜΑ	ΤΕΠ
A3039	<i>Escherichia coli</i>	2021	ΑΙΜΑ	ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΟΛΟΓΙΚΗ
A3040	<i>Escherichia coli</i>	2021	ΟΥΡΑ	ΤΕΠ
A3118	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2022	ΕΝΔΟΣΚΟΠΙΟ	(ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ)
A3119	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2022	ΕΝΔΟΣΚΟΠΙΟ	(ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ)
A3173	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2022	ΟΥΡΑ	ΤΕΠ
A3185	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2022	ΑΣΚΙΤΙΚΟ ΥΓΡΟ	ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ
A3214	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2021	ΟΥΡΑ	ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ
A3453	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2023	ΒΡΟΓΧΙΚΕΣ ΕΚΚΡΙΣΕΙΣ	ΜΕΘ
A3454	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2023	ΚΕΝΤΡΙΚΟΣ ΦΛΕΒΙΚΟΣ ΚΑΘΕΤΗΡΑΣ	ΜΕΘ
A3462	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2023	ΑΙΜΑ	ΜΕΘ
A3468	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2023	ΒΡΟΓΧΙΚΕΣ ΕΚΚΡΙΣΕΙΣ	ΜΕΘ
A3472	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2023	ΚΕΝΤΡΙΚΟΣ ΦΛΕΒΙΚΟΣ ΚΑΘΕΤΗΡΑΣ	ΜΕΘ
A3504	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2023	ΑΙΜΑ	ΜΕΘ
A3529	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2023	ΟΥΡΑ	ΜΕΘ
A3534	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2023	ΟΥΡΑ	ΜΕΘ
A3542	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2023	ΙΣΤΟΣ	ΟΡΘΟΠΑΙΔΙΚΗ
A3232	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2022	ΑΙΜΑ	ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ
A3496	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2023	ΒΡΟΓΧΙΚΕΣ ΕΚΚΡΙΣΕΙΣ	ΜΕΘ
A3538	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2023	ΚΑΘΕΤΗΡΑΣ	ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ
A3557	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2023	ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΟ ΥΓΡΟ	ΜΕΘ
A3569	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2023	ΒΡΟΓΧΙΚΕΣ ΕΚΚΡΙΣΕΙΣ	ΜΕΘ
A3570	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2023	ΑΙΜΑ	ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ
A3593	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2023	ΑΙΜΑ	ΜΕΘ
A3597	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2023	ΟΥΡΑ	ΤΕΠ
A3629	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2023	ΒΡΟΓΧΙΚΕΣ ΕΚΚΡΙΣΕΙΣ	ΜΕΘ
A3637	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2023	ΤΡΑΥΜΑ	ΜΕΘ

Αποτελέσματα στελέχους *E.coli* ζωικής προέλευσης

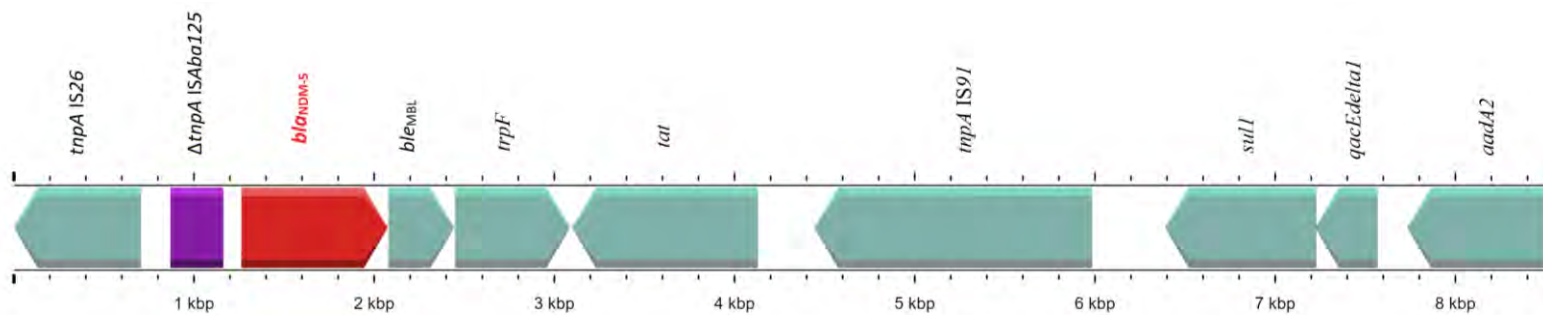
Κατά την τυποποίηση του στελέχους με την μέθοδο MLST προέκυψε ότι το στέλεχος ανήκει στον κλώνο (Sequence type, ST) ST361. Η αναζήτηση των γονιδίων αντοχής επιβεβαίωσε την παρουσία του γονιδίου *bla_{NDM}* και η συγκριτική ανάλυση με την βάση δεδομένων έδειξε ότι είναι το αλληλίο 5 (*bla_{NDM-5}*). Εκτός του γονιδίου αυτού το στέλεχος βρέθηκε να φέρει επιπλέον 16 γονίδια αντοχής(*bla_{TEM-1}*, *aadA1*, *aadA2*, *aph(3')-Ia*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, *rmtB*, *mph(A)*, *cmlA1*, *floR*, *sul1*, *sul2*, *sul3*, *tet(A)* *tet(M)*, *dfrA12*). Παράλληλα ο έλεγχος αποκάλυψε την παρουσία μεταλλάξεων στα γονίδια *gyrA* (⁸³S→L, ⁸⁷D→N), *parC* (⁸⁰S→I) και *parE* (⁴⁵⁸S→A). Ο έλεγχος για την παρουσία πλασμιδίων έδειξε την παρουσία 5 τύπων πλασμιδίων (IncFIA, IncFIB(AP001918), IncFII, IncX1 και p0111) με ποσοστά ομοιότητας από 97.65% έως 100%. Ο έλεγχος παρουσίας γονιδίων που κωδικοποιούν για λοιμογόνους παράγοντες έδειξε την παρουσία των γονιδίων *capU*, *csgA*, *fimH* *gad*, *iss*, *sitA*, *terC*, και *traT*. Το γονίδιο *bla_{NDM-5}* εντοπίστηκε σε γενετική δομή, η συγκριτική ανάλυση της οποίας έδειξε μεγάλη ομοιότητα με το πλασμίδιο p52148 που είχε περιγραφεί στο παρελθόν σε στέλεχος *E.coli* (Accession Number CP050384) (εικ. 34).

Σημείωση: Στις παρακάτω εικόνες (συμπεριλαμβανομένων των αποτελεσμάτων όλων των στελεχών) απεικονίζεται ένα ενδεικτικό τμήμα του γενετικού περιβάλλοντος του γονιδίου *bla_{NDM}* (κόκκινο χρώμα). Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται κωδικές περιοχές με γνωστή λειτουργία (το γονίδιο ή η πρωτεΐνη των οποίων αναγράφονται δίπλα από κάθε βέλος), με γκρι χρώμα απεικονίζονται περιοχές που κωδικοποιούν υποθετικές πρωτεΐνες ενώ με μωβ χρώμα είναι σημειωμένες οι περιοχές οι οποίες λόγω αλλαγής του γενετικού κώδικα (μετάλλαξης, μετατόπισης κλπ.) δεν εμφανίζουν λειτουργικότητα. Λόγω ότι κάθε τμήμα έχει διαφορετικό μέγεθος, το μέγεθος των γονιδίων σε κάθε εικόνα είναι αντιπροσωπευτικά της περιοχής που απεικονίζεται και οποιαδήποτε διαφορά του μεγέθους των γονιδίων ανάμεσα στις εικόνες είναι αποτέλεσμα προσαρμογής στην εικόνα και όχι διαφοράς των βάσεων (μεταξύ κοινών γονιδίων).

(α)



(β)

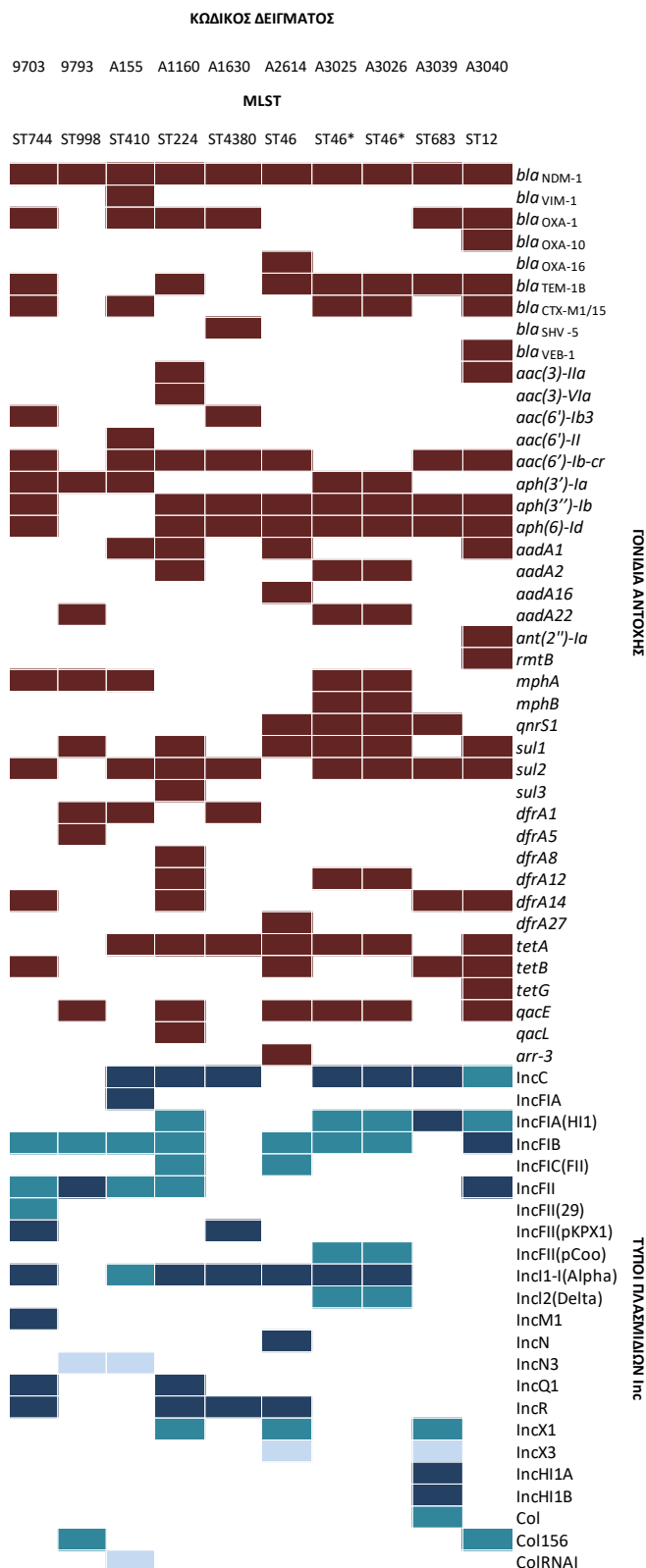


Εικόνα 34 (α) Εικόνα στην οποία απεικονίζεται το πλασμίδιο p52148 (Acc.no CP050384) σε σύγκριση με τη γενετική δομή που εντοπίζεται το γονίδιο *bla*_{NDM-5} του στελέχους *E. coli* B103. (β) Σχηματική απεικόνιση του γενετικού περιβάλλοντος του γονιδίου *bla*_{NDM-5} στο στέλεχος B103 (μέγεθος 8.5kb)

Αποτελέσματα στελεχών *E.coli* ανθρώπινης προέλευσης

Η ανάλυση MLST έδειξε ότι τα στελέχη προερχόμενα από ανθρώπους ανήκουν σε 9 διαφορετικούς κλώνους και συγκεκριμένα τα στελέχη ανήκουν στους κλώνους ST744, ST998, ST410, ST224, ST4380, ST46, ST683, ST12 και δύο στελέχη ανήκουν σε νέο κλώνο λόγω μίας σημειακής αλλαγής στο αλληλίο 840 του γονιδίου *adk* στην θέση 535 ($^{535}\text{C}\rightarrow\text{T}$) ενώ τα υπόλοιπα αλληλία εμφανίζουν 100% ομοιότητα με τα αλληλία του κλώνου ST46 (είναι σημειωμένο ως 46*). Ο έλεγχος γονιδίων αντοχής επιβεβαίωσε την παρουσία του γονιδίου *bla*_{NDM-1} και παράλληλα έδειξε ότι τα στελέχη έφεραν επιπλέον από 8 έως 20 διαφορετικά γονίδια αντοχής, τα οποία προσδίδουν ανθεκτικότητα έναντι 8 διαφορετικών κατηγοριών αντιβιοτικών. Εκτός αυτών, πέντε από τα στελέχη (9793, A155, A1160, A1630 και A2614) έφεραν μεταλλάξεις, με το 9793 να εμφανίζει μεταλλάξεις στα γονίδια *gyrA* ($^{83}\text{S}\rightarrow\text{L}$, $^{87}\text{D}\rightarrow\text{N}$) και *parC* ($^{56}\text{A}\rightarrow\text{T}$, $^{80}\text{S}\rightarrow\text{I}$) και τα υπόλοιπα τέσσερα στελέχη στα γονίδια *parC* ($^{80}\text{S}\rightarrow\text{I}$), *parE*

Εικόνα 35 Παρουσίαση των γονιδίων αντοχής και των τύπων πλασμιδίων *Inc* που εντοπίζονται στα στελέχη *E.coli* από την ανάλυση ολικού γονιδιώματος. Στο τμήμα των τύπων πλασμιδίων *Inc* η διαφορετική χρωματική απεικόνιση υποδεικνύει το ποσοστό ομοιότητας σύμφωνα με την ανάλυση BlastN με πλασμίδια που έχουν χαρακτηριστεί και καταχωρηθεί στην βάση δεδομένων. Σκούρο μπλε: $\geq 99\%$, Μπλε: 90-98% και Ανοιχτό μπλε: 80-89% ομοιότητα.



(⁴⁵⁸S→A) και *gyrA* (⁸³S→L, ⁸⁷D→N). Ο πλασμιδιακός έλεγχος έδειξε ότι τα στελέχη φέρουν από 3 έως 9 διαφορετικούς τύπους πλασμιδίων ανά στέλεχος ενώ στο σύνολο βρέθηκαν 20 διαφορετικοί τύποι. Η σύγκριση των γονιδίων και των τύπων πλασμιδίων εμφανίζει 100% και 80-99% ομοιότητα αντίστοιχα με ήδη υπάρχοντα γονίδια και πλασμίδια που είναι καταχωρημένα στην βάση δεδομένων NCBI (εικ. 35). Η αναζήτηση λοιμογόνων παραγόντων έδειξε ότι τα στελέχη φέρουν από 8 έως 32 γονίδια έκαστος, τα οποία περιλαμβάνονται στον παρακάτω πίνακα.

Σημείωση: Στα σημεία όπου αναγράφονται τα γονίδια που κωδικοποιούν λοιμογόνους παράγοντες (πίνακες/κείμενο) συμπεριλαμβάνονται γονίδια παραγωγής τοξινών αλλά και γονίδια που συμμετέχουν στα μεταβολικά μονοπάτια σχηματισμού βιομεμβράνης, στην ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης, την προσκόλληση, καθώς και άλλα, κάθε ένα από τα οποία συμβάλλει στην αύξηση της παθογονικότητας του στελέχους.

Πίνακας 5 Πίνακας που περιέχει τα γονίδια που κωδικοποιούν για λοιμογόνους παράγοντες στα στελέχη *E.coli* σύμφωνα με την βάση δεδομένων VirulenceFinder (v.2.0)

Κωδικός δείγματος/MLST	Γονίδια Λοιμογόνων παραγόντων
9703/ST744	<i>cia, cma, csgA, cvaC, fimH, gad, hlyE, hlyF, iroN, iss, ompT, sitA, terC, traT, yehA/B/C/D</i>
9793/ST998	<i>chua, cia, clbB, cnfI, cvaC, etsC, fimH, focC, focG, fyuA, gad, hlyA, hlyF, hra, ibeA, iroN, iss, iucC, iutA, kpsE, kpsMII_K1, neuC, ompT, sfaD/E, sfaS, sitA, tcpC, terC, traT, usp, vat, yehA/B/C/D,</i>
A155/ST410	<i>csgA, fimH, gad, hlyE, iss, iucC, iutA, lpfA, sitA, terC, yehA/B/C/D</i>
A1160/ST224	<i>astA, cia, cib, cma, csgA, cvaC, fimH, gad, hlyE, hlyF, iroN, inuC, iutA, lpfA, ompT, sitA, terC, yehA/B/C/D</i>
A1630/ST4380	<i>csgA, fdeC, fimH, gad, hlyE, lpfA, terC, yehA/B/C/D</i>
A2614/ST46	<i>cma, cvaC, fimH, fyuA, gad, hlyE, hlyF, iss, inuC, iutA, ompT, sitA, terC, traT, yehA/B/C/D</i>
A3025/ST46*	<i>cia, cib, clpK1, cma, csgA, cvaC, gad, hlyE, hlyF, iroN, iss, ompT, sitA, terC, traT, yehA/B/C/D</i>
A3026/ST46*	<i>cia, cib, clpK1, cma, csgA, cvaC, gad, hlyE, hlyF, iroN, iss, ompT, sitA, terC, traT, yehA/B/C/D</i>
A3039/ST683	<i>csgA, fimH, gad, hlyE, lpfA, ompT, terC, yehA/B/C/D</i>
A3040/ST12	<i>cea, chuA, clbB, cnfI, fimH, fyuA, gad, hra, iroN, iss, mchB/C/F, ompT, senB, sitA, terC, traT, usp, vat, yehA/B/C/D</i>

Από την ανάλυση του γενετικού περιβάλλοντος του γονιδίου *bla*_{N_{DM-1}} προέκυψαν τρεις γενετικές δομές στις οποίες εντοπίζεται το γονίδιο. Συγκεκριμένα, η πρώτη γενετική δομή βρέθηκε σε 7 (9793, A155, A1160, A3025, A3026, A3039 και A3040) από τα 10 στελέχη. Κατά την συγκριτική μελέτη προέκυψε ότι η δομή αυτή εμφανίζει ομοιότητα με το πλασμίδιο pS-3002cz το οποίο χαρακτηρίστηκε στο παρελθόν σε στέλεχος *K.pneumoniae* (Accession number KJ958927) (εικ 37α-38α). Η δεύτερη γενετική δομή βρέθηκε σε 2 στελέχη (9703 και A1630). Η σύγκριση αυτής με την βάση δεδομένων έδειξε ότι έχει ομοιότητα με το πλασμίδιο pB-3002cz που είχε βρεθεί σε στέλεχος *K.pneumoniae* (Accession number KJ958926) (εικ 37β-38β). Η τρίτη γενετική δομή ανιχνεύθηκε σε ένα μόνο στέλεχος (A2614) και κατά την συγκριτική ανάλυση εμφανίζει ομοιότητα με το πλασμίδιο pEc19397-131 (Accession number MG878866) (εικ 37γ-38γ).

