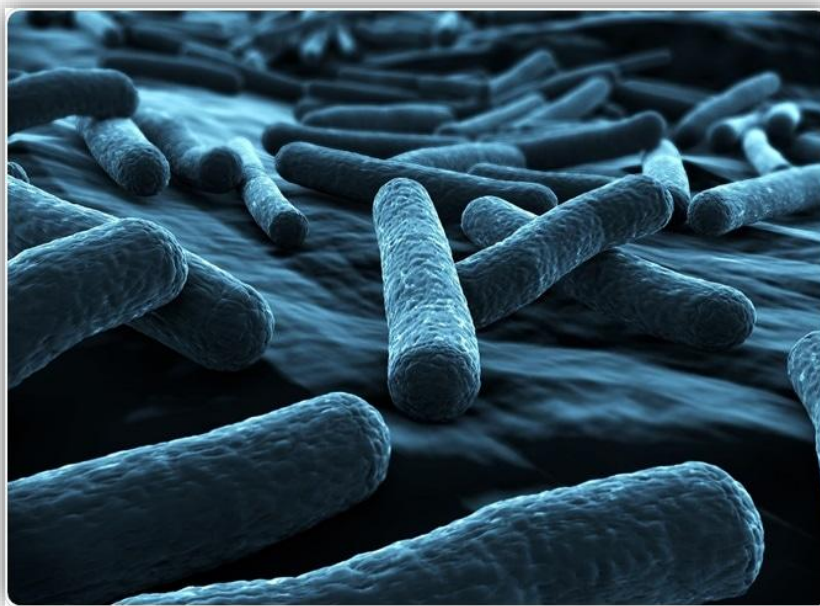


Διπλωματική Εργασία

**Αξιολόγηση μεθοδολογιών για τη μελέτη
της παθογονικότητας των βακτηρίων**



Λιονταρής Αντρέας του Χρυσόστομου

ΛΑΡΙΣΑ 2025

Θέμα Διπλωματικής Εργασίας

«Αξιολόγηση μεθοδολογιών για τη μελέτη
της παθογονικότητας των βακτηρίων»

Λιονταρής Αντρέας

Diploma Thesis

“Evaluation of methodologies for studying bacterial pathogenicity”

Liontaris Antreas

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Κωνσταντίνος Παπαγιαννίτσας (επιβλέπων), Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Μικροβιολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δημήτριος Καρπούζας (συνεπιβλέπων), Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και
Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

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

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
Ευχαριστίες	5
Περίληψη	6
Abstract	7
1. Εισαγωγή	8
1.1. Βακτήρια	8
1.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	9
1.2.1. Γενικά χαρακτηριστικά	9
1.2.2. Μορφολογία	9
1.2.3. Κλινική σημασία	10
1.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
1.3.1. Γενικά χαρακτηριστικά	10
1.3.2. Ονοματολογία	11
1.3.3. Μορφολογία	11
1.3.4. Κλινική σημασία	12
1.4. <i>Escherichia coli</i>	13
1.4.1. Γενικά χαρακτηριστικά	13
1.4.2. Ονοματολογία	13
1.4.3. Μορφολογία	13
1.4.4. Κλινική σημασία	14
1.5. Καλλιέργεια	15
1.6. Παθογονικότητα και μηχανισμοί της	16
1.6.1. Παθογονικότητα	16
1.6.2. Μηχανισμοί βακτηριακής παθογένειας	16
1.6.3. Παραγωγή τοξινών	17
1.6.4. Προσκόλληση στα κύτταρα του ξενιστή	18
	3

1.6.5. Αποφυγή του ανοσοποιητικού συστήματος	18
1.6.6. Συστήματα έκκρισης	19
1.6.7. Σχηματισμός βιοφίλμ	20
1.6.8. Συστήματα επικοινωνίας για τον σχηματισμό ενός βακτηριακού βιοφίλμ (Μηχανισμός ανίχνευσης απαρτίας στο <i>P. aeruginosa</i>)	21
1.6.9. Εξωκυτταρικοί πολυσακχαρίτες (EPS)	22
1.6.10. Υδροφοβικότητα κυτταρικής επιφάνειας (CSH)	23
1.6.10.1. Μεμβρανικά κυστίδια (MVs)	23
2.Σκοπός	24
3.Υλικά και Μέθοδοι	25
3.1. Λήψη δειγμάτων	25
3.2. Καλλιέργεια κλινικών δειγμάτων	27
3.3. Ανάλυση της μεθόδου εκχύλισης και ποσοτικοποίησης εξωπολυσακχαριτών (EPS)	27
3.4. Ανάλυση της μεθόδου Microbial Adhesion to Hydrocarbon (MATH)	29
3.5. Παραγωγή λοιπών υλικών και αντιδραστηρίων	29
3.5.1. LB Broth	29
3.5.2. Φαινόλη 5%	30
4.Αποτελέσματα	31
4.1. Αποτελέσματα μεθόδου εκχύλισης και ποσοτικοποίησης εξωπολυσακχαριτών (EPS)	31
4.2. Αποτελέσματα μεθόδου Microbial Adhesion to Hydrocarbon (MATH)	34
4.3. Συσχέτιση ανάμεσα στην αυξημένη παραγωγή EPS και στην αυξημένη υδροφοβικότητα	37
4.4. Συσχέτιση ανάμεσα στην αυξημένη παραγωγή EPS, στην αυξημένη υδροφοβικότητα και στην παραγωγή βιοφίλμ	40
5.Συμπεράσματα – Συζήτηση	41
6.Βιβλιογραφία	46

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κατά το διάστημα Φεβρουαρίου – Ιουλίου 2025. Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον επιβλέποντα μου, Επίκουρο Καθηγητή Ιατρικής Μικροβιολογίας κ. Κωνσταντίνο Παπαγιαννίτη, για την πολύτιμη καθοδήγηση, την αδιάκοπη υποστήριξη και τις χρήσιμες συμβουλές του σε όλα τα στάδια της εργασίας. Η συμβολή του υπήρξε καθοριστική τόσο για την ολοκλήρωση της μελέτης όσο και για τη δική μου επιστημονική εξέλιξη.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας κ. Δημήτριο Καρπούζα, συνεπιβλέποντα της εργασίας, για τις ουσιαστικές παρατηρήσεις και τη στήριξή του. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον Επίκουρο Καθηγητή Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας και Γονιδιωματικής κ. Σωτήριο Βασιλειάδη, η συμβολή του οποίου υπήρξε σημαντική για την διεξαγωγή της παρούσας πτυχιακής εργασίας.

Η παραμονή μου στο εργαστήριο αποτέλεσε μια εμπειρία γεμάτη συνεργασία, δημιουργικότητα και θετική διάθεση, στοιχεία που συνέβαλαν ουσιαστικά στην πρόοδο της εργασίας και θα αποτελέσουν πολύτιμα εφόδια για τις μελλοντικές μου συνεργασίες.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εστιάζει στη μελέτη της παραγωγής εξωπολυσακχαριτών (EPS) και της υδροφοβικότητας της κυτταρικής επιφάνειας (CSH) σε κλινικά στελέχη τριών σημαντικών Gram-αρνητικών παθογόνων βακτηρίων: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* και *Pseudomonas aeruginosa*. Και οι δύο παράμετροι σχετίζονται άμεσα με τη δημιουργία βιοφίλμ, αλλά και με την παθογενετική ικανότητα των βακτηρίων, ωστόσο η μεταξύ τους σχέση παραμένει ελλιπώς κατανοητή. Στόχος της μελέτης ήταν η αξιολόγηση πιθανής συσχέτισης μεταξύ παραγωγής EPS και CSH, προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο ρόλος τους στην ενίσχυση της δράσης του λοιμογόνου.

Η παραγωγή EPS εκτιμήθηκε με φασματοφωτομετρική μέτρηση απορρόφησης, ενώ η υδροφοβικότητα καθορίστηκε με τη μέθοδο MATH (Microbial Adhesion to Hydrocarbons) χρησιμοποιώντας τολουόλιο ως διαλύτη. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται με διαγράμματα διασποράς (scatter plots) και η μεταξύ τους σχέση εξετάστηκε με τον υπολογισμό του συντελεστή συσχέτισης Pearson.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε διαφοροποίηση ανάμεσα στα είδη. Για την *K. pneumoniae* η συσχέτιση ήταν ουσιαστικά ανύπαρκτη ($r = 0.082$), γεγονός που υποδηλώνει ότι η αυξημένη παραγωγή EPS δεν συνεπάγεται με αύξηση της CSH. Για την *E. coli* παρατηρήθηκε ασθενής θετική συσχέτιση ($r = 0.146$), ενώ για την *P. aeruginosa* η σχέση ήταν πιο εμφανής, αν και όχι ισχυρή ($r = 0.314$). Συνολικά, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η παραγωγή EPS και η υδροφοβικότητα της κυτταρικής επιφάνειας αποτελούν δύο κρίσιμα αλλά όχι συνδεδεμένα χαρακτηριστικά παθογένειας. Η πρώτη συμβάλλει κυρίως στη δομή και στην προστασία του βιοφίλμ, ενώ η δεύτερη σχετίζεται με μηχανισμούς πρόσφυσης που ρυθμίζονται από διαφορετικούς μοριακούς και φαινοτυπικούς παράγοντες.

Τα συμπεράσματα αυτά αναδεικνύουν την πολυπαραγοντική φύση της παθογονικότητας των Gram-αρνητικών βακτηρίων και υπογραμμίζουν τη σημασία περαιτέρω μελετών που θα εστιάσουν στη χημική σύσταση των EPS, στους γενετικούς μηχανισμούς που διέπουν την παραγωγή τους, καθώς και στη λεπτομερή κατανόηση των παραγόντων που καθορίζουν την υδροφοβικότητα. Η σε βάθος διερεύνηση αυτών των παραμέτρων μπορεί να συμβάλει στη βελτίωση στρατηγικών πρόληψης και θεραπείας λοιμώξεων που οφείλονται σε πολυανθεκτικά παθογόνα.

ABSTRACT

This thesis focuses on the investigation of extracellular polysaccharide (EPS) production and cell surface hydrophobicity (CSH) in clinical isolates of three major Gram-negative pathogenic bacteria: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. Both factors are directly associated with biofilm formation and, consequently, with bacterial pathogenicity. However, the interplay between EPS production and hydrophobicity remains insufficiently understood. The aim of this study was to evaluate the possible correlation between EPS production and CSH, in order to clarify their role in enhancing bacterial virulence.

EPS production was quantified spectrophotometrically, while CSH was determined using the MATH (Microbial Adhesion to Hydrocarbons) method with toluene as the hydrocarbon phase. The results were visualized through scatter plots and statistically analyzed using Pearson's correlation coefficient.

The analysis revealed differences among the species. In *K. pneumoniae*, virtually no correlation was observed ($r = 0.082$), suggesting that increased EPS production does not necessarily lead to higher hydrophobicity. In *E. coli*, a weak positive correlation was recorded ($r = 0.146$), while in *P. aeruginosa* the correlation was slightly stronger though still not high ($r = 0.314$). Overall, the findings indicate that EPS production and CSH are two critical but largely independent traits of pathogenicity. EPS mainly contributes to biofilm structure and protection, whereas CSH reflects adhesion mechanisms regulated by distinct molecular and phenotypic factors.

These results highlight the multifactorial nature of Gram-negative bacterial pathogenicity and emphasize the need for further research focusing on the chemical composition of EPS, the genetic mechanisms underlying their production, and the determinants of hydrophobicity. A deeper understanding of these factors could contribute to the development of improved strategies for the prevention and treatment of infections caused by multidrug-resistant pathogens.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Βακτήρια

Τα μικρόβια είναι τόσο μικροσκοπικά που δεν φαίνονται με γυμνό μάτι, όμως τρισεκατομμύρια από αυτά επηρεάζουν την υγεία μας, είτε προκαλώντας ασθένειες είτε ενισχύοντας την άμυνα μας. Ανάμεσα σε όλα, τα πιο πολυάριθμα είναι τα βακτήρια. Αυτοί οι μονοκύτταροι οργανισμοί βρίσκονται κυριολεκτικά παντού: στο έδαφος, βαθιά στο γήινο φλοιό, σε περιβάλλοντα με ακραίες συνθήκες όπως θερμές πηγές με οξύ ή περιοχές με ραδιενεργά απόβλητα. Δεν ζουν μόνο γύρω μας, αλλά και μέσα μας, ως μέρος της φυσικής μας χλωρίδας.

Τα βακτήρια εμφανίζουν τεράστια ποικιλία σε σχήμα και μέγεθος. Συνήθως έχουν μήκος από 0,5 έως 5μm και το σχήμα τους ποικίλλει: μπορεί να είναι σφαιρικά (κόκκοι), ραβδόμορφα (βάκιλοι), κυρτά, ελικοειδή ή πολύ σπειροειδή. Εκτός από τη μορφολογική τους ποικιλομορφία, τα βακτήρια διαφέρουν σημαντικά και ως προς τον μεταβολισμό τους. Ανάλογα με το πώς αποκτούν ενέργεια και άνθρακα, διακρίνονται σε διάφορες ομάδες. Φωτοτροφικά βακτήρια αντλούν ενέργεια από το φως μέσω φωτοσύνθεσης. Άλλα είναι χημειοτροφικά και παίρνουν ενέργεια από την οξείδωση χημικών ουσιών, χρησιμοποιώντας ανόργανες (λιθότροφα) ή οργανικές (οργανότροφα) ενώσεις.

Σε ό,τι αφορά την πηγή άνθρακα, κάποια βακτήρια είναι ετερότροφα, δηλαδή χρειάζονται οργανικές ουσίες από το περιβάλλον, ενώ άλλα, όπως τα κυανοβακτήρια (γνωστά και ως μπλε-πράσινα φύκη) είναι αυτότροφα και «χτίζουν» το σώμα τους από το διοξείδιο του άνθρακα. Υπάρχουν επίσης εξειδικευμένα βακτήρια, τα μεθανότροφα, που χρησιμοποιούν το μεθάνιο τόσο ως καύσιμο όσο και ως πηγή άνθρακα.

Μία από τις βασικές μεθόδους ταξινόμησης των βακτηρίων είναι η χρώση κατά Gram, η οποία διαχωρίζει τα βακτήρια σε δύο κύριες ομάδες: τα Gram-θετικά και τα Gram-αρνητικά. Τα Gram-θετικά βακτήρια διαθέτουν ένα παχύ στρώμα πεπτιδογλυκάνης στο κυτταρικό τους τοίχωμα. Η απλή αυτή δομή τους τα κατατάσσει στην κατηγορία των «μονόδερμων». Αντίθετα, τα Gram-αρνητικά βακτήρια, όπως το *Escherichia coli*, *Klebsiella* και *Pseudomonas aeruginosa*, έχουν πιο πολύπλοκη κυτταρική δομή. Το λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης τους περιβάλλεται από μια εξωτερική μεμβράνη πλούσια σε λιποπολυσακχαρίτες, γεγονός που τα καθιστά «δίδερμα».

Τα Gram-αρνητικά βακτήρια θεωρούνται γενικά πιο επικίνδυνα, καθώς είναι πιο ανθεκτικά στην άμυνα του ανθρώπινου οργανισμού και στην δράση των αντιβιοτικών. Διαθέτουν εξωτερική μεμβράνη που λειτουργεί ως φυσικό φράγμα και έχουν ειδικές αντλίες που απομακρύνουν τα φάρμακα από το εσωτερικό τους, καθώς και ένζυμα όπως β-λακταμάσες που εξουδετερώνουν πολλές κοινές αντιβιοτικές ουσίες. Επιπλέον, έχουν τη δυνατότητα να σχηματίζουν βιοφίλμ, κάτι που τα προστατεύει ακόμη περισσότερο από την θεραπευτική παρέμβαση, και να μεταβάλλουν τα μόρια στην επιφάνειά τους, αποφεύγοντας έτσι την ανίχνευση από το ανοσοποιητικό σύστημα. Το μεγαλύτερο πρόβλημα όμως που έχουν, είναι η τάση να αναπτύσσουν πολυανθεκτικότητα, με αποτέλεσμα πολλά αντιβιοτικά να μην είναι πλέον αποτελεσματικά στην αντιμετώπισή τους (Soní, J. et al, 2024)

1.2. *Klebsiella pneumoniae*

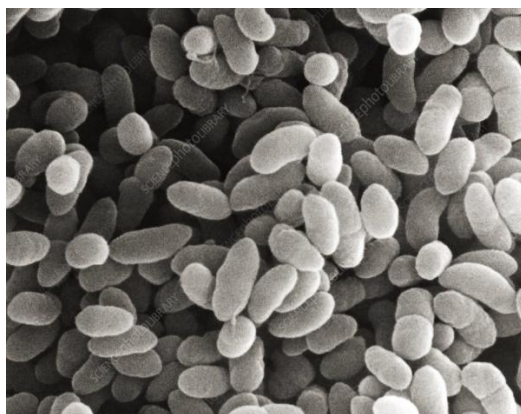
1.2.1. Γενικά χαρακτηριστικά

Τα βακτήρια *Klebsiella* ζουν σε πολλά διαφορετικά περιβάλλοντα και συναντώνται φυσιολογικά στον ανθρώπινο οργανισμό, κυρίως στο έντερο, στο στόμα και στο ρινοφάρυγγα. Ορισμένα είδη, όπως το *K. pneumoniae*, προκαλούν συχνά ευκαιριακές λοιμώξεις, με το λεγόμενο σύμπλεγμα *K. pneumoniae* να είναι το πιο επιβαρυντικό για την υγεία. Αν και άλλα είδη, όπως *K. oxytoca*, ήταν σπανιότερα στο παρελθόν, πλέον εμφανίζονται πιο συχνά.

Η αυξημένη ικανότητα τους να προκαλεί λοιμώξεις ίσως να οφείλεται στα χαρακτηριστικά όπως η αντοχή στα αντιβιοτικά, η ανταγωνιστικότητα με άλλα βακτήρια και η ικανότητα χρήσης γενετικού υλικού. Το *K. pneumoniae* ξεχωρίζει για τη μεγάλη γενετική ποικιλία του και τη συνύπαρξη λίγων, αλλά ιδιαίτερα επιτυχημένων κλωνικών γενετικών σειρών. Αυτοί οι κλώνοι ανήκουν κυρίως σε δύο ομάδες: πολυανθεκτικοί ή υπερμολυσματικοί (Gonzalez-Ferrer, S. et al, 2021).

1.2.2. Μορφολογία

Τα βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Klebsiella* είναι Gram-αρνητικά και έχουν ραβδόμορφο σχήμα. Ως επί το πλείστον είναι μη κινητά και βρίσκονται εντός μιας πολυσακχαριδικής κάψουλας. Το μέγεθος τους μπορεί να κυμαίνεται από 0,3-1 μm σε διάμετρο και 0,6-6 μm σε μήκος. Τα βακτήρια αυτά βρίσκονται είτε μόνα τους, είτε σε ζεύγη ή μικρές αλυσίδες. Το γονιδίωμα του περιλαμβάνει 5 000 - 6 000 γονίδια, ενώ το πανγονιδίωμα ξεπερνά τα 100 000. Η ποικιλία των βοηθητικών γονιδίων διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις πληροφορίες που μπορούν να δώσουν για το βακτήριο γενικά αλλά και για την παθογένεια του (Gonzalez-Ferrer, S. et al, 2021).