Αποτελέσματα στελεχών *K.pneumoniae*

Τα 5 στελέχη *K.pneumoniae* που επιλέχθηκαν για αλληλούχιση ολικού γονιδιώματος έφεραν τους εξής συνδυασμούς: 2 στελέχη *bla_{NDM}*, 2 στελέχη *bla_{NDM}+bla_{OXA-48}* και 1 στέλεχος *bla_{NDM}+bla_{KPC}*. Η τυποποίηση των στελεχών έδειξε ότι τα στελέχη ανήκουν σε 3 διαφορετικούς κλώνους. Συγκεκριμένα τρία στελέχη ανήκουν στον κλώνο ST11, ένα στέλεχος στον κλώνο ST231 και το εναπομένον στέλεχος ανήκει σε νέο κλώνο λόγω του ότι φέρει τον εξής συνδυασμό αλληλίων: *gapA*:3, *infB*:3, *mdh*:1, *pgi*:1, *phoE*:1, *rpoB*:1, *tonB*:546, συνδυασμός ο οποίος δεν είχε χαρακτηριστεί στο παρελθόν. Η αναζήτηση των γονιδίων αντοχής οδήγησε στον εντοπισμό 29 διαφορετικών γονιδίων. Εκτός του γονιδίου *bla_{NDM-1}*, κάθε στέλεχος βρέθηκε ότι φέρει από 10 έως 18 διαφορετικά γονίδια, προσφέροντας αντοχή σε 10 κατηγορίες αντιβιοτικών. Ο έλεγχος για την παρουσία πλασμιδίων έδειξε την παρουσία 12 διαφορετικών τύπων Inc, με το κάθε στέλεχος να φέρει από 5 έως 6 διαφορετικούς τύπους (εικ. 36).



Εικόνα 36 Παρουσίαση των γονιδίων αντοχής και των τύπων πλασμιδίων Inc που εντοπίζονται στα στελέχη *K.pneumoniae* από την ανάλυση ολικού γονιδιώματος. Στο τμήμα των τύπων πλασμιδίων Inc η διαφορετική χρωματική απεικόνιση υποδεικνύει το ποσοστό ομοιότητας σύμφωνα με την ανάλυση BlastN με πλασμίδια που έχουν χαρακτηριστεί και καταχωρηθεί στην βάση δεδομένων. Σκούρο μπλε: ≥99% και Μπλε: 90-98%.

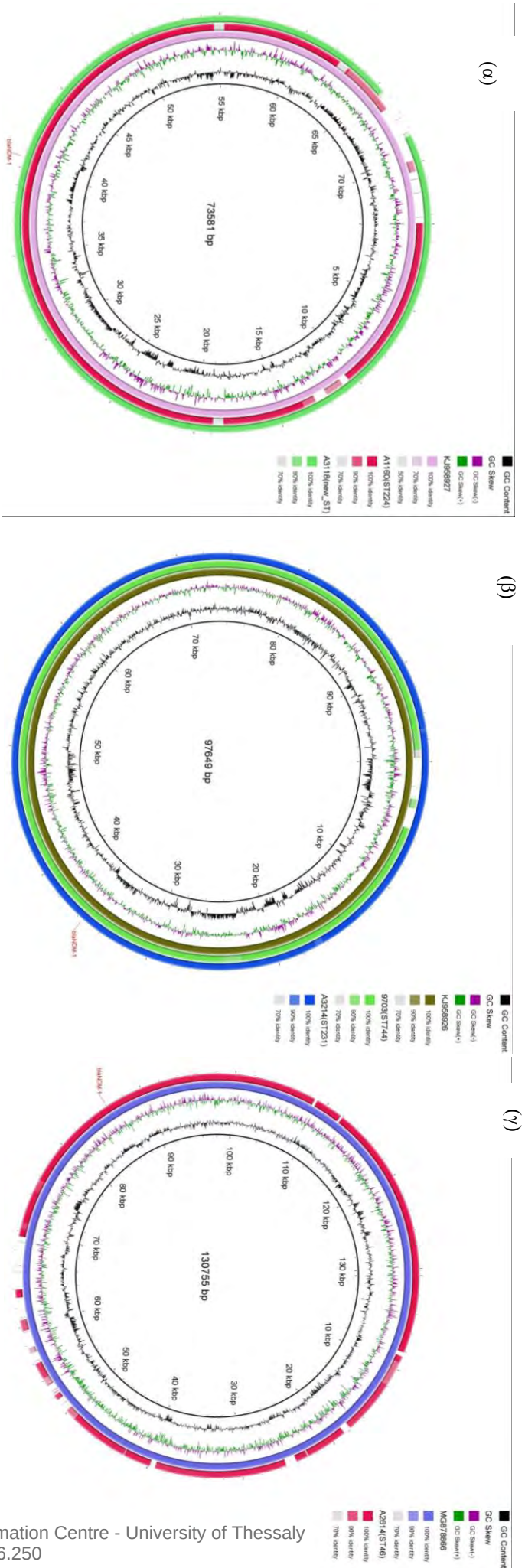
Ο έλεγχος παρουσίας γονιδίων που κωδικοποιούν για λοιμογόνους παράγοντες έδειξε πλήθος γονιδίων να χαρακτηρίζει κάθε στέλεχος. Συγκεκριμένα κάθε στέλεχος έφερε από 25 έως 29 γονίδια, τα οποία περιγράφονται αναλυτικότερα στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 6 Πίνακας που περιέχει τα γονίδια που κωδικοποιούν για λοιμογόνους παράγοντες στα στελέχη *K.pneumoniae* σύμφωνα με την βάση δεδομένων Virulence Factor Database.

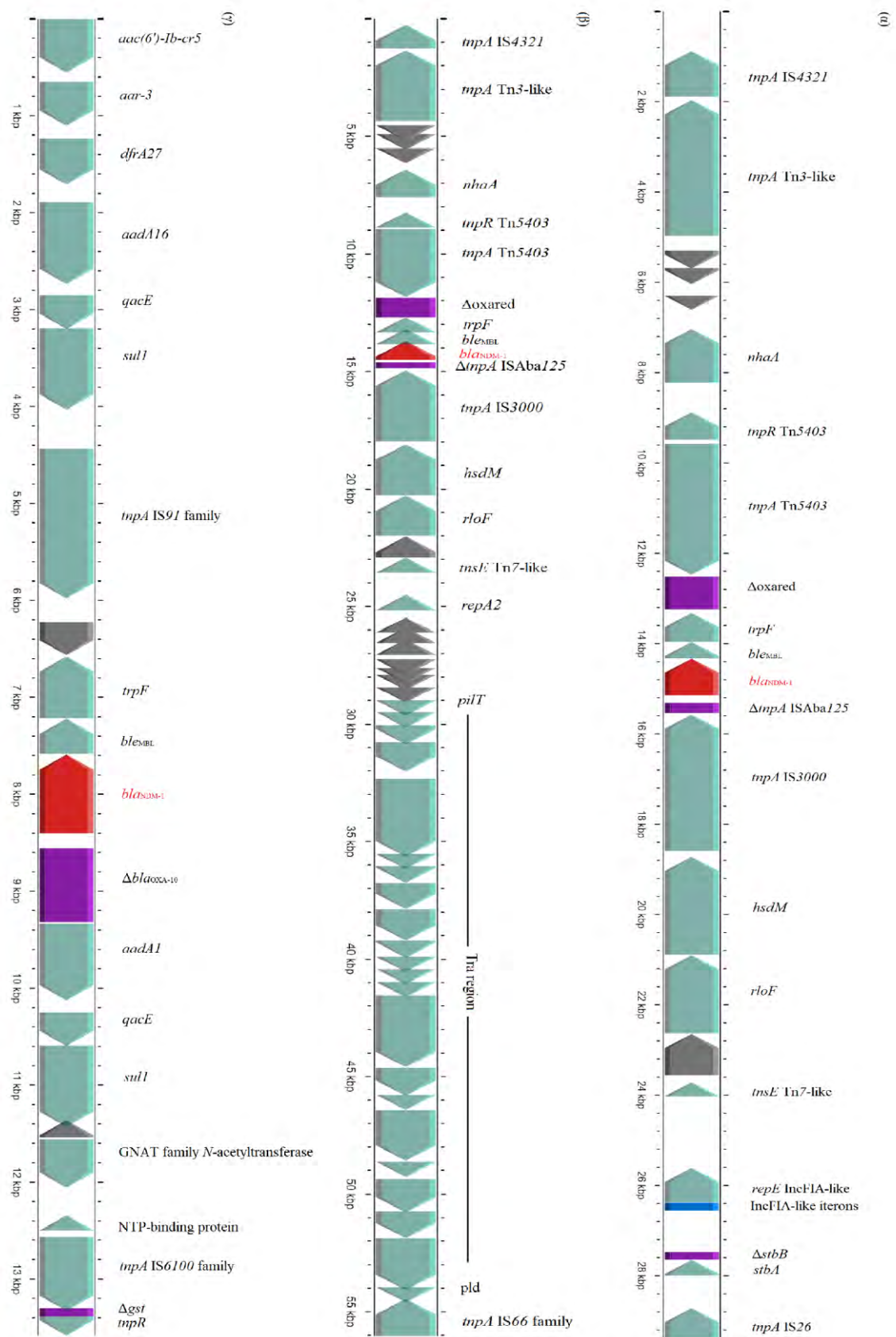
Κωδικός δείγματος/MLST	Γονίδια Λοιμογόνων παραγόντων
A3118/ Νέο ST	<i>acrB, clpV/tssH, entF, fepA, fimD, galF, gspD, gspE, gspF, gspH, gspJ, gspK, gspL, icmF/tssM, impG, iroE, iroN, irp1, iutA, KPHS_35700, KPK_RS08035, KPN2242_RS16205, mrkC, ompA, rcsB, rfbK1, tssF, vgrG/tssI</i>
A3119/ST11	<i>acrB, clpV/tssH, entF, fepA, fimD, galF, gspD, gspE, gspF, gspH, gspJ, gspK, gspL, icmF/tssM, iroE, iroN, irp1, iutA, KPHS_357040, KPK_RS08035, KPK_RS21755, KPN2242_RS16205, mrkC, rcsA/B, rfbK1, vgrG</i>
A3173/ST11	<i>acrB, clpV/tssH, entF, fepA, fimD, galF, gspD, gspE, gspF, gspH, gspJ, gspK, gspL, icmF/tssM, iroE, iroN, iutA, KPHS_35700, KPK_RS08035, KPK_RS21755, KPN2242_RS16205, mrkC, rcsA/B, tssF, vgrG/tssI</i>
A3185/ST11	<i>acrB, clpV/tssH, entF, fepA, fimD, galF, gspD, gspE, gspF, gspH, gspJ, gspK, gspL, icmF/tssM, impG, iroE, iroN, irp1, iutA, KPHS_35700, KPK_RS08035, KPK_RS21755, KPN2242_RS16205, mrkC, mrkH, ompA, rcsA, tssF, vgrG/tssI</i>
A3214/ST231	<i>acrB, clpV/tssH, entF, fepA, fimD, gspD, gspE, gspF, gspG, gspJ, gspK, gspL, icmF/tssM, iroE, iroN, iutA, KPHS_35700, KPK_RS21755, KPN2242_RS16205, KPR_RS09080, mrkC, rcsB, tssF, vgrG/tssI</i>

Η αναζήτηση της θέσης του γονιδίου *bla*_{NDM-1} στα στελέχη *K.pneumoniae* αποκάλυψε την παρουσία του γονιδίου σε 2 διαφορετικές γενετικές δομές. Συγκεκριμένα σε τέσσερα στελέχη (A3118, A3119, A3173 και A3185) το γονίδιο εντοπίζεται σε δομή η οποία εμφανίζει ομοιότητα με το πλασμίδιο pS-3002cz (Accession number KJ958927). Στο εναπομένον στέλεχος (A3214) το *bla*_{NDM-1} γονίδιο εντοπίζεται σε γενετική δομή η οποία έχει ομοιότητα με το πλασμίδιο pB-3002cz (Accession number KJ958926).

Σημείωση: Η σχηματική απεικόνιση του γενετικού περιβάλλοντος του γονιδίου *bla*_{NDM-1} στα στελέχη *K.pneumoniae* έχει πλήρη ταύτιση με την σχηματική απεικόνιση των στελεχών *E.coli* (εικόνα 37-38(α) και 37-38(β)).



Εικόνα 37: Ενδεικτική απεικόνιση των γενετικών δομών των στελεχών *E. coli* και *K. pneumoniae* στις οποίες εντοπίζεται η θέση του γονιδίου *bla*NDM-1 σε σύγκριση με τα όμοια γενετικά περιβάλλοντα που βρέθηκαν από την βάση δεδομένων κατά την συγκριτική ανάλυση. (α) Εικόνα στην οποία απεικονίζεται το πλάσμιδιο PS-3002cz (Acc.no KJ958927) σε σύγκριση με την γενετική δομή ενός στελέχους *E. coli* (A1160) και ενός στελέχους *K. pneumoniae* (A3118). (β) Εικόνα στην οποία απεικονίζεται το πλάσμιδιο pB-3002cz (Acc.no KJ958926) σε σύγκριση με την γενετική δομή ενός στελέχους *E. coli* (9703) και του στελέχους *K. pneumoniae* A3214. (γ) Εικόνα στην οποία απεικονίζεται το πλάσμιδιο pEcl9397-131 (Acc.no MG878866) σε σύγκριση με την γενετική δομή του στελέχους *E. coli* A2614.



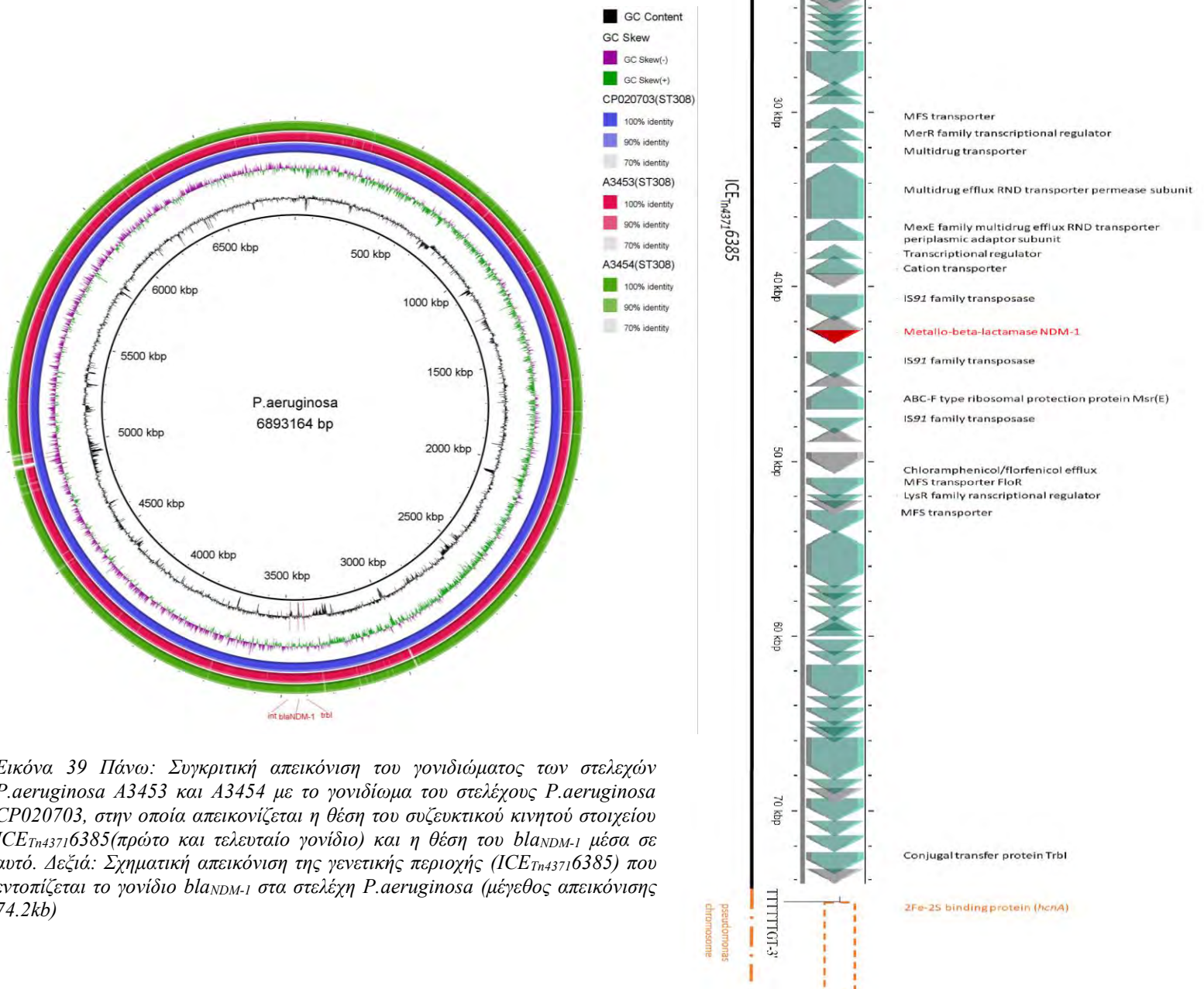
Εικόνα 38: Σχηματική απεικόνιση των τριών διαφορετικών γενετικών περιόχων που εντοπίζονται το γονίδιο *bla_{NDM-1}* στα στελέχη *E. coli* και *K. pneumoniae* (α) Απεικονίζονται τα στελέχη *E. coli* 9793, A155, A160, A3025, A3026, A3039 και A3040 και *K. pneumoniae* A3118, A3119, A3173 και A3185 η δομή των οποίων είναι όμοια με το πλάσμιδιο pS-3002cz (μέγεθος απεικόνισης 29.5kb), (β) Απεικονίζονται τα στελέχη *E. coli* 9703 και A1630 και *K. pneumoniae* A3214 η δομή των οποίων έχει ομοιότητα με το πλάσμιδιο pB-3002cz (μέγεθος απεικόνισης 56kb) και (γ) Απεικονίζεται το στέλεχος A2614 η δομή του οποίου έχει ομοιότητα με το πλάσμιδιο pEc19397-131 (μέγεθος απεικόνισης 13.6kb)

Αποτελέσματα στελεχών *P.aeruginosa*

Η ανάλυση ολικού γονιδιώματος των στελεχών αποκάλυψε ότι τα στελέχη *P.aeruginosa* ήταν πανομοιότητα τόσο για την παρουσία γονιδίων ανθεκτικότητας και λοιμογόνων παραγόντων όσο και στην τοποθέτηση του γονιδίου *bla_{NDM-1}* στο γονιδίωμα των στελεχών. Η μέθοδος MLST κατηγοριοποίησε όλα τα στελέχη *P.aeruginosa* στον κλώνο ST308. Η ανάλυση του γονιδιώματος των στελεχών αποκάλυψε την παρουσία των ίδιων 22 γονιδίων. Συγκεκριμένα, βρέθηκαν 4 γονίδια που κωδικοποιούν β-λακταμάσες (*bla_{NDM-1}*, *bla_{PABO}*, *bla_{OXA-10}*, *bla_{OXA-488}*), 7 γονίδια που προσδίδουν αντοχή στις αμινογλυκοσίδες (*aph(3)-Ib*, *aph(6)-Id*, *aac(3)-Id*, *aac(6')-Ib3*, *aac(6')-II*, *aadA10*, *rmtF*), 3 γονίδια που προσφέρουν αντοχή στις κινολόνες (*crpP*, *aac(6')-Ib-cr*, *qnrVC1*) και 3 στις σουλφοναμίδες (*sul1*, *sul2*, *dfrB5*), 2 γονίδια που προσδίδουν αντοχή στην χλωραμφενικόλη (*ctaB7*, *floR*) και ένα γονίδιο που σχετίζεται με αντοχή στην φθορομυκίνη (*fosA*), τις μακρολίδες (*msrE*) και το τεταρτογενές αμμώνιο (quaternary ammonium) (*qacE*) αντίστοιχα.

Σύμφωνα με την βάση δεδομένων βρέθηκε ότι τα στελέχη φέρουν πλήθος γονιδίων που κωδικοποιούν λοιμογόνους παράγοντες όπως *exoU*, *lasA*, *lasB*, *toxA*, *estA*, *plcB*, *plcH*, *plcN*, *pcrD*, *spcS*, *rhlA*, *rhlB*, *alg8*, *algB*, *algC*, *algE*, *algG*, *algQ*, *algR*, *algU*, *algW*, *mucA*, *mucB*, *mucD*, *mucP*, *hdtS* κ.α.

Η σύγκριση του γονιδιώματος των στελεχών *P.aeruginosa* με την διαθέσιμη βιβλιογραφία έδειξε 98% ομοιότητα με στέλεχος που είχε χαρακτηριστεί στην Σιγκαπούρη το 2018 (Accession number CP020703). Παράλληλα, η θέση του γονιδίου *bla*_{NDM-1} βρίσκεται πάνω σε κινητό στοιχείο το οποίο εμφανίζει ομοιότητα με το κινητό στοιχείο ICE_{Tn4371}6385 μεγέθους 74.2kb, το οποίο τοποθετείται στο χρωμόσωμα (εικ. 39).



Εικόνα 39 Πάνω: Συγκριτική απεικόνιση του γονιδιώματος των στελεχών *P.aeruginosa* A3453 και A3454 με το γονιδίωμα του στελέχους *P.aeruginosa* CP020703, στην οποία απεικονίζεται η θέση του συζευκτικού κινητού στοιχείου ICE_{Tn4371}6385(πρώτο και τελευταίο γονίδιο) και η θέση του *bla*_{NDM-1} μέσα σε αυτό. Δεξιά: Σχηματική απεικόνιση της γενετικής περιοχής (ICE_{Tn4371}6385) που εντοπίζεται το γονίδιο *bla*_{NDM-1} στα στελέχη *P.aeruginosa* (μέγεθος απεικόνισης 74.2kb)

Αποτελέσματα στελεχών *A.baumannii*

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης ολόκληρου του γονιδιώματος των 9 στελεχών *A.baumannii* έδειξε ότι τα στελέχη ανήκουν σε 4 διαφορετικούς κλώνους και συγκεκριμένα 3 στελέχη ανήκουν στους κλώνους ST85 και ST2, έκαστος, 1 στέλεχος ανήκει στον κλώνο ST160 ενώ τα υπόλοιπα 2 στελέχη ανήκουν σε νέο κλώνο λόγω νέου συνδυασμού αλληλίων (ST2493). Παράλληλα, εκτός του γονιδίου *bla*_{NDM-1}, κάθε στέλεχος βρέθηκε ότι φέρει από 8 έως 15 διαφορετικά γονίδια αντοχής.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	MLST (PASTEUR)	AMR GENES																						
		<i>bla</i> NDM-1	<i>bla</i> OXA-23	<i>bla</i> OXA-66	<i>bla</i> OXA-69	<i>bla</i> OXA-94	<i>bla</i> TEM-1D	<i>bla</i> ADC-25	<i>tet</i> (B)	<i>tet</i> 39	<i>qacE</i>	<i>dfrA1</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>mphE</i>	<i>msrE</i>	<i>aph</i> (3')-Ia	<i>aph</i> (6)-Id	<i>aph</i> (3')-VI	<i>aph</i> (3'')-Ib	<i>aac</i> (3)-Ia	<i>aadA1</i>	<i>armA</i>	
A3232	ST160																							
A3496	ST85																							
A3557	ST2493																							
A3569	ST2493																							
A3570	ST85																							
A3593	ST2																							
A3597	ST85																							
A3629	ST2																							
A3637	ST2																							

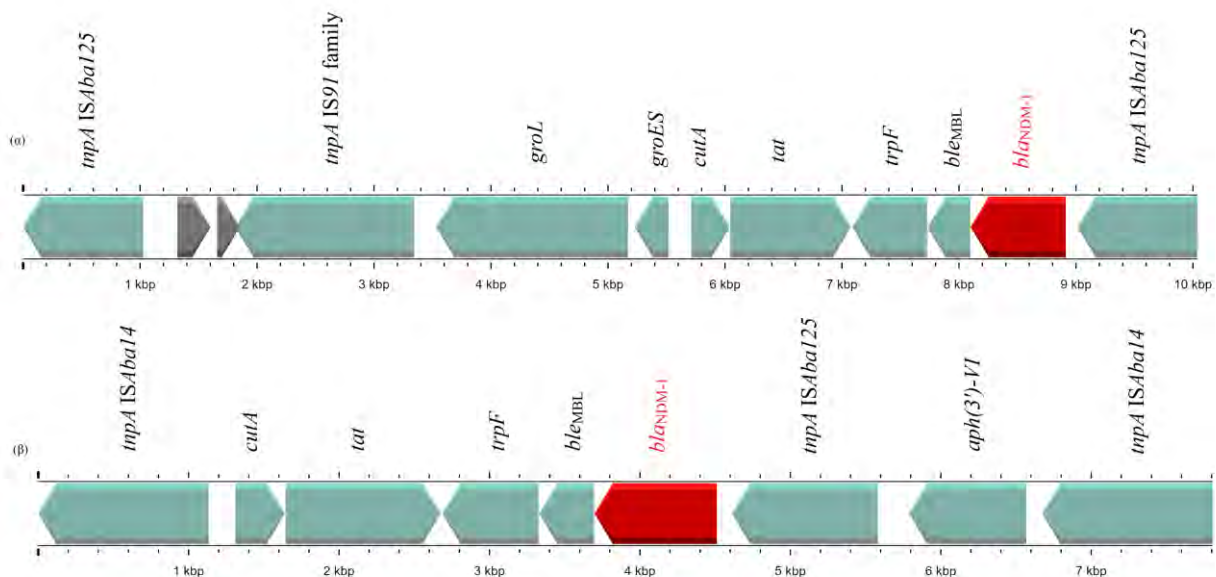
Εικόνα 40 Παρουσίαση των γονιδίων αντοχής που εντοπίζονται στα στελέχη *A.baumannii* από την ανάλυση ολικού γονιδιώματος.

Η αναζήτηση παρουσίας γονιδίων που κωδικοποιούν για λοιμογόνους παράγοντες έδειξε ότι τα στελέχη φέρουν από 30 έως 42 γονίδια. Τα αποτελέσματα της αναζήτησης αυτής περιλαμβάνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 7 Πίνακας που περιέχει τα γονίδια που κωδικοποιούν για λοιμογόνους παράγοντες στα στελέχη *A.baumannii* σύμφωνα με την βάση δεδομένων Virulence Factor Database.

Κωδικός Δείγματος/MLST	Γονίδια Λοιμογόνων παραγόντων
A3232/ST160	<i>abaI, abaR, adeG, basD, bauA, bfmR, bfmS, csuD, clpV/tssH, gspD, gspE1, gspF, gspK, lpxB, lpxD, lpxM, ompA, pilB, pilC, pilF, pilJ, pilS, pilT/pilU, pilY1, plc1, plc2, plcD, tsaP, tssC, tssF, tssG, tssM, vgrG/tssI</i>
A3496/ST85	<i>adeG, basD, bauA, bfmS, cpaA, csuD, gspD, gspE1, gspE2, gspF, gspJ, gspK, lpxA, lpxB, lpxC, lpxD, ompA, pgaA, pilB, pilC, pilF, pilJ, pilQ, pilR, pilT/pilU, pilY1, plc1, plc2, plcD, tagX, vgrG/tssI</i>
A3557/ST2493	<i>adeG, bap, basD, bfmR, bfmS, clpV/tssH, gspD, gspE1, gspE2, gspF, gspJ, gspK, lpsB, lpxA, lpxB, lpxD, lpxL, ompA, pgaA, pilB, pilC, pilF, pilJ, pilQ, pilS, pilT/pilU, pilY1, plc1, plc2, plcD, tonB, tssM, vgrG/tssI</i>
A3569/ST2493	<i>adeG, bap, basD, bfmR, bfmS, clpV/tssH, gspD, gspE1, gspE2, gspF, gspJ, gspK, lpsB, lpxA, lpxB, lpxD, lpxL, ompA, pgaA, pilB, pilC, pilF, pilJ, pilQ, pilS, pilT/pilU, pilY1, plc1, plc2, plcD, tonB, tssM, vgrG/tssI</i>
A3570/ST85	<i>adeG, bap, basB, basD, bauA, bfmR, bfmS, cpaA, csuD, gspD, gspE1, gspE2, gspF, gspK, lpxA, lpxB, lpxD, lpxM, ompA, pgaA, pilB, pilF, pilJ, pilQ, pilR, pilT/pilU, pilY1, plc1, plc2, plcD, tagX, vgrG/tssI</i>
A3593/ST2	<i>adeG, ata, bap, basB, basD, bauA, bfmR, bfmS, csuD, fimT, hemO, gspD, gspE1, gspF, gspJ, gspK, lpxA, lpxB, lpxC, lpxD, lpxL, lpxM, ompA, pgaA, pgaB, pilB, pilC, pilF, pilJ, pilM, pilQ, pilS, pilT/pilU, pilY1, pilW, plc1, plc2, plcD, tonB, tssM, vgrG/tssI</i>
A3597/ST85	<i>adeG, adeH, basB, basD, bauA, bfmR, bfmS, cpaA, csuD, gspD, gspE1, gspE2, gspF, gspJ, gspK, gspL, lpxA, lpxB, lpxC, lpxD, lpxM, pbpG, pgaA, pilB, pilC, pilF, pilQ, pilT/pilU, pilY1, plc1, plc2, plcD, tagX, tsaP, tssL, vgrG/tssI</i>
A3629/ST2	<i>adeG, ata, bap, basB, basD, bauA, bfmR, bfmS, csuD, fimT, hemO, gspD, gspE1, gspF, gspJ, gspK, lpsB, lpxA, lpxB, lpxD, lpxL, lpxM, ompA, pgaA, pgaB, pilB, pilC, pilF, pilJ, pilQ, pilT/pilU, pilY1, pilW, plc1, plc2, plcD, tssM, vgrG/tssI</i>
A3637/ST2	<i>adeG, ata, bap, basB, basD, bauA, bfmR, bfmS, csuD, clpV/tssH, fimT, hemO, gspD, gspE1, gspF, gspJ, gspK, lpxA, lpxB, lpxC, lpxD, lpxM, ompA, pgaA, pgaB, pilB, pilC, pilF, pilH, pilJ, pilM, pilQ, pilR, pilT/pilU, pilY1, pilW, plc1, plc2, plcD, tonB, tssK, tssM, vgrG/tssI</i>

Η ανάλυση του γενετικού περιβάλλοντος του γονιδίου *bla*_{N_{DM}-1} έδειξε την παρουσία δύο γενετικών τόπων. Συγκεκριμένα, η πρώτη δομή που εμφανίζεται σε ένα μόνο στέλεχος (ST160) τοποθετείται στο χρωμόσωμα. Το γονίδιο *bla*_{N_{DM}-1} βρίσκεται στο τρανσποζόνιο Tn125 (μεγέθους 10kb), το οποίο περικλείεται από 2 αντίγραφα των αλληλουχιών εισδοχής *ISAbal25*. Η δεύτερη δομή εντοπίστηκε σε 8 στελέχη διαφόρων κλώνων (ST2, ST85, ST2493) και συγκεκριμένα βρέθηκε ότι το γονίδιο *bla*_{N_{DM}-1} βρίσκεται σε μία κινητή δομή που περικλείεται από δύο αντίγραφα του *ISAbal14* και έχει περιγραφεί ως τρανσποζόνιο Tn7382. Η αναζήτηση όμοιου γενετικού περιβάλλοντος και στις δύο περιπτώσεις έδειξε ότι οι ίδιες δομές έχουν περιγραφεί στο παρελθόν και έχει παρατηρηθεί ότι εντοπίζονται τόσο στο χρωμόσωμα όσο και σε πλασμίδια (μόνο η πρώτη δομή) (εικ41-42).



Εικόνα 41 Σχηματική απεικόνιση των δύο διαφορετικών περιοχών που εντοπίζεται το γονίδιο *bla*_{N_{DM}-1} στα στελέχη *A.baumannii*. (α) Απεικονίζεται το κινητό γενετικό στοιχείο του στελέχους A3232 τα οποία είναι 100% όμοιο με το τρανσποζόνιο Tn125 (μέγεθος απεικόνισης 10kb) και (β) Απεικονίζεται το κινητό γενετικό στοιχείο των στελεχών A3496, A3557, A3569, A3570, A3593, A3597, A3629 και A3637, τα οποία εμφανίζουν 100% ομοιότητα με το τρανσποζόνιο Tn7382 (μέγεθος απεικόνισης 7.8kb)

Εικόνα 42 Πίνακας (σε μορφή εικόνας) των στελεχών στα οποία έχουν βρεθεί τα τρανσποζόνια Tn125 και Tn7382. Ο πίνακας περιλαμβάνει των αριθμό πρόσβασης των στελεχών στην βάση δεδομένων, την χώρα που πραγματοποίησε την κατάθεση, το έτος κατά το οποίο απομονώθηκε το εκάστοτε στέλεχος και την θέση του τρανσποζονίου στο γονιδίωμα (χρωμόσωμα/πλασμίδιο).
*Αποτελούν έτος κατάθεσης και όχι έτος απομόνωσης των στελεχών.

(α) Δομή Tn125		
Αριθμός πρόσβασης στελέχους	Χώρα Χρωμόσωμα	Έτος
AP014649	Βιετνάμ	2013
LN868200	Γερμανία	2013
LN997846	Γερμανία	2014
CP053215	Νορβηγία	2017
CP027528	Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής	2018
CP091596	Γερμανία	2018
CP130627	Αυστραλία	2018
CP130628	Αυστραλία	2018
CP050388	Ινδία	2019
CP050403	Ινδία	2019
CP072398	Ινδία	2020
CP072295	Ινδία	2020
CP072300	Ινδία	2020
CP072290	Ινδία	2020
CP072275	Ινδία	2020
CP072285	Ινδία	2020
CP072280	Ινδία	2020
CP072270	Ινδία	2020
CP072122	Ινδία	2020
CP087312	Γερμανία	2022
	Πλασμίδια	
JN377410.2	Κίνα	2011*
CP129246	Γαλλία	2013
CP059301	Μαλαισία	2016
CP048828.1	Κίνα	2017
CP047975	Κίνα	2019
CP098796	Ινδία	2020
(β) Δομή Tn7382		
	Χρωμόσωμα	
CP082952	Λίβανος	2015
CP060011	Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής	2016
CP060013	Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής	2016
CP038644	Ινδία	2018
CP121598	Σαουδική Αραβία	2018
CP121595	Σαουδική Αραβία	2019
CP121563	Σαουδική Αραβία	2019
CP121604	Σαουδική Αραβία	2019
CP065392	Ισπανία	2019
CP088894	Κίνα	2021
CP088895	Κίνα	2021
CP091361	Βέλγιο	2022*

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αντιμικροβιακή αντοχή αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που καταγράφονται παγκοσμίως, με τους ιατρούς να αντιμετωπίζουν καθημερινά εμπόδια στην θεραπευτική αντιμετώπιση των λοιμώξεων που προκαλούνται από ανθεκτικούς μικροοργανισμούς και τους ερευνητές να προσπαθούν συνεχώς να βρουν νέους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Σε μία έκθεση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας καταγράφηκαν 5 εκατομμύρια θάνατοι οφειλόμενοι στην αντιμικροβιακή αντοχή ενώ το ετήσιο κόστος ξεπερνά τα 50 δισεκατομμύρια μόνο για τις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (190,191). Με την συνεχή και αυξανόμενη εξάπλωση των πολύ-ανθεκτικών μικροοργανισμών εκτιμάται ότι κατά το έτος 2050 ο αριθμός των θανάτων θα ανέλθει στα 20 εκατομμύρια ενώ ταυτόχρονα το κόστος για την αντιμετώπιση αυτών των καταστάσεων (νοσηλεία, θεραπεία κ.α.) υπολογίζεται περίπου 2,9 τρισεκατομμύρια ετησίως. Μία κατηγορία βακτηρίων, τα οποία έχουν θορυβήσει όλους τους οργανισμούς υγείας είναι τα καρβαπενέμη ανθεκτικά Gram-αρνητικά βακτήρια, τα οποία αποτελούν έναν από τους συχνότερους αιτιολογικούς παράγοντες πρόκλησης σοβαρών νοσοκομειακών λοιμώξεων. Η σοβαρότητα του προβλήματος έγκειται στο ότι οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί δεν εμφανίζουν ευαισθησία στα ήδη υπάρχοντα αντιβιοτικά επιβεβαιώνοντας την ανάγκη για εύρεση νέων θεραπευτικών παραγόντων. Παράλληλα, μελέτες έχουν δείξει ότι τα συγκεκριμένα βακτήρια έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν σε ακραία περιβάλλοντα, ακόμη και σε αποχετεύσεις από νεροχύτες σε υγειονομικές εγκαταστάσεις ενώ παράλληλα μπορούν να εξαπλωθούν στην κοινότητα. Όπως αναφέρθηκε, μέσα στην τελευταία πενταετία τα τέσσερα αυτά ανθεκτικά βακτήρια (*E.coli*, *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa* και *A.baumannii*) τα οποία μελετώνται στην παρούσα διατριβή έχουν τοποθετηθεί σε υψηλότερου κινδύνου κατηγορία χαρακτηρίζοντας το καθένα από αυτά ως επείγον.