Εικόνα 1: *Klebsiella pneumoniae* εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM)

(sciencephotolibrary.com)

1.2.3. Κλινική σημασία

Η *Klebsiella* και ειδικότερα η *Klebsiella pneumoniae*, αποτελούσε τη συχνότερη αιτία σποραδικών πνευμονικών λοιμώξεων μέχρι τα μέσα του 20^{ου} αιώνα όπου και άρχισε η ανεξέλεγκτη χρήση των αντιβιοτικών. Ο χαρακτηρισμός της έγινε το 1882, όταν απομονώθηκε από πνευμονικά δείγματα ασθενών που κατέληγαν από πνευμονία (Ko, W.C., 2002). Τα τελευταία χρόνια, η εξάπλωση της *K. pneumoniae* εκτός νοσοκομείων έχει περιοριστεί αρκετά, ωστόσο παραμένει σοβαρός κίνδυνος για ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις. Αν και δεν μεταδίδεται αερογενώς, οι ασθενείς που φέρουν αναπνευστήρες, καθετήρες ή έχουν ανοιχτά τραύματα είναι ιδιαίτερα ευάλωτοι. Διάφορες σοβαρές παθήσεις μπορούν να προκληθούν από το βακτήριο αυτό, όπως βρογχοπνευμονία, λοιμώξεις του ουροποιητικού, μηνιγγίτιδα, σηψαιμία, αποστήματα στο ήπαρ και πιο σπάνια διάρροια. Ορισμένα υποείδη, όπως τα *ozaenae* και *rhinoscleromatis*, σχετίζονται με ατροφική ρινίτιδα και ρινοσκλήρωμα. Τα συμπτώματα διαφέρουν ανάλογα με τη μορφή της λοίμωξης. Για παράδειγμα, η μηνιγγίτιδα επιφέρει σύγχυση και φωτοφοβία, η σηψαιμία επιφέρει φαγούρα και η πνευμονία επιφέρει βήχα, όμως σχεδόν πάντα υπάρχει υψηλός πυρετός. Γενικότερα, οι πνευμονικές λοιμώξεις θεωρούνται οι πιο επικίνδυνες, λόγω του υψηλού ποσοστού θνησιμότητας που παρουσιάζουν (Clegg, S. and Murphy, C. N., 2016). Σε φυσιολογικές περιπτώσεις, η αντιμετώπιση της λοίμωξης βασίζεται στη χορήγηση αντιβιοτικών, κυρίως κεφαλοσπορινών δεύτερης και τρίτης γενιάς, τετρακυκλινών και εναλλακτικών αμινογλυκοσιδών ή αμπικιλλίνης. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί ραγδαία αύξηση πολυανθεκτικών στελεχών, καθιστώντας τα περισσότερα από τα συνήθη φάρμακα αναποτελεσματικά. Αυτά τα ανθεκτικά στελέχη είναι ιδιαίτερα επιρρεπή στην πρόσληψη πλασμιδίων ανθεκτικότητας, τα οποία φέρουν γονίδια που προσδίδουν αντοχή σε πλήθος αντιβιοτικών. Έτσι, ως αποτέλεσμα δημιουργείται μια κατάσταση σχεδόν αδιοδής θεραπείας, όπου το μικρόβιο λειτουργεί σαν ένα «θωρακισμένο» παθογόνο, δηλαδή δεν καταστέλλει απλώς το ανοσοποιητικό, αλλά παρακάμπτει τους φυσικούς αμυντικούς μηχανισμούς και επιβιώνει παρά την φαρμακευτική αγωγή (Paterson, D.L. et al, 2004).

1.3. *Pseudomonas aeruginosa*

1.3.1. Γενικά χαρακτηριστικά

Ο Gessard, το 1882 απομόνωσε τη *Pseudomona* η οποία πλέον αποτελεί το βασικότερο εκπρόσωπο των αζυμοτικών βακτηρίων. Πάνω από 160 είδη ψευδομονάδων έχουν διαχωριστεί και ταυτοποιηθεί μέχρι και σήμερα, με την Κλινική Μικροβιολογία να στρέφει το ενδιαφέρον της σε ορισμένες από αυτές οι οποίες είναι είτε αποικιστές του ανθρώπινου σώματος, είτε καθαροί παθογόνοι παράγοντες, είτε ως συμπαράγοντες νόσων (Κουμεντάκου Ε., 1974). Η *P. aeruginosa* είναι ένα Gram-αρνητικό, προαιρετικά αερόβιο βακτήριο, το οποίο είναι υπεύθυνο για το 57% όλων των νοσοκομειακών λοιμώξεων. Προσβάλλει κυρίως ανοσοκατεσταλμένα άτομα που πάσχουν από κυστική ίνωση και εγκαύματα (Rajkumari J. et al, 2018).

Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει την επιστημονική ταξινόμηση της *P. aeruginosa* (Πίνακας 1).

Επιστημονική ταξινόμηση <i>P. aeruginosa</i>	
Βασίλειο	Bacteria
Φύλο	Proteobacteria
Κατηγορία	Gammaproteobacteria
Τάξη	Pseudomonadales
Οικογένεια	Pseudomonadaceae
Γένος	<i>Pseudomonas</i>
Είδος	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Συνώνυμο	<i>Bacterium aeruginosum</i>

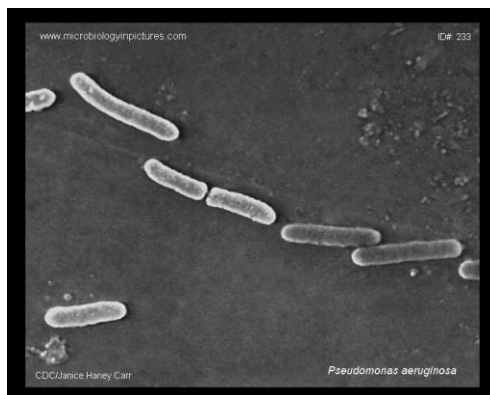
Πίνακας 1: Ταξινόμηση του είδους *P. aeruginosa* (NCBI taxonomy, 2017)

1.3.2. Ονοματολογία

Το βακτήριο *P. aeruginosa* μπορεί κανείς να το συναντήσει με τις ονομασίες «βακτήριο του κυανού» και «ψευδομονάς η πυοκυανική» καθώς αυτό το χαρακτηριστικό χρώμα που παίρνουν οι αποικίες οφείλεται στις χρωστικές πυοκυανίνη (pyocyanine) και πυοβερδίνη (pyoverdine) οι οποίες παράγονται συνδιαστικά (Brown, 1956). Η ονομασία του βακτηρίου αποτελείται από μια σύνθετη λέξη (pseudes + monas), η οποία έχει ελληνική ρίζα (ψευδές + μονάς [μονάδα]) και η λέξη *aeruginosa* σημαίνει «σκουριά χαλκού», το οποίο προκύπτει από το χρώμα των αποικιών που προσομοιάζει με αυτό της σκουριάς του χαλκού και έχει λατινική προέλευση (Hendry, 2012).

1.3.3. Μορφολογία

Τα βακτήρια του είδους αυτού, έχουν ραβδοειδές σώμα το οποίο είναι ελαφρώς λυγισμένο. Το μήκος τους κυμαίνεται από 0,2-0,6 μm και είναι διατεταγμένα είτε σε ζεύγη, είτε το κάθε ένα μόνο του. Ακόμη, έχουν πολικά μαστίγια που βοηθούν στην κίνηση. Τέλος, ένα κυκλικό χρωμόσωμα μήκους 5,5-7 Mbp και μια πληθώρα πλασμιδίων αποτελούν το γονιδίωμα τους. Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι παρόμοια για όλες τις ψευδομονάδες (Reimer L. et al, 2019).



Εικόνα 2: *P. aeruginosa* εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM)

(microbiologypictures.com)

1.3.4. Κλινική σημασία

Η Κλινική Μικροβιολογία δείχνει έντονο ενδιαφέρον για την *P. aeruginosa* επειδή είναι ένας από τους βασικούς παθογόνους μικροοργανισμούς που προκαλούν σοβαρές λοιμώξεις, κυρίως στο αίμα, στους πνεύμονες και σε άλλα σημεία του σώματος, ιδιαίτερα μετά από χειρουργικές επεμβάσεις. Οι περισσότερες από τις λοιμώξεις, εμφανίζονται σε νοσοκομειακό περιβάλλον και πλήττουν άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα, ενώ είναι σπάνιες σε υγιείς, μη νοσηλευόμενους. Ιδιαίτερα ευάλωτοι είναι οι ασθενείς με κυστική ίνωση, χρόνια αναπνευστικά προβλήματα ή ανοιχτά τραύματα.

Η μετάδοση του βακτηρίου γίνεται κυρίως μέσω μολυσμένων ιατρικών εργαλείων, όπως καθετήρες, αναπνευστήρες και ενδοσκόπια, ή ακόμα και μέσω του προσωπικού του νοσοκομείου. Στατιστικά στοιχεία δείχνουν τη σοβαρότητα του προβλήματος, καθώς έρευνες έχουν δείξει ότι το βακτήριο αυτό ευθύνεται για το 10% των λοιμώξεων από Gram-αρνητικά βακτήρια, ενώ στις Ηνωμένες Πολιτείες έχουν ανιχνευθεί σε σχεδόν στους μισούς ασθενείς που πάσχουν από κυστική ίνωση.

Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της *P. aeruginosa* είναι η φυσική της ανθεκτικότητα σε πολλά αντιβιοτικά, κάτι που κάνει τη θεραπεία των λοιμώξεων αυτών δύσκολη. Το βακτήριο παρουσιάζει μεταβολική ευελιξία, δηλαδή μπορεί να προσαρμόσει τον μεταβολισμό του ανάλογα με τις συνθήκες του περιβάλλοντος. Επιπλέον, σε ασθενείς που είχαν προσβληθεί από ένα συγκεκριμένο στέλεχος, αργότερα ανιχνεύτηκαν νέα στελέχη με διαφορετικά γενετικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά, δείχνοντας πως το βακτήριο μπορεί να εξελιχθεί μέσα στον ξενιστή και να αποκτήσει νέες ιδιότητες όπως αυξημένη αντοχή στα φάρμακα. Όλα αυτά καθιστούν την *P. aeruginosa* αντικείμενο εντατικής επιστημονικής μελέτης εδώ και πολλά χρόνια (Jurado-Martin, 2021).

Η υψηλή θνησιμότητα που σχετίζεται με τη λοίμωξη από το βακτήριο οφείλεται σε τέσσερις βασικούς λόγους (Carmelli, 1999) (Zumla, A., 2010):

- Το βακτήριο σχηματίζει βιοφίλμ, δηλαδή ένα προστατευτικό περίβλημα από πολυσακχαρίτες, το οποίο βοηθά να αποφύγει την αναγνώριση και την καταστροφή από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή.
- Παράγει μια σειρά από ένζυμα και τοξίνες, τα οποία θα πρέπει να προσβάλλει αποτελεσματικά τον οργανισμό και να εγκαθιστά τη λοίμωξη.
- Πολλοί ασθενείς έχουν ήδη εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα, που μειώνει την ικανότητα του οργανισμού να καταπολεμήσει τη μόλυνση.
- Τέλος, τα νοσοκομειακά στελέχη του βακτηρίου παρουσιάζουν συχνά αυξημένη αντοχή στα αντιβιοτικά, κάτι που δυσκολεύει ακόμα περισσότερο τη θεραπεία.

1.4. *Escherichia coli*

1.4.1. Γενικά χαρακτηριστικά

Το *E. coli* είναι ένας Gram-αρνητικός βάκιλος που φυσιολογικά ζει στο έντερο του ανθρώπου, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να προκαλέσει σοβαρές λοιμώξεις τόσο στο έντερο όσο και σε άλλα σημεία του σώματος. Υπάρχουν εκατοντάδες διαφορετικά στελέχη του *E. coli*, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν ποικιλία ασθενειών, όπως μια ήπια γαστρεντερίτιδα που υποχωρεί μόνη της, μέχρι σοβαρές καταστάσεις όπως νεφρική ανεπάρκεια και σηπτικό σοκ. Η παθογένεια του σχετίζεται με την ικανότητα του να ξεφεύγει από την ανοσολογική άμυνα του ανθρώπινου οργανισμού και να αναπτύσσει αντίσταση σε πολλά αντιβιοτικά. Αποτελεί μία από τις βασικές αιτίες νοσοκομειακών λοιμώξεων, όπως οι ουρολοιμώξεις από καθετήρες και η πνευμονία που σχετίζεται με τον αναπνευστήρα. Ακόμη, μπορεί να εντοπιστεί στο περιβάλλον όπως στο χώμα, στο νερό, σε λαχανικά, αλλά και σε κρέας που δεν έχει ψηθεί επαρκώς και να προκαλέσουν εντερική λοίμωξη στον άνθρωπο όταν καταναλωθούν (Mueller, M., & Tainter, C. R., 2023).

1.4.2. Ονοματολογία

Ο Theodor Escherich ήταν ο πρώτος που κατάφερε να απομονώσει και να περιγράψει το βακτήριο *E. coli* το 1885. Εκείνη την εποχή στην Ευρώπη, η βρεφική διάρροια αποτελούσε την κύρια αιτία θανάτου στα νεογνά, κάτι που ώθησε τον Escherich να μελετήσει τον ρόλο του συγκεκριμένου μικροοργανισμού στις εντερικές παθήσεις και στη διαδικασία της πέψης. Αρχικά το βακτήριο το είχε ονομάσει “*Bacterium coli commune*” καθώς είχε παρατηρήσει ότι αναπτυσσόταν έντονα και σε απλά θρεπτικά μέσα. Το 1919 όμως, το βακτήριο αυτό μετονομάστηκε σε *Escherichia coli*, προς τιμήν του ίδιου του Escherich (Chetri, S., 2025).

1.4.3. Μορφολογία

Το *E. coli* ανήκει στα Gram-αρνητικά βακτήρια, τα οποία διαθέτουν ένα χαρακτηριστικό περίβλημα που αποτελείται από τρεις κύριες στιβάδες: την εσωτερική κυτταροπλάσματική μεμβράνη, το κυτταρικό τοίχωμα από την πεπτιδογλυκάνη και την εξωτερική μεμβράνη. Η εξωτερική μεμβράνη περιλαμβάνει διπλοστιβάδα λιπιδίων, ειδικές πρωτεΐνες και λιποσακχαρίτες (LPS), οι οποίοι μπορούν να προκαλέσουν τοξική αντίδραση αν το κύτταρο καταστραφεί. Τα παθογόνα στελέχη του *E. coli* διαθέτουν διαφορετικούς παράγοντες παθογένειας, οι οποίοι είναι συνήθως κωδικοποιημένοι σε πλασμίδια, τρανσποζόνια ή ενσωματωμένους βακτηριοφάγους. Δεν σχηματίζουν σπόρια, φέρουν μαστίγια που τους προσδίδουν κινητικότητα και μπορούν να επιβιώσουν σε περιβάλλοντα με ή χωρίς οξυγόνο, είναι δηλαδή προαιρετικά αναερόβιοι οργανισμοί (Mueller, M., & Tainter, C. R., 2023).

1.4.4. Κλινική σημασία

Η κλινική σημασία του *E. coli* είναι πολύπλευρη και περιλαμβάνει τόσο τη φυσιολογική του παρουσία στον ανθρώπινο οργανισμό όσο και τον παθογόνο του ρόλο σε πολλές λοιμώξεις.

Από τη μία πλευρά, το *E. coli* αποτελεί φυσιολογικό μικρόβιο του παχέος εντέρου στους ανθρώπους και στα θερμόαιμα ζώα, συμβάλλοντας στην πέψη και στην αποτροπή της εγκατάστασης άλλων παθογόνων. Ωστόσο, υπό συγκεκριμένες συνθήκες, ορισμένα στελέχη μπορούν να αποκτήσουν παθογόνες ιδιότητες και να προκαλέσουν σοβαρές λοιμώξεις (Allocati, N. et al, 2013).

Οι παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με το *E. coli* διακρίνονται σε εντερικές και εξωεντερικές λοιμώξεις όπως φαίνεται και στον Πίνακα 2. Οι εντερικές λοιμώξεις οφείλονται σε πέντε διαφορετικούς τύπους του βακτηρίου, οι οποίοι αναγνωρίζονται από ειδικά αντιγόνα που φέρουν το αντιγόνο O (που βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη του κυττάρου) και το αντιγόνο H (που σχετίζεται με τα μαστίγια του βακτηρίου). Οι εξωεντερικές λοιμώξεις από την άλλη, προκαλούνται όταν το *E. coli*, που φυσιολογικά ζει στο έντερο, μετακινείται σε άλλα σημεία του σώματος ή μεταδίδεται σε νοσοκομειακά περιβάλλοντα. Μπορεί να προκαλέσει ουρολοιμώξεις, λοιμώξεις στην κοιλιά ή τη λεκάνη, πνευμονία, σηψαιμία και μηνιγγίτιδα, ιδίως σε νοσηλευόμενους ή ευάλωτους πληθυσμούς (Mueller, M., & Tainter, C. R., 2023).

Παθολογικός τύπος <i>E. coli</i>	Πλήρης ονομασία	Τύπος ασθένειας	Κύρια συμπτώματα/επιπτώσεις	Οδός μετάδοσης
<i>ETEC</i>	Εντεροτοξιγόνο <i>E. coli</i>	Εντερική	Υδαρής διάρροια, αφυδάτωση	Μολυσμένα τρόφιμα και νερό
<i>EPEC</i>	Εντεροπαθογόνο <i>E. coli</i>	Εντερική	Διάρροια σε βρέφη και μικρά παιδιά	Από στόμα ή άτομο σε άτομο
<i>EKAE</i>	Εντεροσυσσωρευτικό <i>E. coli</i>	Εντερική	Οξεία και χρόνια διάρροια	Μολυσμένα τρόφιμα και νερό
<i>EHEC/STEC</i>	Εντεροαιμορραγικό/ <i>E. coli</i> που παράγει σιγκατοξίνη	Εντερική	Αιματηρή διάρροια, HUS (νεφρική ανεπάρκεια)	Ωμό/υπομαγειρεμένο βοδινό, φρούτα, λαχανικά
<i>EIEK</i>	Εντεροδιηθητικό <i>E. coli</i>	Εντερική	Διάρροια, πυρετός, κοιλιακός πόνος	Μολυσμένα τρόφιμα και νερό
<i>UPEC</i>	Ουροπαθογόνο <i>E. coli</i>	Εξωεντερική	Ουρολοιμώξεις (κυστίτιδα, πυελονεφρίτιδα)	Ανάβαση από την ουρήθρα
<i>NMEC</i>	Νεογνική μηνιγγίτιδα <i>E. coli</i>	Εξωεντερική	Μηνιγγίτιδα σε νεογνά	Περιγεννητική μετάδοση
<i>APEC</i>	Παθογόνα <i>E. coli</i> των πτηνών	Εξωεντερική (σε πτηνά)	Λοιμώξεις σε πτηνά, πιθανή μετάδοση στον άνθρωπο μέσω τροφής	Μολυσμένα προϊόντα πτηνών

Πίνακας 2: παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με το *E. coli*.