Το γονίδιο *bla_{NDM}* απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά το 2009 στην Ινδία εμφανίζοντας μεγάλη επέκταση στις ασιατικές χώρες. Από τα μέσα της επόμενης δεκαετίας άρχισε να κάνει την εμφάνιση του και σε πιο απομακρυσμένες περιοχές, συμπεριλαμβανομένης της Ευρώπης και των Ηνωμένων Πολιτειών. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί το ένζυμο μέταλλο-β-λακταμάση NDM, η οποία έχει την δυνατότητα να υδρολύει όλα τα αντιβιοτικά συμπεριλαμβανομένων των περισσότερων β-λακταμών με εξαίρεση την αζτρεονάμη. Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί 60 διαφορετικά αλληλία του γονιδίου *bla_{NDM}* εκ των

οποίων τα 55 έχουν χαρακτηρισμένη δράση καρβαπενεμάσης (152). Παρουσία του γονιδίου έχει βρεθεί σε 11 διαφορετικές οικογένειες βακτηρίων της κλάσης Gammaproteobacteria, με ποιο συχνά τα μέλη της οικογένειας των Εντεροβακτηριακών (Enterobacterales) και συγκεκριμένα εντοπίζεται σε μεγαλύτερα ποσοστά στα στελέχη *E.coli*, με το γονίδιο να εντοπίζεται στα διάφορα στελέχη είτε στο χρωμόσωμα είτε σε πλασμίδια (192).

Στην παρούσα διατριβή, στα πλαίσια διερεύνησης της παρουσίας μικροοργανισμών με αντοχή σε καρβαπενέμες έγινε έλεγχος σε 756 ορθοπρωκτικά δείγματα προερχόμενα από ζώα από διάφορες περιοχές της Ελλάδος. Τα αποτελέσματα έδειξαν ένα μόνο *E.coli* με αντοχή σε καρβαπενέμες, το οποίο ανήκε στον κλώνο ST361 και το οποίο βρέθηκε να φέρει το γονίδιο *bla*_{NDM-5}. Το στέλεχος αυτό απομονώθηκε από βοοειδές στην ευρύτερη περιοχή του νομού Λάρισας. Σύμφωνα με την διαθέσιμη βιβλιογραφία φαίνεται να είναι η πρώτη αναφορά του γονιδίου *bla*_{NDM-5} στην Ελλάδα. Η διαφορά μεταξύ των *bla*_{NDM-1} και *bla*_{NDM-5} οφείλεται σε 2 αμινοξικές αλλαγές στις θέσεις 88 (Val→Leu) και 154 (Met→Leu), οι οποίες φαίνεται να παρέχουν υψηλότερη αντοχή έναντι των καρβαπενεμών (193). Το γονίδιο *bla*_{NDM-5} απομονώθηκε πρώτη φορά το 2011 σε στέλεχος *E.coli* ST648, σε ασθενή του Ηνωμένου Βασιλείου κατά τον έλεγχο ρουτίνας για την παρουσία καρβαπενέμη ανθεκτικών στελεχών, ο οποίος είχε καταγεγραμμένο ιστορικό ταξιδιού στην Ινδία (194). Από τότε και έπειτα άρχισαν να εμφανίζονται περισσότερες αναφορές παγκοσμίως για την εμφάνιση στελεχών *E.coli* που φέρουν το εν λόγω γονίδιο, ενώ παράλληλα βρέθηκε ότι τα στελέχη αυτά ανήκουν σε διαφορετικούς κλώνους, ορισμένοι από τους οποίους χαρακτηρίζονται ως υψηλού κινδύνου λόγω πρόκλησης εξωεντερικών λοιμώξεων. Εκτός των ανθρώπινων λοιμώξεων, πολλαπλές μελέτες έχουν δείξει τον εντοπισμό στελεχών *E.coli* και σε ζώα καθώς και στο περιβάλλον (195,196). Ένας από τους υψηλού κινδύνου κλώνους στους οποίους εντοπίζεται το αλλήλιο NDM-5 είναι και ο ST361, ο ίδιος που εντοπίστηκε και στην παρούσα μελέτη. Είναι ένας από τους πιο συχνά εμφανιζόμενους κλώνους καθώς, την παρούσα χρονική στιγμή κατατάσσεται τέταρτος στην συχνότητα εντοπισμού στον άνθρωπο παγκοσμίως, ενώ παράλληλα φαίνεται να εντοπίζεται περισσότερο σε καταστάσεις φορείας και να σχετίζεται λιγότερο με λοιμώξεις του ανθρώπου (197). Ωστόσο χαρακτηριστικό αυτού είναι η παρουσία πολλαπλών γονιδίων αντοχής καθιστώντας τα στελέχη αυτά ανθεκτικά πιθανόν σε όλα τα διαθέσιμα αντιβιοτικά. Η παρουσία γονιδίων ανθεκτικότητας επιβεβαιώνεται και στην παρούσα μελέτη καθώς βρέθηκαν γονίδια τα οποία προσφέρουν ανθεκτικότητα έναντι 7 διαφορετικών τάξεων αντιβιοτικών. Επιπρόσθετα, η

διασπορά του γονιδίου σε παγκόσμιο επίπεδο φαίνεται να οφείλεται στον εντοπισμό του γονιδίου σε διαφορετικά πλασμίδια με τα συχνότερα να αποτελούν τα IncFIA/B, IncX3, IncFK και IncFII (198). Παρόμοιο γενετικό περιβάλλον με την δομή στην οποία εντοπίστηκε το γονίδιο *bla*_{NDM-5} στην παρούσα διατριβή έχει βρεθεί σε στέλεχος *E.coli* που απομονώθηκε στην Τσεχία το 2021, όπου οι ερευνητές παρατήρησαν μεγάλο ποσοστό ομοιότητας του πλασμιδίου με πλασμίδιο που είχε χαρακτηριστεί στο παρελθόν στην Ινδία (199). Παρόλο που τα ποσοστά αντοχής των στελεχών *E.coli* έναντι των καρβαπενεμών παραμένουν χαμηλά στις χώρες της Ευρώπης, η παγκόσμια εξάπλωση των *bla*_{NDM-5} ανθεκτικών αυτών στελεχών έχει προκαλέσει ανησυχία στους Οργανισμούς Υγείας, καθώς η περαιτέρω διασπορά αυτών σε χώρους υγειονομικής περίθαλψης θα έχει σοβαρές συνέπειες τόσο στον τομέα της υγείας όσο και στον τομέα της οικονομίας.

Παράλληλα, η μελέτη 91 Εντεροβακτηριακών (22 *E.coli* και 69 *K.pneumoniae*) με αντοχή σε καρβαπενέμες, έδειξε ότι όλα τα στελέχη έφεραν τουλάχιστον ένα από τα 4 πιο μελετημένα γονίδια παγκοσμίως (*bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48}), με τα 39 (42,9%) εξ αυτών να φέρουν περισσότερα από ένα γονίδια. Ενδιαφέρον εύρημα είναι ότι 10 από τα 22 *E.coli* έφεραν το *bla*_{NDM} γονίδιο. Η γενετική ανάλυση των *bla*_{NDM}(+) στελεχών έδειξε ότι τα περισσότερα στελέχη *E.coli* ανήκουν σε διαφορετικούς κλώνους. Συγκεκριμένα, η ανάλυση έδειξε ότι τα *bla*_{NDM}(+) στελέχη *E.coli* ανήκουν σε 9 διαφορετικούς κλώνους (ST744, SST998, ST224, ST410, ST4380, ST46, ST683, ST12). Σύμφωνα με την βιβλιογραφία όλοι οι κλώνοι που εντοπίστηκαν στην παρούσα μελέτη έχουν βρεθεί στο παρελθόν σε ανθρώπους, με μερικούς να ανήκουν στην κατηγορία στελεχών πρόκλησης εξωεντερικών λοιμώξεων ενώ παράλληλα έχουν απομονωθεί από ζώα αλλά και από το περιβάλλον. Στην πλειοψηφία των μελετών, στελέχη που ανήκουν στους περισσότερους από αυτούς τους κλώνους φαίνεται να φέρουν μεταλλάξεις και γονίδια που προσφέρουν αντοχή έναντι πολλών τάξεων αντιβιοτικών, αν και αξιοσημείωτη είναι η απουσία γονιδίων που κωδικοποιούν για καρβαπενεμάσες (195,200–203). Δύο από τους κλώνους, ο ST410 και ο ST46 αναφέρονται ως επιδημικοί υψηλού κινδύνου κλώνοι καθώς μέχρι στιγμής ανήκουν στους 10 συχνότερους κλώνους που εντοπίζονται και φαίνεται να φέρουν το γονίδιο *bla*_{NDM}, αν και το αλλήλιο με το οποίο σχετίζεται κατά κύριο λόγο είναι το NDM-5 (204). Παράλληλα κάποιοι από τους κλώνους φαίνεται να σχετίζονται και με ανθεκτικότητα στην κολιστίνη, καθώς μελέτες έχουν εστιάσει στην παρουσία των γονιδίων *mcr* (205–207). Λόγω του χαμηλού ποσοστού καρβαπενέμη-ανθεκτικών στελεχών *E.coli*

παγκόσμια, οι περισσότερες μελέτες επικεντρώνονται σε άλλα μέλη της οικογένειας των Εντεροβακτηριακών (όπως *K.pneumoniae*) (208). Αυτό έχει ως συνέπεια τα στελέχη σε πολλές περιπτώσεις να περνούν απαρατήρητα χωρίς να γίνεται καταγραφή και αναφορά αυτών των καρβαπενέμη-ανθεκτικών στελεχών με συνέπεια να υπάρχει πιθανότητα διασποράς τόσο εντός των ίδιων των υγειονομικών εγκαταστάσεων στις οποίες ανιχνεύονται, όσο και διασπορά εκτός συνόρων. Αντίστοιχα, τα στελέχη *K.pneumoniae* της παρούσας μελέτης ανήκαν σε 3 διαφορετικούς κλώνους. Ο κλώνος ST11, στον οποίο ανήκαν τα 3 από τα 5 στελέχη, αποτελεί έναν από τους πιο συχνά εμφανιζόμενους κλώνους παγκοσμίως και σχετίζεται με το γονίδιο *bla_{NDM}*, ενώ παράλληλα είναι ένας από τους πρώτους κλώνους στο οποίο οφείλονταν τα πρώτα ξεσπάσματα (outbreaks) που καταγράφηκαν στην Ελλάδα το 2012 (209). Επιπρόσθετα, αξιοσημείωτο αποτελεί το γεγονός ότι τα στελέχη που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή, παρόλο που ανήκουν στον ίδιο κλώνο φαίνεται να φέρουν διαφορετικό συνδυασμό γονιδίων αντοχής, δείχνοντας την ποικιλομορφία των στελεχών. Ο δεύτερος κλώνος στον οποίο ανήκε μόνο ένα στέλεχος, ο ST231, έχει περιγραφεί στο παρελθόν σε στελέχη που απομονώθηκαν από ανθρώπους αλλά φαίνεται να σχετίζεται κυρίως με γονίδια της οικογένειας των οξασιλινών (210).

Η ανάλυση του γενετικού περιβάλλοντος του γονιδίου *bla_{NDM-1}* έδειξε ότι όλα τα στελέχη *E.coli* αλλά και τα 5 στελέχη *K.pneumoniae* που μελετήθηκαν στην διατριβή έχουν γενετικό περιβάλλον όμοιο με αυτό συγκεκριμένων πλασμιδίων που έχουν χαρακτηριστεί. Η γενετική δομή που βρέθηκε σε μεγαλύτερη συχνότητα στην παρούσα μελέτη είναι όμοια με αυτή του πλασμιδίου pS-3002cz καθώς ανιχνεύτηκε σε 7 από τα 10 στελέχη *E.coli* και στα 4 από τα 5 στελέχη *K.pneumoniae*. Η δεύτερη γενετική δομή που ανιχνεύτηκε είναι όμοια με αυτή του πλασμιδίου pB-3002cz το οποίο βρέθηκε σε 2 στελέχη *E.coli* και στο εναπομένον στέλεχος *K.pneumoniae*. Τα πλασμίδια αυτά χαρακτηρίστηκαν λεπτομερώς από τους Studentova et al το 2015 σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Τσεχία (211). Η μελέτη τους έδειξε ότι το πλασμίδιο pB-3002cz προήλθε από το πλασμίδιο pKPX-1, με το οποίο εμφανίζει 99% ομοιότητα και είχε ανιχνευθεί προηγουμένως σε στελέχη *K.pneumoniae* (212). Από την άλλη, η ανάλυση του πλασμιδίου pS-3002cz έδειξε ότι προήλθε από την σύζευξη των πλασμιδίων pB-3002cz (κατά 54,7%) και pKpn2146b, εκ των οποίων το τελευταίο αποτελεί ένα από τα πλασμίδια που χαρακτηρίστηκε στο πρώτο στέλεχος *K.pneumoniae* που απομονώθηκε στις Ηνωμένες Πολιτείες (213). Χαρακτηριστικό αποτελεί το γεγονός ότι όλα αυτά τα στελέχη

K.pneumoniae στα οποία εντοπίστηκαν τα πλασμίδια στις διάφορες μελέτες ανήκουν στον ίδιο κλώνο (ST11) και όλα τα πλασμίδια σχετίζονται με την παρουσία του γονιδίου *bla_{NDM}*. Η τρίτη γενετική δομή είναι όμοια με αυτή του πλασμιδίου pEc19397-131, το οποίο είχε χαρακτηριστεί το 2018 σε ένα στέλεχος που απομονώθηκε στην Κίνα. Η ανάλυση του πλασμιδίου αυτού, έδειξε ότι προήλθε από σύζευξη δύο παλαιότερων χαρακτηρισμένων πλασμιδίων (pAMPD2 και pLK75) και τα δύο προερχόμενα από στελέχη *E.coli* (163). Ωστόσο, η προέλευση του στελέχους εντός των ελληνικών συνόρων παραμένει άγνωστη.

Η *P.aeruginosa* αποτελεί βακτήριο το οποίο συναντάται συχνά ως αίτιο ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων, κυρίως σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς και στις μονάδες εντατικής θεραπείας, και σχετίζεται με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Η συνεχής εξέλιξη και η ολοένα και αυξανόμενη ανθεκτικότητα του έναντι εύρους αντιβιοτικών το έχει καταστήσει επίκεντρο μελέτης εδώ και πολλά χρόνια. Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν 77 στελέχη *P.aeruginosa* εκ των οποίων βρέθηκε ότι τα 30 έφεραν το γονίδιο *bla_{VIM}* και 17 το γονίδιο *bla_{NDM-1}*. Από όσο μπορούμε να γνωρίζουμε, και βασιζόμενοι στην διαθέσιμη βιβλιογραφία, το γονίδιο *bla_{NDM}* αποτελεί μηχανισμό αντοχής που εντοπίζεται για πρώτη φορά στην Ελλάδα στο συγκεκριμένο βακτήριο. Τα στελέχη *P.aeruginosa bla_{NDM}* (+) στα οποία πραγματοποιήθηκε περαιτέρω ανάλυση βρέθηκε ότι ανήκουν στον κλώνο ST308. Λόγω της πλαστικότητας που παρουσιάζει ο συγκεκριμένος κλώνος, αλλά και λόγω της ικανότητας του να αποικίζει σε διάφορα περιβάλλοντα έχει χαρακτηριστεί ως επιδημικός κλώνος και λόγω αυτού πραγματοποιήθηκαν διάφορες μελέτες για την εξέλιξη του ανά τα χρόνια. Ο συγκεκριμένος κλώνος φαίνεται να υπάρχει τουλάχιστον 25 χρόνια, καθώς ανιχνεύθηκε σε δείγματα του 1997. Κατά την συγκριτική μελέτη που πραγματοποίησε ο Khan et al βρήκαν ότι στελέχη του ίδιου κλώνου που απομονώθηκαν το 2018 έφεραν τουλάχιστον τα διπλάσια γονίδια αντοχής σε σχέση με τα στελέχη της δεκαετίας του 1990, ενώ παράλληλα διαφορές στο γενετικό τους υλικό λόγω προσθηκών ή/και διαγραφών προσθέτουν επιπλέον ανθεκτικότητα έναντι των αντιβιοτικών (214). Μελέτες εύρεσης του μηχανισμού αντοχής των στελεχών αυτών έδειξε την παρουσία διαφόρων β-λακταμασών και πορινών, χωρίς όμως το γονίδιο *bla_{NDM}* να ανιχνεύεται ανάμεσα σε αυτούς τους μηχανισμούς. Ωστόσο, το γεγονός αυτό άλλαξε τουλάχιστον από το 2011 και έπειτα, όταν *bla_{NDM}*(+) *P.aeruginosa* στελέχη απομονώθηκαν για πρώτη φορά σε 2 ασθενείς στην Σερβία (215). Η εύρεση αυτών των στελεχών έδωσε το έναυσμα για έλεγχο των στελεχών σε περισσότερες Ευρωπαϊκές χώρες το οποίο οδήγησε στην ανακάλυψη επιπλέον στελεχών σε

ασθενείς που είχαν νοσηλευτεί προηγουμένως στην Σερβία (216,217). Εκτός αυτών όμως, παρουσία των στελεχών αυτών φάνηκε να υπάρχει και σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες αλλά και την Αίγυπτο, την Ινδία και την Αμερική (218,219). Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις οι κλώνοι στους οποίους ανήκουν τα στελέχη φάνηκε να μην είναι ο ST308. Ο κλώνος ST308 σε συνδυασμό με το γονίδιο *bla_{NDM}* άρχισε να αναδύεται το 2015 και έπειτα, με τις μελέτες να τοποθετούνται μόνο στην Σιγκαπούρη και την Μαλαισία (220,221). Στην παρούσα μελέτη το γονίδιο *bla_{NDM-1}* τοποθετείται στο χρωμόσωμα πάνω στο συζευκτικό στοιχείο ICE_{Tn4371}/6385. Στις περισσότερες από τις προαναφερθείσες μελέτες (και όπου πραγματοποιήθηκε ενδεδειγμένη ανάλυση) το γονίδιο *bla_{NDM}* τοποθετείται σε πλασμίδια και κινητά στοιχεία, διαφορετικά από αυτό που βρέθηκε στην παρούσα διατριβή (222). Η συγκριτική μελέτη που πραγματοποιήσαμε, έδειξε ότι τα στελέχη του ΠΓΝΛ εμφανίζουν 98% ομοιότητα με τα στελέχη που μελετήθηκαν στην Σιγκαπούρη (223). Το πρώτο στέλεχος που βρέθηκε στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας (ΠΓΝΛ) απομονώθηκε τον Μάιο 2023, χωρίς να έχει προσδιοριστεί ο χρόνος και ο τρόπος της εισόδου του. Έκτοτε, ο κλώνος αυτός επεκτάθηκε στο νοσοκομείο και αποτελεί σήμερα το 37% των στελεχών *P.aeruginosa* με αντοχή σε καρβαπενέμες στο ΠΓΝΛ.