1.5. Καλλιέργεια

Τα βακτήρια και των τριών οικογενειών, μπορούν να καλλιεργηθούν και να αναπτυχθούν σε διάφορα θρεπτικά μέσα σε εργαστηριακή κλίμακα όπως MacConkey agar και Blood agar. Γενικά, η ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης και των τριών βακτηρίων είναι οι 37°C. Καλλιέργεια *E. coli* σε Blood agar δίνει στρογγυλές, με επίπεδη επιφάνεια αποικίες, το μέγεθος των οποίων είναι περίπου 1-2mm και έχουν γκριζωπό χρώμα καθώς και υγρή υφή. Αντίθετα, καλλιέργεια του *K. pneumoniae* στο ίδιο θρεπτικό θα δώσει αποικίες οι οποίες είναι μεγαλύτερες, με βλεννώδεις υφή, θολωτή επιφάνεια και τείνουν να ενωθούν μεταξύ τους. Όταν χρησιμοποιούμε ως θρεπτικό υπόστρωμα το MacConkey, το *E. coli* θα έχει κόκκινες αποικίες λόγω της ικανότητας τους να ζυμώνουν τη λακτόζη, ενώ οι αποικίες του *K. pneumoniae*, που επίσης ζυμώνουν τη λακτόζη, θα εμφανίζονται μεγαλύτερες, βλεννώδεις και έντονα ροζ (Moini, A. S. et al, 2015). Στην περίπτωση του *P. aeruginosa* οι αποικίες του βακτηρίου θα έχουν μεγαλώσει αρκετά και θα φαίνονται θολές, ελαφρώς υπερυψωμένες, με ανοιχτό καφέ χρώμα και ελαφρώς τραχιά άκρα. Το *P. aeruginosa* μπορεί να παράγει μια χρωστική που λέγεται πυοκυανίνη, η οποία βάφει το άγαρ με μπλε-πράσινες αποχρώσεις. Η ποσότητα αυτής της χρωστικής ποικίλλει ανάλογα με το στέλεχος του βακτηρίου. Τέλος, σε πλούσια θρεπτικά μέσα, μπορεί να αναδύεται μια χαρακτηριστική γλυκιά μυρωδιά που μοιάζει με σταφύλι, εξαιτίας μιας χημικής ουσίας που λέγεται 2-αμινοακετοφαινόνη (LaBauve, A. E., & Wargo, M. J., 2012).



Εικόνα 3: καλλιέργεια *K. pneumoniae* σε Blood agar



Εικόνα 4: καλλιέργεια *E. coli* σε Blood agar

(microbiologypictures.com)

1.6. Παθογονικότητα και μηχανισμοί της

1.6.1. Παθογονικότητα

Με τον όρο «παθογονικότητα» αναφερόμαστε στην ικανότητα ενός μικροοργανισμού, όπως ενός βακτηρίου, ιού ή μύκητα, να προκαλέσει νόσο στον ξενιστή του (δηλαδή στον οργανισμό που προσβάλλει, π.χ. τον άνθρωπο). Σχετίζεται με τους μηχανισμούς μέσω των οποίων ένα μικρόβιο εισέρχεται στον οργανισμό, αποφεύγει τις άμυνες του ανοσοποιητικού συστήματος και τελικά προκαλεί βλάβες στους ιστούς του ξενιστή. Αυτοί οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν παραγωγή τοξινών, προσκόλληση σε κύτταρα του ξενιστή, αποφυγή φαγοκυττάρων και άλλες στρατηγικές που προάγουν την εγκατάσταση και τον πολλαπλασιασμό του παθογόνου.

Συχνά, υπάρχει η λάθος εντύπωση πως με τον όρο «παθογονικότητα» εννοούμε και το ποσοστό της έντασης της νόσου που μπορεί να προκληθεί από ένα παθογόνο. Η παθογονικότητα, είναι η ικανότητα ενός μικροοργανισμού να προκαλέσει ή όχι μια νόσο, δηλαδή απαντά στο ερώτημα αν ένας μικροοργανισμός είναι σε θέση να προκαλέσει βλάβη στον ξενιστή ή όχι. Αντίθετα, η λοιμογόνος δύναμη (ή λοιμογόνος ικανότητα) αναφέρεται στον βαθμό ή την ένταση της νόσου που προκαλεί ένας παθογόνος μικροοργανισμός, επομένως απαντά στο ερώτημα πόσο σοβαρή είναι η νόσος που προκαλεί. Η παθογονικότητα είναι ποιοτική έννοια, ενώ η λοιμογόνος δύναμη είναι ποσοτική και μπορεί να κυμαίνεται από χαμηλή έως υψηλή. Με άλλα λόγια, ένας μικροοργανισμός μπορεί να είναι παθογόνος (να προκαλεί νόσο) αλλά να έχει χαμηλή λοιμογόνο δύναμη (να προκαλεί ήπια συμπτώματα), ενώ άλλος να έχει υψηλή λοιμογόνο δύναμη και να προκαλεί σοβαρή ή θανατηφόρα νόσο (Casadeval A., Pirofski L., 1999).

1.6.2. Μηχανισμοί βακτηριακής παθογένειας

Πολλά διαφορετικά βακτήρια που προκαλούν ασθένειες έχει αποδηχθεί ότι χρησιμοποιούν παρόμοιους μηχανισμούς για να μπορέσουν να προσκολληθούν στα κύτταρα του ξενιστή, να διεισδύσουν σε αυτά και να προκαλέσουν βλάβες στους ιστούς. Επιπλέον, έχουν κοινές στρατηγικές για να ξεφεύγουν από την άμυνα του ανοσοποιητικού συστήματος και να εγκαθίστανται επιτυχώς στον οργανισμό προκαλώντας λοίμωξη.

Πολλά από τα κοινά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με τις βακτηριακές λοιμώξεις φαίνεται να οφείλονται στην απόκτηση μεγάλων τμημάτων γονιδίων που σχετίζονται με τη λοιμογόνο δράση, τα οποία πιθανώς προέρχονται από έναν κοινό πρόγονο. Αυτά τα γενετικά τμήματα μπορούν να μεταφερθούν σε άλλα βακτήρια μέσω οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς. Η διαδικασία αυτή συμβάλλει σημαντικά στην εμφάνιση νέων βακτηριακών στελεχών, πολλά από τα οποία εμφανίζουν αντοχή σε πολλαπλά αντιβιοτικά (Wilson, J. W. et al, 2002).

Οι κύριοι μηχανισμοί βακτηριακής παθογένειας είναι οι εξής (Wilson, J. W. et al, 2002):

- Παραγωγή τοξινών: τα παθογόνα βακτήρια συχνά εκκρίνουν τοξίνες που προκαλούν βλάβη στους ιστούς του ξενιστή. Αυτές οι τοξίνες μπορούν να χωριστούν σε δύο ομάδες, τις εξωτοξίνες (παράγονται και εκκρίνονται από το βακτήριο) και τις ενδοτοξίνες

(συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος των Gram-αρνητικών βακτηρίων, π.χ. λιποπολυσακχαρίτες-LPS).

- Προσκόλληση στα κύτταρα του ξενιστή: μέσω ειδικών δομών όπως ινίδια ή επιφανειακές πρωτεΐνες, τα βακτήρια προσκολλώνται σε κύτταρα του ξενιστή, ένα κρίσιμο πρώτο βήμα για την αποικιοποίηση.
- Αποφυγή του ανοσοποιητικού συστήματος: αυτό μπορεί να γίνει μέσω τριών τρόπων. Ο πρώτος τρόπος είναι με την παρουσία κάψας η οποία εμποδίζει την φαγοκυττάρωση. Ο δεύτερος τρόπος, είναι με την παραγωγή πρωτεϊνών που παρεμποδίζουν την φαγοκυττάρωση ή την ενεργοποίηση του συμπληρώματος και ο τρίτος τρόπος είναι με την μεταβλητότητα των αντιγόνων (π.χ. αλλαγή επιφανειακών πρωτεϊνών για να αποφευχθεί η ανοσολογική αναγνώριση).
- Διείσδυση και εξάπλωση στους ιστούς: πολλά βακτήρια παράγουν ένζυμα (π.χ. κολλαγενάση) που διευκολύνουν τη διείσδυση στους ιστούς και τη διασπορά στο σώμα.
- Συστήματα έκκρισης: ιδιαίτερα στα Gram-αρνητικά βακτήρια, συστήματα όπως το σύστημα έκκρισης τύπου III (Type III secretion system, T3SS) βοηθά για την άμεση έγχυση πρωτεϊνών-παραγόντων παθογένειας μέσα στα κύτταρα στόχους του ξενιστή.
- Βιοφίλμς (biofilms): η δημιουργία τους επιτρέπει την προστασία από τα αντιβιοτικά και το ανοσοποιητικό σύστημα, καθιστώντας τις λοιμώξεις πιο χρόνιες και δύσκολες στην αντιμετώπιση.

1.6.3. Παραγωγή τοξινών

Οι βακτηριακές τοξίνες χωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες: τις πρωτεϊνικές τοξίνες (γνωστές και ως εξωτοξίνες) και τις ενδοτοξίνες. Οι εξωτοξίνες είναι πρωτεΐνες που παράγονται και εκκρίνονται από τα βακτήρια, κυρίως μέσω του συστήματος έκκρισης Sec, στο περιβάλλον τους. Αντίθετα, οι ενδοτοξίνες είναι συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων, κυρίως λιποπολυσακχαρίτες (LPS), που απελευθερώνονται από το βακτήριο όταν αυτό καταστραφεί.

Τα βακτήρια που παράγουν τοξίνες προκαλούν βλάβες και συγκεκριμένα συμπτώματα στον ξενιστή μέσω αυτών των ουσιών. Οι πρωτεϊνικές τοξίνες μπορούν να δράσουν τοπικά, στο σημείο που βρίσκονται τα βακτήρια, ή να μεταφερθούν μέσω της κυκλοφορίας του αίματος και να επηρεάσουν άλλους ιστούς ή όργανα.

Αυτές οι τοξίνες έχουν την ικανότητα να διαχέονται στον εξωκυττάριο χώρο και να συνδέονται με ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων. Η δράση τους μπορεί να είναι είτε στην εξωκυτταρική πλευρά των κυττάρων είτε εντός τους, μιας και σε ορισμένες περιπτώσεις εισέρχονται στο εσωτερικό των κυττάρων για να επηρεάσουν συγκεκριμένους ενδοκυτταρικούς στόχους.

Οι βακτηριακές πρωτεϊνικές τοξίνες παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία ως προς τη μοριακή τους μορφή, περιλαμβάνοντας διαφορές στο μέγεθος, τη σειρά των αμινοξέων τους, τη δομή και τον τρόπο με τον οποίο δρουν. Μπορεί να είναι είτε απλές πρωτεΐνες με μία μόνο πολυπεπτιδική

αλυσίδα, είτε πιο σύνθετες ενώσεις που αποτελούνται από περισσότερες πρωτεΐνες ενωμένες μεταξύ τους χωρίς ομοιοπολικούς δεσμούς. Αυτές οι σύνθετες μορφές μπορούν να περιλαμβάνουν δύο, τρεις ή και περισσότερες υπομονάδες.

Το μέγεθός τους ποικίλλει σημαντικά, καθώς μπορεί να είναι από πολύ μικρά πεπτίδια (όπως οι εντεροτοξίνες της *E. coli* που αποτελούνται από μόλις 18-19 αμινοξέα), έως πολύ μεγάλες πρωτεΐνες. Οι απλούστερες μορφές, όπως αυτές της μονής αλυσίδας και οι δυαδικές τοξίνες, παράγονται κυρίως από Gram-θετικά βακτήρια. Αντίθετα, οι πιο περίπλοκες τοξίνες, που αποτελούνται από περισσότερες πρωτεϊνικές μονάδες, απαντώνται συχνότερα σε Gram-αρνητικά βακτήρια (Poroff M. R., 2024).

1.6.4. Προσκόλληση στα κύτταρα του ξενιστή

Η προσκόλληση των βακτηρίων στα κύτταρα του ξενιστή αποτελεί κρίσιμο πρώτο βήμα για την εγκατάσταση της λοίμωξης. Πρόκειται για μια στοχευμένη διαδικασία κατά την οποία τα βακτήρια χρησιμοποιούν ειδικές πρωτεΐνες, γνωστές ως adhesins, για να συνδεθούν με μόρια προσκόλλησης στην επιφάνεια των κυττάρων του ξενιστή, τα λεγόμενα CAMs (cell adhesion molecules).

Οι CAM είναι πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης που διαμεσολαβούν στη σύνδεση μεταξύ κυττάρων ή μεταξύ κυττάρων και του εξωκυτταρικού τους περιβάλλοντος. Πολλά βακτήρια μιμούνται τα φυσικά συνδετικά μόρια του ξενιστή για να δεσμεύονται στους υποδοχείς οι οποίοι χωρίζονται σε τέσσερις κύριες κατηγορίες:

- Ιντεγκρίνες (integrins)
- Καδχερίνες (cadherins)
- Μόρια της υπεροικογένειας της ανοσοσφαιρίνης (IgCAM)
- Σελεκτίνες (selectins)

Η προσκόλληση δεν είναι απλώς μια μηχανική σύνδεση, αλλά συχνά είναι μονοπάτια ενδοκυτταρικής σηματοδότησης, οδηγώντας είτε σε είσοδο του βακτηρίου στο κύτταρο, είτε σε τροποποιήσεις του κυτταρικού περιβάλλοντος, που διευκολύνουν την επιβίωση και την εξάπλωσή του. Είναι μια εξαιρετικά εξελιγμένη διαδικασία, αποτέλεσμα συμπαράγωγής μορίων μεταξύ βακτηρίων και ξενιστή, με κύριο στόχο την αποφυγή της ανοσολογικής άμυνας και την εγκατάσταση της λοίμωξης (Boyle, E. C., & Finlay, B. B., 2003).

1.6.5. Αποφυγή του ανοσοποιητικού συστήματος

Πολλά παθογόνα βακτήρια, για να καταφέρουν να αποφύγουν το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή παράγουν κάψα, δηλαδή μια εξωκυτταρική πολυσακχαριδική δομή που περιβάλλει το κυτταρικό τους τοίχωμα. Η κάψα εμποδίζει τη φαγοκυττάρωση (γνωστό και ως «frustrated phagocytosis») επειδή καλύπτει τις επιφανειακές δομές που αναγνωρίζονται από τα φαγοκύτταρα (όπως τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα) και τα αντισώματα. Επιπλέον, ορισμένες κάψες έχουν ανοσορρυθμιστική δράση, ενισχύοντας τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις που προκαλούν περαιτέρω βλάβη στους ιστούς του ξενιστή.

Ακόμη, ορισμένα βακτήρια παράγουν εξειδικευμένες πρωτεΐνες που είτε αναστέλλουν τη φαγοκυττάρωση (π.χ. με την παρεμπόδιση της σύνδεσης αντισωμάτων ή συμπληρωματικών πρωτεϊνών στην επιφάνειά τους), είτε αναστέλλουν την ενεργοποίηση του συμπληρώματος (π.χ. μέσω αποφυγής της εναπόθεσης πρωτεϊνών του συμπληρώματος στην επιφάνεια του βακτηρίου, εμποδίζοντας τη δημιουργία των ποροποιών συμπλεγμάτων MAC – Membrane Attack Complex).

Τέλος, ορισμένα βακτήρια αλλάζουν τις επιφανειακές τους πρωτεΐνες (όπως πρωτεΐνες της κάψας ή προσκολλητικά μόρια) ώστε να μην αναγνωρίζονται από το ανοσοποιητικό σύστημα. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται αντιγονική μεταβλητότητα. Μέσω αυτής της στρατηγικής, τα βακτήρια αποφεύγουν την εξουδετέρωση από αντισώματα που έχουν παραχθεί προηγουμένως και διατηρούν την ικανότητα αποικισμού και επιβίωσης στον οργανισμό για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (Wilson, J. W. et al, 2002).

1.6.6. Συστήματα έκκρισης

Τα βακτήρια διαθέτουν εξειδικευμένα συστήματα έκκρισης που τους επιτρέπουν να επηρεάζουν και να εκμεταλλεύονται το περιβάλλον γύρω τους. Μέσω αυτών των συστημάτων, μεταφέρουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες (πρωτεΐνες-τελεστές) οι οποίες βοηθούν τόσο στη διαμόρφωση του περιβάλλοντος όσο και στην επιτυχή μόλυνση των κυττάρων του ξενιστή.

Στα Gram-αρνητικά βακτήρια έχουν αναγνωριστεί εννέα τύποι τέτοιων συστημάτων (τύπου I έως IX). Αυτά τα συστήματα μπορούν είτε να εκκρίνουν τις πρωτεΐνες προς το εξωτερικό περιβάλλον είτε να τις διοχετεύουν απευθείας στο εσωτερικό των κυττάρων του ξενιστή.

Από αυτά, το σύστημα έκκρισης τύπου III (T3SS) είναι ένα από τα πιο πολύπλοκα και καλά μελετημένα. Το T3SS διακρίνεται σε δύο μορφές:

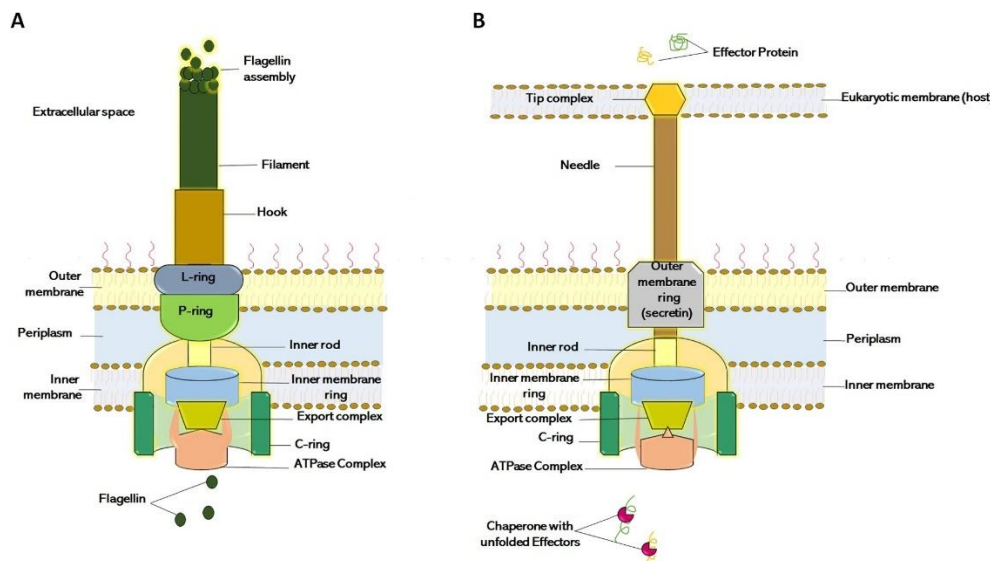
- Flagellar-T3SS, που σχετίζεται με την κατασκευή του μαστιγίου (ουρά κίνησης του βακτηρίου).
- Non-Flagellar-T3SS (NF-T3SS), που σχετίζεται με τη μεταφορά πρωτεϊνών στο κύτταρο του ξενιστή και εμπλέκεται άμεσα στη μολυσματική διαδικασία.

Το T3SS λειτουργεί σαν μια μικροσκοπική μηχανή (νανομηχανή), η οποία διαπερνά το βακτηριακό τοίχωμα. Αποτελείται από πάνω από 20 πρωτεΐνες και περιλαμβάνει:

- Δακτύλιους στην εσωτερική και εξωτερική μεμβράνη
- Εσωτερική ράβδο που ενώνει αυτούς τους δακτύλιους
- Συσκευή εξαγωγής που μεταφέρει τις πρωτεΐνες
- Μια πρωτεΐνη με λειτουργία ATPάσης, η οποία παρέχει την απαραίτητη ενέργεια για τη λειτουργία του συστήματος

Η πιο χαρακτηριστική δομή του T3SS είναι μια βελονοειδής προεξοχή που μπορεί να «αισθανθεί» την επαφή με τη μεμβράνη του κυττάρου-ξενιστή. Μόλις γίνει αυτή η επαφή, το T3SS μεταφέρει τις πρωτεΐνες-τελεστές στο εσωτερικό του κυττάρου. Εκεί οι τελεστές αλλάζουν τη λειτουργία του

κυττάρου-ξενιστή με τρόπους που διευκολύνουν τον αποικισμό του από το βακτήριο και την εξάπλωση της μόλυνσης (Hajra, D. et al, 2021).



Εικόνα 5: Αναπαράσταση της γενικής δομής της συσκευής έκκρισης T3SS. **A:** Flagellar-T3SS που λειτουργεί για τη μεταφορά και τη συναρμολόγηση μαστιγοειδών πρωτεϊνών. **B:** NF-T3SS που μεταφέρει τους τελεστές λοιμογόνου δράσης στο κύτταρο ξενιστή βοηθώντας στην παθογένεση (Hajra, D. et al, 2021).

1.6.7. Σχηματισμός βιοφίλμ

Τα περισσότερα βακτήρια έχουν την ικανότητα να προσκολλώνται είτε μεταξύ τους είτε σε διάφορες επιφάνειες, σχηματίζοντας ομάδες κυττάρων γνωστές ως βιοφίλμ. Αυτά, περιβάλλονται από ένα προστατευτικό πλέγμα που αποτελείται από εξωκυτταρικές πολυμερικές ουσίες (EPS), το οποίο προσφέρει προστασία και αυξάνει την αντοχή των βακτηρίων σε εξωτερικές επιθέσεις, όπως για παράδειγμα τα αντιβιοτικά. Τα βιοφίλμ μπορούν να αποτελούνται από έναν ή περισσότερους μικροοργανισμούς και συχνά συνδέονται με χρόνιες λοιμώξεις, επειδή είναι δύσκολο να εξαλειφθούν πλήρως. Η αδυναμία πλήρους εξουδετέρωσης των βιοφίλμ, ακόμη και με συμβατικές θεραπείες, αποτελεί σοβαρή πρόκληση. Τα βακτήρια μέσα στα βιοφίλμ είναι έως και 5000 φορές πιο ανθεκτικά στα αντιβιοτικά σε σύγκριση με τα αλεύθερα κύτταρα (da Silva, R. A. G. et al, 2021).

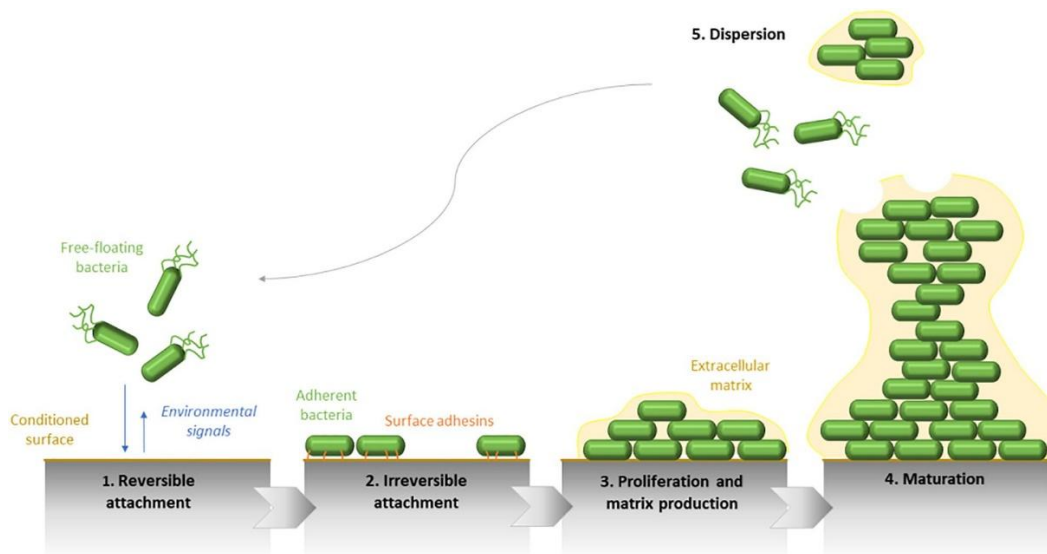
Για να γίνει ο σχηματισμός του βιοφίλμ, αρχικά τα ελεύθερα βακτήρια εντοπίζουν μια επιφάνεια που τους προσφέρει κατάλληλες συνθήκες ανάπτυξης, όπως ιδανικό pH, αρκετό οξυγόνο, κατάλληλη θερμοκρασία και σωστή ώσμωση. Μόλις την εντοπίσουν, προσκολλώνται πάνω της με τη βοήθεια φυσικοχημικών και ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Σε αυτό το πρώτο στάδιο, η προσκόλληση είναι προσωρινή και μπορεί να αντιστραφεί.

Στο επόμενο βήμα, η προσκόλληση ενισχύεται και γίνεται σταθερή, με τη συμμετοχή ειδικών βακτηριακών δομών, όπως η πύλη τύπου IV, που «κλειδώνει» τα βακτήρια στην επιφάνεια.

Αφού σταθεροποιηθούν, τα βακτήρια αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται και να παράγουν εξωπολυσακχαρίτες, όπου ουσιαστικά είναι ουσίες που λειτουργούν σαν «κόλλα» και σχηματίζουν το βιοφίλμ. Η όλη διαδικασία καθοδηγείται από χημικά σήματα που ανταλλάσσουν τα βακτήρια μεταξύ τους. Τα σήματα αυτά επιτρέπουν την επικοινωνία και συντονίζουν την ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων που είναι απαραίτητα για τη δημιουργία του βιοφίλμ.

Στη συνέχεια, προσκολλώνται και άλλα βακτήρια, μεγαλώνοντας το βιοφίλμ μέχρι να ωριμάσει. Το ώριμο βιοφίλμ διαθέτει εξωτερικές δομές που ανιχνεύουν το περιβάλλον και στέλνουν σήματα τα οποία μειώνουν την κινητικότητα άλλων βακτηρίων, διευκολύνοντας έτσι την προσκόλλησή τους στο βιοφίλμ.

Τελικά, έρχεται και η φάση της αποδόμησης του βιοφίλμ, που μπορεί να προκληθεί από φυσικές αναταραχές, έλλειψη τροφής ή υπερβολικό πλήθος βακτηρίων. Σε αυτή τη φάση, κομμάτια του βιοφίλμ αποκολλώνται και απελευθερώνονται στο περιβάλλον, με σκοπό να βρουν νέες επιφάνειες για να ξεκινήσει ξανά ο κύκλος δημιουργίας βιοφίλμ (Olivares, E. et al, 2020).



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση των βημάτων παραγωγής βιοφίλμ (Olivares, E. et al, 2020).

1.6.8. Συστήματα επικοινωνίας για τον σχηματισμό ενός βακτηριακού βιοφίλμ (Μηχανισμός ανίχνευσης απαρτίας στο *P. aeruginosa*)

Στο *P. aeruginosa* η επικοινωνία των βακτηριακών κυττάρων βασίζεται κυρίως σε δύο συστήματα ανίχνευσης και απόκρισης απαρτίας: το *lasR-lasI* και το *rhlR-rhlI* (γνωστό και ως *vsmR-vsmI*). Το πρώτο σύστημα, *lasR-lasI*, ελέγχει την παραγωγή και ανίχνευση ενός συγκεκριμένου χημικού μηνύματος, της N-(3-οξοδοδεκανοϋλ)-L-ομοσερίνης λακτόνης ($C_{12}O_3$ -HSL). Η σύνθεση του μορίου αυτού δημιουργήθηκε από το ένζυμο που κωδικοποιείται από το γονίδιο *lasI*. Όταν η συγκέντρωση του $C_{12}O_3$ -HSL στο περιβάλλον αυξηθεί αρκετά (αυτό συμβαίνει όταν η πυκνότητα των βακτηρίων είναι υψηλή), το μόριο συνδέεται με την πρωτεΐνη *LasR*, έναν μεταγραφικό ρυθμιστή. Η ενεργοποιημένη *LasR* μπορεί τότε να διεγείρει την έκφραση πολλών γονιδίων που

σχετίζονται με τη λοιμογόνο δράση, να ενισχύσει την παραγωγή του ίδιου του *lasI* και να ενεργοποιήσει το δεύτερο σύστημα επικοινωνίας, το *rhlR-rhlI*.

Το δεύτερο αυτό σύστημα λειτουργεί με παρόμοιο τρόπο, αλλά έχει ένα διαφορετικό σήμα, την N-βουτυρυλ-L-ομοσερίνη λακτόνη, η οποία παράγεται από το ένζυμο που κωδικοποιεί το γονίδιο *rhlI*. Όταν η συγκέντρωση του συγκεκριμένου μορίου αυξηθεί, συνδέεται με τον ρυθμιστή *RhlR* και ενεργοποιεί την έκφραση πρόσθετων γονιδίων που σχετίζονται με τη λοιμογόνο δράση, καθώς και την παραγωγή του παράγοντα *Rpox*, ο οποίος εμπλέκεται στη ρύθμιση της στατικής φάσης ανάπτυξης.

Και στα δύο αυτά συστήματα, η βασική αρχή είναι ότι τα μόρια-σήματα συσσωρεύονται στο περιβάλλον όσο ο πληθυσμός των βακτηρίων. Μόλις ξεπεράσουν ένα κρίσιμο όριο συγκέντρωσης, ενεργοποιούν μηχανισμούς που οδηγούν σε συντονισμένη γονιδιακή έκφραση σε όλη την κοινότητα. Αυτός ο μηχανισμός, γνωστός ως quorum sensing (ανίχνευση και απόκριση απαρτίας), επιτρέπει στα βακτήρια να «αισθάνονται» την πυκνότητα τους και να προσαρμόζουν συλλογικά τη συμπεριφορά τους, ενισχύοντας έτσι την ικανότητα τους να προκαλούν λοίμωξη και να επιβιώνουν σε διαφορετικά περιβάλλοντα (David G. Davies et al, 1998).

1.6.9. Εξωκυτταρικοί πολυσακχαρίτες (EPS)

Το EPS (εξωκυτταρικός πολυσακχαρίτης) είναι ένας πολυσακχαρίτης που παράγεται από βακτήρια και αποτελείται από πολυμερή μόρια. Μπορεί είτε να παραμένει προσκολλημένος στην επιφάνεια του κυττάρου (καψικός πολυσακχαρίτης) είτε να απελευθερώνεται στο περιβάλλον γύρω από το κύτταρο (ελεύθερο EPS). Η χημική δομή του ποικίλλει ανάλογα με το βακτηριακό στέλεχος και συνήθως περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενα σάκχαρα όπως η D-γαλακτόζη, D-γλυκόζη, L-ραμνόζη και η N-ακετυλογαλακτοζαμίνη. Τα στελέχη που εκκρίνουν EPS στο περιβάλλον κάνουν το ιξώδες του μέσου πιο υψηλό και έχουν ως αποτέλεσμα να χαρακτηρίζονται ως «σχοινοειδή» λόγω της υφής που προσδίδουν (Wa, Y. et al, 2022).

Ο ρόλος τους είναι να συγκρατούν τα κύτταρα του βιοφίλμ κοντά το ένα στο άλλο για μεγάλο χρονικό διάστημα, δημιουργώντας έτσι συνθήκες για στενή συνεργασία μεταξύ τους. Αυτό διευκολύνει τη μεταξύ τους επικοινωνία, τη μεταφορά γενετικού υλικού από το ένα κύτταρο στο άλλο, καθώς και τη δημιουργία μικρών συνεργατικών ομάδων μικροοργανισμών που δρουν συντονισμένα (Flemming, H. C., & Wingender, J., 2010).

Οι επιστήμονες έχουν βρεί ότι τρεις βασικοί εξωκυτταρικοί πολυσακχαρίτες παίζουν σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό βιοφίλμ από την *Pseudomonas*: το αλγινικό, το Psl και το Pel. Καθένας από αυτούς παράγεται και μεταφέρεται μέσω μιας συγκεκριμένης βιοσυνθετικής οδού, δηλαδή της οδού για το αλγινικό, της οδού για το Psl και της οδού για το Pel (Liu, Q. et al, 2025).

1.6.10. Υδροφοβικότητα κυτταρικής επιφάνειας (CSH)

Στο φυσικό περιβάλλον οι μικροοργανισμοί σπάνια ζούν μεμονωμένοι (ως ελεύθερα κύτταρα) και συνήθως προτιμούν να συγκεντρώνονται σε ομάδες. Σε υδάτινα και εδαφικά οικοσυστήματα,

έχουν την ικανότητα να ακινητοποιούνται μόνοι τους, μια διαδικασία στην οποία παίζει σημαντικό ρόλο η υδροφοβικότητα της επιφάνειας των κυττάρων τους (CSH). Όταν αυτή η υδροφοβικότητα είναι υψηλή, οι μικροοργανισμοί μπορούν να προσκολληθούν πιο εύκολα σε σταγονίδια υδρογονανθράκων και να μετακινηθούν από το υδάτινο περιβάλλον προς την οργανική, πλούσια σε υδρογονάνθρακες φάση. Εκεί, μέσω της δράσης επιφανειοδραστικών ουσιών και ενζύμων, διασπούν ρυπογόνες ουσίες.

Ένας από τους τρόπους με τους οποίους ενισχύεται αυτή η διαδικασία είναι η απελευθέρωση κυστιδίων εξωτερικής μεμβράνης (MV) από Gram-αρνητικά βακτήρια. Τα κυστίδια αυξάνουν την υδροφοβικότητα της κυτταρικής επιφάνειας και ενισχύουν την ικανότητα αυτών των μικροοργανισμών να σχηματίζουν βιοφίλμ. Οι υδρόφοβες μικροβιακές επιφάνειες βοηθούν επίσης στην προσκόλληση τόσο σε ζωντανές όσο και σε αβιοτικές επιφάνειες, καθώς και την είσοδο των μικροοργανισμών σε ιστούς του ξενιστή (Krasowska, A., & Sigler, K., 2014).

1.6.10.1. Μεμβρανικά κυστίδια (MVs)

Τα περισσότερα βακτήρια εκκρίνουν μικρά σφαιρικά νανοσωματίδια, γνωστά ως μεμβρανικά κυστίδια (MVs), στο περιβάλλον γύρω τους. Αυτά τα κυστίδια έχουν μέγεθος μεταξύ 20 και 400nm και αποτελούνται κυρίως από φωσφολιπίδια και πρωτεΐνες της βακτηριακής μεμβράνης, περιέχοντας περιπλασματικά υλικά, καθώς και υλικά του κυτταροπλάσματος. Τα MVs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις σχέσεις των βακτηρίων με τον ξενιστή τους, καθώς μεταφέρουν ουσίες όπως τοξίνες, ένζυμα και μόρια που επηρεάζουν το ανοσοποιητικό σύστημα, ενώ λειτουργούν και ως μέσα επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων. Ειδικά στα Gram-αρνητικά βακτήρια, τα MVs που προέρχονται από την εξωτερική τους μεμβράνη ονομάζονται κυστίδια εξωτερικής μεμβράνης (OMVs) και περιέχουν χαρακτηριστικά μοριακά σήματα που αναγνωρίζονται από το ανοσοποιητικό σύστημα, όπως οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS) και πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης, όπως οι λιποπρωτεΐνες (Takahara, M. et al, 2024).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο κύριος σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η αξιολόγηση της παθογονικότητας επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών τριών σημαντικών Gram-αρνητικών παθογόνων: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* και *Pseudomonas aeruginosa*. Για την αξιολόγηση του σκοπού αυτού, εφαρμόστηκαν δύο διαφορετικές πειραματικές μέθοδοι που εστιάζουν σε βασικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται άμεσα με τη λοιμογόνιο δράση των βακτηρίων.

Η πρώτη μέθοδος είναι η εκχύλιση και ποσοτικοποίηση εξωπολυσακχαριτών (EPS), με την οποία εκτιμάται η ικανότητα των μικροοργανισμών να παράγουν εξωκυτταρικά πολυμερή. Τα EPS αποτελούν κρίσιμο παράγοντα για τη δημιουργία και τη διατήρηση βακτηριακών βιοφίλμ, ενισχύοντας τη σταθερότητα των αποικιών και την προστασία έναντι του ανοσοποιητικού συστήματος και των αντιμικροβιακών παραγόντων. Η ποσοτική ανάλυση EPS παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τον βαθμό παθογονικότητας του κάθε στελέχους.

Η δεύτερη μέθοδος που χρησιμοποιείται είναι η Microbial Adhesion to Hydrocarbon (MATH), μια τεχνική εκτίμησης της υδρόφοβης φύσης της βακτηριακής κυτταρικής επιφάνειας. Η υδρόφοβη ή υδρόφιλη συμπεριφορά επηρεάζει σημαντικά την ικανότητα προσκόλλησης των βακτηρίων σε επιφάνειες και ιστούς του ξενιστή, γεγονός που σχετίζεται άμεσα με την εγκατάσταση και την εξέλιξη των λοιμώξεων. Μέσω της MATH μεθόδου, μπορεί να εκτιμηθεί το ποσοστό των βακτηριακών κυττάρων που προσκολλώνται σε μη πολικά συστήματα (όπως οι υδρογονάνθρακες), γεγονός που αντικατοπτρίζει έμμεσα την πιθανή ικανότητα αποίκησης και μόλυνσης ιστών.

Η μελέτη έγινε σε 90 βακτηριακά στελέχη συνολικά, εκ των οποίων 30 ανήκουν στην οικογένεια *E. coli*, 30 στην οικογένεια *K. pneumoniae* και 30 στη *P. aeruginosa*. Μέσα από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από αυτές τις δύο μεθοδολογίες, επιχειρείται η διερεύνηση ενδεχόμενων διαφορών παθογένειας μεταξύ των τριών ειδών, καθώς και η συσχέτιση της παραγωγής EPS με την υδρόφοβη συμπεριφορά.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Λήψη δειγμάτων

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό σκέλος της παρούσας πτυχιακής εργασίας προήλθαν από ασθενείς που νοσηλεύονταν σε διάφορες κλινικές του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Στο πλαίσιο συνεργασίας με το συγκεκριμένο νοσοκομείο, συλλέχθηκαν συνολικά 90 διαφορετικά κλινικά δείγματα από ασθενείς, εκ των οποίων 30 είναι δείγματα *P. aeruginosa*, 30 είναι *K. pneumoniae* και 30 είναι *E. coli* (Πίνακας 3). Η ταυτοποίηση του τύπου αλληλουχίας (Sequence Type – ST) για κάθε βακτηριακό στέλεχος πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο πολυτοπικής τυποποίησης αλληλουχιών (MLST – Multilocus Sequence Typing).