Το βακτήριο *A.baumannii* αποτελεί για χρόνια έναν από τους κύριους αντιπροσώπους των γονιδίων της οικογένειας των οξασιλλινών, ενώ παράλληλα υπάρχουν λίγες αναφορές για την παρουσία καρβαπενεμασών των κλάσεων A και B στο είδος αυτό. Τα πρώτα στελέχη *A.baumannii* που σχετίζονται με την παραγωγή της καρβαπενεμάσης NDM βρέθηκαν στην Ινδία το 2010 (224). Έκτοτε, αρκετές μελέτες αναφέρουν την παρουσία του γονιδίου αυτού στα στελέχη *A.baumannii* παγκοσμίως. Σημαντικό χαρακτηριστικό των στελεχών αποτελεί η προσαρμοστικότητα που εμφανίζουν, καθώς μπορούν και επιβιώνουν σε ακραίες συνθήκες (παρουσία αντιβιοτικών/περιβαλλοντικές) για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Ρόλο για την επιβίωση τους φαίνεται να είναι η παρουσία γονιδίων που προσφέρουν αντοχή έναντι πολλαπλών τάξεων αντιβιοτικών, τα οποία απεικονίζουν την εξαιρετική γενετική πλαστικότητα των στελεχών και η απόκτηση των οποίων πραγματοποιείται κυρίως μέσω οριζόντιας μεταφοράς (225). Στελέχη *A.baumannii bla_{NDM}(+)* φαίνεται να απομονώνονται σε μεγαλύτερο βαθμό στο περιβάλλον και να σχετίζονται λιγότερο με λοιμώξεις στον άνθρωπο, το οποίο τονίζει τον ρόλο του βακτηρίου στην εξάπλωση του γονιδίου. Στην παρούσα διατριβή ελέγχθηκαν 103 στελέχη *A.baumannii* με αντοχή στις καρβαπενέμες, στα οποία έγινε έλεγχος για την παρουσία των γονιδίων ανθεκτικότητας *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}* και *bla_{OXA-48}*. Για επιβεβαίωση της

ανθεκτικότητας των στελεχών και βασιζόμενοι στην ελληνική βιβλιογραφία, έγινε έλεγχος των στελεχών για την παρουσία των γονιδίων *bla*_{OXA-23} και *bla*_{OXA-58}, όπου βρέθηκε ότι όλα τα στελέχη έφεραν το πρώτο γονίδιο ενώ το δεύτερο δεν εντοπίστηκε σε κανένα στέλεχος (τα αποτελέσματα της ανάλυσης δεν παρουσιάζονται στην διατριβή). Ο γονιδιακός έλεγχος έδειξε την παρουσία του γονιδίου *bla*_{NDM-1} σε 9 στελέχη, ενώ δεν ανιχνεύτηκε κανένα από τα άλλα 3 γονίδια ενδιαφέροντος. Τα στελέχη αυτά βρέθηκαν να ανήκουν σε 4 διαφορετικούς κλώνους, ST2, ST85, ST160 και ST2493, με τον τελευταίο να χαρακτηρίζεται για πρώτη φορά. Οι κλώνοι ST2 και ST85 έχουν περιγραφεί στο παρελθόν και στην Ελλάδα, με τον δεύτερο να εμφανίζεται για πρώτη φορά σε ελληνικό νοσοκομείο το 2003 και έκτοτε έχει βρεθεί σε όλον το κόσμο (226,227). Ο κλώνος ST160 εμφανίζεται σε μελέτες παγκοσμίως ενώ δεν φαίνεται να υπάρχει κάποια αναφορά σε στελέχη από την ελληνική επικράτεια (228).

Η ανάλυση ολικού γονιδιώματος των στελεχών και σε συμφωνία με την βιβλιογραφία έδειξε την παρουσία πολλαπλών αλληλουχιών εισδοχής (*Insertion sequences*, IS), οι οποίες μπορούν να προσφέρουν στα στελέχη την ικανότητα απόκτησης πολλαπλών γονιδίων ανθεκτικότητας. Τέτοιες δομές, που περιβάλλονται από αλληλουχίες εισδοχής και περιβάλλουν γονίδια αντοχής, είναι και αυτές που εντοπίζονται στα στελέχη *A.baumannii* της διατριβής αυτής. Συγκεκριμένα, το γονίδιο *bla*_{NDM-1} εντοπίζεται σε 2 διαφορετικά τρανσποζόνια, Tn/25 και Tn7382. Τα αποτελέσματα αναζήτησης στελεχών που εντοπίζεται το γενετικό αυτό περιβάλλον μας έδειξε ότι το Tn/25 (στέλεχος ST160) έχει χαρακτηριστεί τόσο σε χρωμοσώματα όσο και σε πλασμίδια σε στελέχη διαφόρων κλώνων (ST1, ST2, ST25, ST103, ST107, ST267, ST374, ST622) σε αρκετές χώρες παγκοσμίως, συμπεριλαμβανομένων Ευρωπαϊκών χωρών (Γερμανία, Νορβηγία, Σουηδία, Σλοβενία, Γαλλία), Ασιατικών χωρών (Βιετνάμ, Ινδία, Ισραήλ, Κίνα, Μαλαισία) αλλά και στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής και την Αυστραλία. Το τρανσποζόνιο Tn7382 (που βρέθηκε στα υπόλοιπα 8 στελέχη των κλώνων ST2, ST85 και ST2493) σύμφωνα με τα δεδομένα του NCBI έχει βρεθεί στο χρωμόσωμα στελεχών που ανήκουν σε διάφορους κλώνους (ST2, ST85, ST164, ST570) και εντοπίζονται κυρίως στην Ευρώπη (Πορτογαλία, Βέλγιο, Ισπανία) και την Ασία (Κίνα, Σαουδική Αραβία). Από όσο μπορούμε να γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη εκτεταμένη ανάλυση *bla*_{NDM(+)} στελεχών *A.baumannii* στην Ελλάδα, καθώς η πρώτη και μοναδική αναφορά του γονιδίου *bla*_{NDM-1} σε ένα στέλεχος *A.baumannii* στην Ελλάδα έγινε το 2016, στο οποίο όμως δεν είχε πραγματοποιηθεί ενδελεχής ανάλυση του γενετικού περιβάλλοντος του γονιδίου αυτής της

μέταλλο-β-λακταμάσης (229).

Η αντιμετώπιση των καρβαπενέμη ανθεκτικών στελεχών αποτελεί εδώ και αρκετά χρόνια πρόκληση για τους ιατρούς, λόγω του περιορισμένου αριθμού αντιμικροβιακών παραγόντων που εμφανίζουν δράση έναντι αυτών των στελεχών, ενώ παράλληλα φαίνεται να απαιτείται συνδυασμός χορήγησης αντιβιοτικών για την αντιμετώπιση αυτών (230). Όπως αναφέρθηκε, η μέταλλο-β-λακταμάση NDM υδρολύει όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, με εξαίρεση τις μονοβακτάμες. Παρόλα αυτά, η αζτρεονάμη υδρολύεται από γονίδια που κωδικοποιούν ευρέως φάσματος β-λακταμάσες, η παρουσία των οποίων βρίσκεται συχνά στα Εντεροβακτηριακά και στα Αζυμωτικά Gram αρνητικά βακτήρια. Έτσι, οι θεραπευτικές επιλογές για την αντιμετώπιση λοιμώξεων από τους συγκεκριμένους μικροοργανισμούς περιορίζονται σημαντικά. Δύο αντιβιοτικά που υπάρχουν εδώ και χρόνια ως θεραπευτική επιλογή είναι η κολιστίνη (colistin) και η τιγκεσυκλίνη (tigecycline). Η κολιστίνη, ένας αντιμικροβιακός παράγοντας που έγινε αποδεκτός για χρήση την δεκαετία του 1950, λόγω των σοβαρών παρενεργειών που προκαλούσε (νεφροτοξικότητα), σταμάτησε να χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση λοιμώξεων. Ωστόσο, λόγω των περιορισμένων επιλογών, επανήλθε στην κυκλοφορία, καθώς σε πολλές περιπτώσεις φαίνεται ότι αποτελούσε ο μοναδικός παράγοντας στον οποίον εμφάνιζαν ευαισθησία τα στελέχη. Η εκτεταμένη χρήση του, κυρίως στον τομέα της κτηνοτροφίας, οδήγησε στην ανάπτυξη και την εξάπλωση ανθεκτικών στελεχών, με αποτέλεσμα η χρήση του να περιορίζεται εκ νέου (231). Από την άλλη, η τιγκεσυκλίνη εμφανίζει δράση έναντι των Εντεροβακτηριακών (*E.coli*), ενώ δεν έχει δράση έναντι των στελεχών *P.aeruginosa* και για τα στελέχη *A.baumannii*, λόγω περιορισμένων ακόμη δεδομένων, δεν υπάρχουν όρια τιμών στην EUCAST (232).

Η εισαγωγή των νέων αναστολέων β-λακταμασών (αβιμπακτάμη, βαμπορμπακτάμη, ρελεμπακτάμη) βοήθησε στη θεραπεία λοιμώξεων από μικροοργανισμούς που παράγουν καρβαπενεμάσες της τάξης A (*bla_{KPC}*). Ωστόσο οι συγκεκριμένοι αναστολείς δεν είχαν δράση σε καρβαπενεμάσες των τάξεων B και D. Ένας αντιμικροβιακός παράγοντας που χρησιμοποιείται ευρέως στην κλινική θεραπευτική αποτελεί η κεφταζιδίμη-αβιμπακτάμη (ceftazidime-avibactam), η οποία όμως δεν εμφανίζει δράση έναντι των *bla_{NDM}* μικροοργανισμών. Κλινικές μελέτες προτείνουν συνδυασμό αζτρεονάμης με κεφταζιδίμη+αβιμπακτάμη για την αντιμετώπιση λοιμώξεων από Εντεροβακτηριακά που

παράγουν μέταλλο-β-λακταμάσες. Ένας νέος αντιμικροβιακός παράγοντας, η αζτρεονάμη-αβιμπακτάμη (aztreonam-avibactam), η οποία βρίσκεται ακόμη σε κλινικές δοκιμές πιθανόν να έχει δράση έναντι *bla*_{NDM} μικροοργανισμών (233).

Δύο νέοι αναστολείς β-λακταμασών συνδυασμένοι με τις καρβαπενέμες, μεροπενέμη-βαμπορμπακτάμη και ιμιπενέμη-ρελεμπακτάμη, δημιουργήθηκαν για την θεραπεία λοιμώξεων από καρβαπενέμη-ανθεκτικά στελέχη. Ωστόσο μελέτες έχουν δείξει την απουσία δράσης έναντι *bla*_{NDM} μικροοργανισμών.

Ένα από τα νεότερα αντιβιοτικά το οποίο εμφανίζει δράση έναντι των διαφόρων μικροοργανισμών που παράγουν το ένζυμο NDM είναι η κεφιντεροκόλη (cefiderocol), μια νέα κεφαλοσπορίνη με μεγαλύτερη σταθερότητα έναντι της υδρόλυσης από τις β-λακταμάσες. Αποτελεί αντιβιοτικό το οποίο έγινε αποδεκτό για χρήση το 2019 στις Ηνωμένες Πολιτείες και έναν χρόνο αργότερα στην Ευρώπη. Παρόλο που θεωρήθηκε καλός αντιμικροβιακός παράγοντας για την αντιμετώπιση λοιμώξεων από ανθεκτικά Gram αρνητικά βακτήρια, πολύ σύντομα μετά τη χρήση του άρχισαν να εμφανίζονται τα πρώτα ανθεκτικά στελέχη, με αξιοσημείωτη την αντοχή Εντεροβακτηριακών που κωδικοποιούν την μέταλλο-β-λακταμάση NDM. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Γαλλία για την δράση αυτής της κεφαλοσπορίνης έναντι στελεχών *E.coli bla*_{NDM-5} θετικών στελεχών, οι ερευνητές παρατήρησαν την ανθεκτικότητα των στελεχών έναντι της κεφιντεροκόλης, τονίζοντας ότι η αντοχή αυτή δεν οφείλεται μόνο στην παρουσία της μέταλλο-β-λακταμάσης αλλά στην παρουσία διαφόρων παραγόντων (234). Αντοχή έναντι της κεφιντεροκόλης έχει χαρακτηριστεί και σε στέλεχη *P.aeruginosa* και *A.baumannii* (235,236). Παράλληλα, αξίζει να σημειωθεί ότι ο συγκεκριμένος παράγοντας δεν είναι διαθέσιμος στην Ελλάδα.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ανάλυση του γενετικού περιβάλλοντος του *bla_{NDM}* σε διαφορετικά γένη, με τα τρία εξ αυτών να αποτελούν συχνό αίτιο νοσοκομειακών λοιμώξεων, μας δίνει την δυνατότητα να κατανοήσουμε τους μηχανισμούς εξάπλωσης του γονιδίου τόσο μεταξύ των στελεχών του ίδιου γένους και είδους όσο και μεταξύ διαφορετικών γενών. Παράλληλα η γνώση της παρουσίας αυτών των βακτηρίων μπορεί να βοηθήσει στην λήψη μέτρων για μείωση της εξάπλωσης τους εντός του νοσοκομείου.

Η ποικιλομορφία που χαρακτηρίζει την γενετική περιοχή γύρω από το γονίδιο *bla_{NDM}* και η παράλληλη πρωτοφανής εμφάνιση του γονιδίου σε είδη που δεν είχαν χαρακτηριστεί ξανά στην Ελλάδα εγείρει προβληματισμούς που αφορούν την προέλευση και την εξάπλωση αυτών. Συνεπώς, απαραίτητη είναι η επιτήρηση και ο ενδεδειγμένος έλεγχος των ειδών τόσο από ζώα (συμπεριλαμβανομένων και των ανθρώπων που εμπλέκονται στην κτηνοτροφία), όσο και ασθενών πριν την εισαγωγή τους στο νοσοκομείο αλλά και κατά την διάρκεια παραμονής τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αντιμικροβιακή αντοχή έχει αναδειχθεί ως ένα από τα κυριότερα προβλήματα της δημόσιας υγείας που καταγράφονται τον 21^ο αιώνα καθώς εμποδίζει την αποτελεσματική θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται κυρίως από πολυανθεκτικά Gram-αρνητικά βακτήρια, τα οποία δεν εμφανίζουν πλέον καμία ευαισθησία σε αντιβιοτικά.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν 4 είδη Gram αρνητικών βακτηρίων (*E.coli*, *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa* και *A.baumannii*) με αντοχή στις καρβαπενέμες, τα οποία συλλέχθηκαν κατά τα έτη 2017-2023 και απομονώθηκαν κυρίως από ασθενείς του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Πρώτο στάδιο της μελέτης αποτέλεσε η απομόνωση ανθεκτικών στελεχών και η ανίχνευση των συχνότερων μηχανισμών αντοχής που εμφανίζονται στην Ελλάδα (*bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}* και *bla_{OXA-48}*). Δεύτερο στάδιο ήταν η επιλογή των *bla_{NDM}* (+) βακτηρίων και ο χαρακτηρισμός του γενετικού περιβάλλοντος του γονιδίου *bla_{NDM}* με αλληλούχιση ολικού γονιδιώματος. Τέλος, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αποτελεσμάτων με την διαθέσιμη βιβλιογραφία. Ο στόχος ήταν η διερεύνηση της διασποράς του γονιδίου *bla_{NDM}* σε διάφορα Gram-αρνητικά βακτηρίδια τα οποία απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα ανθρώπων και ζώων κατά την περίοδο 2017-2023 στην Θεσσαλία.

Από τα 756 δείγματα ζώων που μελετήθηκαν, αναπτύχθηκε μόνο ένα στέλεχος *E.coli* (0,1%) με αντοχή σε καρβαπενέμες, ενώ από τα ανθρώπινα δείγματα μελετήθηκαν 270 μικροοργανισμοί με αντοχή σε καρβαπενέμες. Ο έλεγχος ανίχνευσης γονιδίων αντοχής έδειξε την παρουσία τεσσάρων γονιδίων (*bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}* και *bla_{OXA-48}*) στα στελέχη *K.pneumoniae* και τριών γονιδίων (*bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*) στα στελέχη *E.coli* σε διάφορους συνδυασμούς, ενώ σε στέλεχη *P.aeruginosa* εντοπίστηκαν δύο γονίδια (*bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*) και σε στέλεχη *A.baumannii* ένα γονίδιο (*bla_{NDM}*). Από τα 70 *bla_{NDM}* (+) στελέχη που προέκυψαν κατά τον γονοτυπικό έλεγχο, τα 34 (11 *E.coli* -1 ζωικής προέλευσης και 10 ανθρώπινης προέλευσης, 9 *A.baumannii*, 9 *P.aeruginosa* και 5 *K.pneumoniae*) επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση. Συγκεκριμένα το ζωικό στέλεχος *E. coli* βρέθηκε να ανήκει στον κλώνο ST361 και να φέρει το *bla_{NDM-5}* γονίδιο σε γενετική δομή όμοια με αυτή του πλασμιδίου p52148 που είχε περιγραφεί στο παρελθόν. Από τα ανθρώπινα δείγματα, τα στελέχη *E.coli* βρέθηκε ότι ανήκουν σε διάφορους κλώνους (ST744, SST998, ST224, ST410, ST4380, ST46, ST683, ST12) ενώ το *bla_{NDM-1}* εντοπίστηκε σε τρεις γενετικές δομές όμοιες με προηγούμενα χαρακτηρισμένα

πλασμίδια (pS-3002cz, pB3002cz, pEc19397-131). Τα στελέχη *K.pneumoniae* βρέθηκε ότι ανήκουν σε τρεις διαφορετικούς κλώνους (ST11, ST231, Νέο ST) ενώ το γονίδιο *bla_{NDM-1}* εντοπίστηκε σε γενετικές δομές όμοιες με αυτές των στελεχών *E.coli* της μελέτης (pS-3002cz, pB3002cz). Τα στελέχη *P.aeruginosa* βρέθηκε ότι ανήκουν στον κλώνο ST308 και το γονίδιο *bla_{NDM-1}* βρέθηκε στο χρωμόσωμα πάνω στο συζευκτικό στοιχείο ICE_{Tn4371}6385. Τέλος, τα στελέχη *A.baumannii* βρέθηκε ότι ανήκουν σε 4 διαφορετικούς κλώνους (ST2, ST85, ST160 και ST2493), ενώ το γονίδιο *bla_{NDM-1}* εντοπίστηκε σε 2 διαφορετικές δομές τοποθετημένες στο χρωμόσωμα σε ήδη χαρακτηρισμένα μεταθετά στοιχεία (Tn125, Tn7382). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η ανίχνευση του γονιδίου *bla_{NDM-5}* σε στέλεχος *E.coli* και *bla_{NDM-1}* σε στελέχη *E.coli* και *P.aeruginosa* αναφέρεται για πρώτη φορά στην Ελλάδα, ενώ ταυτόχρονα είναι η πρώτη εκτεταμένη μελέτη *bla_{NDM}(+)* στελεχών *A.baumannii*.

Η διασπορά συγκεκριμένων πολυανθεκτικών παθογόνων κλώνων και η μεταφορά γονιδίων αντοχής τόσο μεταξύ βακτηρίων του ίδιου είδους όσο και μεταξύ διαφορετικών γενών που απομονώνονται στον τομέα της υγείας και της κτηνιατρικής δημιουργεί μία αναδυόμενη απειλή για τις υπηρεσίες Υγείας του ανθρώπου σε παγκόσμιο επίπεδο.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance has emerged as one of the major public health problems recorded in the 21st century, hindering the effective treatment of infections caused primarily caused by multidrug-resistant Gram-negative bacteria that no longer exhibit sensitivity to antibiotics.