ISOLATE	ST
Kpn2112	11
Kpn2281	11
Kpn2285	11
Kpn2408	11
Kpn2111	18
Kpn2467	18
Kpn2105	39
Kpn2300	39
Kpn2323	39
Kpn2337	39
Kpn2369	39
Kpn2430	39
kpn8819/10/2020	48
Kpn2308	258
Kpn2358	258
Kpn2192	323
Kpn2282	323
Kpn2335	323
Kpn2341	323
Kpn2440	323
Kpn9174/10/2020	323
Kpn6820/10/2020	788
Kpn9066/10/2020	1190
Kpn8436/10/2020	1286
Kpn2188	1286
Kpn2399	1458
Kpn2277	2435
Kpn6376/10/2020	2711
Kpn2438	1042/4042
Kpn9251	4090
Pae400/11/2020	774 or 262

Pae4014/09/2020 (πυορ.)	554
Pae4917/09/2020	3160
Pae6114/10/2020	253
Pae6560/10/2020	309
Pae681/11/2020	110
PaeA2166	304
PaeA2231	309
PaeA2266	111
PaeA2276	112
PaeA2297	235
PaeA2298	111
PaeA2325	277
PaeA2380	111
PaeA2432	17
PaeA2433 (πλάκες)	16
PaeA2441	111
PaeA2486	274
PaeA2493 (πυορ.)	309
PaeA2542 (πυοβ.)	3191
PaeA2544	277
PaeA2550 (πυοβ.)	323
PaeA2564	244
PaeA2565 (πυοβ.)	253
PaeA2608	112
PaeA2657	395
PaeA2698	323
PaeA2732	242
PaeA2748	304
PaeA2364	17
Eco2131	131
Eco2180	131
Eco2194	501
Eco2253	5328
Eco3090	140
Eco3092	1011
Eco3095	2371*
Eco3096	131
Eco3191	69
Eco3281	9312
Eco5740/01/2021	646
Eco5868/09/2020	646
Eco6289/10/2020	410
Eco6371/10	69
Eco6440/10	569

Eco6443/10	744
Eco6502/10/2020	410
Eco7293/04/2021	14
Eco7686	95
Eco7702/05	58
Eco7827	10
Eco7853/05/2021	104
Eco8539/05	69
Eco8593/05/2021	186
Eco8623/05	216
eco8704/05/2021	922
EcoA2194	501
EcoA2268	922
EcoA3169	569
EcoA3189	501

Πίνακας 3: Στελέχη βακτηρίων.

3.2. Καλλιέργεια κλινικών δειγμάτων

Τα κλινικά δείγματα τοποθετήθηκαν σε στερεά θρεπτικά μέσα, συγκεκριμένα σε αιματούχο άγαρ (Blood agar), για να καλλιεργηθούν οι μικροοργανισμοί. Στη συνέχεια, οι καλλιέργειες επώαστηκαν σε ειδικό κλίβανο παρουσίας οξυγόνου (αερόβιες συνθήκες), σε θερμοκρασία 37°C, για χρονικό διάστημα 18 έως 24 ώρες. Μετά την ανάπτυξη τους, απομονώθηκαν αποικίες οι οποίες αραιώθηκαν σε φυσιολογικό ορό (φιαλίδια των 5mL) έως ότου επιτευχθεί οπτική πυκνότητα 0,5 στην κλίμακα McFarland στα 600nm με τη χρήση νεφελομέτρου.

3.3. Ανάλυση της μεθόδου εκχύλισης και ποσοτικοποίησης εξωπολυσακχαριτών (EPS)

Η μέθοδος καθίζησης, που χρησιμοποιείται στην προκειμένη μέθοδο, είναι ιδιαίτερα δημοφιλής λόγω της εύκολης εφαρμογής της, της υψηλής απόδοσης, της ελάχιστης χημικής επιμόλυνσης και της δυνατότητας χειρισμού μεγάλων όγκων δειγμάτων. Ωστόσο, παρουσιάζει και ορισμένα μειονεκτήματα, όπως η ατελής καθίζηση, η συγκαθίζηση ανεπιθύμητων ουσιών (π.χ. πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων και άλλων βιομορίων) και η ανάγκη χρήσης μεγάλων ποσοτήτων αιθανόλης (Yadav, M. K. et al, 2024).

Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την ακριβή ποσοτικοποίηση των EPS είναι η μέθοδος φαινόλης-θεικού οξέος, που εισήχθη το 1956 από τον Dubois. Η βασική αρχή της μεθόδου είναι η αφυδάτωση των πολυσακχαριτών από το πυκνό θειικό οξύ, η οποία οδηγεί στον σχηματισμό ουρονικών οξέων και φορμαλδεϋδικών παραγώγων, τα οποία στη συνέχεια αντιδρούν με τη φαινόλη και παράγουν πορτοκαλοκόκκινο χρώμα. Η ποσοτική εκτίμηση των EPS μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορες μεθόδους, όπως η βαρυμετρική, η χρωματομετρική, η χρωματογραφική, η μικροσκοπική και η φασματοσκοπία στο εγγύς υπέρυθρο. Η πιο απλή προσέγγιση είναι η ζύγιση της ξηρής σκόνης των EPS, όμως είναι ανακριβής λόγω πιθανής παρουσίας ακαθαρσιών.

Η μέθοδος φαινόλης-θεικού οξέος είναι ιδιαίτερα αγαπητή λόγω της ακρίβειας, της ευκολίας, της σταθερότητας και της ευαισθησίας της. Παρ'όλα αυτά, παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα, όπως η έλλειψη εξειδίκευσης, οι πιθανές παρεμβολές από άλλες ενώσεις και η εξάρτηση από τις πειραματικές συνθήκες, οι οποίες μπορεί να επηρεάσουν την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Για το λόγο αυτό, απαιτείται προσεκτική εφαρμογή όταν χρησιμοποιείται για την ανάλυση των EPS (Yadav, M. K. et al, 2024).

Αφού επιτευχθεί οπτική πυκνότητα 0,5 στην κλίμακα McFarland, 50μL από το βακτηριακό εναιώρημα κάθε δείγματος αναμιγνύονται με 2mL LB Broth και γίνεται για άλλη μια φορά επώαση σε κλίβανο στους 37°C για 24 ώρες, σε αερόβιες συνθήκες. Στη συνέχεια τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή του πειράματος ήταν τα εξής:

- Αιθανόλη (100% v/v)
- Φαινόλη (5% m/v)
- Πυκνό θεικό οξύ

Τα βήματα τα οποία ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

1. Αφού περάσει ο χρόνος επώασης, γίνεται μια ελαφριά ανάδευση των δειγμάτων και μετά σε tubes γίνεται ανάμειξη των δειγμάτων με τρεις όγκους παγωμένης απόλυτης αιθανόλης (250μL δείγμα και 750μL αιθανόλη) η οποία έχει επωαστεί στους 4°C για 24 ώρες, για να κατακρημνιστεί το EPS και τα αφήνουμε στο ψυγείο στους 4°C για άλλες 24 ώρες. Η αιθανόλη, επειδή είναι λιγότερο πολική από το νερό, διαταράσσει το υδατινό περίβλημα που σχηματίζεται γύρω από τα υδρόφιλα τμήματα των μορίων EPS, με αποτέλεσμα να μειώνεται η διαλυτότητα τους και να καθιζάνουν.
2. Για την συλλογή των EPS γίνεται φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 10 000rpm στους 4°C.
3. Έπειτα, απορρίπτουμε το υπερκείμενο και επαναϊρούμε το ίζημα σε κατάλληλο όγκο νερού Milli-Q (1ml) για περαιτέρω καθαρισμό, ποσοτικοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Φαινόλης-Θεικού οξέος (PSA).
4. Για τη μέθοδο Φαινόλης-Θεικού οξέος, σε φάλλον βάζουμε 5ml θεικό οξύ (H_2SO_4) και 1ml κρύας φαινόλης 5% και γίνεται ανάδευση.
5. Μετά, γίνεται προσθήκη 1ml από το EPS, ανάδευση και γίνεται μέτρηση της έντασης του χρώματος στα 490nm με τη χρήση plate όπου σε κάθε πηγαδάκι μπαίνουν 150μL από το δείγμα.
6. Για το τυφλό όπου θα χρησιμοποιηθεί για να μηδενιστεί το φωτόμετρο χρησιμοποιείται 1ml H_2O , 1ml κρύας φαινόλης 5% και 5ml H_2SO_4 .

3.4. Ανάλυση της μεθόδου Microbial Adhesion to Hydrocarbon (MATH)

Όπως και στη μέθοδο εκχύλισης και ποσοτικοποίησης εξωπολυσακχαριτών (EPS), έτσι και σε αυτήν αφού επιτευχθεί οπτική πυκνότητα 0,5 στην κλίμακα McFarland, 100μL από το βακτηριακό εναιώρημα κάθε δείγματος αναμιγνύονται με 5mL LB Broth και γίνεται για άλλη μια φορά

επώαση σε κλίβανο στους 37°C για 24 ώρες, σε αερόβιες και πάλι συνθήκες. Στη συνέχεια για την διεξαγωγή του πειράματος χρειάστηκε να χρησιμοποιήσουμε τολουόλιο.

Τα βήματα τα οποία ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

1. Αφού τελειώσει ο χρόνος επώασης, τα δείγματα αναδεύονται ελαφρά για να έχουμε μια ομοιογένεια. Στη συνέχεια, συλλέγονται 150μL από το κάθε δείγμα και φωτομετρούνται στα 600nm με τη χρήση plate.
2. Μετά σε tubes προστίθενται ίσες ποσότητες από κάθε δείγμα και από τολουόλιο, συγκεκριμένα 500μL από το καθένα. Μετά, τα σωληνάρια τοποθετούνται σε συσκευή vortex και αναδεύονται δυνατά για 2 λεπτά, ώστε να έχουμε μια πλήρη και αποτελεσματική ανάμειξη των δύο φάσεων.
3. Στη συνέχεια, αφήνω τα δείγματα να παραμείνουν σε ηρεμία για περίπου 15 λεπτά, ώστε να δοθεί χρόνος στις δύο φάσεις να διαχωριστούν ξανά, δηλαδή το υδατικό και το οργανικό στρώμα (τολουόλιο) να διαμορφωθούν ξεκάθαρα.
4. Αφού ολοκληρωθεί ο διαχωρισμός, με τη βοήθεια μιας καθαρής πιπέτας, συλλέγεται προσεκτικά ένας όγκος 150μL από το βακτηριακό εναιώρημα και φωτομετρούμε στα 600nm με τη χρήση plate. Κατά τη διαδικασία αυτή δίνεται ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μην τραβηχτεί καθόλου από το ανώτερο στρώμα, δηλαδή το στρώμα των υδρογονανθράκων. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η λήψη του δείγματος γίνεται από την κάτω φάση, όπου βρίσκεται το υδατικό διάλυμα με τα βακτήρια.
5. Η υδροφοβικότητα της κυτταρικής επιφάνειας (CSH) εκφράζεται ως ποσοστό και υπολογίζεται με τον εξής τύπο:

$$\text{CSH\%} = [1 - (\text{OD}_{600} \text{ μετά τον στροβιλισμό} / \text{OD}_{600} \text{ πριν τον στροβιλισμό})] * 100$$

3.5. Παραγωγή λοιπών υλικών και αντιδραστηρίων

3.5.1. LB Broth

Το μέσο Luria-Bertani (LB) είναι ένα θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται ευρέως για την καλλιέργεια βακτηρίων. Είναι ένα σύνθετο μέσο που περιέχει κυρίως τρυπτόνη (πηγή αμινοξέων), εκχύλισμα ζύμης (παρέχει βιταμίνες και άλλα θρεπτικά συστατικά) και χλωριούχο νάτριο (NaCl, για την διατήρηση της ωσμωτικής ισορροπίας).

Το LB μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε ως υγρό μέσο (για καλλιέργεια σε δοκιμαστικούς σωλήνες ή φιάλες) είτε με προσθήκη άγαρ για να γίνει στερεό μέσο (για καλλιέργεια σε πλάκες) (Wang, H. et al, 2023).

Συνήθως χρησιμοποιείται:

- Για την καλλιέργεια βακτηριακών στελεχών πριν από πιο εξειδικευμένα πειράματα.
- Για την ανάπτυξη γενετικά τροποποιημένων βακτηρίων (*E. coli*).

- Για τη μελέτη διαφόρων βακτηριακών χαρακτηριστικών (φαινοτύπων), αφού το LB υποστηρίζει τη διαφοροποίηση υποπληθυσμών.

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων μας, χρησιμοποιήσαμε φιαλίδια των 200mL όπου εμείς προσθέσαμε απιονισμένο νερό μέχρι τα 150mL. Στη συνέχεια, με τη χρήση ζυγαρίας, μετρήσαμε 4,5g σκόνης LB (διαλύονται 30g LB στα 1000mL σύμφωνα με τις οδηγίες της συσκευασίας) τα οποία προσθέσαμε στο φιαλίδιο με το νερό και ανακινούμε καλά έως ότου έχουμε ένα ομογενοποιημένο διάλυμα. Τέλος, για να μπορέσουμε να χρησιμοποιήσουμε το LB broth πρέπει πρώτα να κάνουμε αποστείρωση.

3.5.2. Φαινόλη 5%

Η φαινόλη (C_6H_5OH), γνωστή και ως καρβολικό οξύ, είναι μια αρωματική οργανική ένωση με χαρακτηριστική οσμή, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στη χημεία και τη βιομηχανία. Είναι ένα ισχυρό απολυμαντικό, αντισηπτικό και καυστικό μέσο και για αυτό βρίσκει εφαρμογή σε αντιμικροβιακά διαλύματα. Στη φυσική της μορφή εμφανίζεται ως λευκή κρυσταλική ουσία, που διαλύεται εύκολα σε νερό, αιθανόλη και αιθέρα, ενώ η επαφή της με το δέρμα μπορεί να προκαλέσει έντονο ερεθισμό. Η χρήση της εκτίνεται από τον ρόλο της ως αντισηπτικό, μέχρι την εφαρμογή της στη βιομηχανία για την παραγωγή χρωμάτων, πλαστικών και ρητινών, καθώς και στην ανάλυση δειγμάτων.

Για την Παρασκευή διαλύματος φαινόλης συγκέντρωσης 5% w/v στο εργαστήριο, απαιτείται:

- Στερεή φαινόλη
- Απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό
- Ζύγος ακριβείας
- Ογκομετρική φιάλη

Η διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά την ακριβή ζύγιση 1,25g φαινόλης (καθώς φτιάχναμε διαλύματα των 25mL και όχι των 100mL) που εισάγονται σε ογκομετρική φιάλη των 100mL. Στη συνέχεια προστίθεται νερό μέχρι ο τελικός όγκος να φτάσει τα 25mL και το μείγμα αναδεύεται καλά μέχρι η φαινόλη να διαλυθεί πλήρως. Τέλος η φαινόλη φυλάγεται στο ψυγείο, αφού πρώτα την καλύψουμε ολοκληρωτικά με ασημόχαρτο, καθώς είναι φωτοευαίσθητη.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Αποτελέσματα μεθόδου εκχύλισης και ποσοτικοποίησης εξωπολυσακχαριτών (EPS)

Στον παρακάτω Πίνακα 4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την συνολική ανάλυση των 90 δειγμάτων, μετά την εφαρμογή της μεθόδου εκχύλισης και ποσοτικοποίησης εξωπολυσακχαριτών (EPS). Η συγκεκριμένη μεθοδολογία βασίστηκε σε τυποποιημένα πρωτόκολλα απομόνωσης και μέτρησης, ώστε να διασφαλιστεί η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων.

ISOLATE	ST	ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ
Kpn2112	11	0.06404
Kpn2281	11	0.03581
Kpn2285	11	0.01925
Kpn2408	11	0.003958
Kpn2111	18	0.04243
Kpn2467	18	0.013830
Kpn2105	39	0.04079
Kpn2300	39	0.04113
Kpn2323	39	0.02862
Kpn2337	39	0.07773
Kpn2369	39	0.0077
Kpn2430	39	0.0506
kpn8819/10/2020	48	0.0169
Kpn2308	258	0.0307
Kpn2358	258	0.0095
Kpn2192	323	0.0432
Kpn2282	323	0.1901
Kpn2335	323	0.0468
Kpn2341	323	0.0896
Kpn2440	323	0.0783
Kpn9174/10/2020	323	0.0575
Kpn6820/10/2020	788	0.0137
Kpn9066/10/2020	1190	0.0182
Kpn8436/10/2020	1286	0.0132
Kpn2188	1286	0.0717
Kpn2399	1458	0.0187
Kpn2277	2435	0.0499
Kpn6376/10/2020	2711	0.0183
Kpn2438	1042/4042	0.0621
Kpn9251	4090	0.0269
Pae400/11/2020	774 or 262	0.0268
Pae4014/09/2020 (πυορ.)	554	0.0359
Pae4917/09/2020	3160	0.0258
Pae6114/10/2020	253	0.0336

Pae6560/10/2020	309	0.0325
Pae681/11/2020	110	0.01389
PaeA2166	304	0.002299
PaeA2231	309	0.003420
PaeA2266	111	0.02020
PaeA2276	112	0.006212
PaeA2297	235	-0.004369
PaeA2298	111	0.03461
PaeA2325	277	0.04653
PaeA2380	111	0.0002606
PaeA2432	17	0.03617
PaeA2433 (πλάκες)	16	0.007568
PaeA2441	111	0.001557
PaeA2486	274	0.01920
PaeA2493 (πυορ.)	309	0.007550
PaeA2542 (πυοβ.)	3191	0.01442
PaeA2544	277	0.01149
PaeA2550 (πυοβ.)	323	0.03821
PaeA2564	244	0.03322
PaeA2565 (πυοβ.)	253	0.03170
PaeA2608	112	0.02548
PaeA2657	395	0.03900
PaeA2698	323	0.03894
PaeA2732	242	-0.01084
PaeA2748	304	-0.003427
PaeA2364	17	0.01656
Eco2131	131	0.04588
Eco2180	131	0.03952
Eco2194	501	-0.01346
Eco2253	5328	0.04912
Eco3090	140	0.003507
Eco3092	1011	0.01996
Eco3095	2371*	0.01539
Eco3096	131	0.07328
Eco3191	69	0.03636
Eco3281	9312	0.04794
Eco5740/01/2021	646	0.004508
Eco5868/09/2020	646	0.04857
Eco6289/10/2020	410	-0.0000879
Eco6371/10	69	0.03039
Eco6440/10	569	0.02701
Eco6443/10	744	0.006534
Eco6502/10/2020	410	0.01939
Eco7293/04/2021	14	0.02585
Eco7686	95	0.04259

Eco7702/05	58	0.01388
Eco7827	10	0.06780
Eco7853/05/2021	104	0.05835
Eco8539/05	69	0.06929
Eco8593/05/2021	186	0.04498
Eco8623/05	216	0.05738
eco8704/05/2021	922	0.06633
EcoA2194	501	0.03534
EcoA2268	922	0.08580
EcoA3169	569	0.02197
EcoA3189	501	0.05959

Πίνακας 4: Αποτελέσματα μεθόδου εκχύλισης και ποσοτικοποίησης EPS.

Η καταγραφή των τιμών στον πίνακα επιτρέπει όχι μόνο τη συστηματική αποτύπωση της ποσότητας των παραγόμενων EPS, αλλά και τη δυνατότητα σύγκρισης μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων. Μέσα από αυτή την παρουσίαση, γίνεται πιο ξεκάθαρη η διακύμανση που εμφανίζεται ανάμεσα στις μετρήσεις, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί είτε σε βιολογικούς παράγοντες (π.χ. διαφορές ανάμεσα σε στελέχη μικροοργανισμών), είτε σε πειραματικές συνθήκες (π.χ. θρεπτικά υποστρώματα, χρόνος καλλιέργειας, θερμοκρασία κλπ).

Η συγκεντρωτική μορφή του πίνακα καθιστά εφικτή την εξαγωγή συμπερασμάτων για την αποτελεσματικότητα της μεθόδου εκχύλισης, αλλά και για τη δυναμική παραγωγή εξωπολυσακχαριτών από τα δείγματα. Επιπλέον, τα δεδομένα αυτά είναι χρήσιμη βάση για περαιτέρω στατιστικές αναλύσεις, που μπορεί να αναδεικνύονται πρότυπα και τάσεις που διαφορετικά ήταν δυσδιάκριτα. Με αυτόν τον τρόπο, η παρουσίαση των αποτελεσμάτων συμβάλλει ουσιαστικά τόσο στην κατανόηση της παραγωγικής ικανότητας των εξεταζόμενων μικροοργανισμών, όσο και στην αξιολόγηση της μεθοδολογικής προσέγγισης που εφαρμόστηκε.

Η ανάλυση των δεδομένων του Πίνακα 4, έδειξε αξιοσημείωτη ποικιλία στις τιμές απορρόφησης μεταξύ των διαφορετικών στελεχών. Οι τιμές κυμάνθηκαν σε ένα πολύ ευρύ φάσμα, από πολύ χαμηλά επίπεδα (0,0039 στο δείγμα Kpn2408) έως και υψηλές συγκεντρώσεις (0,1901 στο δείγμα Kpn2282). Η διαφοροποίηση αυτή αποτυπώνει το γεγονός ότι η ικανότητα παραγωγής εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών δεν είναι ομοιογενές χαρακτηριστικό ούτε μεταξύ στελεχών του ίδιου είδους, αλλά αντίθετα εξαρτάται από συγκεκριμένους γενετικούς και φυσιολογικούς παράγοντες. Η παρουσία αρνητικών τιμών οφείλεται σε μικρές αποκλίσεις του φάσματος απορρόφησης σε σχέση με το τυφλό που έγινε κατά τον μηδενισμό του φωτομέτρου και ουσιαστικά φανερώνει στελέχη που δεν εμφανίζουν καμία μετρημένη παραγωγή EPS, τα οποία πιθανόν εμφανίζουν ελάχιστη ή ανύπαρκτη ικανότητα σχηματισμού βιοφίλμ.

Η παρατηρούμενη διακύμανση στις τιμές απορρόφησης των EPS υποδηλώνει διαφοροποίηση στην ικανότητα σχηματισμού βιοφίλμ μεταξύ των στελεχών. Στελέχη με ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις EPS, όπως το Kpn2282 (0,1901), πιθανόν διαθέτουν αυξημένη ικανότητα δημιουργίας και σταθεροποίησης βιοφίλμ, δεδομένου ότι τα εξωπολυσακχαριδικά μόρια

αποτελούν τον κύριο δομικό σκελετό της βιομεμβράνης. Αντίθετα, στελέχη με πολύ χαμηλές ή μηδενικές τιμές παραγωγής EPS (π.χ. Kpn2408 με 0,0039), ενδέχεται να έχουν περιορισμένη δυνατότητα σχηματισμού βιοφίλμ ή να βασίζονται σε εναλλακτικούς μηχανισμούς προσκόλλησης.

Τέλος, παρατηρούμε πως η ταξινόμηση των απομονωθέντων στελεχών, με βάση το Sequence Type (ST) ανέδειξε την ύπαρξη διαφορετικών κλωνικών γραμμών. Η ανάλυση των τιμών απορρόφησης που αντιστοιχούν στην παραγωγή EPS ανά ST ανέδειξε διαφοροποιήσεις τόσο μεταξύ διαφορετικών ST όσο και εντός του ίδιου ST.

- **ST11** (*K. pneumoniae*): Οι τιμές κυμάνθηκαν από 0,003958 (Kpn2408) έως 0,06404 (Kpn2112), με τα στελέχη Kpn2281 και Kpn2285 να δίνουν ενδιάμεσες τιμές.
- **ST18** (*K. pneumoniae*): Καταγράφηκαν δύο τιμές, 0,04243 (Kpn2111) και 0,013830 (Kpn2467).
- **ST39** (*K. pneumoniae*): Οι απορροφήσεις κυμάνθηκαν σε ευρύτερο επίπεδο, από 0,0077 (Kpn2369) έως 0,07773 (Kpn2337).
- **ST131** (*E. coli*): Τα δύο στελέχη, Eco2131 και Eco2180, παρουσίασαν παρόμοιες τιμές 0,04588 και 0,03952 αντίστοιχα.
- **ST111** (*P. aeruginosa*): Τα στελέχη PaeA2266 και PaeA2298, παρουσίασαν παρόμοιες σε μέτρια επίπεδα τιμές 0,02020 και 0,03461 αντίστοιχα, ενώ τα στελέχη PaeA2380 και PaeA2441, παρουσίασαν σχεδόν μηδενικές τιμές 0,00026 και 0,001557 αντίστοιχα.

Συνολικά, παρατηρήθηκαν σχετικές ομοιότητες μεταξύ των στελεχών που ανήκουν στον ίδιο ST, αλλά και διαφοροποιήσεις στην κατανομή των τιμών απορρόφησης μεταξύ διαφορετικών ST.

4.2. Αποτελέσματα μεθόδου Microbial Adhesion to Hydrocarbon (MATH)

Στον Πίνακα 5 παρατίθενται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση και την επεξεργασία των συνολικά 90 δειγμάτων, έπειτα από την εφαρμογή της μεθόδου Microbial Adhesion to Hydrocarbon (MATH). Η συγκεκριμένη τεχνική επιλέχθηκε λόγω της ευρείας χρήσης της στη μελέτη της υδρόφοβης συμπεριφοράς μικροοργανισμών και στη διερεύνηση της ικανότητας τους να προσκολλώνται σε υδρογονανθρακικές επιφάνειες.

ΔΕΙΓΜΑ	ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ		CSH
	ΧΩΡΙΣ ΤΟΛΟΥΟΛΙΟ	ΜΕ ΤΟΛΟΥΟΛΙΟ	
Kpn 2281	0.3087	0.3673	-14.7100
Kpn 2111	0.3202	0.4118	-28.607
Kpn 2105	0.2670	0.3515	-31.648
Kpn 2112	0.3571	0.3780	-5.853
Kpn 2408	0.3246	0.4353	-34.104
Kpn 2467	0.3468	0.3916	-12.918
Kpn 2323	0.3304	0.3312	-0.242
Kpn 2337	0.2452	0.3029	-23.532

Kpn 2300	0.3261	0.3482	-6.777
Kpn 2285	0.3197	0.3482	-8.915
Kpn 2430	0.1516	0.1975	-30.2780
Kpn 2438	0.5422	0.2157	60.218
Kpn 2440	0.1521	0.03091	79.678
Kpn 6376/10/2020	0.2267	0.2468	-8.8660
Kpn 6820/10/2020	0.5293	0.2508	52.617
Kpn 8436/10/2020	0.1625	0.2339	-43.938
Kpn 8819/10/2020	0.1753	0.2076	-18.426
Kpn 9066/10/2020	0.1776	0.2985	-68.074
Kpn 9174/10/2020	0.2051	0.2543	-23.988
Kpn 2188	0.2069	0.2381	-15.08
Kpn 2192	0.1432	0.2320	-62.011
			-
Kpn 2277	0.05175	0.1213	134.3960
Kpn 2282	0.1290	0.1792	-38.915
Kpn 2308	0.2916	0.2080	28.669
Kpn 2335	0.1474	0.2410	-63.5
Kpn 2358	0.2124	0.2666	-25.5180
Kpn 2341	0.4555	0.5820	-27.772
Kpn 2399	0.1234	0.2564	-107.78
Kpn 2369	0.1530	0.2567	-67.778
Kpn 9251	0.2635	0.3249	-23.302
Pae 681/11/2020	0.5749	0.2906	49.45200
Pae 6114/10/2020	0.5123	0.2363	53.87500
Pae 4014/09/2020	0.04730	0.03176	32.854
Pae 400/11/2020	0.5557	0.2596	53.284
Pae 6560/10/2020	0.3672	0.4173	-13.644
Pae 4917/09/2020	0.5200	0.3029	41.75
Pae A2266	0.3533	0.4761	-34.758
Pae A2231	0.3525	0.2480	29.645
Pae A2276	0.3567	0.2994	16.064
Pae A2166	0.2915	0.1510	48.199
Pae A2297	0.2947	0.3001	-1.832
Pae A2298	0.3377	0.1876	44.448
Pae A2325	0.6562	0.2755	58.016
Pae A2380	0.4973	0.2927	41.142
Pae A2432	0.4985	0.3066	38.495
Pae A2433	0.009949	0.02402	-141.43
Pae A2441	0.3042	0.2512	17.423
Pae A2486	0.2929	0.2638	9.935
Pae A2493	0.01704	0.03167	-85.857
Pae A2542	0.6541	0.3368	48.509
Pae A2544	0.4764	0.3349	29.702
Pae A2550	0.6082	0.3140	48.372

Pae A2564	0.2729	0.1298	52.437
Pae A2565	0.4661	0.3042	34.735
Pae A2608	0.1291	0.05579	56.785
Pae A2657	0.5154	0.2782	46.022
Pae A2698	0.2712	0.2656	2.065
Pae A2732	0.7571	0.6695	11.57
Pae A2748	0.6991	0.5088	27.221
Pae A2364	0.5191	0.3950	23.907
Eco 2131	0.6177	0.5596	9.406
Eco 2180	0.4293	0.4589	-6.895
Eco 2194	0.2605	0.3764	-44.491
Eco 2253	0.5384	0.5752	-6.835
Eco 3090	0.2482	0.3818	-53.828
Eco 3092	0.4986	0.5682	-13.959
Eco 3095	0.5150	0.6705	-30.194
Eco 3096	0.4836	0.5522	-14.185
Eco 3191	0.6252	0.6797	-8.717
Eco 3281	0.4687	0.4672	0.32
Eco 5740/01/2021	0.3806	0.5171	-35.864
Eco 5868/09/2020	0.4521	0.5681	-25.658
Eco 6289/10/2020	0.5326	0.6334	-18.926
Eco 6371/10	0.5325	0.6495	-21.972
Eco 6440/10	0.5795	0.6621	-14.254
Eco 6443/10	0.5544	0.6789	-22.457
Eco 6502/10/2020	0.5388	0.6128	-13.734
Eco 7293/04/2021	0.5261	0.5891	-11.975
Eco 7686	0.4320	0.5199	-20.347
Eco 7702/05	0.5129	0.5764	-12.381
Eco 7827	0.5122	0.6576	-28.387
Eco 7853/05/2021	0.4619	0.4894	-5.954
Eco 8539/05	0.6078	0.7163	-17.851
Eco 8593/05/2021	0.5043	0.6267	-24.271
Eco 8623/05	0.6432	0.7969	-23.896
Eco 8704/05/2021	0.6734	0.7844	-16.484
Eco A2194	0.3027	0.4135	-36.604
Eco A2268	0.6261	0.7383	-17.92
Eco A3169	0.4805	0.6085	-26.639
Eco A3189	0.3049	0.6013	-97.212

Πίνακας 5: Αποτελέσματα μεθόδου Microbial Adhesion to Hydrocarbon (MATH)

Η εφαρμογή της μεθόδου Microbial Adhesion to Hydrocarbons (MATH) στα στελέχη βακτηρίων που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη, ανέδειξε έντονες διαφοροποιήσεις ως προς την υδροφοβικότητα της κυτταρικής τους επιφάνειας (CSH). Η ποσοτική αποτύπωση των αποτελεσμάτων στον Πίνακα 5 καταδικνύει ότι τα τρία είδη βακτηρίων που εξετάστηκαν, *E. coli*, *K. pneumoniae* και *P. aeruginosa*, παρουσίασαν ετερογενή συμπεριφορά, τόσο μεταξύ τους όσο

και εντός του ίδιου είδους. Σε αρκετά στελέχη καταγράφηκαν αρνητικές τιμές CSH, οι οποίες υποδηλώνουν χαμηλή ή και ανύπαρκτη ικανότητα προσκόλλησης σε υδρογονάνθρακες, στοιχείο που αντανακλά κυρίως υδρόφιλες επιφάνειες. Αντίθετα, σε άλλα στελέχη παρατηρήθηκαν ιδιαίτερα υψηλές θετικές τιμές, άνω του 60%, που μαρτυρούν έντονα υδρόφοβο χαρακτήρα και άρα αυξημένη προσκολλητική ικανότητα.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το είδος *K. pneumoniae*, το οποίο εμφανίζει τη μεγαλύτερη διακύμανση στις τιμές CSH. Ορισμένα στελέχη, όπως τα Kpn2438 και Kpn2440, καταγράφηκαν με υψηλό ποσοστό υδροφοβικότητας, γεγονός που υποδηλώνει ότι διαθέτουν αυξημένη ικανότητα προσκόλλησης σε βιοτικές και αβιοτικές επιφάνειες και κατά συνέπεια αυξημένη ικανότητα σχηματισμού βιοφίλμ. Αντίθετα, άλλα στελέχη του ίδιου είδους παρουσίασαν αρνητικές τιμές, γεγονός που αναδिकνύει την εκτεταμένη ενδοειδική ποικιλομορφία της *K. pneumoniae* και υπογραμμίζει την ανάγκη αξιολόγησης κάθε απομονωμένου στελέχους μεμονωμένα. Στην περίπτωση της *P. aeruginosa* οι τιμές συγκεντρώθηκαν κυρίως στη χαμηλή και μέση κλίμακα, χωρίς ακραίες αποκλίσεις. Το εύρημα αυτό ευθυγραμμίζεται με την ήδη γνωστή βιολογία του είδους, το οποίο βασίζεται περισσότερο σε άλλους μηχανισμούς για την προσκόλληση και την εγκατάσταση, όπως είναι η παραγωγή εξωπολυσακχαριτών και η ενεργοποίηση συστημάτων επικοινωνίας, παρά αποκλειστικά στην υδροφοβικότητα της επιφάνειας. Αντίστοιχα, στα στελέχη *E. coli* εμφανίστηκαν κυρίως χαμηλές ή αρνητικές τιμές CSH, στοιχείο που μαρτυρά μειωμένη υδροφοβικότητα σε σχέση με τα άλλα δύο είδη, χωρίς ωστόσο να αναιρείται η ικανότητα τους να προκαλούν λοιμώξεις μέσω εναλλακτικών μηχανισμών παθογένειας.

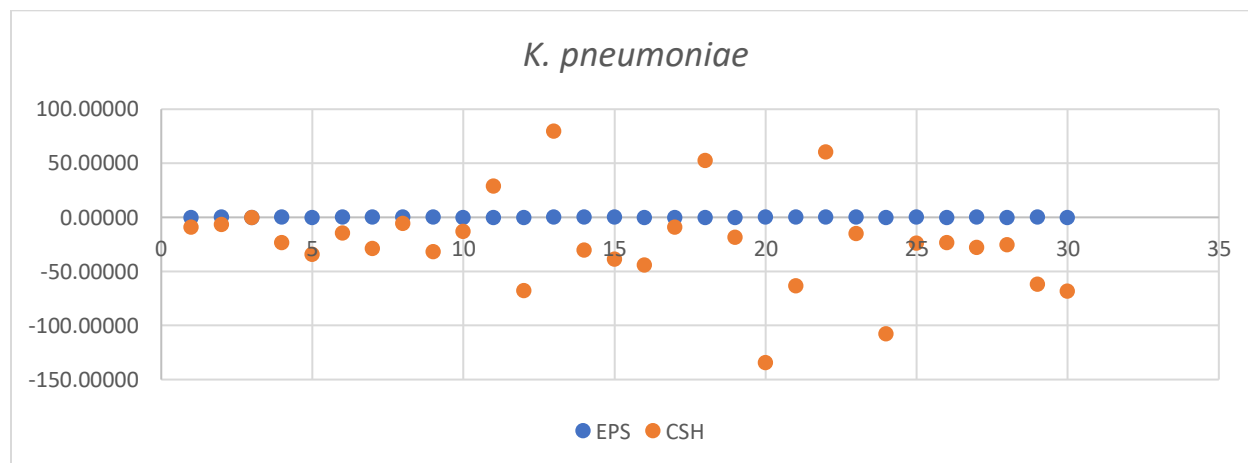
4.3. Συσχέτιση ανάμεσα στην αυξημένη παραγωγή EPS και στην αυξημένη υδροφοβικότητα

Η μελέτη της σχέσης ανάμεσα στην παραγωγή εξωπολυσακχαριτών (EPS) και την υδροφοβικότητα της κυτταρικής επιφάνειας (CSH) αποτελεί σημαντικό βήμα για την κατανόηση των μηχανισμών παθογένειας των βακτηρίων. Η ανάλυση μιας πιθανής συσχέτισης ανάμεσα στις δύο αυτές παραμέτρους μπορεί να αποκαλύψει κατά πόσο η υψηλή παραγωγή EPS συνδέεται με αυξημένη υδροφοβικότητα και άρα με μεγαλύτερη λοιμογόνο δύναμη. Η αξιολόγηση αυτή είναι σημαντική τόσο σε επίπεδο μεμονωμένων στελεχών εντός κάθε βακτηριακού είδους, όσο και σε συγκριτικό επίπεδο μεταξύ των τριών παθογόνων. Ο συντελεστής συσχέτισης εμφανίζεται ως ένας αριθμός από -1 έως +1.

- Κοντά στο +1 → ισχυρή θετική συσχέτιση
- Κοντά στο -1 → ισχυρή αρνητική συσχέτιση
- Κοντά στο 0 → αδύναμη ή μηδενική συσχέτιση

Μέσα από αυτήν τη συγκριτική προσέγγιση, διερευνάται αφενός εάν παρατηρούνται διαφοροποιήσεις στη συσχέτιση EPS-CSH εντός των στελεχών μιας οικογένειας, και αφετέρου εάν τα τρία βακτήρια εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα συσχέτισης που αντανακλούν τις ιδιαιτερότητες της παθογονικότητάς τους. Η κατανόηση αυτών των σχέσεων μπορεί να συμβάλλει στην καλύτερη αποσαφήνιση των μηχανισμών μολυσματικότητας και στην ανάπτυξη πιο στοχευμένων στρατηγικών αντιμετώπισης των λοιμώξεων.

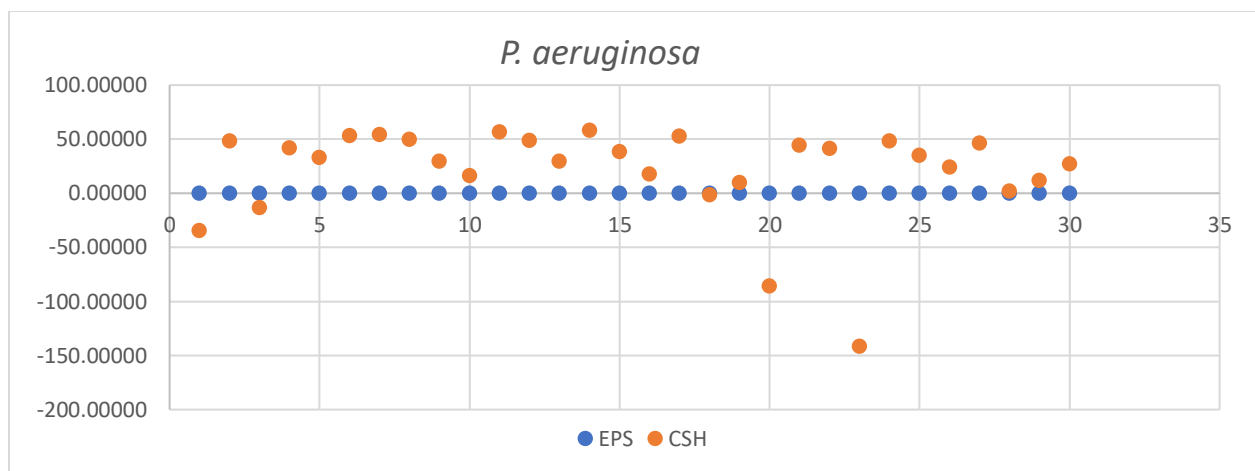
Το διάγραμμα διασποράς (scatter plot) αποτελεί μια στατιστική απεικόνιση που χρησιμοποιείται για να διερευνηθεί η σχέση μεταξύ δύο μεταβλητών. Κάθε σημείο στο διάγραμμα αντιπροσωπεύει ένα δείγμα, το οποίο τοποθετείται στις αντίστοιχες τιμές των δύο μετρούμενων παραμέτρων (άξονας X – EPS και άξονας Ψ – CSH). Με τον τρόπο αυτό, καθίσταται δυνατή η οπτική εκτίμηση πιθανής συσχέτισης, δηλαδή αν η μεταβολή της μιας μεταβλητής σχετίζεται με τη μεταβολή της άλλης. Σε περίπτωση που τα σημεία ακολουθούν ανοδική ή καθοδική τάση, υποδηλώνεται θετική ή αρνητική συσχέτιση αντίστοιχα, ενώ μια τυχαία κατανομή χωρίς προσανατολισμό δείχνει απουσία γραμμικής σχέσης.



Διάγραμμα 1: συσχέτιση ανάμεσα στα στελέχη της *K. pneumoniae*.

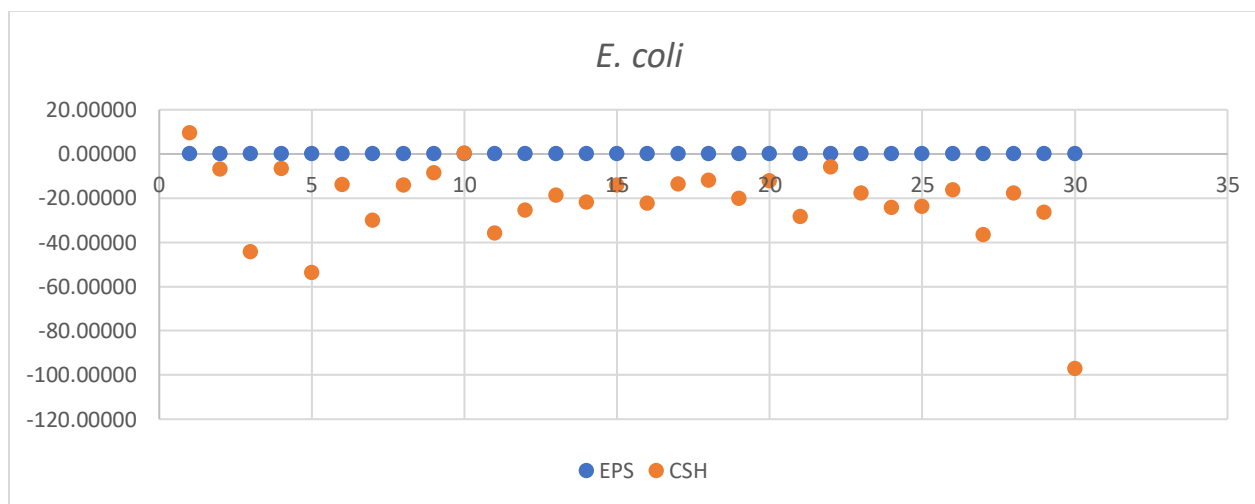
Για τα στελέχη της *K. pneumoniae*, ανάλυση για συσχέτιση μεταξύ της παραγωγής εξωπολυσακχαριτών (EPS) και της υδροφοβικότητας της κυτταρικής επιφάνειας (CSH), με βάση τα αποτελέσματα της μεθόδου MATH, το διάγραμμα διασποράς (scatter plot) έδειξε ότι τα δεδομένα κατανέμονται χωρίς σαφή γραμμική τάση. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από τον υπολογισμό του συντελεστή συσχέτισης Pearson ($r = 0.0819$), όπου η τιμή αυτή είναι ιδιαίτερα χαμηλή και υποδεικνύει ότι δεν υπάρχει ουσιαστική γραμμική συσχέτιση μεταξύ των δύο παραμέτρων.

Με βάση τα αποτελέσματα, φαίνεται ότι η αυξημένη παραγωγή EPS στα στελέχη της *K. pneumoniae* δεν συνοδεύεται από αυξημένη υδροφοβικότητα της κυτταρικής επιφάνειας. Πιθανόν αυτό να οφείλεται στο ότι η χημική σύσταση των EPS στα στελέχη αυτά μπορεί να είναι πιο υδρόφιλη, επομένως να μην επηρεάζει την υδροφοβικότητα της κυτταρικής επιφάνειας. Επίσης, η *K. pneumoniae* μπορεί να ενισχύει την παθογένεια της μέσω διαφορετικών μηχανισμών (π.χ. κάψα, ένζυμα, αντοχή στα αντιβιοτικά), χωρίς να χρειάζεται να υπάρχει άμεση σύνδεση μεταξύ EPS και CSH.



Διάγραμμα 2: συσχέτιση ανάμεσα στα στελέχη της *P. aeruginosa*.

Στα στελέχη *P. aeruginosa* η συσχέτιση ήταν ασθενής προς μέτρια θετική ($r = 0.314$). Στο scatter plot διακρίνεται μια χαλαρή ανοδική τάση. Στελέχη με υψηλότερη παραγωγή EPS τείνουν να εμφανίζουν αυξημένες τιμές CSH, αλλά η σχέση και πάλι δεν είναι τόσο ισχυρή. Το εύρημα αυτό είναι ενδιαφέρον, δεδομένου ότι η *P. aeruginosa* θεωρείται κλασικό παράδειγμα βακτηρίου που βασίζεται στην έντονη παραγωγή EPS για το σχηματισμό βιοφίλμ. Αυτό υποδηλώνει ότι, παρότι τα EPS συμβάλλουν στη δημιουργία βιοφίλμ, η υδροφοβικότητα επηρεάζεται και από επιπλέον μηχανισμούς (π.χ. σύσταση εξωτερικών συστατικών μεμβράνης, πρωτεΐνες/ λιποπολυσακχαρίτες επιφάνειας).



Διάγραμμα 3: συσχέτιση ανάμεσα στα στελέχη της *E. coli*.

Στην περίπτωση των στελεχών της *E. coli*, η ανάλυση της σχέσης μεταξύ παραγωγής εξωπολυσακχαριτών (EPS) και υδροφοβικότητας (CSH) ήταν ασθενής θετική ($r = 0.146$). Παρά την ύπαρξη στελεχών με σχετικά αυξημένη παραγωγή EPS, η αντίστοιχη υδροφοβικότητα δεν ακολούθησε ανάλογη πορεία, γεγονός που αποτυπώθηκε στο scatter plot με σημεία διάσπαρτα και χωρίς ξεκάθαρη γραμμική κατανομή. Το εύρημα αυτό υποδεικνύει ότι, για την *E. coli*, η

παραγωγή EPS και η υδροφοβικότητα αποτελούν ανεξάρτητους παράγοντες παθογένειας. Πιθανόν η συμβολή των EPS στη λοιμογόνο ικανότητα σχετίζεται περισσότερο με τη δομή και τη σταθερότητα του βιοφίλμ, ενώ η CSH να συνδέεται με εναλλακτικούς μηχανισμούς πρόσφυσης που δεν επηρεάζονται από τους εξωπολυσακχαρίτες.

Συνολικά, και για τα τρία είδη, παρατηρείται θετική αλλά αδύναμη σχέση μεταξύ EPS και CSH, εντονότερη στην *P. aeruginosa* και πολύ ασθενή σε *E. coli* και *K. pneumoniae*. Με βάση τις τιμές r (0.082 – 0.314), τα δεδομένα δείχνουν ότι η σχέση μεταξύ παραγωγής EPS και υδροφοβικότητας δεν είναι γραμμική και δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική συσχέτιση. Αυτό υποδεικνύει πως οι δύο παράγοντες, αν και κρίσιμοι για την παθογένεια, λειτουργούν με διαφορετικό τρόπο. Η παραγωγή EPS φαίνεται να συμβάλλει κυρίως στη δομή και την προστασία του βιοφίλμ, ενώ η CSH αντανakλά διαφορετικούς μηχανισμούς πρόσφυσης που ενισχύουν την ικανότητα αποικισμού και επιβίωσης.

4.4. Συσχέτιση ανάμεσα στην αυξημένη παραγωγή EPS, στην αυξημένη υδροφοβικότητα και στην παραγωγή βιοφίλμ

Από μια παράλληλη μελέτη με τίτλο ‘Microbial virulence-biofilms and serum resistance assays’, η οποία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας υπό την καθοδήγηση του κ. Παπαγιαννήτη, εξετάστηκε η ικανότητα σχηματισμού βιοφίλμ από τα ίδια στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν και στην παρούσα εργασία. Τα δεδομένα εκείνα αξιοποιήθηκαν συμπληρωματικά, προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανή συσχέτιση της παραγωγής βιοφίλμ τόσο με την παραγωγή εξωπολυσακχαριτών (EPS), όσο και με την υδροφοβικότητα της κυτταρικής μεμβράνης (CSH).

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων ανέδειξε διαφοροποιήσεις στη σχέση μεταξύ παραγωγής εξωπολυσακχαριτών (EPS) και σχηματισμού βιοφίλμ ανάμεσα στα τρία είδη βακτηρίων που μελετήθηκαν. Στα στελέχη της *K. pneumoniae* καταγράφηκε τιμή συντελεστή συσχέτισης $r = 0,371$, γεγονός που υποδηλώνει ασθενή προς μέτρια θετική συσχέτιση. Αντίθετα, στην *P. aeruginosa* η τιμή $r = 0,048$ καταδεικνύει πρακτικά την απουσία γραμμικής σχέσης μεταξύ των δύο παραμέτρων, ενώ στην *E. coli* η τιμή $r = 0,104$ υποδηλώνει μόνο μια πολύ ασθενή θετική τάση, η οποία δεν μπορεί να ερμηνευτεί ως ουσιαστική συσχέτιση.

Παράλληλα, εξετάστηκε η πιθανή συσχέτιση ανάμεσα στις τιμές βιοφίλμ και στην υδροφοβικότητα της κυτταρικής μεμβράνης (CSH), με τα αποτελέσματα να αποκαλύπτουν εξαιρετικά χαμηλές τιμές συντελεστή συσχέτισης. Συγκεκριμένα, στην *K. pneumoniae* υπολογίστηκε $r = 0,0245$, στην *P. aeruginosa* $r = 0,088$ και στην *E. coli* η τιμή ήταν $r = 0,0236$. Οι τιμές υποδηλώνουν ότι, υπό τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες, δεν τεκμηριώνεται ουσιαστική γραμμική σχέση μεταξύ της υδροφοβικότητας της κυτταρικής επιφάνειας και της ικανότητας σχηματισμού βιοφίλμ.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη ανέδειξε τη σημασία της πολυπαραγοντικής προσέγγισης στην αξιολόγηση της παθογονικότητας των Gram-αρνητικών βακτηρίων. Η εφαρμογή δύο διαφορετικών, αλλά συμπληρωματικών μεθοδολογιών, της εκχύλισης και ποσοτικοποίησης εξωπολυσακχαριτών (EPS) και της Microbial Adhesion to Hydrocarbon (MATH), παρείχε πολύτιμες πληροφορίες για διαφορετικές πτυχές της λοιμογόνου δυναμικής.

Η μέθοδος εκχύλισης και ποσοτικοποίησης εξωπολυσακχαριτών (EPS) επικεντρώνεται στη μελέτη της παραγωγής εξωπολυσακχαριτικών δομών που αποτελούν τη βάση για το σχηματισμό και τη σταθεροποίηση βιοφίλμ. Η αυξημένη παραγωγή EPS συσχετίζεται άμεσα με την ικανότητα των βακτηρίων να εγκαθιστούν χρόνιες λοιμώξεις, καθώς τα βιοφίλμ αυτά προσφέρουν αφενός μηχανική προστασία έναντι των αντιβιοτικών και των ασθενειών του συστήματος, αφετέρου προκαλούν ευνοϊκά μικροπεριβάλλοντα για την ανταλλαγή γενετικού υλικού. Επομένως, τα αποτελέσματα της μεθόδου EPS αποτυπώνουν κυρίως τα χρόνια νοσήματα και την ανθεκτική φάση της λοίμωξης, υποδεικνύοντας στελέχη με αυξημένη λοιμογόνο δράση σε βάθος χρόνου.

Η παρουσία στελεχών με ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις EPS είναι ένδειξη της ενισχυμένης ικανότητάς τους να σχηματίζουν βιοφίλμ. Τα εξωπολυσακχαριδικά αυτά μόρια δρουν ως «κόλλα» που συγκρατεί τα κύτταρα μεταξύ τους και συμβάλλει στη δομική σταθερότητα του βιοφίλμ, ενώ ταυτόχρονα δημιουργεί ένα προστατευτικό μικροπεριβάλλον. Έτσι, τα βακτήρια που παράγουν υψηλές ποσότητες EPS είναι πιθανό να εμφανίσουν αυξημένη ανθεκτικότητα, καθώς και μηχανισμούς που αντιστέκονται στις γραμμές άμυνας του ανοσοποιητικού συστήματος του εκάστοτε οργανισμού, στοιχεία που συνδέονται άμεσα με την παθογονικότητά τους. Από την άλλη πλευρά, στελέχη με πολύ χαμηλή ή σχεδόν μηδενική παραγωγή EPS ενδέχεται να διαθέτουν μειωμένη ικανότητα προσκόλλησης και αποίκησης, γεγονός που τα καθιστά λιγότερο ικανά να αναπτύξουν χρόνιες λοιμώξεις που βασίζονται στη σταθερότητα του βιοφίλμ.

Είναι επίσης αξιοσημείωτο ότι η μεγάλη διακύμανση στις τιμές EPS δεν περιορίζεται σε διαφοροποίηση μεταξύ διαφορετικών ειδών (π.χ. *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*), αλλά παρατηρείται ακόμη και ανάμεσα σε στελέχη της ίδιας ομάδας. Αυτό επιβεβαιώνει ότι η παραγωγή EPS είναι ένα πολυπαραγοντικό χαρακτηριστικό, το οποίο επηρεάζεται όχι μόνο από το είδος του μικροοργανισμού, αλλά και από επιμέρους μηχανισμούς ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, μεταβολικά μονοπάτια και περιβαλλοντικά ερεθίσματα (π.χ. διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά, οξειδωτικό στρες, παρουσία αντιβιοτικών κλπ).

Η διαπίστωση αυτή έχει ιδιαίτερη σημασία για την κατανόηση της λοιμογόνου δράσης των μικροοργανισμών που εξετάστηκαν. Για παράδειγμα, τα στελέχη υψηλής παραγωγής EPS είναι πιο πιθανό να εγκαθίσταται σε ιατρικές συσκευές, όπως καθετήρες ή αναπνευστήρες, σχηματίζοντας ανθεκτικά βιοφίλμ που καθιστούν δύσκολη την αποστείρωση και αυξάνουν τον κίνδυνο ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων. Αντίθετα, η χαμηλή παραγωγή EPS, μπορεί να

υποδηλώνει στελέχη με πιο περιορισμένη ικανότητα μακροχρόνιας εγκατάστασης, αλλά μια πιθανή συμμετοχή σε οξείες λοιμώξεις όπου ο σχηματισμός βιοφίλμ δεν είναι κρίσιμος.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα του Πίνακα 4 ανέδειξαν την ύπαρξη ενός ευρέος φάσματος παραγωγικότητας EPS στα εξεταζόμενα στελέχη. Η ανομοιογένεια αυτή προσδίδει ιδιαίτερη αξία στη συγκεκριμένη μεθοδολογία, καθώς καθιστά δυνατή την αξιολόγηση της ικανότητας των μικροοργανισμών να σχηματίζουν βιοφίλμ και κατά συνέπεια να εκδηλώνουν αυξημένη παθογονικότητα. Το εύρημα αυτό αποτέλεσε κρίσιμο κομμάτι της παρούσας μελέτης, δεδομένου ότι επέτρεψε στη συνέχεια να συσχετιστούν τα δεδομένα EPS με άλλες παραμέτρους, όπως η υδροφοβικότητα της κυτταρικής επιφάνειας (μέθοδος MATH), προκειμένου να εξαχθούν ολοκληρωμένα συμπεράσματα για τη λοιμογόνο δυναμική των στελεχών.

Η ανάλυση των στοιχείων που σχετίζονται με την παραγωγή EPS ανά ST ανέδειξε ενδιαφέρουσες διαφοροποιήσεις. Στα στελέχη *K. pneumoniae* παρατηρήθηκε σημαντική ενδο-ομαδική διακύμανση, ιδιαίτερα στο ST39, όπου οι τιμές κυμάνθηκαν από πολύ χαμηλά (0,0077) έως ιδιαίτερα υψηλό επίπεδο (0,07773). Αυτό υποδηλώνει ότι, ακόμη και εντός του ίδιου γενετικού υπότυπου, μπορεί να συνυπάρχουν στελέχη με διαφορετική ικανότητα παραγωγής EPS, πιθανόν λόγω δευτερογενών γενετικών ή ρυθμιστικών διαφορών.

Αντίθετα, στα στελέχη του ST131 της *E. coli* εμφανίστηκαν πολύ κοντινές τιμές (0,04588 και 0,03952), γεγονός που δείχνει μεγαλύτερη ομοιογένεια στην παραγωγή EPS. Αυτό δείχνει ότι τα στελέχη του συγκεκριμένου κλωνικού τύπου έχουν σταθερό φαινότυπο ως προς την παραγωγή εξωπολυσακχαριτών. Έτσι, η ομοιογενής παραγωγή EPS ενισχύει την άποψη ότι ο συγκεκριμένος κλώνος διαθέτει συνεπείς μηχανισμούς παθογένειας, οι οποίοι συμβάλλουν στην ικανότητα του να εγκαθιδρύει λοιμώξεις και να εμφανίζει ανθεκτικότητα.

Στην *P. aeruginosa* (ST111) η ανάλυση των στελεχών έδειξε ιδιαίτερα μεγάλη διακύμανση στην παραγωγή EPS. Συγκεκριμένα, δύο στελέχη (PaeA2266 και PaeA2298) εμφάνισαν μέτριες τιμές απορρόφησης (0,02020 και 0,03461), ενώ τα υπόλοιπα δύο (PaeA2380 και PaeA2441) κατέγραψαν σχεδόν μηδενικές τιμές (0,00026 και 0,001557). Η διαφοροποίηση αυτή φανερώνει έντονη ενδο-ομαδική ετερογένεια, η οποία δεν παρατηρήθηκε στον ίδιο βαθμό σε άλλα ST. Στην *K. pneumoniae*, οι ομάδες ST11 και ST18 παρουσίασαν επίσης εσωτερική διακύμανση, αν και λιγότερο έντονη σε σχέση με το ST39.

Συνολικά, τα δεδομένα δείχνουν ότι η σχέση μεταξύ ST και παραγωγής EPS δεν είναι απόλυτη. Ορισμένοι κλώνοι (π.χ. ST131 στην *E. coli*) εμφανίζουν μεγαλύτερη συνέπεια στην έκφραση του φαινοτύπου, ενώ άλλοι (π.χ. ST39 στην *K. pneumoniae*) παρουσιάζουν ετερογένεια. Αυτό πιθανόν να αντικατοπτρίζει διαφορές στη ρύθμιση της παραγωγής EPS, την παρουσία επιπλέον γενετικών παραγόντων ή την επίδραση του μικροπεριβάλλοντος στην έκφραση των χαρακτηριστικών αυτών.

Από την άλλη πλευρά, η μέθοδος Microbial Adhesion to Hydrocarbon (MATH) αξιολογεί την υδροφοβικότητα της βακτηριακής επιφάνειας, μια ιδιότητα που συνδέεται με την αρχική φάση της παθογένειας, δηλαδή με την ικανότητα προσκόλλησης σε βιοτικές ή αβιοτικές επιφάνειες. Στελέχη

με υψηλή τιμή CSH παρουσιάζουν αυξημένη πιθανότητα ταχείας αποίκησης επιφανειών όπως τα υλικά ιατρικών συσκευών ή ιστούς του ξενιστή, γεγονός που τους προσδίδει πλεονέκτημα κατά την εγκατάσταση της λοίμωξης. Η μέθοδος MATH καταγράφει μια περισσότερο δυναμική και άμεση εμφάνη παράμετρο παθογένειας, η οποία ωστόσο δεν αντανακλά τη μακροπρόθεσμη ικανότητα επιβίωσης ή ανθεκτικότητας.

Η διαφοροποίηση που παρατηρείται ανάμεσα στα τρία είδη και κυρίως ανάμεσα στα στελέχη της *K. pneumoniae* έχει σημαντικές βιολογικές και κλινικές προεκτάσεις. Από την άλλη, χαμηλές ή αρνητικές τιμές CSH δεν υποδηλώνουν μειωμένη παθογένεια, καθώς άλλοι παράγοντες, όπως η παραγωγή τοξινών, η αντοχή στα αντιβιοτικά και η ύπαρξη ειδικών συστημάτων έκκρισης, μπορούν να αντισταθμίσουν τη μειωμένη ικανότητα προσκόλλησης. Επίσης, η μέθοδος MATH αποδεικνύεται ως ένα αξιόπιστο εργαλείο για την εκτίμηση της υδροφοβικότητας των κλινικών αυτών δειγμάτων, ενώ ταυτόχρονα υπογραμμίζει ότι η παθογένεια είναι πολυπαραγοντικό φαινόμενο που δεν μπορεί να ερμηνευθεί αποκλειστικά από μία μόνο παράμετρο.

Συγκεκριμένα η *K. pneumoniae* παρουσίασε γενικά υψηλότερη παραγωγή EPS, γεγονός που συνδέεται με την ικανότητά της να σχηματίζει ιδιαίτερα ανθεκτικά βιοφίλμ και να εγκαθιδρύει χρόνιες λοιμώξεις. Το εύρημα αυτό ευθυγραμμίζεται με την κλινική εμπειρία, όπου η *K. pneumoniae* αναδεικνύεται ως σημαντικό νοσοκομειακό παθογόνο με αυξημένα ποσοστά πολυανθεκτικότητας.

Η *P. aeruginosa* διαφοροποιήθηκε εμφανώς ως προς την υδροφοβικότητα της κυτταρικής επιφάνειας, με αρκετά μεγάλο μέρος των στελεχών να εμφανίζουν υψηλές τιμές στη μέθοδο MATH. Το χαρακτηριστικό αυτό εξηγεί την ικανότητα της να αποικίζει γρήγορα τους ιστούς του ξενιστή, καθώς και τις ιατροτεχνολογικές επιφάνειες, γεγονός που καθιστά κρίσιμη την πρόληψη της αρχικής εγκατάστασης. Παράλληλα, η παραγωγή EPS από την *P. aeruginosa* συνέβαλε στην ενίσχυση της ανθεκτικότητας της, αποδεικνύοντας τη συνδιαστική στρατηγική της παθογένειας.

Η *E. coli* εμφάνισε μεγαλύτερη ετερογένεια, με τα στελέχη να παράγουν υψηλό επίπεδο EPS, αλλά και να εμφανίζουν αυξημένη υδροφοβικότητα. Το γεγονός αυτό αποτυπώνει τη γενετική και φαινοτυπική ποικιλομορφία του είδους, το οποίο μπορεί να είναι τόσο συμβιωτικός μικροοργανισμός του εντέρου, όσο και ως παθογόνος παράγοντας με ποικίλες στρατηγικές μόλυνσης.

Η ανάλυση των δεδομένων έδειξε ότι για την *K. pneumoniae* δεν παρατηρήθηκε ουσιαστική συσχέτιση, γεγονός που υποδηλώνει ότι η παραγωγή EPS δεν επηρεάζει σημαντικά την υδροφοβικότητα στα στελέχη αυτά. Για την *E. coli* καταγράφηκε πολύ ασθενής θετική συσχέτιση, ενώ για την *P. aeruginosa* παρατηρήθηκε κάπως εντονότερη αν και πάλι όχι ισχυρή τάση παράλληλης αύξησης EPS και CSH. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με τη βιβλιογραφία, σύμφωνα με την οποία η *P. aeruginosa* αποτελεί πρότυπο οργανισμού όπου οι EPS διαδραματίζουν καίριο ρόλο στη δημιουργία βιοφίλμ, αλλά η υδροφοβικότητα επηρεάζεται και από άλλους μηχανισμούς, όπως η σύνθεση της εξωτερικής μεμβράνης και η παρουσία ειδικών πρωτεϊνών επιφάνειας.

Η έλλειψη ισχυρής συσχέτισης σε όλα τα είδη δείχνει ότι η παθογένεια είναι πολυπαραγοντική. Η παραγωγή EPS φαίνεται να σχετίζεται περισσότερο με την προστασία και τη σταθεροποίηση του βιοφίλμ, ενώ η υδροφοβικότητα αντανακλά μηχανισμούς πρόσφυσης που δρουν ανεξάρτητα. Το γεγονός αυτό αναδεικνύει την ανάγκη για περαιτέρω μελέτη της ποιοτικής σύστασης των EPS και των μοριακών μηχανισμών που ρυθμίζουν την CSH.

Συνολικά, η συνδιαστική εφαρμογή των μεθόδων EPS και MATH προσφέρει μια πιο σφαιρική και αξιόπιστη αξιολόγηση της βακτηριακής παθογένειας. Ενώ η EPS αναδεικνύει τον ρόλο της ανθεκτικότητας και της χρονικότητας, η MATH φωτίζει την ικανότητα αρχικής προσκόλλησης και αποίκησης. Η ολοκληρωμένη χρήση τους μπορεί να συμβάλει ουσιαστικά τόσο στη βασική κατανόηση των μηχανισμών λοιμογένεσης, όσο και στη διαμόρφωση νέων στρατηγικών πρόληψης και θεραπευτικής αντιμετώπισης των Gram-αρνητικών παθογόνων.

Σημαντική πρόσθετη πληροφορία προκύπτει από μια άλλη μελέτη με τίτλο ‘Microbial virulence-biofilms and serum resistance assays’ που έχει διεξαχθεί στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισα, με επικεφαλής τον κ. Παπαγιαννήτη. Στη μελέτη αυτή, τα δεδομένα δείχνουν ότι η ικανότητα σχηματισμού βιοφίλμ δεν εξαρτάται αποκλειστικά από την ποσότητα των EPS αλλά και από ποιοτικά χαρακτηριστικά, όπως η ιξώδη σύσταση των αποικιών και η συνεργασία με άλλες δομικές πρωτεΐνες. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί γιατί στην παρούσα εργασία δεν παρατηρήθηκε στατιστικά ισχυρή γραμμική σχέση EPS-CSH.

Παράλληλα, υλικό από την ίδια μελέτη αναδεικνύει την ποικιλία των λοιμογόνων παραγόντων που διαθέτουν τα συγκεκριμένα είδη. Για παράδειγμα, στην *P. aeruginosa* η παραγωγή πυοκυανίνης, η έκκριση ενζύμων (πρωτεασών, ελαστάσης) και οι μηχανισμοί quorum sensing έχουν καθοριστικό ρόλο στη δημιουργία ώριμων βιοφίλμ. Στην *K. pneumoniae*, η διαφοροποίηση μεταξύ «κλασικών» (cKp) και «υπερλοιμογόνων» (hvKp) στελεχών βασίζεται σε χαρακτηριστικά όπως η παραγωγή κάψας, η ικανότητα serum resistance και η υπερβλεννώδης υφή, τα οποία δεν αποτυπώνονται επαρκώς μόνο με την ποσοτικοποίηση EPS ή CSH. Αντίστοιχα, στην *E. coli* η παρουσία σιδεροφόρων και εξειδικευμένων παραγόντων πρόσφυσης (fimbriae, adhesins) επηρεάζει σημαντικά τη λοιμογόνο δράση.

Συγκεκριμένα, με τη βοήθεια του συντελεστή συσχέτισης (r) καταφέραμε να μελετήσουμε κατά πόσο η παραγωγή EPS σχετίζεται με την παραγωγή βιοφίλμ. Έτσι καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η συσχέτιση αυτή διαφέρει σημαντικά μεταξύ των ειδών που μελετήθηκαν. Στα στελέχη της *K. pneumoniae* καταγράφηκε ασθενής προς μέτρια θετική συσχέτιση ($r = 0,371$), γεγονός που υποδηλώνει ότι η αυξημένη παραγωγή EPS μπορεί ενισχύει σε κάποιο βαθμό τον σχηματισμό βιοφίλμ, χωρίς ωστόσο να αποτελεί τον αποκλειστικό καθοριστικό παράγοντα. Αντίθετα, στην *P. aeruginosa* η τιμή του συντελεστή συσχέτισης ($r = 0,048$) κατέδειξε ουσιαστικά απουσία γραμμικής σχέσης, στοιχείο που συμφωνεί με τη γνωστή βιολογία του είδους, το οποίο βασίζεται σε εναλλακτικούς μηχανισμούς, όπως η ρύθμιση μέσω quorum sensing και η συμμετοχή ειδικών πρωτεϊνών επιφάνειας. Στην *E. coli* παρατηρήθηκε πολύ ασθενής θετική συσχέτιση ($r = 0,104$), γεγονός που δείχνει ότι η παραγωγή EPS δεν συνδέεται στενά με την ικανότητα σχηματισμού

βιοφίλμ στα εξεταζόμενα στελέχη. Συνολικά, τα δεδομένα αναδεικνύουν ότι η παραγωγή βιοφίλμ αποτελεί πολυπαραγοντικό φαινόμενο, όπου οι εξωπολυσακχαρίτες συνεισφέρουν μεν στην παθογονικότητα, αλλά σε διαφορετικό βαθμό ανάλογα με το βακτηριακό είδος.

Το ίδιο ακριβώς κάναμε για να δούμε τη συσχέτιση ανάμεσα στην παραγωγή βιοφίλμ και στην υδροφοβικότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν παρατηρείται ουσιαστική συσχέτιση ανάμεσα τους. Οι τιμές του συντελεστή συσχέτισης (r) για την *K. pneumoniae* (0,0245), *P. aeruginosa* (0,088) και *E. coli* (0,0236) υποδηλώνουν ότι η CSH δεν αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την ικανότητα σχηματισμού βιοφίλμ υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες μελέτης. Τα δεδομένα αυτά, υπογραμμίζουν και πάλι τον πολυπαραγοντικό χαρακτήρα της βιολογικής διαδικασίας σχηματισμού βιοφίλμ και δείχνουν ότι πιθανώς άλλοι παράγοντες παίζουν σημαντικότερο ρόλο.

Συνολικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, σε συνδιασμό με τα δεδομένα της έρευνας που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, δείχνουν ότι, αν και οι EPS και η CSH είναι κρίσιμες για τη δημιουργία βιοφίλμ, δεν αποτελούν από μόνες τους επαρκείς δείκτες παθογένειας. Χρειάζεται συνδιαστική μελέτη και άλλων παραμέτρων, όπως η σύσταση και λειτουργικότητα των EPS, η γονιδιακή ρύθμιση των παραγόντων λοιμογόνου δύναμης και η αλληλεπίδραση τους με τις συνθήκες του ξενιστή.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΕΙΑ

1. Κουμεντάκου Ε., (1974), Ψευδομονάδες – νόσοι εκ ψευδομονάδων, Οικολογία και Μικροβιολογία των ψευδομονάδων. Πρακτικά 6^{ου} Εθνικού Συνεδρίου Μικροβιολογίας, Αθήνα.
2. Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. F., & Di Ilio, C. (2013). Escherichia coli in Europe: an overview. *International journal of environmental research and public health*, 10(12), 6235–6254. <https://doi.org/10.3390/ijerph10126235>
3. Boyle, E. C., & Finlay, B. B. (2003). Bacterial pathogenesis: exploiting cellular adherence. *Current opinion in cell biology*, 15(5), 633–639. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(03\)00099-1](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(03)00099-1)
4. Brown R.W., (1956), Composition of Scientific Words, Smithsonian Institutional Press, ISBN 978-0-87474-286-2.
5. Carmeli, Y., Troillet, N., Eliopoulos, G. M., & Samore, M. H. (1999). Emergence of antibiotic-resistant Pseudomonas aeruginosa: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(6), 1379–1382. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.6.1379>
6. Casadevall, A., & Pirofski, L. A. (1999). Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infection and immunity*, 67(8), 3703–3713. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.8.3703-3713.1999>
7. Chetri S. (2025). Escherichia coli: An arduous voyage from commensal to Antibiotic-resistance. *Microbial pathogenesis*, 198, 107173. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.107173>
8. Clegg, S. and Murphy, C.N., (2016), Epidemiology and virulence of klebsiella pneumoniae, Urinary Tract Infections, pp. 435-457. doi: [10.1128/microbiolspec.UTI-0005-2012](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.UTI-0005-2012)
9. da Silva, R. A. G., Afonina, I., & Kline, K. A. (2021). Eradicating biofilm infections: an update on current and prospective approaches. *Current opinion in microbiology*, 63, 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.07.001>
10. David G. Davies, Matthew R. Parsek, James P. Pearson, Barbara H. Iglewski, J. W. Costerton, E. P. Greenberg, The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. *Science* 280, 295-298 (1998). <https://doi.org/10.1126/science.280.5361.295>
11. Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews. Microbiology*, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
12. Gonzalez-Ferrer, S., Penaloza, H. F., Budnick, J. A., Bain, W. G., Nordstrom, H. R., Lee, J. S., Tyne, D. V., (2021), Finding order in the Chaos: Outstanding questions in Klebsiella pneumoniae pathogenesis, *Infection and Immunity*, 89(4). doi: [10.1128/IAI.00693-20](https://doi.org/10.1128/IAI.00693-20)
13. Hajra, D., Nair, A. V., & Chakravorty, D. (2021). An elegant nano-injection machinery for sabotaging the host: Role of Type III secretion system in virulence of different human and animal pathogenic bacteria. *Physics of life reviews*, 38, 25–54. <https://doi.org/10.1016/j.plrev.2021.05.007>

14. Henry, R. (August 2012). "Etymologia: Pseudomonas". Emerging Infectious Diseases. 18 (8):1241. doi:10.3201/eid1808.ET1808. Retrieved 27 February 2021.
15. Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M., & McClean, S. (2021). *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *International journal of molecular sciences*, 22(6), 3128. <https://doi.org/10.3390/ijms22063128>
16. Ko, W.C., (2002), Community-acquired Klebsiella pneumoniae bacteremia: Global differences in clinical patterns, *Emerging Infectious Diseases*, 8(2), pp. 160-166. doi: [10.3201/eid0802.010025](https://doi.org/10.3201/eid0802.010025)
17. Krasowska, A., & Sigler, K. (2014). How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs?. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 4, 112. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00112>
18. LaBauve, A. E., & Wargo, M. J. (2012). Growth and laboratory maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current protocols in microbiology*, Chapter 6, Unit–6E.1. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc06e01s25>
19. Liu, Q., Wu, Q., Liu, J., Xu, T., Liu, J., Wu, Q., Malakar, P. K., Zhu, Y., Zhao, Y., & Zhang, Z. (2025). New Insights into the Mediation of Biofilm Formation by Three Core Extracellular Polysaccharide Biosynthesis Pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of molecular sciences*, 26(8), 3780. <https://doi.org/10.3390/ijms26083780>
20. Moini, A. S., Soltani, B., Taghavi Ardakani, A., Moravveji, A., Erami, M., Haji Rezaei, M., & Namazi, M. (2015). Multidrug-Resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated From Patients in Kashan, Iran. *Jundishapur journal of microbiology*, 8(10), e27517. <https://doi.org/10.5812/jjm.27517>
21. Mueller, M., & Tainter, C. R. (2023). *Escherichia coli* Infection. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
22. Olivares, E., Badel-Berchoux, S., Provot, C., Prévost, G., Bernardi, T., & Jehl, F. (2020). Clinical Impact of Antibiotics for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections. *Frontiers in microbiology*, 10, 2894. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02894>
23. Paterson, D.L., et al, (2004), Antibiotic therapy for *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: Implications of production of extended-spectrum-β-lactamases, *Clinical Infectious Diseases*, 39(1), pp. 31-37. doi: [10.1086/420816](https://doi.org/10.1086/420816)
24. Popoff M. R. (2024). Overview of Bacterial Protein Toxins from Pathogenic Bacteria: Mode of Action and Insights into Evolution. *Toxins*, 16(4), 182. <https://doi.org/10.3390/toxins16040182>
25. Rajkumari, J., Borkotoky, S., Murali, A., Suchiang, K., Mohanty, S. K., & Busi, S. (2018). Attenuation of quorum sensing controlled virulence factors and biofilm formation in *Pse* by pentacyclic triterpenes, betulin and betulinic acid. *Microbial Pathogenesis*, 118, 48–60. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.012>
26. Reimer L. C., Vetcinova A., Carbasse J. S., Söhngen C., Gleim D., Ebeling C., Overmann J., (2019), Bacterial phenotypic data for High-throughput biodiversity analysis, *Nucleic*

Acids Research, Volume 47, Issue D1, 08 January 2019, Pages D631–D636,
<https://doi.org/10.1093/nar/gky879>

27. Soni, J., Sinha, S., & Pandey, R. (2024). Understanding bacterial pathogenicity: a closer look at the journey of harmful microbes. *Frontiers in microbiology*, 15, 1370818. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1370818>
28. Takahara, M., Hirayama, S., Futamata, H., Nakao, R., & Tashiro, Y. (2024). Biofilm-derived membrane vesicles exhibit potent immunomodulatory activity in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology and immunology*, 68(7), 224–236. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.13156>
29. Wa, Y., Chanyi, R. M., Nguyen, H. T. H., Gu, R., Day, L., & Altermann, E. (2022). Extracellular Polysaccharide Extraction from *Streptococcus thermophilus* in Fermented Milk. *Microbiology spectrum*, 10(2), e0228021. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02280-21>
30. Wang, H., Guo, J., Chen, X., & He, H. (2023). The Metabolomics Changes in Luria-Bertani Broth Medium under Different Sterilization Methods and Their Effects on *Bacillus* Growth. *Metabolites*, 13(8), 958. <https://doi.org/10.3390/metabo13080958>
31. Wilson, J. W., Schurr, M. J., LeBlanc, C. L., Ramamurthy, R., Buchanan, K. L., & Nickerson, C. A. (2002). Mechanisms of bacterial pathogenicity. *Postgraduate medical journal*, 78(918), 216–224. <https://doi.org/10.1136/pmj.78.918.216>
32. Yadav, M. K., Song, J. H., Vasquez, R., Lee, J. S., Kim, I. H., & Kang, D. K. (2024). Methods for Detection, Extraction, Purification, and Characterization of Exopolysaccharides of Lactic Acid Bacteria-A Systematic Review. *Foods (Basel, Switzerland)*, 13(22), 3687. <https://doi.org/10.3390/foods13223687>
33. Zumla A. (2010). Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. *The Lancet. Infectious Diseases*, 10(5), 303–304. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70089-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70089-X)