In this dissertation, four species of Gram-negative bacteria (*E.coli*, *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa*, and *A.baumannii*) with resistance to carbapenems were studied. These bacteria were collected between the years 2017-2023 and mainly isolated from patients at the University General Hospital of Larissa. The first stage of the study involved the isolation of resistant strains and the detection of the most common resistance mechanisms observed in Greece (*bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}* and *bla_{OXA-48}*). The second stage included the selection of *bla_{NDM}*(+) bacteria and the characterization of the genetic environment of the *bla_{NDM}* gene through Whole Genome Sequencing. Finally, a comparison of the results with available literature was conducted. The aim was to investigate the spread of the *bla_{NDM}* gene in various Gram-negative bacteria isolated from samples of humans and animals in Thessaly during the period 2017-2023.

Out of 756 animal samples, only one strain of *E.coli* (0.1%) with resistance to carbapenems isolated, while 270 microorganisms with carbapenem resistance were examined from human samples. Detection of resistance genes revealed the presence of four genes (*bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, and *bla_{OXA-48}*) in *K. pneumoniae* strains and three genes (*bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*) in *E. coli* strains, each in various combinations. In *P. aeruginosa* strains, two genes (*bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*) were identified, and in *A. baumannii* strains, one gene (*bla_{NDM}*) was found. Among the 70 *bla_{NDM}* (+) strains identified in the genotypic analysis, 34 were selected for further analysis, including 11 *E. coli* (1 of animal origin and 10 of human origin), 9 *A. baumannii*, 9 *P. aeruginosa*, and 5 *K. pneumoniae* strains. Specifically, the animal *E. coli* strain was found to belong to clone ST361 and carried the *bla_{NDM-5}* gene in a genetic structure similar to the previously described plasmid p52148. Among human samples, *E. coli* strains were found to belong to various clones (ST744, SST998, ST224, ST410, ST4380, ST46, ST683, ST12), with the *bla_{NDM-1}* gene identified in three genetic structures similar to previously characterized plasmids (pS-3002cz, pB3002cz, pEc19397-131). *K. pneumoniae* strains were found to belong to three different clones (ST11, ST231, New ST), with the *bla_{NDM-1}* gene detected in genetic

structures similar to those of the *E. coli* strains studied (pS-3002cz, pB3002cz). *P. aeruginosa* strains were found to belong to clone ST308, and the *bla*_{NDM-1} gene was located on the chromosome in the integrative element ICE_{Tn4371}6385. Finally, *A. baumannii* strains were found to belong to four different clones (ST2, ST85, ST160, and ST2493), with the *bla*_{NDM-1} gene identified in two different chromosome-located structures in previously characterized transpositional elements (Tn125, Tn7382). It is noteworthy that the detection of the *bla*_{NDM-5} gene in an *E. coli* strain and the *bla*_{NDM-1} gene in *E. coli* and *P. aeruginosa* strains is reported for the first time in Greece, and simultaneously, it is the first extensive study of *bla*_{NDM} (+) *A. baumannii* strains.

The spread of specific multidrug-resistant pathogenic clones and the transfer of resistance genes, both between bacteria of the same species and between bacteria of different genus, isolated in the fields of health, veterinary medicine, and the environment, create an emerging threat to human health services worldwide.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Antonie van Leeuwenhoek | Biography, Discoveries, & Facts | Britannica [Internet]. 2023 [cited 2023 Apr 29]. Available from: <https://www.britannica.com/biography/Antonie-van-Leeuwenhoek>
2. Ferdinand Cohn | German botanist | Britannica [Internet]. [cited 2023 Apr 29]. Available from: <https://www.britannica.com/biography/Ferdinand-Cohn>
3. Coico R. Gram Staining. *Curr Protoc Microbiol*. 2006;00(1):A.3C.1-A.3C.2.
4. Blogger G. Plasmids 101: Gram Negative and Positive Bacteria [Internet]. [cited 2022 Sep 18]. Available from: <https://blog.addgene.org/plasmids-101-gram-negative-and-positive-bacteria>
5. Hacker J, Blum-Oehler G. In appreciation of Theodor Escherich. *Nat Rev Microbiol*. 2007 Dec;5(12):902–902.
6. Méric G, Hitchings MD, Pascoe B, Sheppard SK. From Escherich to the Escherichia coli genome. *Lancet Infect Dis*. 2016 Jun 1;16(6):634–6.
7. Sneath PHA, McGOWAN V, Skerman VBD. Approved Lists of Bacterial Names. *Int J Syst Evol Microbiol*. 1980 Jan 1;30(1):225–420.
8. Microorganisms NRC (US) SG for the W on SL of VS. Correlates of Smallest Sizes for Microorganisms [Internet]. Size Limits of Very Small Microorganisms: Proceedings of a Workshop. National Academies Press (US); 1999 [cited 2022 Oct 19]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK224751/>
9. Gómez-Gómez JM, Manfredi C, Alonso JC, Blázquez J. A novel role for RecA under non-stress: promotion of swarming motility in Escherichia coli K-12. *BMC Biol*. 2007 Mar 28;5(1):14.
10. Son MS, Taylor RK. Growth and Maintenance of Escherichia coli Laboratory Strains. *Curr Protoc*. 2021 Jan;1(1):e20.
11. Jung B, Hoilat GJ. MacConkey Medium. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [cited 2022 Oct 19]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557394/>
12. Hasman H, Schembri MA, Klemm P. Antigen 43 and Type 1 Fimbriae Determine Colony Morphology of Escherichia coli K-12. *J Bacteriol*. 2000 Feb;182(4):1089–95.
13. Wilks JC, Slonczewski JL. pH of the Cytoplasm and Periplasm of Escherichia coli: Rapid Measurement by Green Fluorescent Protein Fluorimetry. *J Bacteriol*. 2007 Aug;189(15):5601–7.

14. Philip P, Kern D, Goldmanns J, Seiler F, Schulte A, Habicher T, et al. Parallel substrate supply and pH stabilization for optimal screening of *E. coli* with the membrane-based fed-batch shake flask. *Microb Cell Factories*. 2018 May 9;17(1):69.
15. Mueller M, Tainter CR. *Escherichia Coli*. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [cited 2023 Apr 10]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564298/>
16. Martinson JNV, Walk ST. *Escherichia coli* residency in the gut of healthy human adults. *EcoSal Plus*. 2020 Sep;9(1):10.1128/ecosalplus.ESP-0003–2020.
17. Sim M, Koirala S, Picton D, Strahl H, Hoskisson PA, Rao CV, et al. Growth rate control of flagellar assembly in *Escherichia coli* strain RP437. *Sci Rep*. 2017 Jan 24;7(1):41189.
18. Zhou M, Yang Y, Chen P, Hu H, Hardwidge PR, Zhu G. More than a locomotive organelle: flagella in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015 Nov 1;99(21):8883–90.
19. Ashurst JV, Dawson A. *Klebsiella Pneumonia*. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [cited 2023 May 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519004/>
20. NCBI [Internet]. [cited 2023 May 28]. *Klebsiella pneumoniae*. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/573/>
21. Brabb T, Newsome D, Burich A, Hanes M. Chapter 23 - Infectious Diseases. In: Suckow MA, Stevens KA, Wilson RP, editors. *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents* [Internet]. Boston: Academic Press; 2012 [cited 2023 May 28]. p. 637–83. (American College of Laboratory Animal Medicine). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123809209000237>
22. Diggle SP, Whiteley M. Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology*. 2020 Jan;166(1):30–3.
23. NCBI [Internet]. [cited 2023 May 28]. *Pseudomonas aeruginosa*. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/287/>
24. Dodd CER. PSEUDOMONAS | Introduction. In: Batt CA, Tortorello ML, editors. *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* [Internet]. Oxford: Academic Press; 2014 [cited 2023 May 28]. p. 244–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123847300002822>
25. Moore NM, Flaws ML. Introduction: *Pseudomonas aeruginosa*. *Am Soc Clin Lab Sci*. 2011 Jan 1;24(1):41–2.
26. Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator RD. *Acinetobacter baumannii*. *Virulence*. 2012 May 1;3(3):243–50.

27. Schoch CL, Ciufo S, Domrachev M, Hotton CL, Kannan S, Khovanskaya R, et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database. 2020 Jan 1;2020:baaa062.
28. Percival SL, Williams DW. Chapter Two - Acinetobacter. In: Percival SL, Yates MV, Williams DW, Chalmers RM, Gray NF, editors. Microbiology of Waterborne Diseases (Second Edition) [Internet]. London: Academic Press; 2014 [cited 2023 Jul 2]. p. 35–48. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124158467000020>
29. Almasaudi SB. Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. Saudi J Biol Sci. 2018 Mar 1;25(3):586–96.
30. Zhang G, Meredith TC, Kahne D. On the Essentiality of Lipopolysaccharide to Gram-Negative Bacteria. Curr Opin Microbiol. 2013 Dec;16(6):779–85.
31. Klemm P. Fimbrial adhesions of Escherichia coli. Rev Infect Dis. 1985 Jun;7(3):321–40.
32. Schroll C, Barken KB, Krogfelt KA, Struve C. Role of type 1 and type 3 fimbriae in Klebsiella pneumoniae biofilm formation. BMC Microbiol. 2010 Jun 23;10(1):179.
33. Whitfield C. Structure and Assembly of Escherichia coli Capsules. EcoSal Plus. 2009 Aug;3(2).
34. Jann K, Jann B. Capsules of Escherichia coli, expression and biological significance. Can J Microbiol. 1992 Jul;38(7):705–10.
35. Caza M, Kronstad J. Shared and distinct mechanisms of iron acquisition by bacterial and fungal pathogens of humans. Front Cell Infect Microbiol [Internet]. 2013 [cited 2023 May 2];3. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2013.00080>
36. Hossain Z. Bacteria: Pseudomonas. In: Motarjemi Y, editor. Encyclopedia of Food Safety [Internet]. Waltham: Academic Press; 2014 [cited 2023 Jul 2]. p. 490–500. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123786128001098>
37. Slater SL, S  gfors AM, Pollard DJ, Ruano-Gallego D, Frankel G. The Type III Secretion System of Pathogenic Escherichia coli. In: Frankel G, Ron EZ, editors. Escherichia coli, a Versatile Pathogen [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2018 [cited 2023 May 2]. p. 51–72. (Current Topics in Microbiology and Immunology). Available from: https://doi.org/10.1007/82_2018_116
38. Liao C, Huang X, Wang Q, Yao D, Lu W. Virulence Factors of Pseudomonas Aeruginosa and Antivirulence Strategies to Combat Its Drug Resistance. Front Cell Infect Microbiol [Internet]. 2022 [cited 2023 Jul 2];12. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.926758>
39. Mainil J. Escherichia coli virulence factors. Vet Immunol Immunopathol. 2013 Mar;152(1–2):2–12.

40. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2004 Feb;2(2):123–40.
41. *E. coli* [Internet]. [cited 2022 Oct 19]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
42. Diarrhoeal disease [Internet]. [cited 2023 Jan 26]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>
43. Chen HD, Frankel G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev*. 2005 Jan;29(1):83–98.
44. Clarke SC, Haigh RD, Freestone PPE, Williams PH. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection: history and clinical aspects. *Br J Biomed Sci*. 2002 Jan 1;59(2):123–7.
45. Alonso MZ, Lucchesi PMA, Rodríguez EM, Parma AE, Padola NL. Enteropathogenic (EPEC) and Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) in broiler chickens and derived products at different retail stores. *Food Control*. 2012 Feb 1;23(2):351–5.
46. Enteropathogenic *E. Coli* (EPEC).
47. Hill SM, Phillips AD, Walker-Smith JA. Enteropathogenic *Escherichia coli* and life threatening chronic diarrhoea. *Gut*. 1991 Feb;32(2):154–8.
48. Celli J, Deng W, Finlay BB. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) attachment to epithelial cells: exploiting the host cell cytoskeleton from the outside. *Cell Microbiol*. 2000 Feb;2(1):1–9.
49. Harrington SM, Dudley EG, Nataro JP. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS Microbiol Lett*. 2006 Jan 1;254(1):12–8.
50. Jiang ZD, Greenberg D, Nataro JP, Steffen R, DuPont HL. Rate of Occurrence and Pathogenic Effect of Enteroaggregative *Escherichia coli* Virulence Factors in International Travelers. *J Clin Microbiol*. 2002 Nov;40(11):4185–90.
51. Hebbelstrup Jensen B, Olsen KEP, Struve C, Krogfelt KA, Petersen AM. Epidemiology and Clinical Manifestations of Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. 2014 Jul;27(3):614–30.
52. Huang DB, DuPont HL. Enteroaggregative *Escherichia coli*: An emerging pathogen in children. *Semin Pediatr Infect Dis*. 2004 Oct 1;15(4):266–71.
53. Okeke IN, Nataro JP. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Lancet Infect Dis*. 2001 Dec 1;1(5):304–13.
54. Kaur P, Chakraborti A, Asea A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: An Emerging Enteric Food Borne Pathogen. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2010;2010:254159.

55. Steiner TS, Lima AAM, Nataro JP, Guerrant RL. Enteroaggregative *Escherichia coli* Produce Intestinal Inflammation and Growth Impairment and Cause Interleukin-8 Release from Intestinal Epithelial Cells. *J Infect Dis*. 1998 Jan 1;177(1):88–96.
56. Ewing WH, Gravatti JL. *Shigella* Types Encountered in the Mediterranean Area. *J Bacteriol*. 1947 Feb;53(2):191–5.
57. ROWE B, GROSS RJ, WOODROOF DP. Proposal to Recognise Seroovar 145/46 (Synonyms: 147, *Shigella* 13, *Shigella* sofia, and *Shigella* manolovii) as a New *Escherichia coli* O Group, O164. *Int J Syst Evol Microbiol*. 1977;27(1):15–8.
58. Tulloch EF, Ryan KJ, Formal SB, Franklin FA. Invasive Enteropathic *Escherichia coli* Dysentery. *Ann Intern Med*. 1973 Jul;79(1):13–7.
59. Prats G, Llovet T. [Enteroinvasive *Escherichia coli*. Pathogenesis and epidemiology]. *Microbiol Madr Spain*. 1995 Mar;11(1):91–6.
60. Lan R, Reeves PR. *Escherichia coli* in disguise: molecular origins of *Shigella*. *Microbes Infect*. 2002 Sep 1;4(11):1125–32.
61. Sack RB, Gorbach SL, Banwell JG, Jacobs B, Chatterjee BD, Mitra RC. Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolated from Patients with Severe Cholera-like Disease. *J Infect Dis*. 1971;123(4):378–85.
62. Sack RB, Jacobs B, Mitra R. Antitoxin Responses to Infections with Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Infect Dis*. 1974 Mar 1;129(3):330–5.
63. Gyles CL, Barnum DA. A Heat-Labile Enterotoxin from Strains of *Escherichia coli* Enteropathogenic for Pigs. *J Infect Dis*. 1969 Oct 1;120(4):419–26.
64. Merson MH, Sack RB, Islam S, Saklayen G, Huda N, Huq I, et al. Disease due to enterotoxigenic *Escherichia coli* in Bangladeshi adults: clinical aspects and a controlled trial of tetracycline. *J Infect Dis*. 1980 Jun;141(6):702–11.
65. Kang G, Hart CA, Shears P. 24 - Bacterial Enteropathogens. In: Farrar J, Hotez PJ, Junghanss T, Kang G, Lalloo D, White NJ, editors. *Manson's Tropical Infectious Diseases (Twenty-third Edition)* [Internet]. London: W.B. Saunders; 2014 [cited 2023 Mar 23]. p. 319-336.e2. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978070205101200025X>
66. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) [Internet]. [cited 2023 Apr 1]. Available from: [https://www.who.int/teams/immunization-vaccines-and-biologicals/diseases/enterotoxigenic-c-escherichia-coli-\(etec\)](https://www.who.int/teams/immunization-vaccines-and-biologicals/diseases/enterotoxigenic-c-escherichia-coli-(etec))
67. Daniels NA. Enterotoxigenic *Escherichia coli*: Traveler's Diarrhea Comes Home. *Clin Infect Dis*. 2006 Feb 1;42(3):335–6.

68. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* [Internet]. 2019 [cited 2023 Apr 2]. Available from: <https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/enterohemorrhagic-escherichia-coli>
69. Lim JY, Yoon JW, Hovde CJ. A Brief Overview of *Escherichia coli* O157:H7 and Its Plasmid O157. *J Microbiol Biotechnol*. 2010 Jan;20(1):5–14.
70. Cramer JP. Chapter 17 - Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome (HUS). In: Ergönül Ö, Can F, Madoff L, Akova M, editors. *Emerging Infectious Diseases* [Internet]. Amsterdam: Academic Press; 2014 [cited 2023 Apr 2]. p. 213–27. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124169753000170>
71. Duffy G. *ESCHERICHIA COLI* | Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), Including Non-O157. In: Batt CA, Tortorello ML, editors. *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edition) [Internet]. Oxford: Academic Press; 2014 [cited 2023 Apr 2]. p. 713–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123847300003840>
72. National Enteric Disease Surveillance: Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) Annual Report, 2017 | *E. coli* | CDC [Internet]. 2021 [cited 2023 Apr 2]. Available from: <https://www.cdc.gov/ecoli/surv2017/index.html>
73. Rock C, Donnenberg MS. Human Pathogenic Enterobacteriaceae. In: *Reference Module in Biomedical Sciences* [Internet]. Elsevier; 2014 [cited 2023 Apr 2]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128012383001367>
74. Nguyen Y, Sperandio V. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012 Jul 12;2:90.
75. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. 1998 Jan;11(1):142–201.
76. Mansan-Almeida R, Pereira AL, Giugliano LG. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains isolated from children and adults constitute two different populations. *BMC Microbiol*. 2013 Feb 1;13(1):22.
77. Terlizzi ME, Gribaudo G, Maffei ME. UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. *Front Microbiol*. 2017 Aug 15;8:1566.
78. Wijetunge DSS, Gongati S, DebRoy C, Kim KS, Couraud PO, Romero IA, et al. Characterizing the pathotype of neonatal meningitis causing *Escherichia coli* (NMEC). *BMC Microbiol*. 2015 Oct 14;15:211.
79. Ananias M, Yano T. Serogroups and virulence genotypes of *Escherichia coli* isolated from patients with sepsis. *Braz J Med Biol Res*. 2008 Oct;41:877–83.
80. VetBact [Internet]. [cited 2023 May 4]. Available from: <https://www.vetbact.org/species/68>

81. Kathayat D, Lokesh D, Ranjit S, Rajashekara G. Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC): An Overview of Virulence and Pathogenesis Factors, Zoonotic Potential, and Control Strategies. *Pathogens*. 2021 Apr 12;10(4):467.
82. Corrin B, Nicholson AG. Chapter 5 - Infectious diseases. In: Corrin B, Nicholson AG, editors. *Pathology of the Lungs* (Third Edition) [Internet]. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2011 [cited 2023 May 28]. p. 155–262. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702033698000057>
83. Farver CF. 10 - Bacterial Diseases. In: Zander DS, Farver CF, editors. *Pulmonary Pathology* (Second Edition) [Internet]. Philadelphia: Elsevier; 2018 [cited 2023 May 28]. p. 163–200. (Foundations in Diagnostic Pathology). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323393089000108>
84. Krawczyk B, Wysocka M, Michalik M, Gołębiewska J. Urinary Tract Infections Caused by *K. pneumoniae* in Kidney Transplant Recipients – Epidemiology, Virulence and Antibiotic Resistance. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2022 [cited 2023 Jul 3];12. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.861374>
85. Ribeiro MG, de Moraes ABC, Alves AC, Bolaños CAD, de Paula CL, Portilho FVR, et al. *Klebsiella*-induced infections in domestic species: a case-series study in 697 animals (1997–2019). *Braz J Microbiol*. 2022 Jan 11;53(1):455–64.
86. Zhang Z, Zhang L, Dai H, Zhang H, Song Y, An Q, et al. Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Complex From Clinical Dogs and Cats in China: Molecular Characteristics, Phylogroups, and Hypervirulence-Associated Determinants. *Front Vet Sci* [Internet]. 2022 [cited 2023 Aug 14];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2022.816415>
87. Roe WD, Rogers L, Pinpimai K, Dittmer K, Marshall J, Chilvers BL. Septicaemia and meningitis caused by infection of New Zealand sea lion pups with a hypermucoviscous strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Vet Microbiol*. 2015 Apr 17;176(3–4):301–8.
88. Wu W, Jin Y, Bai F, Jin S. Chapter 41 - *Pseudomonas aeruginosa*. In: Tang YW, Sussman M, Liu D, Poxton I, Schwartzman J, editors. *Molecular Medical Microbiology* (Second Edition) [Internet]. Boston: Academic Press; 2015 [cited 2023 Jul 3]. p. 753–67. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012397169200041X>
89. Wilson MG, Pandey S. *Pseudomonas Aeruginosa*. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [cited 2023 May 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557831/>
90. de Sousa T, Garcês A, Silva A, Lopes R, Alegria N, Hébraud M, et al. The Impact of the Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Dogs. *Vet Sci*. 2023 May;10(5):343.
91. EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), Nielsen SS, Bicout DJ, Calistri P, Canali E, Drewe JA, et al. Assessment of listing and categorisation of animal diseases within the framework of the Animal Health Law (Regulation (EU) No 2016/429):

- antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in dogs and cats. EFSA J. 2022;20(5):e07310.
92. Ramírez-Castillo FY, Guerrero-Barrera AL, Avelar-González FJ. An overview of carbapenem-resistant organisms from food-producing animals, seafood, aquaculture, companion animals, and wildlife. Front Vet Sci [Internet]. 2023 [cited 2023 Aug 14];10. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2023.1158588>
 93. Wareth G, Neubauer H, Sprague LD. *Acinetobacter baumannii* – a neglected pathogen in veterinary and environmental health in Germany. Vet Res Commun. 2019 Feb 1;43(1):1–6.
 94. Tan SY, Tatsumura Y. Alexander Fleming (1881–1955): Discoverer of penicillin. Singapore Med J. 2015 Jul;56(7):366–7.
 95. Iyer RN. 7.02 - Beta lactam. In: Kenakin T, editor. Comprehensive Pharmacology [Internet]. Oxford: Elsevier; 2022 [cited 2023 Apr 2]. p. 3–63. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128204726002127>
 96. Pandey N, Cascella M. Beta Lactam Antibiotics. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [cited 2023 Apr 3]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545311/>
 97. Hsu YP, Meng X, VanNieuwenhze MS. Chapter 1 - Methods for visualization of peptidoglycan biosynthesis. In: Harwood C, Jensen GJ, editors. Methods in Microbiology [Internet]. Academic Press; 2016 [cited 2023 Apr 3]. p. 3–48. (Imaging Bacterial Molecules, Structures and Cells; vol. 43). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0580951716300046>
 98. Palzkill T. Metallo- β -lactamase structure and function. Ann N Y Acad Sci. 2013 Jan;1277:91–104.
 99. ASM.org [Internet]. [cited 2023 Apr 4]. Opening the Black Box of Phenotypic Carbapenemase Detection. Available from: <https://asm.org:443/Articles/2019/May/Opening-the-Black-Box-Phenotypic-Carbapenemas-e-Det>
 100. Penicillins - Infectious Disease and Antimicrobial Agents [Internet]. [cited 2023 Apr 4]. Available from: <http://www.antimicrobe.org/d24.asp>
 101. Nakajima S. [The origin of cephalosporins]. Yakushigaku Zasshi. 2003;37(2):119–27.
 102. Abraham EP. A glimpse of the early history of the cephalosporins. Rev Infect Dis. 1979;1(1):99–105.
 103. Bui T, Preuss CV. Cephalosporins. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [cited 2023 Apr 4]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551517/>

104. Casapao AM, Steed ME, Levine DP, Rybak MJ. Ceftriaxone fosamyl for community-acquired bacterial pneumonia and acute bacterial skin and skin structure infection. *Expert Opin Pharmacother*. 2012 Jun;13(8):1177–86.
105. Henry R. Etymologia: Carbapenem. *Emerg Infect Dis*. 2019 Jul;25(7):1393.
106. Bonner DP, Koster WH, Sykes RB. Monobactams and other monocyclic β -lactams. In: Paton W, Mitchell J, Turner P, editors. *IUPHAR 9th International Congress of Pharmacology London 1984: Proceedings Volume 1* [Internet]. London: Palgrave Macmillan UK; 1984 [cited 2023 Apr 5]. p. 111–4. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-349-17613-7_12
107. Paris JM. 1.3 Chirality in Antibacterial Agents. In: Carreira EM, Yamamoto H, editors. *Comprehensive Chirality* [Internet]. Amsterdam: Elsevier; 2012 [cited 2023 Apr 5]. p. 30–53. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080951676001099>
108. Aronson JK, editor. Monobactams. In: *Meyler's Side Effects of Drugs (Sixteenth Edition)* [Internet]. Oxford: Elsevier; 2016 [cited 2023 Apr 5]. p. 1097–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444537171011033>
109. Sykes RB, Bonner DP. Discovery and development of the monobactams. *Rev Infect Dis*. 1985;7 Suppl 4:S579-593.
110. Duma RJ. Aztreonam, the First Monobactam. *Ann Intern Med*. 1987 May;106(5):766–7.
111. Brewer NS, Hellinger WC. The Monobactams. *Mayo Clin Proc*. 1991 Nov 1;66(11):1152–7.
112. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: Past, Present, and Future ▽. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Nov;55(11):4943–60.
113. Maddison JE, Watson ADJ, Elliott J. Chapter 8 - Antibacterial drugs. In: Maddison JE, Page SW, Church DB, editors. *Small Animal Clinical Pharmacology (Second Edition)* [Internet]. Edinburgh: W.B. Saunders; 2008 [cited 2023 Apr 5]. p. 148–85. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702028588500105>
114. Geddes AM, Klugman KP, Rolinson GN. Introduction: historical perspective and development of amoxicillin/clavulanate. *Int J Antimicrob Agents*. 2007 Dec;30 Suppl 2:S109-112.
115. Wong D, van Duin D. Novel Beta-lactamase Inhibitors: Unlocking Their Potential in Therapy. *Drugs*. 2017 Apr;77(6):615–28.
116. Khanna NR, Gerriets V. Beta Lactamase Inhibitors. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [cited 2023 Apr 5]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557592/>

117. Aslam B, Rasool M, Muzammil S, Siddique AB, Nawaz Z, Shafique M, et al. Carbapenem Resistance: Mechanisms and Drivers of Global Menace [Internet]. Pathogenic Bacteria. IntechOpen; 2020 [cited 2023 Apr 5]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/70581>
118. Aurilio C, Sansone P, Barbarisi M, Pota V, Giaccari LG, Coppolino F, et al. Mechanisms of Action of Carbapenem Resistance. *Antibiotics*. 2022 Mar 21;11(3):421.
119. Armstrong T, Fenn SJ, Hardie KR. JMM Profile: Carbapenems: a broad-spectrum antibiotic. *J Med Microbiol*. 2021 Dec 10;70(12):001462.
120. Quinn JP, Dudek EJ, DiVincenzo CA, Lucks DA, Lerner SA. Emergence of resistance to imipenem during therapy for *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Infect Dis*. 1986 Aug;154(2):289–94.
121. eucast: Clinical breakpoints and dosing of antibiotics [Internet]. [cited 2023 Apr 6]. Available from: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints
122. Diak IL. Merrem IV (meropenem for injection).
123. Scholar E. Meropenem. In: Enna SJ, Bylund DB, editors. xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference [Internet]. New York: Elsevier; 2007 [cited 2023 Apr 5]. p. 1–5. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080552323621336>
124. Blumer JL. Meropenem: evaluation of a new generation carbapenem. *Int J Antimicrob Agents*. 1997 Mar;8(2):73–92.
125. Papich MG. Ertapenem. In: Papich MG, editor. *Saunders Handbook of Veterinary Drugs (Fourth Edition)* [Internet]. St. Louis: W.B. Saunders; 2016 [cited 2023 Apr 7]. p. 296–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323244855002461>
126. Rose L, Peahota MM, Gallagher JC. Chapter 23 - Beta-Lactams and Tetracyclines. In: Ray SD, editor. *Side Effects of Drugs Annual* [Internet]. Elsevier; 2016 [cited 2023 Apr 7]. p. 217–27. (A Worldwide Yearly Survey of New Data in Adverse Drug Reactions; vol. 38). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378608016300447>
127. Paterson DL, DePestel DD. Doripenem. *Clin Infect Dis*. 2009 Jul 15;49(2):291–8.
128. Papich MG. Doripenem. In: Papich MG, editor. *Saunders Handbook of Veterinary Drugs (Fourth Edition)* [Internet]. St. Louis: W.B. Saunders; 2016 [cited 2023 Apr 7]. p. 268–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323244855002291>
129. Bassetti M, Merelli M, Temperoni C, Astilean A. New antibiotics for bad bugs: where are we? *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2013 Aug 28;12(1):22.
130. Goa KL, Noble S. Panipenem/betamipron. *Drugs*. 2003;63(9):913–25; discussion 926.

131. Lee DG, Chun HS, Choi SM, Choi JH, Yoo JH, Shin WS. Efficacy of Panipenem versus Imipenem against Clinical Isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in a Two-Compartment Artificial Capillary Model. *Infect Chemother*. 2004;227–33.
132. Wang X, Zhang X, Zong Z, Yu R, Lv X, Xin J, et al. Biapenem versus meropenem in the treatment of bacterial infections: a multicenter, randomized, controlled clinical trial. *Indian J Med Res*. 2013 Dec;138(6):995–1002.
133. Miyazaki S, Hosoyama T, Furuya N, Ishii Y, Matsumoto T, Ohno A, et al. In Vitro and In Vivo Antibacterial Activities of L-084, a Novel Oral Carbapenem, against Causative Organisms of Respiratory Tract Infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Jan;45(1):203–7.
134. Revill P, Serradell N, Bolós J. Tomopenem. *Drugs Future*. 2007;32(1):37.
135. Koga T, Masuda N, Kakuta M, Namba E, Sugihara C, Fukuoka T. Potent In Vitro Activity of Tomopenem (CS-023) against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Aug;52(8):2849–54.
136. PubChem. Tomopenem [Internet]. [cited 2023 Apr 11]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9809656>
137. Koulenti D, Xu E, Song A, Sum Mok IY, Karageorgopoulos DE, Armaganidis A, et al. Emerging Treatment Options for Infections by Multidrug-Resistant Gram-Positive Microorganisms. *Microorganisms*. 2020 Feb;8(2):191.
138. Hurst AL, Neemann KA, Chatterjee A. Chapter 55 - New antibiotics. In: Bagchi D, Das A, Downs BW, editors. *Viral, Parasitic, Bacterial, and Fungal Infections* [Internet]. Academic Press; 2023 [cited 2023 Apr 6]. p. 675–98. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323857307000369>
139. Smith JR, Rybak JM, Claeys KC. Imipenem-Cilastatin-Relebactam: A Novel β -Lactam- β -Lactamase Inhibitor Combination for the Treatment of Multidrug-Resistant Gram-Negative Infections. *Pharmacotherapy*. 2020 Apr;40(4):343–56.
140. Mushtaq S, Meunier D, Vickers A, Woodford N, Livermore DM. Activity of imipenem/relebactam against *Pseudomonas aeruginosa* producing ESBLs and carbapenemases. *J Antimicrob Chemother*. 2021 Jan 19;76(2):434–42.
141. Habboush Y, Guzman N. Antibiotic Resistance. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [cited 2023 Apr 8]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513277/>
142. Uddin TM, Chakraborty AJ, Khusro A, Zidan BRM, Mitra S, Emran TB, et al. Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *J Infect Public Health*. 2021 Dec 1;14(12):1750–66.

143. nhs.uk [Internet]. 2018 [cited 2023 Apr 10]. Antibiotic resistance. Available from: <https://www.nhs.uk/conditions/antibiotics/antibiotic-antimicrobial-resistance/>
144. Antibiotic resistance [Internet]. [cited 2023 Apr 10]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
145. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 2022 [cited 2023 Apr 10]. What Exactly is Antibiotic Resistance? Available from: <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>
146. Ni RT, Onishi M, Mizusawa M, Kitagawa R, Kishino T, Matsubara F, et al. The role of RND-type efflux pumps in multidrug-resistant mutants of *Klebsiella pneumoniae*. *Sci Rep*. 2020 Jul 2;10(1):10876.
147. Lorusso AB, Carrara JA, Barroso CDN, Tuon FF, Faoro H. Role of Efflux Pumps on Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci*. 2022 Jan;23(24):15779.
148. Zhang Y, Li Z, He X, Ding F, Wu W, Luo Y, et al. Overproduction of efflux pumps caused reduced susceptibility to carbapenem under consecutive imipenem-selected stress in *Acinetobacter baumannii*. *Infect Drug Resist*. 2018 Mar 29;11:457–67.
149. Ma P, He LL, Pironti A, Laibinis HH, Ernst CM, Manson AL, et al. Genetic determinants facilitating the evolution of resistance to carbapenem antibiotics. *eLife*. 10:e67310.
150. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995 Jun;39(6):1211–33.
151. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980 Dec 16;289(1036):321–31.
152. Naas T, Oueslati S, Bonnin RA, Dabos ML, Zavala A, Dortet L, et al. Beta-lactamase database (BLDB) – structure and function. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2017 Jan 1;32(1):917–9.
153. Walther-Rasmussen J, Høiby N. Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Sep 1;60(3):470–82.
154. The Comprehensive Antibiotic Resistance Database [Internet]. [cited 2023 Apr 30]. Available from: <https://card.mcmaster.ca/ontology/36196>
155. Antunes NT, Fisher JF. Acquired Class D β -Lactamases. *Antibiotics*. 2014 Sep;3(3):398–434.
156. Mammeri H, Guillon H, Eb F, Nordmann P. Phenotypic and Biochemical Comparison of the Carbapenem-Hydrolyzing Activities of Five Plasmid-Borne AmpC β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Nov;54(11):4556–60.

157. WHO global priority pathogens list of antibiotic-resistant bacteria [Internet]. 2021 [cited 2023 Jul 27]. Available from: <https://www.doherty.edu.au/news-events/news/who-global-priority-pathogens-list-of-antibiotic-resistant-bacteria/>
158. Centers for Disease Control and Prevention [Internet]. 2022 [cited 2023 Jul 27]. The biggest antibiotic-resistant threats in the U.S. Available from: <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html>
159. Report signals increasing resistance to antibiotics in bacterial infections in humans and need for better data [Internet]. [cited 2023 Apr 6]. Available from: <https://www.who.int/news/item/09-12-2022-report-signals-increasing-resistance-to-antibiotics-in-bacterial-infections-in-humans-and-need-for-better-data>
160. Peirano G, Chen L, Nobrega D, Finn TJ, Kreiswirth BN, DeVinney R, et al. Genomic Epidemiology of Global Carbapenemase-Producing *Escherichia coli*, 2015–2017. *Emerg Infect Dis*. 2022 May;28(5):924–31.
161. Vatopoulos A. High rates of metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece - a review of the current evidence. *Eurosurveillance*. 2008 Jan 24;13(4):7–8.
162. Mavroidi A, Miriagou V, Malli E, Stefos A, Dalekos GN, Tzouveleki LS, et al. Emergence of *Escherichia coli* sequence type 410 (ST410) with KPC-2 β -lactamase. *Int J Antimicrob Agents*. 2012 Mar 1;39(3):247–50.
163. Tsilipounidaki K, Florou Z, Skoulakis A, Fthenakis GC, Miriagou V, Petinaki E. Diversity of Bacterial Clones and Plasmids of NDM-1 Producing *Escherichia coli* Clinical Isolates in Central Greece. *Microorganisms*. 2023 Feb;11(2):516.
164. Meng L, Liu Z, Liu C, Li C, Shen H, Cao X. The distribution characteristics of global blaOXA-carrying *Klebsiella pneumoniae*. *BMC Infect Dis*. 2023 Mar 29;23(1):182.
165. Galani I, Karaikos I, Karantani I, Papoutsaki V, Maraki S, Papaioannou V, et al. Epidemiology and resistance phenotypes of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece, 2014 to 2016. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 2018 Aug;23(31).
166. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*. 2011 Oct;17(10):1791–8.
167. Giakkoupi P, Papagiannitsis CC, Miriagou V, Pappa O, Polemis M, Tryfinopoulou K, et al. An update of the evolving epidemic of blaKPC-2-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009–10). *J Antimicrob Chemother*. 2011 Jul 1;66(7):1510–3.
168. Poirel L, Marqué S, Héritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordmann P. OXA-58, a Novel Class D β -Lactamase Involved in Resistance to Carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Jan;49(1):202–8.

169. Hamidian M, Nigro SJ. Emergence, molecular mechanisms and global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Microb Genomics*. 2019 Oct 10;5(10):e000306.
170. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect*. 2006 Sep 1;12(9):826–36.
171. Rostami S, Farajzadeh Sheikh A, Shoja S, Farahani A, Tabatabaiefar MA, Jolodar A, et al. Investigating of four main carbapenem-resistance mechanisms in high-level carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *J Chin Med Assoc*. 2018 Feb 1;81(2):127–32.
172. Meletis G, Exindari M, Vavatsi N, Sofianou D, Diza E. Mechanisms responsible for the emergence of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Hippokratia*. 2012;16(4):303–7.
173. Tsakris A, Pournaras S, Woodford N, Palepou MFI, Babini GS, Douboyas J, et al. Outbreak of Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa* Producing VIM-1 Carbapenemase in Greece. *J Clin Microbiol*. 2000 Mar;38(3):1290–2.
174. Al Bayssari C, Dabboussi F, Hamze M, Rolain JM. Emergence of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in livestock animals in Lebanon. *J Antimicrob Chemother*. 2015 Mar 1;70(3):950–1.
175. Haenni M, Bour M, Châtre P, Madec JY, Plésiat P, Jeannot K. Resistance of Animal Strains of *Pseudomonas aeruginosa* to Carbapenems. *Front Microbiol* [Internet]. 2017 [cited 2023 Aug 14];8. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.01847>
176. *E. coli* Infection | Healthy Pets, Healthy People | CDC [Internet]. 2019 [cited 2023 May 4]. Available from: <https://www.cdc.gov/healthypets/diseases/ecoli.html>
177. World Organisation for Animal Health (OIE) [Internet]. [cited 2023 May 4]. Available from: <https://www.woah.org/app/uploads/2021/06/a-oie-list-antimicrobials-june2021.pdf>
178. Thungrat K, Price SB, Carpenter DM, Boothe DM. Antimicrobial susceptibility patterns of clinical *Escherichia coli* isolates from dogs and cats in the United States: January 2008 through January 2013. *Vet Microbiol*. 2015 Sep 30;179(3–4):287–95.
179. Silva JM da, Menezes J, Marques C, Pomba CF. Companion Animals—An Overlooked and Misdiagnosed Reservoir of Carbapenem Resistance. *Antibiotics*. 2022 Apr;11(4):533.
180. Polymerase Chain Reaction (PCR) [Internet]. [cited 2023 Jun 4]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>
181. Bonnin RA, Naas T, Poirel L, Nordmann P. Phenotypic, Biochemical, and Molecular Techniques for Detection of Metallo- β -Lactamase NDM in *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*. 2012 Apr;50(4):1419–21.

182. Shirani K, Ataei B, Roshandel F. Antibiotic resistance pattern and evaluation of metallo-beta lactamase genes (VIM and IMP) in *Pseudomonas aeruginosa* strains producing MBL enzyme, isolated from patients with secondary immunodeficiency. *Adv Biomed Res*. 2016 Jul 29;5:124.
183. Lomaestro BM, Tobin EH, Shang W, Gootz T. The Spread of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase–Producing *K. pneumoniae* to Upstate New York. *Clin Infect Dis*. 2006 Aug 1;43(3):e26–8.
184. Brink AJ, Coetzee J, Corcoran C, Clay CG, Hari-Makkan D, Jacobson RK, et al. Emergence of OXA-48 and OXA-181 Carbapenemases among Enterobacteriaceae in South Africa and Evidence of In Vivo Selection of Colistin Resistance as a Consequence of Selective Decontamination of the Gastrointestinal Tract. *J Clin Microbiol*. 2013 Jan;51(1):369–72.
185. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Feb;74(2):560–4.
186. Genome.gov [Internet]. 2022 [cited 2023 Jun 17]. Human Genome Project Fact Sheet. Available from: <https://www.genome.gov/about-genomics/educational-resources/fact-sheets/human-genome-project>
187. Meera Krishna B, Khan MA, Khan ST. Next-Generation Sequencing (NGS) Platforms: An Exciting Era of Genome Sequence Analysis. In: Tripathi V, Kumar P, Tripathi P, Kishore A, Kamle M, editors. *Microbial Genomics in Sustainable Agroecosystems: Volume 2* [Internet]. Singapore: Springer; 2019 [cited 2023 Jun 17]. p. 89–109. Available from: https://doi.org/10.1007/978-981-32-9860-6_6
188. Grant JR, Enns E, Marinier E, Mandal A, Herman EK, Chen C yu, et al. Proksee: in-depth characterization and visualization of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*. 2023 Jul 5;51(W1):W484–92.
189. BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons | BMC Genomics | Full Text [Internet]. [cited 2024 Jan 2]. Available from: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-12-402>
190. Antimicrobial resistance [Internet]. [cited 2023 Sep 20]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
191. Watkins RR, Bonomo RA. Overview: Global and Local Impact of Antibiotic Resistance. *Infect Dis Clin North Am*. 2016 Jun 1;30(2):313–22.
192. Cui X, Zhang H, Du H. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Detection and Antimicrobial Therapy. *Front Microbiol* [Internet]. 2019 [cited 2023 Apr 28];10. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.01823>

193. Wu W, Feng Y, Tang G, Qiao F, McNally A, Zong Z. NDM Metallo- β -Lactamases and Their Bacterial Producers in Health Care Settings. *Clin Microbiol Rev.* 2019 Jan 30;32(2):e00115-18.
194. Hornsey M, Phee L, Wareham DW. A Novel Variant, NDM-5, of the New Delhi Metallo- β -Lactamase in a Multidrug-Resistant *Escherichia coli* ST648 Isolate Recovered from a Patient in the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Dec;55(12):5952-4.
195. Dwivedi A, Kumar CB, Kumar A, Soni M, Sahu V, Awasthi A, et al. Molecular characterization of carbapenem resistant *E. coli* of fish origin reveals the dissemination of NDM-5 in freshwater aquaculture environment by the high risk clone ST167 and ST361. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2023 Apr;30(17):49314-26.
196. Alba P, Taddei R, Cordaro G, Fontana MC, Toschi E, Gaibani P, et al. Carbapenemase IncF-borne blaNDM-5 gene in the *E. coli* ST167 high-risk clone from canine clinical infection, Italy. *Vet Microbiol.* 2021 May;256:109045.
197. Increase in cases of carbapenem-resistant *E. coli* carrying the blaNDM-5 gene, EU/EEA countries [Internet]. 2023 [cited 2023 Sep 24]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/increase-cases-carbapenem-resistant-e-coli-carrying-blaNDM-5-gene-eueea-countries>
198. Zou H, Jia X, Liu H, Li S, Wu X, Huang S. Emergence of NDM-5-Producing *Escherichia coli* in a Teaching Hospital in Chongqing, China: IncF-Type Plasmids May Contribute to the Prevalence of blaNDM-5. *Front Microbiol* [Internet]. 2020 [cited 2023 Sep 21];11. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.00334>
199. Chudejova K, Kraftova L, Mattioni Marchetti V, Hrabak J, Papagiannitsis CC, Bitar I. Genetic Plurality of OXA/NDM-Encoding Features Characterized From Enterobacterales Recovered From Czech Hospitals. *Front Microbiol* [Internet]. 2021 [cited 2023 Oct 29];12. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.641415>
200. Yasugi M, Hatoya S, Motooka D, Matsumoto Y, Shimamura S, Tani H, et al. Whole-genome analyses of extended-spectrum or AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from companion dogs in Japan. *PloS One.* 2021;16(2):e0246482.
201. Silva MM, Sellera FP, Fernandes MR, Moura Q, Garino F, Azevedo SS, et al. Genomic features of a highly virulent, ceftiofur-resistant, CTX-M-8-producing *Escherichia coli* ST224 causing fatal infection in a domestic cat. *J Glob Antimicrob Resist.* 2018 Dec;15:252-3.
202. Lima LS, Proietti-Junior AA, Rodrigues YC, da Silva Vieira MC, Lima LNGC, de Oliveira Souza C, et al. High Genetic Diversity and Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Highlight *Arapaima gigas* (Pisces: Arapaimidae) as a Reservoir of Quinolone-Resistant Strains in Brazilian Amazon Rivers. *Microorganisms.* 2022 Apr;10(4):808.

203. Qiu J, Jiang Z, Ju Z, Zhao X, Yang J, Guo H, et al. Molecular and Phenotypic Characteristics of *Escherichia coli* Isolates from Farmed Minks in Zhucheng, China. *BioMed Res Int*. 2019 Jun 27;2019:3917841.
204. Roer L, Overballe-Petersen S, Hansen F, Schønning K, Wang M, Røder BL, et al. *Escherichia coli* Sequence Type 410 Is Causing New International High-Risk Clones. *mSphere*. 2018 Jul 18;3(4):10.1128/msphere.00337-18.
205. Zhong LL, Zhang YF, Doi Y, Huang X, Zhang XF, Zeng KJ, et al. Coproduction of MCR-1 and NDM-1 by Colistin-Resistant *Escherichia coli* Isolated from a Healthy Individual. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Dec 27;61(1):e01962-16.
206. Cordeiro-Moura JR, Kraychete GB, Longo LG de A, Corrêa LL, da Silva NMV, Campana EH, et al. Description and comparative genomic analysis of a *mcr-1*-carrying *Escherichia coli* ST683/CC155 recovered from touristic coastal water in Northeastern Brazil. *Infect Genet Evol*. 2022 Jan 1;97:105196.
207. Loucif L, Chelaghma W, Bendjama E, Cherak Z, Khellaf M, Khemri A, et al. Detection of *bla*OXA-48 and *mcr-1* Genes in *Escherichia coli* Isolates from Pigeon (*Columba livia*) in Algeria. *Microorganisms*. 2022 May;10(5):975.
208. Xu J, Guo H, Li L, He F. Molecular epidemiology and genomic insights into the transmission of carbapenem-resistant NDM-producing *Escherichia coli*. *Comput Struct Biotechnol J*. 2023 Jan 1;21:847–55.
209. Voulgari E, Gartzonika C, Vrioni G, Politi L, Priavali E, Levidiotou-Stefanou S, et al. The Balkan region: NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 clonal strain causing outbreaks in Greece. *J Antimicrob Chemother*. 2014 Aug;69(8):2091–7.
210. Boonyasiri A, Jauneikaite E, Brinkac LM, Greco C, Lerdlamyong K, Tangkoskul T, et al. Genomic and clinical characterisation of multidrug-resistant carbapenemase-producing ST231 and ST16 *Klebsiella pneumoniae* isolates colonising patients at Siriraj hospital, Bangkok, Thailand from 2015 to 2017. *BMC Infect Dis*. 2021 Feb 4;21:142.
211. Studentova V, Dobiasova H, Hedlova D, Dolejska M, Papagiannitsis CC, Hrabak J. Complete Nucleotide Sequences of Two NDM-1-Encoding Plasmids from the Same Sequence Type 11 *Klebsiella pneumoniae* Strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Feb;59(2):1325–8.
212. Huang TW, Chen TL, Chen YT, Lauderdale TL, Liao TL, Lee YT, et al. Copy Number Change of the NDM-1 Sequence in a Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolate. *PLoS ONE*. 2013 Apr 29;8(4):e62774.
213. Hudson CM, Bent ZW, Meagher RJ, Williams KP. Resistance Determinants and Mobile Genetic Elements of an NDM-1-Encoding *Klebsiella pneumoniae* Strain. *PLOS ONE*. 2014 Jun 6;9(6):e99209.

214. Khan M, Willcox MDP, Rice SA, Sharma S, Stapleton F. Development of antibiotic resistance in the ocular *Pseudomonas aeruginosa* clone ST308 over twenty years. *Exp Eye Res.* 2021 Apr 1;205:108504.
215. Jovicic B, Lepsanovic Z, Suljagic V, Rackov G, Begovic J, Topisirovic L, et al. Emergence of NDM-1 Metallo- β -Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from Serbia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Jul 14;55(8):3929–31.
216. Janvier F, Jeannot K, Tessé S, Robert-Nicoud M, Delacour H, Rapp C, et al. Molecular Characterization of blaNDM-1 in a Sequence Type 235 *Pseudomonas aeruginosa* Isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Jun 11;57(7):3408–11.
217. Carattoli A, Fortini D, Galetti R, Garcia-Fernandez A, Nardi G, Orazi D, et al. Isolation of NDM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* sequence type ST235 from a stem cell transplant patient in Italy, May 2013. *Eurosurveillance.* 2013 Nov 14;18(46):20633.
218. Teo JW, La MV, Jureen R, Lin RT. Emergence of a New Delhi metallo- β -lactamase-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Singapore. *Emerg Microbes Infect.* 2015 Jan 1;4(1):1–16.
219. Mataseje LF, Peirano G, Church DL, Conly J, Mulvey M, Pitout JD. Colistin-Nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* Sequence Type 654 with blaNDM-1 Arrives in North America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Feb 26;60(3):1794–800.
220. Liew SM, Rajasekaram G, Puthuchearry SD, Chua KH. Detection of VIM-2-, IMP-1- and NDM-1-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Malaysia. *J Glob Antimicrob Resist.* 2018 Jun 1;13:271–3.
221. Chew KL, Octavia S, Ng OT, Marimuthu K, Venkatachalam I, Cheng B, et al. Challenge of drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: clonal spread of NDM-1-positive ST-308 within a tertiary hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2019 Aug 1;74(8):2220–4.
222. Prakki SRS, Hon PY, Lim ZQ, Thevasagayam NM, Loy SQD, De PP, et al. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* blaNDM-1-Positive ST308 Clone in Singapore. *Microbiol Spectr.* 2023 Apr 12;11(3):e04033-22.
223. Ding Y, Teo JWP, Drautz-Moses DI, Schuster SC, Givskov M, Yang L. Acquisition of resistance to carbapenem and macrolide-mediated quorum sensing inhibition by *Pseudomonas aeruginosa* via ICETn43716385. *Commun Biol.* 2018 May 31;1(1):1–10.
224. Karthikeyan K, Thirunarayan MA, Krishnan P. Coexistence of blaOXA-23 with blaNDM-1 and armA in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Oct 1;65(10):2253–4.
225. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2008 Jul;21(3):538–82.

226. Di Popolo A, Giannouli M, Triassi M, Brisse S, Zarrilli R. Molecular epidemiological investigation of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in four Mediterranean countries with a multilocus sequence typing scheme. *Clin Microbiol Infect*. 2011 Feb 1;17(2):197–201.
227. Gogou V, Pournaras S, Giannouli M, Voulgari E, Piperaki ET, Zarrilli R, et al. Evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages: a 10 year study in Greece (2000–09). *J Antimicrob Chemother*. 2011 Dec 1;66(12):2767–72.
228. Kurihara MNL, de Sales RO, da Silva KE, Maciel WG, Simionatto S. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreaks: a global problem in healthcare settings. *Rev Soc Bras Med Trop*. 53:e20200248.
229. Voulgari E, Politi L, Pitiriga V, Dendrinou J, Poulou A, Georgiadis G, et al. First report of an NDM-1 metallo- β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolate in Greece. *Int J Antimicrob Agents*. 2016 Dec 1;48(6):761–2.
230. Iovleva A, Doi Y. Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Clin Lab Med*. 2017 Jun;37(2):303–15.
231. Sharma J, Sharma D, Singh A, Sunita K. Colistin Resistance and Management of Drug Resistant Infections. *Can J Infect Dis Med Microbiol J Can Mal Infect Microbiol Médicale*. 2022 Dec 10;2022:4315030.
232. Yaghoubi S, Zekiy AO, Krutova M, Gholami M, Kouhsari E, Sholeh M, et al. Tigecycline antibacterial activity, clinical effectiveness, and mechanisms and epidemiology of resistance: narrative review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2022;41(7):1003–22.
233. Sader HS, Carvalhaes CG, Arends SJR, Castanheira M, Mendes RE. Aztreonam/avibactam activity against clinical isolates of Enterobacterales collected in Europe, Asia and Latin America in 2019. *J Antimicrob Chemother*. 2021 Mar 1;76(3):659–66.
234. Jousset AB, Bouabdallah L, Birer A, Rosinski-Chupin I, Mariet JF, Oueslati S, et al. Population Analysis of *Escherichia coli* Sequence Type 361 and Reduced Cefiderocol Susceptibility, France - Volume 29, Number 9—September 2023 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. [cited 2023 Sep 23]; Available from: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/29/9/23-0390_article
235. Larcher R, Laffont-Lozes P, Roger C, Doncesco R, Groul-Viaud C, Martin A, et al. Last resort beta-lactam antibiotics for treatment of New-Delhi Metallo-Beta-Lactamase producing Enterobacterales and other Difficult-to-Treat Resistance in Gram-negative bacteria: A real-life study. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2022 [cited 2023 Oct 28];12. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.1048633>
236. Falcone M, Tiseo G, Leonildi A, Della Sala L, Vecchione A, Barnini S, et al. Cefiderocol- Compared to Colistin-Based Regimens for the Treatment of Severe Infections Caused by Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2022 Mar 21;66(5):e02142-21.

Πίνακας 8 Καταγράφονται ο κωδικός δείγματος, η ταυτοποίηση, ο αντίστοιχος αριθμός πρόσβασης του κάθε δείγματος στην βάση δεδομένων NCBI καθώς και το έργο στο οποίο αντιστοιχεί.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ	ACCESSION NUMBER	BIOPROJECT
9703	<i>Escherichia coli</i>	GCA_026421085.1	PRJNA893175
9793	<i>Escherichia coli</i>	GCA_026421065.1	
A155	<i>Escherichia coli</i>	GCA_026421025.1	
A1160	<i>Escherichia coli</i>	GCA_026421005.1	
A1630	<i>Escherichia coli</i>	GCA_026421045.1	
A2614	<i>Escherichia coli</i>	GCA_026420985.1	
A3025	<i>Escherichia coli</i>	GCA_026420965.1	
A3026	<i>Escherichia coli</i>	GCA_026420925.1	
A3039	<i>Escherichia coli</i>	GCA_026420945.1	
A3040	<i>Escherichia coli</i>	GCA_026420885.1	
A3118	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	GCA_028593925.1	
A3119	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	GCA_028593815.1	
A3173	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	GCA_028593845.1	
A3185	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	GCA_028595105.1	
A3214	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	GCA_028593905.1	
A3453	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	GCA_030504675.1	PRJNA993831
A3454	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	GCA_030504695.1	
A3232	<i>Acinetobacter baumannii</i>	SAMN37453734	PRJNA1018864
A3496	<i>Acinetobacter baumannii</i>	SAMN37453735	
A3557	<i>Acinetobacter baumannii</i>	SAMN37453737	
A3569	<i>Acinetobacter baumannii</i>	SAMN37453738	
A3570	<i>Acinetobacter baumannii</i>	SAMN37751255	
A3593	<i>Acinetobacter baumannii</i>	SAMN37751256	
A3597	<i>Acinetobacter baumannii</i>	SAMN37751257	
A3629	<i>Acinetobacter baumannii</i>	SAMN37751258	
A3637	<i>Acinetobacter baumannii</i>	SAMN37751259	

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ-ABBREVIATIONS

CDC	Centers for Disease Control and Prevention	Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control	Ευρωπαϊκό Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	
ESBL	Extended Spectrum Beta-Lactamase	Ευρέως φάσματος Β-λακταμάση
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing	Ευρωπαϊκή Επιτροπή Ελέγχου της Αντιμικροβιακής Ευαισθησίας
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase	
MHA	Mueller-Hinton Agar	
MIC	Minimum Inhibitory Concentration	Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	
NCBI	National Center for Biotechnology Information	Εθνικό Κέντρο Πληροφοριών Βιοτεχνολογίας
NDM	New Delhi Metallo-beta-lactamase	
PBPs	Penicillin-Binding Proteins	Πενικίλινο-δεσμευτικές πρωτεΐνες
VIM	Verone Integron-encoded Metallo-beta-lactamase	
WGS	Whole Genome Sequencing	Αλληλούχιση Ολικού Γονιδιώματος
WHO	World Health Organization	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
ΠΓΝΑ		Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας