

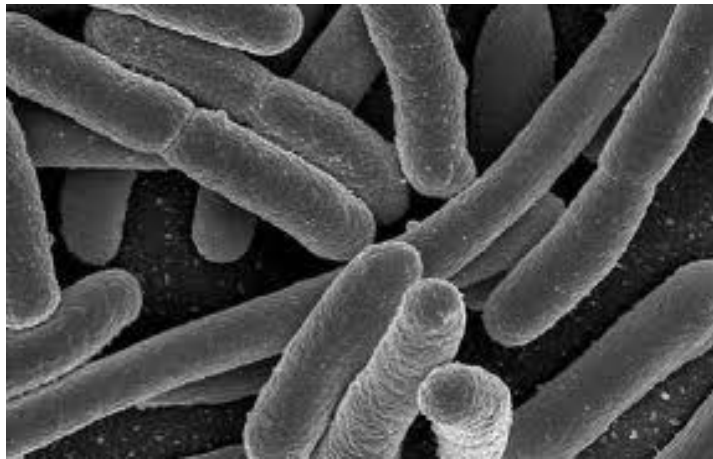


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΙΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΕΣ ΣΤΕΛΕΧΗ *ESCHERICHIA COLI*
ΣΤΗ ΘΕΣΣΑΛΙΑ: ΜΟΡΙΑΚΗ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ
ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ**



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ: ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΓΕΩΡΓΙΑ

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:
ΜΑΤΘΙΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ**

Λάρισα, 2015

**Ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *Escherichia coli*
στη Θεσσαλία: μοριακή επιδημιολογία και μηχανισμοί
ανθεκτικότητας.**

**Carbapenem resistant *Escherichia coli* isolates:
molecular epidemiology and mechanisms of resistance.**

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος

**Καθηγητής
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

Πετεινάκη Ευθυμία

**Αναπληρώτρια καθηγήτρια
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

Μόσιαλος Δημήτρης

**Επίκουρος καθηγητής
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

Ευχαριστίες:

Για την εργασία αυτή θα ήθελα να ευχαριστήσω την Διευθύντρια του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Αναπληρώτρια καθηγήτρια κα. Πετεινάκη Ευθυμία για την ανάθεση της εργασίας, καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, όπως επίσης και τον Καθηγητή του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Ματθιόπουλο Κωνσταντίνο, που ήταν και ο επιβλέπων καθηγητής μου, για τη βοήθεια και την καθοδήγηση που μου παρείχε. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τις κα Σάρρου Στυλιανή και κα Τσουμάνη Κωνσταντίνα, η βοήθειά των οποίων ήταν πολύτιμη και καθοριστική. Τέλος, δε μπορώ να παραλείψω την οικογένειά μου και τους φίλους μου που ήταν δίπλα μου καθ' όλη τη διάρκεια των φοιτητικών μου χρόνων για τη στήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ:

Το βακτήριο *Escherichia coli* ανακαλύφθηκε το 1885 από τον Γερμανό βακτηριολόγο Theodor Escherich. Σήμερα το βακτήριο αυτό αποτελεί μικροοργανισμό-μοντέλο και στέλεχος αναφοράς ταξινόμησης. Αποτελεί μέλος της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου του ανθρώπου και των ζώων, ευεργετώντας τον οργανισμό-ξενιστή και προάγοντας την καλή υγεία του πεπτικού σωλήνα. Ωστόσο κάποια στελέχη του βακτηρίου είναι παθογόνα και μπορούν να προκαλέσουν ασθένεια στον ξενιστή. Με την κατάλληλη θεραπεία με αντιβιοτικά είναι δυνατή η καταπολέμηση των παθογόνων. Κατασταλτικό παράγοντα στη θεραπεία των λοιμώξεων που οφείλονται στην *E. coli* αποτελεί η ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά που αυτά παρουσιάζουν, καθιστώντας τα επικίνδυνα νοσοκομειακά παθογόνα. Ένα βακτήριο μπορεί να αποκτήσει ανθεκτικότητα με πρόσληψη ξένου DNA, είτε αυτό προσλαμβάνεται γυμνό, είτε προέρχεται από άλλο βακτήριο μέσω οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων, διαδικασίες από τις οποίες προκύπτουν πολύ-ανθεκτικά στελέχη, τα οποία δε μπορούν να καταπολεμηθούν με τις συνήθεις αντιμικροβιακές θεραπείες, οδηγώντας ακόμα και στο θάνατο. Η επιδημιολογική μελέτη αυτών των παθογόνων είναι ζωτικής σημασίας ώστε να επιβραδυνθεί ή ακόμα να διακοπεί η αλυσίδα μετάδοσης.

ABSTRACT:

Bacterium *Escherichia coli* was first discovered by bacteriologist Theodor Escherich in 1885. Nowadays, this bacterium is used as a model organism and as a classification reference strain. It is normally a part of the normal flora of the intestine of humans and animals, giving the host many benefits by providing a healthy and good function of the intestine. However, there are some pathogenic strains of *E. coli*. Although the host is possible to be treated from the infection with the appropriate antibiotic therapy, the antibiotic resistance of some strains can inhibit the antimicrobial therapy, so they are considered as dangerous nosocomial pathogens. A strain can become resistant, by the acquisition of extra-chromosomal DNA, either as naked DNA, or by horizontal genetic exchange, resulting to multi-drug resistant strains that cannot be controlled with conventional antimicrobial therapy, leading even to death. The epidemiological study of these pathogens is crucial in order to decelerate or even stop the transmission chain.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	7
1.1 <i>Escherichia coli</i>	7
1.2 Μορφολογία.....	7
1.3 Φυσιολογία.....	8
1.4 Οικολογία.....	10
1.5 λοιμογόνος δράση.....	11
1.5.1 Λοιμογόνοι παράγοντες.....	11
1.5.2 Λοιμώξεις.....	13
1.6 Γονιδίωμα.....	14
1.7 Αντιβιοτικά.....	17
1.7.1 Μηχανισμοί δράσεις αντιβιοτικών.....	17
1.7.2 β-λακτάμες.....	18
1.7.3 Καρβαπενέμες.....	18
1.8 Ανάπτυξη αντοχής.....	19
1.8.1 Μηχανισμοί ανάπτυξης αντοχής.....	19
1.8.2 Νοσοκομειακά στελέχη.....	20
1.8.3 Καρβαπενεμάσες.....	21
1.9 Μέθοδοι μοριακής ταυτοποίησης.....	22
1.10 Σκοπός.....	24
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	25
2.1 Τα βακτήρια.....	25
2.2 Μικροβιολογικές μέθοδοι.....	25
2.2.1 Καλλιέργεια βακτηρίων.....	25
2.2.2 Ταυτοποίηση.....	26
2.2.3 Έλεγχος αντοχής στα αντιβιοτικά.....	27
2.3 Μοριακές μέθοδοι.....	29
2.3.1 Απομόνωση γενετικού υλικού.....	29
2.3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	31

Ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *Escherichia coli* στη
Θεσσαλία: μοριακή επιδημιολογία και μηχανισμοί ανθεκτικότητας

2.3.3 Ηλεκτροφόρηση	38
2.3.4 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR	39
2.3.5 Αλληλούχιση	40
3. Αποτελέσματα	43
4. Συζήτηση	46
5. Βιβλιογραφία	49

1. Εισαγωγή

1.1 *Escherichia coli*

Το είδος *E. coli* αποτελεί μια μεγάλη και πολυποίκιλη ομάδα βακτηρίων. Η *E. coli* είναι μέλος της φυσιολογικής χλωρίδας του ανθρώπου και των ζώων. Τα περισσότερα στελέχη είναι μη μολυσματικά και απολύτως χρήσιμα για τη φυσιολογική λειτουργία του πεπτικού σωλήνα εντέρου, καθώς παράγουν τη βιταμίνη B12 και προλαμβάνουν την αποίκηση του εντέρου από άλλα παθογόνα βκτήρια. Ωστόσο κάποια στελέχη είναι παθογόνα, μπορούν δηλαδή να προκαλέσουν διάρροια, καθώς και άλλα συμπτώματα έξω από τον πεπτικό σωλήνα. Τα στελέχη *E. coli* που προκαλούν διάρροια μπορούν να μεταδοθούν από μολυσμένο νερό ή φαγητό, ή από την επαφή με ανθρώπους ή ζώα.

Το βακτήριο ανακαλύφθηκε πρώτη φορά το 1885 από τον Γερμανό βακτηριολόγο Theodor Escherich στο κόλον του ανθρώπου. Ο Theodor Escherich επίσης ανακάλυψε ότι κάποια στελέχη είναι υπεύθυνα για διάρροια και γαστρεντερίτιδα στα βρέφη. Η ανακάλυψή του αυτή ήταν πολύ σημαντική για τη δημόσια υγεία. Παρόλο που τα βακτήρια αρχικά είχαν την ονομασία *Bacterium coli*, στην πορεία μετονομάστηκαν σε *E. coli*, προς τιμήν του.

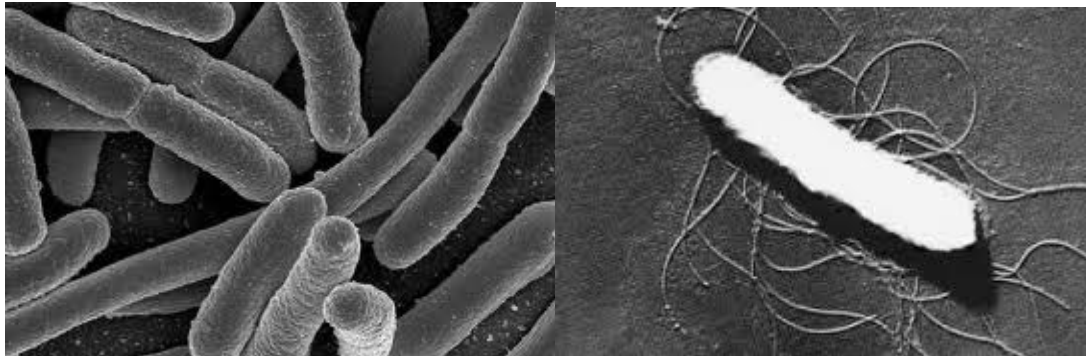
Phylum	Class	Order	Family	Genus
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia</i>

(<http://www.vetbact.org/vetbact/?artid=68>)

1.2 Μορφολογία

Η *E. coli* αποτελεί το πιο αντιπροσωπευτικό είδος της οικογένειας των εντεροβακτηριακών. Είναι Gram αρνητικό, άσπορο βακτηρίδιο, με πάχος 0,5 και μήκος 1-5 μm. Τα κύτταρά του είδους μερικές φορές παίρνουν μορφή κοκκοβακτηρίου ενώ άλλοτε είναι νηματοειδή. Είναι περίτριχο, κινητό μικρόβιο, υπάρχουν όμως και ακίνητα στελέχη. Παράγει ένα πολύ μικρό έλυτρο και φέρει ινίδια προσκολλητικά και συζευκτικά. (Brock Biology of Microorganisms)

Η καλλιέργεια του είδους σε αιματούχο άγαρ σχηματίζει αποικίες μέτριου μεγέθους (3-6mm), αδιαφανείς, βλεννώδεις, γκριζόλευκες με χαρακτηριστική οσμή. Κάποια στελέχη δίνουν μια στενή καθαρή ζώνη αιμόλυσης σε άγαρ αίματος. (<http://www.vetbact.org/vetbact/?artid=68>)



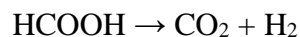
Εικόνα 1: Η *E. coli* (http://www.redorbit.com/reference/escherichia_coli/)

1.3 Φυσιολογία

Η *E. coli* είναι βακτήριο χημειο-οργανοτροφικό, οξειδάση-αρνητικό, αερόβιο και δυνητικά αναερόβιο. Παράγει οξέα και αέρια κατά τη ζύμωση της γλυκόζης, της λακτόζης και άλλων σακχάρων. Τα στελέχη μπορούν να αυξηθούν σε θερμοκρασίες μεταξύ 10°C και 45°C, με βέλτιστη θερμοκρασία μεταξύ 37°C και 42°C και σε pH 5,5-8,0. (Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διάγνωση Λοιμώξεων)

Η *E. coli* είναι μικρόβιο προαιρετικώς αερόβιο, με σχετικά απλές διατροφικές απαιτήσεις και εκτελεί τη ζύμωση των σακχάρων σχηματίζοντας ποικιλία τελικών προϊόντων, γεγονός που τη διαφοροποιεί από άλλα βακτήρια κατά τη διαδικασία της ταυτοποίησής της. Συγκεκριμένα στα βακτηριοειδή αναγνωρίζονται δύο κύριοι μηχανισμοί ζύμωσης της γλυκόζης:

1. η μικτή οξειογόνος ζύμωση, κατά την οποία σχηματίζονται σημαντικές ποσότητες οξικού, γαλακτικού και ηλεκτρικού οξέος, Επίσης παράγονται αιθανόλη, αλλά και CO₂ και H₂ σε ίσες ποσότητες, μέσω διάσπασης του μυρμηκικού από την ενζυμική δράση της υδρογονολυάσης του μυρμηκικού.



2. η ζύμωση της 2,3-βουτανεδιόλης, κατά την οποία σχηματίζονται μικρότερες ποσότητες οξέων και τα κύρια προϊόντα της είναι βουτανεδιόλη, αιθανόλη, CO₂ και H₂. Τα βακτήρια της ζύμωσης της βουτανεδιόλης παράγουν επίσης CO₂ και H₂ από μυρμηκικό οξύ, αλλά παράγουν και δύο επιπλέον μόρια CO₂ για κάθε ένα μόριο βουτανεδιόλης που σχηματίζουν.

Η *E. coli* ακολουθεί τη μικτή οξειογόνο ζύμωση (Brock Biology of Microorganisms)

Με τον όρο αναπνοή αναφερόμαστε στο σύνολο των μεταβολικών διεργασιών που οδηγούν στην παραγωγή ενέργειας και που έχουν ως τελικό αποδέκτη των ηλεκτρονίων που απελευθερώνονται κατά τις οξειδώσεις το μοριακό οξυγόνο ή άλλες

Ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *Escherichia coli* στη Θεσσαλία: μοριακή επιδημιολογία και μηχανισμοί ανθεκτικότητας

οξειδωμένες ενώσεις. Η αναπνοή διακρίνεται στην αερόβια αναπνοή, όπου τελικός δέκτης των ηλεκτρονίων είναι το οξυγόνο, και στην αναερόβια, όπου τελικό δέκτη ηλεκτρονίων αποτελούν ανόργανες οξειδωμένες ενώσεις, όπως νιτρικά, θειικά και ανθρακικά άλατα. Κατά την αναερόβια αναπνοή ως τελικοί δέκτες ηλεκτρονίων χρησιμοποιούνται νιτρικά, θειικά ή ανθρακικά άλατα, κάτω από αυστηρά αναερόβιες συνθήκες, με την αναγωγή των νιτρικών να οδηγεί σε σχηματισμό μοριακού N₂, την αναγωγή των θεικών σε δισθενές θείο και την αναγωγή των ανθρακικών σε μεθάνιο. Κατά την αερόβια αναπνοή, η γλυκόζη καταβολίζεται πλήρως και αποδίδονται CO₂ και H₂O. Αυτό πραγματοποιείται μέσω δύο διεργασιών, μέσω του κύκλου του Krebs, λειτουργία που έχει παρατηρηθεί σε πλήθος βακτηρίων, όπως *E. coli*, *Salmonella spp*, *Brucella abortus*, *Mycobacterium tuberculosis* και *Pasteurella pestis*, και μέσω της μεταβολικής οδού του παρακυκλώματος της πεντόζης, η οποία είναι υπεύθυνη εξ' ολοκλήρου για τη διάσπαση της γλυκόζης από το *Acetobacter xylinum* και για τη διάσπαση του 50% της γλυκόζης από αερόβια βακτήρια όπως π.χ. Ψευδομονάδες. Άλλα βακτήρια (*E. coli*, *B. subtilis*) μεταβολίζουν μικρότερο ποσοστό της γλυκόζης μέσω αυτής της οδού. Και οι δύο περιπτώσεις συνδέονται με την αναπνευστική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων που βρίσκονται στα μεσοσώματα και στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η *E. coli* είναι προαιρετικά αερόβιο μικρόβιο κι έτσι συμβάλλει στην κατανάλωση οξυγόνου, καθιστώντας το παχύ έντερο ανοξικό. Η *E. coli* μπορεί να επιβιώσει είτε παρουσία είτε απουσία οξυγόνου γεγονός που το καθιστά ικανό να προσαρμόζεται τόσο στο αναερόβιο περιβάλλον του εντέρου, όσο και στο εξω-εντερικό περιβάλλον, είτε αερόβιο είτε αναερόβιο.

Η *E. coli*, ως ένας μονοκύτταρος οργανισμός, ανταποκρίνεται στο περιβάλλον του, παραδείγματος χάρι τη θερμοκρασία, στο pH, στην ωσμωτικότητα, στις χημικές ουσίες κλπ. Για παράδειγμα, μπορεί είτε να κινηθεί προς ορισμένες χημικές ενώσεις είτε να απομακρυνθεί από αυτές, διαδικασία που ονομάζεται χημειοτακτισμός. Στη μεμβράνη εντοπίζονται αισθητήριοι υποδοχείς, που αναγνωρίζουν απωθητικούς ή προσελκυστικούς παράγοντες και τη διαβάθμισή τους με την πάροδο του χρόνου, ενώ το κύτταρο βρίσκεται σε κίνηση. Οι πρωτεΐνες αυτές ονομάζονται μεθυλοτακτικές πρωτεΐνες χημειοτακτισμού (MCP). Πέντε τέτοιες πρωτεΐνες έχουν ταυτοποιηθεί στην *E. coli* και είναι όλες διαμεμβρανικές και μπορούν να αναγνωρίσουν διάφορες ενώσεις. Για παράδειγμα, ο μεταγωγέας Tar μπορεί να αισθανθεί τις προσελκυστικές ουσίες μαλτόζη και ασπαρτικό, καθώς επίσης και απωθητικές όπως το κοβάλτιο και το νικέλιο. Οι MCPs εκκινούν ένα μονοπάτι μεταγωγής σήματος, το οποίο επηρεάζει την περιστροφή των μαστιγίων. Σε απόκριση στην αλλαγή της θερμοκρασίας ή της ωσμωτικότητας, μπορεί να μεταβάλλει τη διάμετρο των υδατοπορινών της εξωτερικής μεμβράνης, ώστε να προσλάβει θρεπτικές ουσίες ή να αποκλείσει ανασταλτικές ουσίες.

Τα βακτήρια διαθέτουν μηχανισμούς με τους οποίους παράγουν τα συστατικά που τους είναι απαραίτητα για την επιβίωση και τη διαίωσιση. Τέτοια είναι η βιοσύνθεση των μακρομορίων (νουκλεϊκά οξέα, αμινοξέα, λιπαρά οξέα και σάκχαρα) και από αυτά συνθέτουν τις μεγαλομοριακές ενώσεις των κυττάρων.

Μέσω της σύνθεσης του DNA η γενετική πληροφορία μεταβιβάζεται από το μητρικό στα θυγατρικά κύτταρα. Αυτό προϋποθέτει σύνθεση της ίδιας δομής DNA

και επιτυγχάνεται μέσω της διαδικασίας της αντιγραφής. Η αντιγραφή καταλύεται. Πρόκειται για διαδικασία ταχύτατη, που στα βακτηριακά κύτταρα συμβαίνει καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Υπολογίζεται ότι ολόκληρο το γονιδίωμα του βακτηρίου *E. coli* (4×10^6 ζεύγη βάσεων) αντιγράφεται σε 40 λεπτά με ρυθμό 1700 ζεύγη βάσεων ανά sec. Παρεμπόδιση της αντιγραφής οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, όπως η υπεριώδης ακτινοβολία, που προκαλεί τον σχηματισμό διμερών μεταξύ βάσεων πυριμιδίνης στον ίδιο κλώνο και σε αντιβιοτικά, όπως αυτά της ομάδας της νιτροϊμιδαζόλης η νιτρική ομάδα των οποίων ανάγεται σε αναερόβιες συνθήκες παράγοντας δραστικές ουσίες.

Από το DNA ως μήτρα παράγεται επίσης το RNA, μέσω της διαδικασίας της μεταγραφής, σύμφωνα με τους κανόνες της συμπληρωματικότητας. Μέσω της μεταγραφής παράγεται ένα μονόκλωνο μόριο ριβονουκλεϊκού οξέος, το οποίο στη συνέχεια με περαιτέρω κατεργασία μετατρέπεται σε αγγελιοφόρο (mRNA) που αποτελεί την κωδικοποιημένη πληροφορία για τη σύνθεση των πρωτεϊνών, σε μεταφορικό (tRNA) που συνδέεται και μεταφέρει ειδικά τα αμινοξέα στον τόπο της σύνθεσης της πρωτεΐνης και σε ριβοσωματικό (rRNA) που σχηματίζει με πρωτεΐνες τα ροβισώματα. Η διαδικασία της μεταγραφής αναστέλλεται από τη ριφαμπικίνη, η οποία συνδέεται με τη β-υπομονάδα της βακτηριακής RNA-πολυμεράσης και σταματά τη μεταγραφή σε αρχικά στάδια.

1.4 Οικολογία

Η *E. coli* βρίσκεται σταθερά στον εντερικό σωλήνα και αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος της φυσιολογικής μικροβιακής χλωρίδας του εντέρου του ανθρώπου και των ζώων, παρόλο που αποτελεί πολύ μικρό ποσοστό του μικροβιακού πληθυσμού του εντέρου. Η συμβιωτική *E. coli* που κατοικεί στο έντερο του ανθρώπου αποτελεί ποσοστό μικρότερο του 1% της συνολικής βακτηριακής βιομάζας. Η παρουσία της *E. coli* στο έντερο και στα κόπρανα του ανθρώπου έχει οδηγήσει στην παρακολούθηση του βακτηρίου στη φύση ως δείκτη μόλυνσης από κόπρανα και ρύπανσης του νερού, δηλαδή οπουδήποτε ανιχνευτεί το βακτήριο, μπορεί να υπάρχει μόλυνση από παράσιτα του εντέρου του ανθρώπου. Μπορεί να συμβάλει στην καλή λειτουργία της πέψης και της αφομοίωσης των θρεπτικών ουσιών, καθώς και στην παραγωγή της βιταμίνης K. Διαφορετικά στελέχη εντοπίζονται σε διαφορετικά είδη ζώων και έτσι μπορούμε να εντοπίσουμε την πηγή (άνθρωπος ή άλλα ζώα) των κοπράνων, εξετάζοντας ποιο στέλεχος είναι παρόν στα κόπρανα. Η *E. coli* εντοπίζεται επίσης στο περιβάλλον σε υψηλότερες θερμοκρασίες, όπως θερμές πηγές. Τα περισσότερα στελέχη δεν είναι παθογόνα προς τους ξενιστές τους. Ωστόσο, όλο και περισσότερα στελέχη προκύπτουν μέσω της μετάλλαξης και της εξέλιξης. Κάποια από αυτά προκαλούν σοβαρές ασθένειες, όπως η *E. coli* O157:H7.

1.5 Λοιμογόνος δράση

1.5.1 Λοιμογόνοι παράγοντες

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η *E. coli* αποτελεί μέλος της φυσικής χλωρίδας του εντέρου και είναι δυνητικά παθογόνο μικρόβιο. Έχουν χαρακτηριστεί διάφοροι τύποι οι οποίοι βρέθηκαν να προκαλούν παθογένεση. Η *E. coli* είναι δυνητικά παθογόνο μικρόβιο. Προκαλεί εντερικές ή εξωεντερικές λοιμώξεις. Ως λοιμογόνοι παράγοντες θεωρούνται το K-αντιγόνο, η παραγωγή εντεροτοξινών, αιμολυσινών, προσκολλησινών, τοξικών αντιγονικών ουσιών και η διεισδυτικότητα. Ιδιαίτερη όμως σημασία για την παθογόνο δράση έχουν οι λιποπολυσακχαρίτες (ενδοτοξίνες). Η *E. coli* προκαλεί ποικιλία λοιμώξεων, οι κυριότερες των οποίων είναι ουρολοιμώξεις, μινιγγίτιδα, γαστρεντερίτιδα και σηψαιμία.

Έχουν αναγνωριστεί πάνω από 700 αντιγονικοί τύποι της *E. coli* με βάση τα O, H, και K αντιγόνα. Ωστόσο τα στελέχη που όντως προκαλούν ασθένεια είναι μικρά σε αριθμό. Παθογόνα στελέχη της *E. coli* είναι υπεύθυνα για τρεις τύπους λοιμώξεων στους ανθρώπους: λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος (urinary tract infections, UTI), νεογνική μινιγγίτιδα και εντερικές ασθένειες (γαστρεντερίτιδα). Οι ασθένειες που προκαλούνται από ένα στέλεχος *E. coli* εξαρτώνται από τη συμβολή και έκφραση μιας σειράς λοιμογόνων παραγόντων, όπως προσκολλητίνες, τοξίνες κλπ, οι οποίοι συνοψίζονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1

Προσκολλητίνες

CFAI/CFAII

Κροσσοί τύπου 1

P κροσσοί

S κροσσοί

Intimin (μη κροσσωτή προσκολλητίνη)

παράγοντας προσκόλλησης EPEC

Πρωτεΐνες διείσδυσης (invasins)

Αιμολυσίνη

Shigella-like "invasins" για ενδοκυτταρική διείσδυση και εξάπλωση

Κινητικότητα/χημειοταξία

Μαστίγια

Τοξίνες

LT τοξίνη

ST τοξίνη

Shiga τοξίνη

κυττοτοξίνη

ενδοτοξίνη (LPS)

Ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *Escherichia coli* στη Θεσσαλία: μοριακή επιδημιολογία και μηχανισμοί ανθεκτικότητας

Αντιφαγοκυτταρικές ιδιότητες επιφάνειας

Έλυτρο
K αντιγόνα
LPS

Άμυνα έναντι αντιβακτηριακής δράσης ορού

LPS
K αντιγόνα

Άμυνα έναντι ανοσολογικών αποκρίσεων

Έλυτρο
K αντιγόνα
LPS
αντιγονική ποικιλότητα

Γενετικά χαρακτηριστικά

Ανταλλαγή γενετικού υλικού μέσω μεταγωγής και σύζευξης
Μεταδοτικά πλασμίδια
Παράγοντες R και πλασμίδια αντοχής
τοξίνες και άλλα μολυσματικά πλασμίδια
σιδηροφόρα
νησίδες παθογονικότητας

Οι τοξίνες είναι ουσίες που παράγονται από ορισμένους μικροοργανισμούς, των οποίων συνήθως αποτελούν τον κυριότερο παράγοντα λοιμογονικότητας. Οι μικροοργανισμοί που παράγουν τοξίνες ονομάζονται τοξινογόνοι. Τοξίνες που μεταφέρονται με τη λέμφο προκαλούν σοβαρές ιστικές βλάβες και ενίοτε θάνατο, κάποιες προκαλούν πυρετό, καρδιαγγειακές διαταραχές, διάρροια και καταπληξία. Επίσης οι τοξίνες αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση, καταστρέφουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα αιμοφόρα αγγεία και επιδρούν στη φυσιολογική λειτουργία του να προκαλώντας σπασμούς. Οι εξωτοξίνες, που παράγονται τόσο από gram-θετικά όσο και από Gram-αρνητικά, είναι πρωτεΐνες διαλυτές στα βιολογικά υγρά, διαχέονται εύκολα στο αίμα και μεταφέρονται με την κυκλοφορία σε ολόκληρο το σώμα του ξενιστή. Αντιθέτως, οι ενδοτοξίνες είναι μέρος της εξωτερικής μεμβράνης του κυτταρικού τοιχώματος των Gram-αρνητικών βακτηρίων. Αυτή η εξωτερική μεμβράνη αποτελείται από λιποπρωτεΐνες, φωσφολιπίδια και λιποπολυσακχαρίτες. Το λιπιδικό τμήμα των λιποπολυσακχαριτικών, το λιπίδιο A, είναι η ενδοτοξίνη. (Εισαγωγή στη Μικροβιολογία)

1.5.2 Λοιμώξεις

1. Λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος:

Η ουροπαθογόνος *E. coli* (EPEC) προκαλεί το 90% των λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος. Τα βακτήρια αποικίζουν τα κόπρανα και την περιοχή του περινέου και από εκεί ανεβαίνουν μέσω του ουροποιητικού στην ουροδόχο κύστη. Η ουρολοίμωξη είναι 14 φορές πιο συχνή στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες, λόγω της μικρότερης ουρήθρας. Η συγκολλητίνη που σχετίζεται περισσότερο με την ουροπαθογόνο *E. coli* είναι το P-ινίδιο (P-fimbria), το οποίο προσκολλάται στα ερυθρά αιμοσφαίρια και σε ένα συγκεκριμένο δισακχαρίτη γαλακτόζης που βρίσκεται στην επιφάνεια των ουροεπιθηλιακών κυττάρων του 99% του πληθυσμού. Τα ουροπαθογόνα στελέχη *E. coli* συχνά παράγουν σιδηροφόρα, που πιθανόν να παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόσληψη σιδήρου από τα βακτήρια πριν ή μετά την αποίκηση. Επίσης παράγουν αιμολυσίνες, οι οποίες είναι κυτταροτοξικές λόγω του σχηματισμού διαμεμβρανικών πόρων στις μεμβράνες των κυττάρων του ξενιστή. Μια στρατηγική με την οποία τα βακτήρια προσλαμβάνουν σίδηρο και άλλα θρεπτικά συστατικά για την κυτταρική αύξηση μπορεί να περιλαμβάνει τη λύση των κυττάρων και την επακόλουθη διάχυση των συστατικών. Η στρατηγική της λύσης δεν περιορίζεται μόνο στα ερυθροκύτταρα, καθώς οι α-αιμολυσίνες της *E. coli* προκαλούν λύση των λεμφοκυττάρων και οι β-αιμολυσίνες παρεμποδίζουν τη φαγοκύττωση και τη χημειοταξία από τα ουδετερόφιλα. Ένας ακόμα παράγοντας παθογένειας είναι η αντοχή τους κατά της δράσης του συμπληρώματος λόγω του αντιγόνου K. το αντιγόνο K σχετίζεται με λοιμώξεις του ανώτερου ουροποιητικού και μπορούν να συμβάλλουν στη βακτηριακή λοίμωξη περιορίζοντας την ικανότητα των αντισωμάτων και/ή του συμπληρώματος να συνδέεται στην επιφάνεια του βακτηρίου, όπως και την ικανότητα των φαγοκυττάρων να αναγνωρίζουν και να εγκολπώνουν το βακτήριο.

2. Νεογνική μηνιγγίτιδα

Η νεογνική μηνιγγίτιδα προσβάλλει 1/2000-4000 νεογνά. Το 80% των στελεχών *E. coli* που εμπλέκονται στη νεογνική μηνιγγίτιδα συνθέτουν το αντιγόνο K. τα βακτήρια εισέρχονται στο κυκλοφορικό από το ρινοφάρυγγα ή από το γαστρεντερικό και από εκεί μεταφέρονται στους μήνιγγες. Το K-1 αντιγόνο θεωρείται ο μείζων λοιμογόνος παράγοντας στην πρόκληση νεογνικής μηνιγγίτιδας. Το K-1 αντιγόνο είναι ένα ομοπολυμερές σιαλικού οξέος που αναστέλλει τη φαγοκύττωση, το συμπλήρωμα κι έτσι προσδίδει ανθεκτικότητα έναντι των ανοσολογικών μηχανισμών του ξενιστή. Ωστόσο το K-1 δεν είναι ο μοναδικός λοιμογόνος παράγοντας, καθώς πιθανοί παράγοντες είναι και τα σιδηροφόρα και η ενδοτοξίνη. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η εγκυμοσύνη σχετίζεται με τα αυξημένα ποσοστά μόλυνσης από K-1 στελέχη και ότι τα ίδια στελέχη εμπλέκονται στις επακόλουθες περιπτώσεις μηνιγγίτιδας των νεογνών. Ενδεχομένως το γαστρεντερικό σύστημα να αποτελεί την είσοδο στην κυκλοφορία του αίματος. Παρόλο που η μόλυνση είναι αρκετά συχνή, η είσοδος στην κυκλοφορία είναι εξαιρετικά σπάνια. Στη νεογνική μηνιγγίτιδα είναι απαραίτητη η χορήγηση αντιβιοτικής θεραπείας που περιλαμβάνει αμικικιλίνη και κεφαλοσπορίνη τρίτης γενιάς.

3. λοιμώξεις γαστρεντερικού

Ως παθογόνο η *E. coli* είναι περισσότερο γνωστή για την ικανότητά της να προκαλεί εντερικές ασθένειες. Πέντε κλάσσεις *E. Coli* που προκαλούν διάρροια έχουν αναγνωριστεί: enterotoxigenic *E. Coli* (ETEC), enteroinvasive *E. Coli* (EIEC), enterohemorrhagic *E. Coli* (EHEC), enteropathogenic *E. Coli* (EPEC), enteroaggregative *E. Coli* (EAEC) και τα χαρακτηριστικά τους συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Η ETEC είναι παθογόνος, χάρη στις προσκολλητίνες CFA I, CFAII, K88. K99. Επίσης παράγει τις τοξίνες LT ή/και ST. Πρόκειται για βακτήρια μη διεισδυτικά και προκαλούν διάρροια σε νεογνά και σε ταξιδιώτες. Δεν προκαλούν φλεγμονή ή πυρετό.

Η EIEC είναι παθογόνος λόγω των προσκολλητινών που βρίσκονται πιθανώς στην εξωτερική μεμβράνη. Είναι διεισδυτική και εισχωρεί και πολλαπλασιάζεται εντός των επιθηλιακών κυττάρων. Προκαλεί διάρροια με βλέννα και αίμα, σοβαρή φλεγμονή και πυρετό.

Η EPEC προσκολλάται στα κύτταρα του εντέρου μέσω ενός παράγοντα προσκόλλησης και είναι δυνητικά διεισδυτική. Δεν παράγει LT ή ST τοξίνες, αλλά έχει παρατηρηθεί παραγωγή τοξίνης που μοιάζει με τη shiga. Προκαλεί νεογνική διάρροια ή υδατώδη διάρροια με αίμα, χωρίς πυρετό. Τα συμπτώματα οφείλονται μάλλον στη διείσδυση παρά στην παραγωγή τοξινών.

Η EAEC διαθέτει προσκολλητίνες και είναι μη διεισδυτική. Παράγει μια τοξίνη τύπου ST και μια αιμολυσίνη. Προκαλεί επίμονη διάρροια χωρίς φλεγμονή ή πυρετό σε νεαρά παιδιά.

Η EHEC διαθέτει προσκολλητίνες και είναι δυνητικά διεισδυτική. Δεν παράγει τοξίνες ST ή LT, ωστόσο παράγει την shiga τοξίνη. Προκαλεί παιδική διάρροια, αιμορραγική κολίτιδα, εκτεταμένη φλεγμονή και μπορεί να προκαλέσει μέχρι και αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο.

(http://textbookofbacteriology.net/e.coli_4.html)

1.6 Γονιδίωμα

Το γονιδίωμα της *E. coli* αλληλουχίστηκε στα πλαίσια της Γενομικής Βιβλιοθήκης Βακτηρίων και Αρχαίων (Genomic Encyclopedia of Bacteria and Archaea, GEBA). Ήταν το μοναδικό είδος του προγράμματος που επιλέχθηκε για αλληλούχιση χάρη στη χρήση του ως οργανισμός –μοντέλο και ως στέλεχος αναφοράς ταξινόμησης. (Goker et al 2014)

Ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *Escherichia coli* στη Θεσσαλία: μοριακή επιδημιολογία και μηχανισμοί ανθεκτικότητας

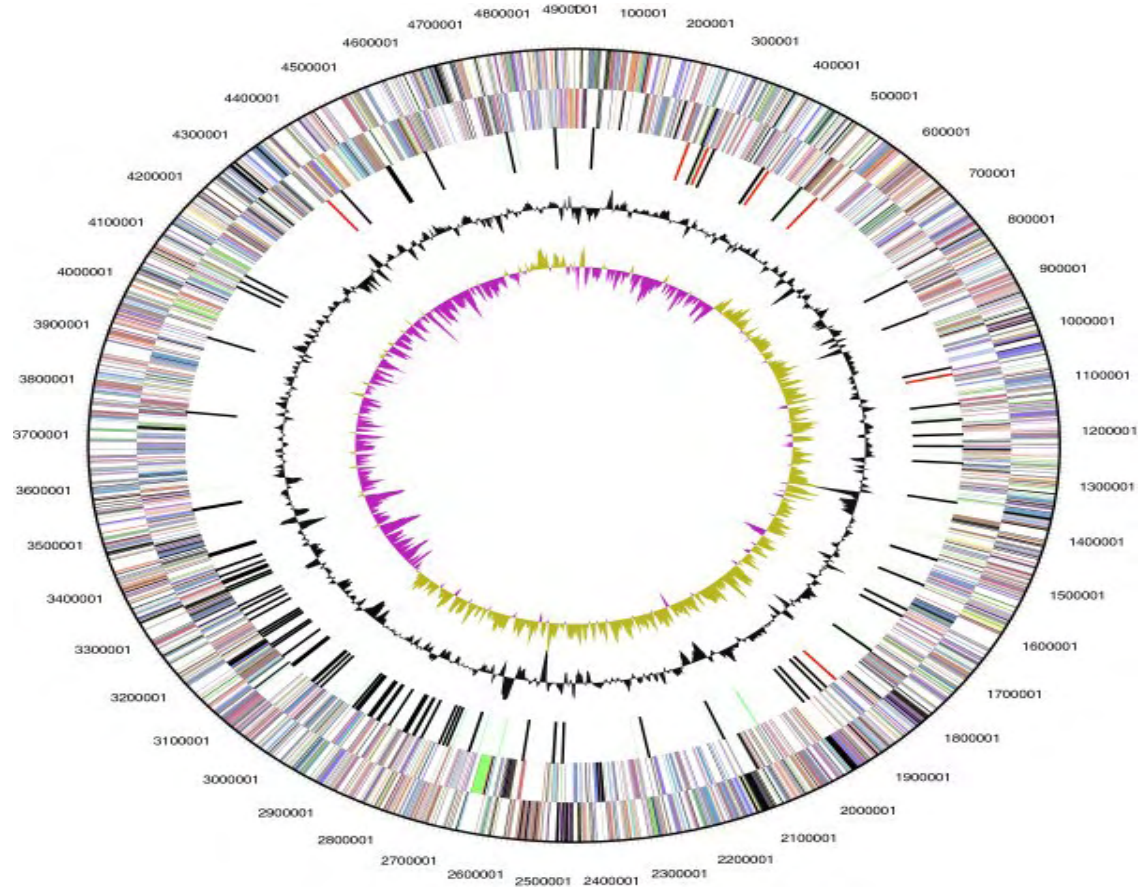
Το γονιδίωμα της *E. coli* αποτελείται από ένα κυκλικό χρωμόσωμα και ένα κυκλικό πλασμίδιο. Το μοναδικό χρωμόσωμα της *E. coli* περιέχει 4.639.221 ζεύγη βάσεων, περίπου 4288 πιθανά ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης, τα οποία αποτελούν περίπου το 88% του γονιδιώματος, και μόνο 1800 γνωστές πρωτεΐνες. Το 1% του γονιδιώματος αποτελείται από tRNA και rRNA και το 0,5% καταλαμβάνεται από επαναλαμβανόμενες, μη κωδικές αλληλουχίες. Το υπόλοιπο 10% περιέχει όλες τις ρυθμιστικές αλληλουχίες, δηλαδή υποκινητές, χειριστές, σημεία έναρξης και λήξης της αντιγραφής του DNA κλπ. Το 70% του γονιδιώματος αποτελείται από μοναδικά γονίδια (μονοκιστρονικά) και το 6% πολυκιστρονικά. Το 30% των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης (ORFs) έχουν άγνωστη λειτουργία. Επιπλέον, υπάρχουν πολλά διαφορετικά στελέχη *E. coli*, καθένα διαφέρει στο γενότυπο και κατ' επέκταση στον φαινότυπο από την *E. coli* άγριου τύπου. Αυτό είναι αποτέλεσμα της διαδικασίας της μετάλλαξης στα γονιδιώματα. Επίσης, όπως τα περισσότερα βακτήρια, έτσι και η *E. coli* μπορεί να μεταφέρει το γενετικό υλικό μέσω βακτηριακής σύζευξης σε άλλα συγγενικά βακτήρια και αυτό προκαλεί την αύξηση του αριθμού των διαφορετικών μεταξύ τους στελεχών στον ήδη υπάρχοντα πληθυσμό.

Αλλα πιθανά στοιχεία που μπορεί να εντοπιστούν στο γονιδίωμα ενός στελέχους είναι στοιχεία IS, κάποια εκ των οποίων απαντώνται και στο πλασμίδιο F και συμμετέχουν στο σχηματισμό των στελεχών Hfr, των στελεχών δηλαδή που έχουν το πλασμίδιο F ενσωματωμένο στο χρωμόσωμά τους. Το πλασμίδιο F κωδικοποιεί τα τριχίδια F (συζευκτικά τριχίδια), τα οποία επιτρέπουν την πραγματοποίηση ειδικής σύζευξης μεταξύ κυττάρου-δότη και κυττάρου-δέκτη, τμήματα προφάγων που έχουν χαθεί προφανώς μέσω ελλειμμάτων, όπως και διάφορα γονίδια που έχουν προστεθεί στο γονιδίωμα μέσω οριζόντιας μεταφοράς. Γνωρίζουμε στελέχη της *E. coli* που μπορούν να αποκτηθούν με οριζόντια μεταφορά, τα οποία περιέχουν γονίδια που συνδέονται με τη μολυσματικότητα και βρίσκονται σε μεγάλες, ασταθείς περιοχές του χρωμοσώματος οι οποίες ονομάζονται παθογονικότητας.

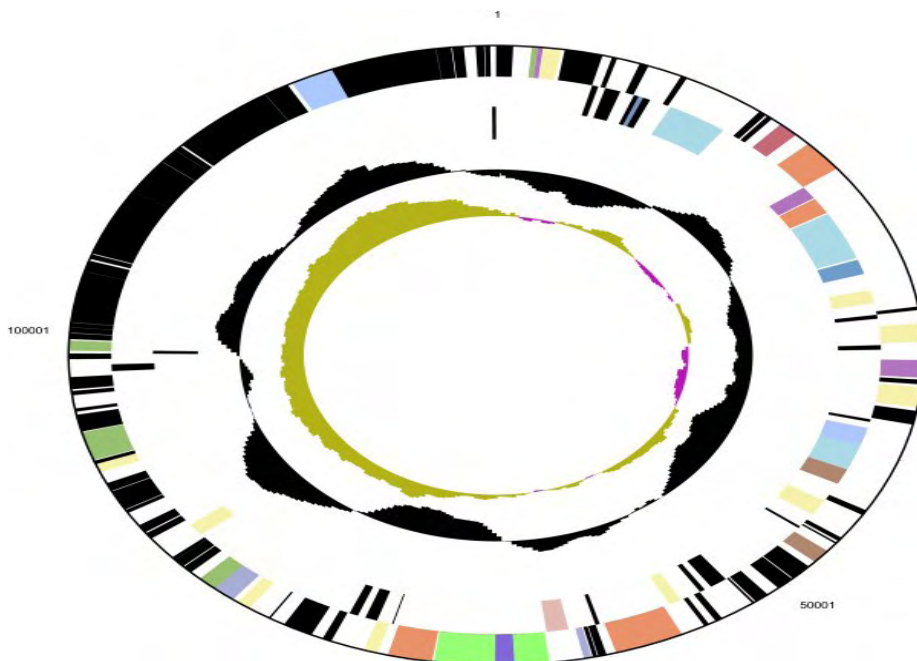
(Brock Βιολογία των Μικροοργανισμών)

Στις εικόνες 2 και 3 απεικονίζονται χάρτες του χρωμοσώματος και του πλασμιδίου της *E. Coli* αντίστοιχα. Με πράσινο απεικονίζονται τα tRNAs, με κόκκινο τα rRNAs και με μαύρο τα υπόλοιπα γονίδια.

Ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *Escherichia coli* στη
Θεσσαλία: μοριακή επιδημιολογία και μηχανισμοί ανθεκτικότητας



Εικόνα 2: Χάρτης του χρωμοσώματος της *E. coli*



Εικόνα 3: Χάρτης του πλασμιδίου της *E. coli*

1.7 Αντιβιοτικά

Οι βακτηριακές λοιμώξεις είναι πολύ συχνές στον άνθρωπο και προκαλούν σοβαρές παθολογικές καταστάσεις στον οργανισμό που μπορεί να οδηγήσουν σε θάνατο. Τα αντιβιοτικά είναι φυσικά παράγωγα μικροοργανισμών και δρουν εναντίον άλλων μικροοργανισμών. Σήμερα ο όρος αντιβιοτικό έχει αντικατασταθεί από τον περιεκτικότερο όρο αντιμικροβιακό, ο οποίος πέρα από τα φυσικά περιλαμβάνει και τα ημισυνθετικά παράγωγα ή συνθετικές ουσίες που δρουν εναντίον μικροβίων.

Η *E. coli* είναι μικρόβιο ευαίσθητο στα β-λακταμικά, στις αμινογλυκοσίδες, τη χλωραμφενικόλη, τις τετρακυκλίνες, τις σουλφοναμίδες, την τριμεθοπρίμη, τη νιτροφουραντοΐνη, τις κινολόνες. Με τη χρήση της αντιμικροβιακής θεραπείας πολλά στελέχη *E. coli* ανέπτυξαν επίκτητη ανοχή στα αντιβιοτικά και έτσι σήμερα απαιτείται να γίνει έλεγχος ευαισθησίας των στελεχών. Ανθεκτικά στελέχη παρατηρούνται ιδιαίτερα στα νοσοκομεία και αποτελούν κύρια πηγή ενδοноσοκομειακών λοιμώξεων.

(Φαρμακολογία, Page, Curtis, Sutter, Walker, Hoffman)

1.7.1 Μηχανισμοί δράσης αντιβιοτικών

Το ιδανικό αντιμικροβιακό φάρμακο παρεμβαίνει σε κάποια ζωτική λειτουργία των βακτηρίων χωρίς να επηρεάζει τα κύτταρα του ξενιστή. Έτσι, ένα αντιβιοτικό μπορεί να έχει βακτηριοστατική ή βακτηριοκτόνο δράση. Η δράση του προσδιορίζεται εύκολα, εκθέτοντας ένα πρότυπο βακτήριο σε διάφορες συγκεντρώσεις αντιβιοτικού και προσδιορίζοντας την ελάχιστη συγκέντρωση που αναστέλλει τη βακτηριακή ανάπτυξη. Η συγκέντρωση αυτή ορίζεται ως “ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα” (minimal inhibitory concentration, MIC). Καθώς η συγκέντρωση αυξάνεται πάνω από την MIC φτάνει σε κάποιο όριο στο οποίο θανατώνονται τα βακτήρια. Η μικρότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που απαιτείται για τη θανάτωση των βακτηρίων ορίζεται ως ελάχιστη “βακτηριοκτόνος πυκνότητα” (minimum bactericidal concentration, MBC). Έτσι, τα αντιβιοτικά μπορούν να διακριθούν σε βακτηριοκτόνα και βακτηριοστατικά, ανάλογα με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που μπορεί να επιτευχθεί στο αίμα, καθώς και τη σχέση του με το μικρόβιο.

Ο μηχανισμός της αντιμικροβιακής δράσης των αντιβιοτικών είναι διαφορετικός μεταξύ των κατηγοριών, αλλά σε γενικές γραμμές οι μηχανισμοί αυτοί συνοψίζονται ως εξής:

1. παρεμβολή στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος
2. παρεμβολή σε κάποια φάση της πρωτεϊνοσύνθεσης των μικροβίων
3. παρεμβολή στη σύνθεση του DNA των μικροβίων

4. μεταβολή ή καταστροφή των στοιχείων της διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών

(<http://amrls.cvm.msu.edu/pharmacology/antimicrobials/antibiotics-of-veterinary-importance/beta-lactam-antibiotics>).

1.7.2 β-λακτάμες

Τα β-λακτάμικά αντιβιοτικά διαθέτουν έναν τετραμελή β-λακταμικό δακτύλιο που περιέχει άζωτο, που είναι και το κλειδί στο μηχανισμό της δράσης τους. Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά περνούν το κυτταρικό τοίχωμα μέσω των πορινών και αφού περάσουν στον περιπλασματικό χώρο, συνδέονται μέσω του β-λακταμικού δακτυλίου τους στις δεσμευτικές πρωτεΐνες των πενικιλινών (PBPs), οι οποίες βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του βακτηρίου και καταλύουν την αντίδραση τρανσπεπτιδάσης, συμμετέχοντας έτσι στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος. Η σύνδεση του αντιβιοτικού στις πρωτεΐνες αυτές, που διαφέρουν ανάλογα με το είδος του βακτηρίου, προκαλεί την αδρανοποίησή τους και αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος. Επιπλέον, το σύμπλοκο αντιβιοτικού-PBP διεγείρει την απελευθέρωση αυτολυσινών που διασπούν το ήδη υπάρχον κυτταρικό τοίχωμα. Αυτό οδηγεί σε ωσμωτική αστάθεια και λύση του κυττάρου, λόγω της διαφοράς ωσμωτικής πίεσης μεταξύ ενδοκυττάρου και εξωκυττάρου χώρου. (μικροβιολογία). Οι κατηγορίες των β-λακταμικών αντιβιοτικών είναι οι πενικιλίνες, οι κεφαλοσπορίνες, οι καρβαπενέμες και οι μονοβακτάμες.

(Biochemistry and Molecular Biology of Antimicrobial Drug Action. T.J. Franklin and G.A. Snow. Kluwer Academic Publishers)

Πολλά βακτήρια παράγουν διάφορες β-λακταμάσες, ένζυμα τα οποία διασπούν πολλά από τα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Στις περιπτώσεις αυτές, ταυτόχρονα με το αντιβιοτικό χορηγούνται και αναστολείς β-λακταμασών που αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου και επιτρέπουν το αντιβιοτικό να παραμείνει ενεργό. Τέτοιες ουσίες είναι το κλαβουλανικό οξύ, η σουλβακτάμη, η ταζομπακτάμη και έχουν μεγάλη θεραπευτική αξία στις λοιμώξεις που οφείλονται σε βακτήρια που παράγουν β-λακταμάσες.

(<http://amrls.cvm.msu.edu/pharmacology/antimicrobials/antibiotics-of-veterinary-importance/beta-lactam-antibiotics>).

1.7.3 Καρβαπενέμες

Οι καρβαπενέμες είναι συνθετικές β-λακτάμες που διαφέρουν από τις πενικιλίνες στο ότι το άτομο S του θειαζολιδινικού δακτυλίου έχει μετατοπιστεί και έχει αντικατασταθεί από άτομο C. Έχουν το ευρύτερο αντιμικροβιακό φάσμα από όλα τα διαθέσιμα μέχρι σήμερα αντιβιοτικά, καθώς είναι ανθεκτικές στις περισσότερες β-λακταμάσες και είναι δραστικές κατά πολλών Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων, όπως στρεπτοκοκκοί, σταφυλόκοκκοι, εντεροβακτηριοειδή, ψευδομονάδες, είδη αιμόφιλων και αναερόβιων βακτηρίων.

(Φαρμακολογία, Page, Curtis, Sutter, Walker, Hoffman). Ως εκ τούτου χρησιμοποιούνται ως αντιβιοτικά «έσχατης ανάγκης», καθώς χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία λοιμώξεων από βακτήρια ανθεκτικά σε άλλα αντιβιοτικά. Επίσης, λόγω του ευρέως αντιμικροβιακού φάσματός τους χορηγούνται σε πολυμικροβιακές λοιμώξεις αντί να χρησιμοποιηθεί συνδυασμός δύο ή περισσότερων αντιβιοτικών. Ο μηχανισμός δράσης των καρβαπενεμών είναι ο ίδιος με αυτόν που περιγράφηκε για τα αντιβιοτικά β-λακτάμης, με τη διαφορά ότι έχουν την ικανότητα να συνδέονται με πολλές διαφορετικές PBPs σε σχέση με τα υπόλοιπα β-λακταμικά. (Papp Wallace et al).

Η θειεναμυκίνη είναι το πρώτο μέλος από τις καρβαπενέμες. Παράγωγο της θειεναμυκίνης είναι η ιμιπενέμη, που είναι 5-10 φορές πιο σταθερή από αυτή. Άλλες καρβαπενέμες είναι η μεροπενέμη, η ερταπενέμη, η ντοριπενέμη. Η ιμιπενέμη διασπάται στους νεφρούς από μια ανθρώπινη β-λακταμάση, τη δεϋδροπεπτιδάση-1, σε ένα νεφροτοξικό μεταβολίτη. Γι' αυτό χορηγείται πάντα μαζί με το φάρμακο σιλαστατίνη, η οποία είναι εκλεκτικός αναστολέας της νεφρικής β-λακταμάσης. Η μεροπενέμη δε διασπάται από τη νεφρική δεϋδροπεπτιδάση και δε χρειάζεται ταυτόχρονη χορήγηση σιλαστατίνης. Η ιμιπενέμη μπορεί να προκαλέσει επιληπτικές κρίσεις σε επιληπτικούς ασθενείς, ειδικά αν υπάρχει ταυτόχρονα νεφρική ανεπάρκεια. (Page, Curtis, Sutter, Walker, Hoffman Φαρμακολογία. Ιατρικές εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης).

1.8 Ανάπτυξη αντοχής

1.8.1 Μηχανισμοί ανάπτυξης αντοχής

Η επίκτητη ανάπτυξη αντοχής οφείλεται είτε σε μεταλλαγή του γενετικού υλικού, που μπορεί να είναι αποτέλεσμα προσθήκης, αφαίρεσης είτε αλλαγής κάποιου ζεύγους βάσεων του DNA που συμβαίνουν κατά την διαδικασία πολλαπλασιασμού και διασποράς του μικροβιακού κλώνου, είτε σε οριζόντια μεταφορά μεταξύ μικροβίων. Μηχανισμοί οριζόντιας μεταφοράς είναι οι εξής:

* Πλασμίδια : είναι δικλωνα κυκλικά μόρια DNA που ευρίσκονται στα μικροβιακά κύτταρα ανεξάρτητα από το χρωμόσωμα τους. Φέρουν σημαντικά γονίδια παθογονικότητας και αντοχής στα αντιβιοτικά. Συχνά έχουν την ικανότητα μετακίνησης από μικροοργανισμό σε μικροοργανισμό με την μικροβιακή σύζευξη.

* Τρανσποζόνια. Αποτελούν δομές πάνω στο γενετικό υλικό του μικροοργανισμού (χρωμόσωμα ή πλασμίδιο) που έχουν την ικανότητα μετακίνησης από μόριο DNA σε μόριο DNA. Τα απλούστερα τρανσποζόνια που καλούνται και αλληλουχίες εισδοχής (insertion sequences-IS) κωδικοποιούν ένα ένζυμο την τρανσποσάση που καταλύει την μετακίνησή τους, ενώ φέρουν στα άκρα τους τις λεγόμενες ανάστροφες αλληλουχίες (inverted repeats) 20-100 βάσεων απαραίτητες για την μετακίνησή τους.

Ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *Escherichia coli* στη Θεσσαλία: μοριακή επιδημιολογία και μηχανισμοί ανθεκτικότητας

Τα πλέον σύνθετα τραπεζοζόνια αποτελούνται από δύο IS που περιβάλλουν σειρά γονιδίων παθογένειας, αντοχής κλπ. Ειδική κατηγορία τραπεζοζονίων είναι αυτά της οικογένειας TnA-Tn3 που έχουν ειδική δομή, ενώ φαίνεται να παίζουν - σημαντικό ρόλο στην δημιουργία και διάδοση της πολυαντοχής στα αντιβιοτικά.

* **Integrans.** Πρόκειται τμήματα των τραπεζοζονίων της οικογένειας TnA-Tn3. Αποτελούνται από δύο συντηρημένα άκρα και μια περιοχή ανασυνδυασμού (att I) όπου υπάρχει η δυνατότητα ενσωμάτωσης γονιδίων (κυρίως αντοχής στα αντιβιοτικά) και δημιουργίας έτσι πολυανθεκτικών στελεχών. Το 5' συντηρημένο άκρο φέρει το ένζυμο ιντεγραση (int I) που είναι απαραίτητο για την ενσωμάτωση των γονιδίων στην περιοχή ανασυνδυασμού καθώς και τους ποαγωγείς (Promoters) της μεταγραφής των γονιδίων αυτών. Το 3' συντηρημένο άκρο φέρει γονίδια αντοχής στις σουλφοναμίδες (sul I) και τα τεταρτοταγή άλατα του αμμωνίου (qac ED I) καθώς και μεταγραφικές περιοχές (Open reading frames- ORF) αγνώστου λειτουργίας. Ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι τα γονίδια που ενσωματώνονται στην attI περιοχή του integron έχουν την μορφή «κασέτας» δηλαδή κάθε γονίδιο ακολουθείται από μια συντηρημένη περιοχή το στοιχείο 59 βάσεων. Επίσης σημαντικό είναι το γεγονός ότι τα «νεώτερα» γονίδια ενσωματώνονται προς την 5' περιοχή, μεταξύ δηλαδή των ήδη ενσωματωμένων και των προαγωγών.

* **Νησίδες παθογονικότητας (Pathogenicity islands).** Είναι μεγάλα τμήματα DNA που φέρουν γόνους παθογονικότητας, αντοχής κ.ά.. Υπάρχουν σε παθογόνους κλώνους ενός μικροβιακού είδους αλλά λείπουν από μη παθογόνους κλώνους του είδους αυτού. Διαφέρουν ως προς την C+G σύνθεση, και περιβάλλονται από ανάστροφες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, γεγονός συμβατό με πιθανή προέλευση από άλλο μικροβιακό είδος σε κάποια στιγμή της εξελικτικής διαδικασίας. Οι νησίδες παθογονικότητας πάντως γενικά δεν μπορούν να μετακινηθούν εύκολα από μικροοργανισμό σε μικροοργανισμό.

* **Μεταμόρφωση.** Συμβάν που αφορά την ικανότητα του μικροοργανισμού να προσροφά γυμνό γενετικό υλικό από το περιβάλλον και να το ενσωματώνει στο δικό του γενετικό υλικό.

(Brock Βιολογία των μικροοργανισμών)

1.8.2 Νοσοκομειακά στελέχη

Το νοσοκομειακό περιβάλλον αποτελεί μείζονα δεξαμενή ποικίλων παθογόνων μικροβίων, και αυτό γιατί ορισμένα μέλη της φυσιολογικής χλωρίδας του ανθρώπου που είναι ευκαιριακά παθογόνα αποτελούν ιδιαίτερο κίνδυνο για τους νοσηλευόμενους ασθενείς. Στις δεκαετίες του 1940 και 1950 η πλειονότητα των νοσοκομειακών λοιμώξεων οφειλόταν σε Gram-θετικά βακτήρια, όπως πχ ο *Staphylococcus aureus* που αποτελούσε την κύρια αιτία νοσοκομειακών λοιμώξεων. Στη 10ετία του 1970 τα συχνότερα αίτια νοσοκομειακών λοιμώξεων ήταν γκραμ αρνητικά βακτήρια, όπως η όπως η *E. coli* και η *Pseudomonas aeruginosa*. Κατόπιν,

Ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *Escherichia coli* στη Θεσσαλία: μοριακή επιδημιολογία και μηχανισμοί ανθεκτικότητας

αναδύθηκαν ως νοσοκομειακά παθογόνα τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά γκράμ θετικά βακτήρια *S. aureus*, κοαγκουλάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι και τα είδη του γένους *Enterococcus*. Μέχρι τη δεκαετία του 1990 αυτά τα Gram-θετικά βακτήρια προκαλούσαν το 34% των νοσοκομειακών λοιμώξεων και τέσσερα Gram-αρνητικά παθογόνα μικρόβια το 32%. Στην πρώτη δεκαετία του 21ου αιώνα η αντοχή των παθογόνων μικροοργανισμών που προκαλούν νοσοκομειακές λοιμώξεις στα αντιβιοτικά αποτελεί ένα πολύ σημαντικό πρόβλημα.

Τα βακτήρια καθίστανται ανθεκτικά στα αντιβιοτικά με 4 βασικούς μηχανισμούς:

1. καταστροφή ή αδρανοποίηση του φαρμάκου (πχ από β-λακταμάσες)
2. παρεμπόδιση της εισόδου του φαρμάκου στο βακτηριακό κύτταρο όπου εντοπίζεται ο στόχος δράσης του (συχνός μηχανισμός αντοχής στις τετρακυκλίνες)
3. τροποποίηση του στόχου του φαρμάκου (για παράδειγμα η αλλαγή ενός και μόνο αμινοξέος στο ριβόσωμα είναι αρκετή για την εμφάνιση αντοχής σε ορισμένες μακρολίδες)
4. ταχεία αποβολή του φαρμάκου από το βακτήριο με τη βοήθεια αντλιών, πριν το φάρμακο προλάβει να δράσει.

Η ιδιοσυστατική αντοχή στα αντιβιοτικά κωδικοποιείται συνήθως από πλασμίδια ή μικρά τμήματα DNA, τα τρανσποζόνια, που μετακινούνται από μια θέση του γονιδιώματος σε μία άλλη. Πλασμίδια μεταξύ των οποίων και αυτά που προκαλούν αντοχή μεταφέρονται μεταξύ των διαφόρων κυττάρων ενός βακτηριακού πληθυσμού και μεταξύ διαφορετικών αλλά συγγενικών βακτηριακών πληθυσμών. Μεγάλο ρόλο στην εξάπλωση ανθεκτικών στελεχών έχει η μη ορθολογική χρήση των αντιβιοτικών, κυρίως στις λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες του κόσμου, αλλά και στις ανεπτυγμένες. Ένας λόγος είναι η αγορά αντιβιοτικών χωρίς ιατρική συνταγή. Από μελέτη στο Μπαγκλαντές προκύπτει ότι μόνο το 8% των αντιβιοτικών χορηγούνται με ιατρική συνταγή, αλλά και το αμερικανικό CDC εκτιμά ότι στις ΗΠΑ μεγάλο ποσοστό αντιβιοτικών που συνταγογραφούνται για ωτίτιδα, φαρυγγίτιδα και κοινό κρυολόγημα είναι είτε αχρείαστα είτε ακατάλληλα για την αντιμετώπιση των συγκεκριμένων λοιμώξεων. Επιπλέον, η μισή ποσότητα αντιβιοτικών από αυτή που καταναλώνεται ετησίως στις ΗΠΑ δε χορηγούνται θεραπευτικά, αλλά προστίθενται στις ζωοτροφές ως αυξητικοί παράγοντες. Στο φαινόμενο αυτό συμβάλλουν και οι ασθενείς, οι οποίοι δε συμπληρώνουν το πλήρες θεραπευτικό σχήμα του αντιβιοτικού τους ή χρησιμοποιούν το περίσσειμα των αντιβιοτικών που έχουν. Τέλος, οι εργαζόμενοι στα νοσοκομεία, όπου χρησιμοποιούνται συνεχώς αντιβιοτικά, είναι συχνά φορείς ανθεκτικών στελεχών. (Εισαγωγή στη μικροβιολογία Tortora Funke Case)

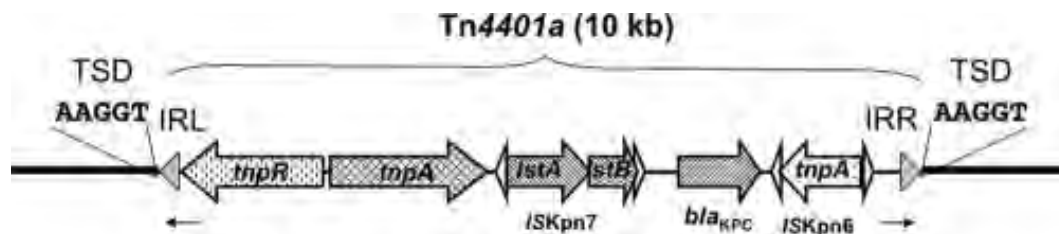
1.8.3 Καρβαπενεμάσες

Οι καρβαπενεμάσες είναι β-λακταμάσες, οι οποίες έχουν συσχετισθεί με την ανθεκτικότητα που προσδίδουν στον μικροοργανισμό που τις φέρει σε πολλά β-λακταμικά, συμπεριλαμβανομένων των καρβαπενεμών. Κατά καιρούς έχουν εντοπιστεί σε στελέχη διάφορα γονίδια τα οποία εκφράζουν καρβαπενεμάσες.

Ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *Escherichia coli* στη Θεσσαλία: μοριακή επιδημιολογία και μηχανισμοί ανθεκτικότητας

Το γονίδιο KPC, που εκφράζει μια καρβαπενεμάση, το οποίο εξαπλώνεται ταχέως σε όλο τον κόσμο, βρίσκεται σε ένα τρανσποζόνιο Tn3, το Tn4401. Σε μια δοκιμασία ενσωμάτωσης-σύζευξης, το Tn4401 ήταν σε θέση να εισάγει το γονίδιο KPC-2 σε συχνότητα $4,4 \times 10^{-6}$ ανά κύτταρο δέκτη. Διπλασιασμός μιας περιοχής 5 ζευγών βάσεων παρατηρείται μετά από κάθε εισαγωγή. Μελέτη έδειξε ότι το Tn4401 είναι ένας ενεργό μεταθετόνιο ικανό να μεταφέρει το γονίδιο KPC σε υψηλή συχνότητα. (Naas et al).

Στην εικόνα 4 απεικονίζεται το Tn4401a, μαζί με τα γονίδια που κωδικοποιούν τα προϊόντα που καταλύουν τη μεταφορά του, καθώς και το γονίδιο blaKPC.



Εικόνα 4: το Tn4401a ως φορέας του blaKPC.

1.9 Μέθοδοι μοριακής τυποποίησης

Η τυποποίηση των στελεχών έχει αξία σε περιπτώσεις που θέλουμε να διαπιστώσουμε κατά πόσο τα στελέχη προέρχονται από μια μονήρη πηγή ή αν συνδέονται επιδημιολογικά. Ο προσδιορισμός της αλυσίδας μετάδοσης μιας λοίμωξης είναι εξαιρετικά σημαντικός, ώστε η αλυσίδα μετάδοσης να διακοπεί με αποτέλεσμα την επιβράδυνση ή διακοπή της εξάπλωσης της λοίμωξης. Μόλις αυτή προσδιοριστεί, εφαρμόζονται τα κατάλληλα μέτρα για τον περιορισμό της εξάπλωσής της. Τέτοια μέτρα είναι η εξουδετέρωση της πηγής της λοίμωξης, η απομόνωση, η ανάπτυξη εμβολίων και η επιμόρφωση του πληθυσμού. (εισαγωγή στη μικροβιολογία tortora funke case)

Οι μέθοδοι μοριακής τυποποίησης διακρίνονται σε φαινοτυπικές και σε γονοτυπικές. Για τη διαφοροποίηση των στελεχών, οι φαινοτυπικές μέθοδοι χρησιμοποιούν προϊόντα γονιδιακής έκφρασης, ενώ οι γονοτυπικές στην ανάλυση των γονιδιωμάτων τους. Στα συστήματα τυποποίησης χρησιμοποιούνται ειδικοί δείκτες των μικροοργανισμών που είναι χαρακτηριστικοί ενός στελέχους ή κλώνου (καθοριστικοί ότι οι μικροοργανισμοί προέρχονται από το ίδιο πρόδρομο κύτταρο) και που διαφέρουν από τα άλλα στελέχη. Η χρησιμότητα ενός συστήματος τυποποίησης εξαρτάται από την επαναληψιμότητά του, την ικανότητα διάκρισης, τη σταθερότητα και το ποσοστό των τελικά τυποποιηθέντων στελεχών. Μια φαινοτυπική μέθοδος είναι η βιοτυποποίηση, η οποία αποτελεί προέκταση των βιοχημικών και

Ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *Escherichia coli* στη Θεσσαλία: μοριακή επιδημιολογία και μηχανισμοί ανθεκτικότητας

ανοσολογικών δοκιμασιών τυποποίησης πχ έκφραση ενζύμων ή ζύμωση σακχάρων. Μια ακόμη μέθοδος είναι η οροτυποποίηση, η οποία διακρίνει τα διάφορα στελέχη με βάση τα διαφορετικά αντιγόνα στην επιφάνειά τους. Η Τρίτη μέθοδος είναι η ευαισθησία σε αντιμικροβιακούς παράγοντες.

Οι γονοτυπικές μέθοδοι μοριακής τυποποίησης περιλαμβάνουν την ηλεκτροφόρηση παλλόμενου πεδίου (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE), η ανάλυση πλασμιδίων με περιοριστικά ένζυμα, η PCR με αυθαίρετους εκκινητές (AP-PCR), οι πολυμορφισμοί μήκους κλασμάτων περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP), η ριβοτυπία, η γονοτύπηση βακτηρίων με τη χρήση μεταβλητού αριθμού διαδοχικών επαναλήψεων (Variable Number Tandem Repeats, VNTR) και τέλος η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, η τυποποίηση αλληλουχίας πολλαπλών γενετικών θέσεων, MLST (Multilocus Sequence Typing). Η MLST βασίζεται στην άμεση σύγκριση επτά ή παραπάνω τμημάτων γονιδίων του βασικού μεταβολισμού (housekeeping genes), που βρίσκονται σε όλα τα στελέχη ενός είδους. Στη συνέχεια κατατάσσει τα στελέχη σε ένα τύπο με βάση το συνδυασμό των τμημάτων των γονιδίων. Επειδή υπάρχουν πολλά πιθανά αλληλία για κάθε γενετικό τόπο, είναι απίθανο πανομοιότυπα προφίλ αλληλίων να έχουν προκύψει τυχαία. Έτσι, στελέχη με τα ίδια αλληλία θεωρούνται μέλη του ίδιου κλώνου. Όπως ήδη αναφέρθηκε τα γονίδια των ενζύμων του βασικού μεταβολισμού που μελετά η MLST, απαρτίζουν το σταθερό τμήμα του γενετικού υλικού, καθώς πρόκειται για καλά συντηρημένα γονίδια, και παίζουν ταξινομητικό ρόλο, αλλά και ρόλο στην παρακολούθηση της μακροχρόνιας εξελικτικής πορείας των διαφόρων κλώνων των μικροοργανισμών στο χώρο και τον χρόνο. Έτσι τα όρια μεταξύ της επιδημιολογικής διερεύνησης, της μελέτης της πληθυσμιακής δομής και της φυλογενετικής εξέλιξης του μικροβιακού είδους συγχέονται. Τονίζεται πάντως ξανά ότι επειδή οι μεταλλαγές στα ένζυμα του βασικού μεταβολισμού εμφανίζονται σε σχετικά αργά χρονικά διαστήματα και δεν υφίστανται εξωτερικές πιέσεις επιλογής, η MLST παρακολουθεί την μακρόχρονη πορεία του μικροβιακού κλώνου, είναι συνεπώς κατάλληλη για μακροχρόνιες παρατηρήσεις ενώ γενικά δεν είναι κατάλληλη για την παρακολούθηση βραχύχρονων πχ ενδονοσοκομειακών επιδημικών επεισοδίων. (Molecular Microbiology, Diagnostic Principles and Practice)

1.10 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη τριών στελεχών *E. coli* που απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια του Απριλίου του 2013 από ασθενείς του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου της Λάρισας, με στόχο τον έλεγχο των μηχανισμών αντοχής τους στις καρβαπενέμες με τη χρήση μοριακών μεθόδων. Επιπλέον, τα στελέχη συγκρίθηκαν με σκοπό να βρεθεί πιθανή γενετική ομοιότητα μεταξύ τους.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Τα βακτήρια

Τρία στελέχη *E. coli* που απομονώθηκαν από δείγματα τριών ασθενών του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας που παρουσίασαν αντοχή στις καρβαπενέμες (φαινοτυπικά κριτήρια) μελετήθηκαν για αυτή την εργασία. Τα χαρακτηριστικά τους συνοψίζονται στον πίνακα 2:

Πίνακας 2:

Ασθενής	Στέλεχος	Ημερομηνία λήψης	Κλινικό δείγμα	Κλινική
A	1	2/4/2013	Πύο	Παθολογική A
B	2	3/4/2013	Αίμα	Παθολογική B
Γ	3	3/4/2013	Κατάκλιση	Παθολογική Γ

2.2 Μικροβιολογικές μέθοδοι

Στις μικροβιολογικές μεθόδους περιλαμβάνονται η καλλιέργεια βακτηρίων, η ταυτοποίηση και ο έλεγχος αντοχής στα αντιβιοτικά.

2.2.1 Καλλιέργεια βακτηρίων

Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα της *E. coli* να αναπτύσσεται σε θρεπτικό μέσο υπό ορισμένες εργαστηριακές συνθήκες.

Υλικά:

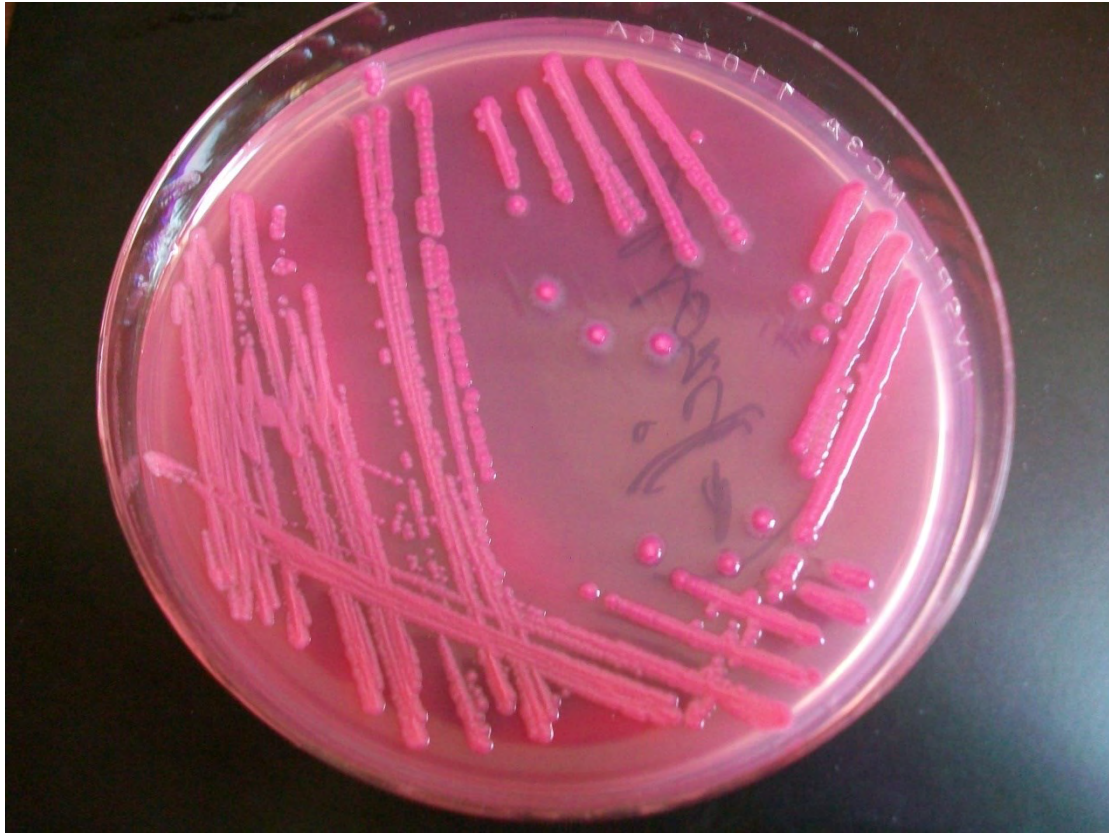
- τρυβλίο MacConkey
- στυλεός
- πιπέτα παστέρ
- κλίβανος

Διαδικασία:

Παίρνουμε με την πιπέτα παστέρ μια μικρή ποσότητα από το κλινικό δείγμα και την εναποθέτουμε στην άκρη του τρυβλίου. Έπειτα παίρνουμε τον στυλεό και

Ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *Escherichia coli* στη Θεσσαλία: μοριακή επιδημιολογία και μηχανισμοί ανθεκτικότητας

απλώνουμε το δείγμα στο τρυβλίο σχηματίζοντας γραμμές και κάνοντας και τις αραιώσεις κυκλικά. Τοποθετούμε το τρυβλίο στον κλίβανο στους 37°C για 18 ως 24 ώρες, ώστε να αναπτυχθούν τα βακτήρια. Στην εικόνα 5 φαίνεται ένα τρυβλίο στο οποίο το στέλεχος έχει αναπτυχθεί.



Εικόνα 5

2.2.2 Ταυτοποίηση

Η ταυτοποίηση των βακτηρίων έγινε με το σύστημα Vitek 2. Το Vitek 2 διαθέτει ένα καλά ανεπτυγμένο σύστημα εξειδίκευσης και ανιχνεύει φαινότυπους για τους περισσότερους μικροοργανισμούς. Επίσης επιτρέπει τον προσδιορισμό του καταλληλότερου για τον ασθενή αντιβιοτικού καθώς και τον καθορισμό της δοσολογίας με βάση την Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση (MIC). Το σύστημα αυτό διαθέτει μια κάρτα GN πάνω στην οποία υπάρχουν 47 βιοχημικές εξετάσεις και μια υποδοχή αρνητικού ελέγχου, και επιτρέπει την αυτοματοποιημένη ταυτοποίηση των περισσότερων κλινικά σημαντικών Gram-αρνητικών βακτηριδίων.

Ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *Escherichia coli* στη Θεσσαλία: μοριακή επιδημιολογία και μηχανισμοί ανθεκτικότητας

Υλικά:

- Αποικίες βακτηρίου
- Κάρτα Vitek 2 GN
- Κιτ Vitek 2 DENSICHEK
- Κασέτα Vitek 2
- Αποστειρωμένος στυλεός
- Δοκιμαστικός σωλήνας 12 x 75 mm
- Στείρο αλατούχο διάλυμα (0,45-0,50% NaCl, pH 4,5-7)
- Συσκευή DENSICHEK

Διαδικασία:

- Για την επιλογή της κάρτας πρέπει αρχικά να κάνουμε χρώση κατά Gram.
- Προετοιμάζουμε το εναιώρημα ως εξής: μεταφέρουμε με τον αποστειρωμένο στυλεό μερικές αποικίες από την καλλιέργεια του στελέχους στο δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 3 ml από το στείρο αλατούχο διάλυμα.
- Μετράμε την οπτική πυκνότητα του εναιωρήματος με τη συσκευή Densichek, η οποία πρέπει να είναι μεταξύ 0,50-0,63 McF.
- Τέλος, ο δοκιμαστικός σωλήνας που περιέχει το εναιώρημα τοποθετείται στην κάρτα GN.

2.2.3 Έλεγχος αντοχής στα αντιβιοτικά

Επιλέγονται τα αντιμικροβιακά τα οποία χρησιμοποιούνται στη χημειοθεραπεία κατά της *E. Coli*, μεταξύ αυτών και οι καρβαπενέμες, ιμιπενέμη και μεροπενέμη. Τα αντιβιοτικά για τα οποία έγινε έλεγχος είναι τα εξής:

- Ιμιπενέμη
- Κεφταζιδίνη
- Αμικασίνη
- Αμπικιλίνη-σουλμπακτάμη
- Κεφεπίμη
- Αμοξικιλίνη-κλαβουλανικό οξύ
- Αζτρεονάμη
- Αμπικιλίνη
- Κεφοξιτίνη
- Κεφοταξίμη
- Μεροπενέμη
- Τικαρκιλίνη
- Τικαρκιλίνη-κλαβουλανικό οξύ
- Σιπροφλοξασίνη

Ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *Escherichia coli* στη Θεσσαλία: μοριακή επιδημιολογία και μηχανισμοί ανθεκτικότητας

- Πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη

Υλικά:

- τρυβλίο Mueller-Hinton
- erpendorfs
- όργανο μέτρησης McF
- πιπέτα παστέρ
- διανεμητής
- δισκία εμποτισμένα με αντιβιοτικά
- κλίβανος

Διαδικασία:

Προετοιμάζουμε από αποικίες του στελέχους εναιώρημα 0,5 McF. Το αναδεύουμε με την πιπέτα και παίρνουμε ποσότητα με την οποία εμποτίζουμε το τετράγωνο τρυβλίο Mueller-Hinton, προσπαθώντας κινώντας το κυκλικά να καλύψουμε όλη την επιφάνεια. Έπειτα απομακρύνουμε την περίσσεια και το αφήνουμε να στεγνώσει για πέντε λεπτά. Τέλος τοποθετούμε τα δισκία στο τρυβλίο με τη βοήθεια του διανεμητή, που περιέχει διαφορετικό συνδυασμό αντιμικροβιακών παραγόντων για κάθε ομάδα βακτηρίων, και τοποθετούμε το τρυβλίο στον κλίβανο για 24 ώρες. Την επόμενη μέρα φαίνονται ξεκάθαρα οι αναστολές στα διάφορα αντιβιοτικά που φέρονται από τα δισκία. Το αντιβιόγραμμα διαβάζεται βάσει των οδηγιών της CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute).

Στην εικόνα 6 φαίνεται το τρυβλίο πάνω στο οποίο έχει αναπτυχθεί το στέλεχος, καθώς και οι αναστολές που προκαλούνται από τα δισκία.



Εικόνα 6

2.3 Μοριακές μέθοδοι

Στις μοριακές μεθόδους περιλαμβάνονται η απομόνωση του γενετικού υλικού, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), η λεκτροφόρηση, ο καθαρισμός των προϊόντων και η αλληλούχιση.

2.3.1 Απομόνωση γενετικού υλικού

Για την απομόνωση του DNA από τα βακτήρια χρησιμοποιήθηκε το Quick-gDNATM MiniPrep kit (Zymo research). Τα κύτταρα αρχικά λύνονται, έπειτα αφαιρούνται κατά σειρά τα μεμβρανικά λιπίδια, οι πρωτεΐνες, το RNA, και το DNA

Ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *Escherichia coli* στη Θεσσαλία: μοριακή επιδημιολογία και μηχανισμοί ανθεκτικότητας

που απομένει καθαρίζεται από πρωτεΐνες, απορρυπαντικά άλατα και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεργασία της απομόνωσης.

Υλικά:

- στήλες
- σωληνάρια συλλογής
- πιπέτες
- tips

όργανα:

- φυγόκεντρος
- vortex

αντιδραστήρια

- genomic lysis buffer
- pre-wash buffer
- wash buffer
- elution buffer

διαδικασία:

- Φτιάχνουμε εναιώρημα 3-4 McF και τοποθετούμε 200 μl από αυτό σε ένα Eppendorf μαζί με τετραπλάσιο όγκο (800μl) Genomic Lysis buffer.
- Αναδεύουμε στο vortex για 4-6 δευτερόλεπτα και επωάζουμε για πέντε λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Μεταφέρουμε το μίγμα (1000 μl) σε μια στήλη του kit που έχουμε πρώτα τοποθετήσει μέσα σε ένα σωληνάριο συλλογής και φυγοκεντρούμε για ένα λεπτό στα 11400 rpm
- Μεταφέρουμε τη στήλη σε νέο σωληνάριο συλλογής και προσθέτουμε 200 μl Pre-wash Buffer, φυγοκεντρούμε για ένα λεπτό σε 11400 rpm και απορρίπτουμε το περιεχόμενο του σωληναρίου συλλογής
- Προσθέτουμε στη στήλη 500 μl Wash Buffer και φυγοκεντρούμε για ένα λεπτό στα 11400 rpm
- Μεταφέρουμε τη στήλη σε ένα Eppendorf και προσθέτουμε 50 μl Elution Buffer, επωάζουμε για πέντε λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρούμε για 30 δευτερόλεπτα σε 14680 rpm. Το DNA θα εκλουθεί στο Eppendorf και μπορεί είτε να χρησιμοποιηθεί κατευθείαν είτε να αποθηκευτεί στους -20oC για μελλοντική χρήση.

2.3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε το 1983 από τον Kary Mullis, και χάρη σε αυτή τη μέθοδο επιτυγχάνεται ο πολλαπλασιασμός μεγάλου αριθμού αντιγράφων ενός τμήματος DNA σε μία *in vitro* ενζυμική αντίδραση, δίνοντας μια καινούρια προοπτική για τη μελέτη και την ανάλυση γονιδίων. Η βασική ιδέα για την ανάπτυξη της PCR μεθόδου βασίζεται στην ανάγκη ταυτοποίησης τμημάτων DNA, προκαλώντας τεχνητά την αύξηση της ποσότητάς του όταν αυτό βρίσκεται σε πολύ μικρή, μη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση.

Η PCR βασίζεται στην ικανότητα της DNA πολυμεράσης να αντιγράφει έναν κλώνο DNA μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA που οριοθετείται δεξιά και αριστερά από δύο εκκινητές-ολιγονουκλεοτίδια (primers), μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων σύνθεσης DNA. Η αλληλουχία του κάθε εκκινητή είναι συμπληρωματική προς τη μία από τις δύο αλυσίδες του δίκλωνου DNA εκμαγείου, επομένως κρίνεται απαραίτητο πριν από την αντίδραση να είναι γνωστά τα όρια της προς ανάλυση αλληλουχίας. Συνήθως, το μέγεθος του τμήματος DNA που χρησιμοποιείται για διαγνωστικές εξετάσεις είναι μεταξύ 100-1000 βάσεις. Η αντίδραση τυπικά περιλαμβάνει 20-40 επαναλαμβανόμενους κύκλους. Κάθε θερμικός κύκλος αποτελείται από 3 στάδια:

- Αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου συνήθως σε συνθήκες 94-96°C για 20-60 δευτερόλεπτα. Στο στάδιο αυτό οι δύο κλώνοι διαχωρίζονται μεταξύ τους, ώστε να μπορούν να υβριδοποιηθούν με τους εκκινητές.
- Υβριδοποίηση εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλυσίδες, συνήθως σε συνθήκες 50-65°C για 20-60 δευτερόλεπτα, μειώνεται δηλαδή η θερμοκρασία ώστε να υβριδοποιηθούν οι εκκινητές με τις συμπληρωματικές αλυσίδες-στόχους.
- Επέκταση των συνδεδεμένων εκκινητών και σύνθεση του DNA με κατεύθυνση 5'-3', τυπικά σε 72°C για 0,5-2 λεπτά.

Πολλές φορές μετά το τέλος των κύκλων της PCR ακολουθεί ένα τελευταίο στάδιο, αυτό της τελικής επέκτασης των εκκινητών, που ελέγχει τυχόν λάθη στην προσθήκη νουκλεοτιδίων και καλύπτει κενά με ελεύθερα νουκλεοτίδια. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε εξειδικευμένα όργανα, τους θερμοκυκλοποιητές. Οι εκκινητές επεκτείνονται σύμφωνα με τη συμπληρωματική αλυσίδα με την οποία υβριδοποιούνται, με τη διαδοχική προσθήκη dNTPs υπό την ενζυμική κατάλυση μιας DNA πολυμεράσης. Το προϊόν επιμήκυνσης του εκκινητή από τον πρώτο κύκλο της αντίδρασης αποτελεί εκμαγείο για τον άλλο εκκινητή στον επόμενο κύκλο. Μετά το πέρας των αντιδράσεων, η θερμοκρασία στη συσκευή μειώνεται στους 4°C ώστε τα προϊόντα να διατηρηθούν.

Ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *Escherichia coli* στη Θεσσαλία: μοριακή επιδημιολογία και μηχανισμοί ανθεκτικότητας

Κατά τη διάρκεια μιας αντίδρασης PCR ο αριθμός των αρχικών αντιγράφων θεωρητικά διπλασιάζεται μιας και η αύξηση είναι εκθετική. Αν η απόδοση της PCR είναι 100%, τότε μετά από n κύκλους το προϊόν PCR περιέχει 2^n αντίγραφα της αλληλουχίας που καθορίζεται από τους εκκινητές. Όμως στην πραγματικότητα η απόδοση της PCR δεν είναι 100%, καθώς αυτή είναι ανάλογη του αρχικού αριθμού των αντιγράφων. Επίσης στα τελευταία στάδια η αντίδραση φτάνει σε πλατώ λόγω της εξάντλησης των αντιδραστηρίων ή της αδρανοποίησης της πολυμεράσης. Η χρήση της PCR ενέχει πολλά πλεονεκτήματα, όπως:

- Παρέχει τη δυνατότητα παραγωγής μεγάλου αριθμού αντιγράφων συγκεκριμένου τμήματος DNA σε μικρό χρονικό διάστημα και
- Η αντίδραση μπορεί να γίνει με τη χρήση ελάχιστης ποσότητας γενωμικού DNA ή πολύ κακής ποιότητας DNA.

(Μοριακή Διαγνωστική, George Patrinos, Wilhelm Ansorge, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου)

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται κατά την εκτέλεση μιας αντίδρασης PCR είναι τα ακόλουθα:

- DNA πολυμεράση, θερμοανθεκτικό ένζυμο που παράγεται από το *Thermus aquaticus*, μικροοργανισμό που ζει σε θερμοπηγές. Το ένζυμο αυτό διτηρεί τη δραστηριότητά του στους 80°C.
- Εκκινητές (primers), μικρές ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες 15-30 νουκλεοτιδίων με περιεκτικότητα περίπου 50% G+C, ειδικές για το DNA που θέλουμε να προσδιορίσουμε.
- Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs), τα οποία προστίθενται για την επέκταση του νεοσυντιθέμενου κλώνου
- Ιόντα μαγνησίου

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR για τα τρία στελέχη για επτά γονίδια βασικού μεταβολισμού (housekeeping genes) με σκοπό την τυποποίηση των στελεχών με τη μέθοδο MLST, και ως προς την ύπαρξη των γονιδίων VIM και KPC για τον προσδιορισμό του γονιδίου της β-λακταμάσης που προσδίδει ανθεκτικότητα στις καρβαπενέμες, καθώς και για το γενετικό περιβάλλον αυτού (PCR mapping).

Υλικά:

- Αποστειρωμένα σωληνάρια Eppendorf
- PCR tubes
- Πιπέτες
- Tips

Ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *Escherichia coli* στη Θεσσαλία: μοριακή επιδημιολογία και μηχανισμοί ανθεκτικότητας

Όργανα:

- Θάλαμος νηματικής ροής
- Συσκευή Vortex
- Θερμοκυκλοποιητής

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν και οι αντίστοιχες ποσότητες ανά αντίδραση φαίνονται στον πίνακα 3:

Πίνακας 3:

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μl) ανά αντίδραση
H ₂ O	36,425
MgCl ₂	0,375
Buffer	5
dNTPs (10mM)	1
Primer 1 (10mM)	1
Primer 2 (10mM)	1
Taq (5u/μl)	0,2
Δείγμα	5
Συνολικός όγκος	50

Διαδικασία:

Όλες οι διεργασίες έγιναν σε θάλαμο νηματικής ροής, ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος επιμόλυνσης των δειγμάτων. Αρχικά προσθέτουμε όλα τα αντιδραστήρια στις ποσότητες που αναγράφονται παραπάνω, πολλαπλασιαζόμενες επί τον αριθμό των δειγμάτων συν τον θετικό και τον αρνητικό μάρτυρα σε ένα σωληνάριο Eppendorf. Έπειτα το αναδεύουμε με vortex και το μοιράζουμε στα PCR tubes (45 μl στο καθένα) και προσθέτουμε στο καθένα ποσότητα από τα αντίστοιχα δείγματα και τους μάρτυρες (5 μl). Τέλος, επιλέγουμε το κατάλληλο πρόγραμμα στη συσκευή του θερμοκυκλοποιητή και τοποθετούμε τα tubes για PCR.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο για τα γονίδια VIM και KPC είναι οι εξής:

VIMF: 5'-AGTGGTGAGTATCCGACA-3'

VIMR: 5'-ATGAAAGTGCGTGGAGAC-3'

KPCF: 5'-TCGCTAAACTCGAACAGG-3'

KPCR: 5'-T TACTGCCCGTTGACGCCCAATCC-3'

**Ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *Escherichia coli* στη
Θεσσαλία: μοριακή επιδημιολογία και μηχανισμοί ανθεκτικότητας**

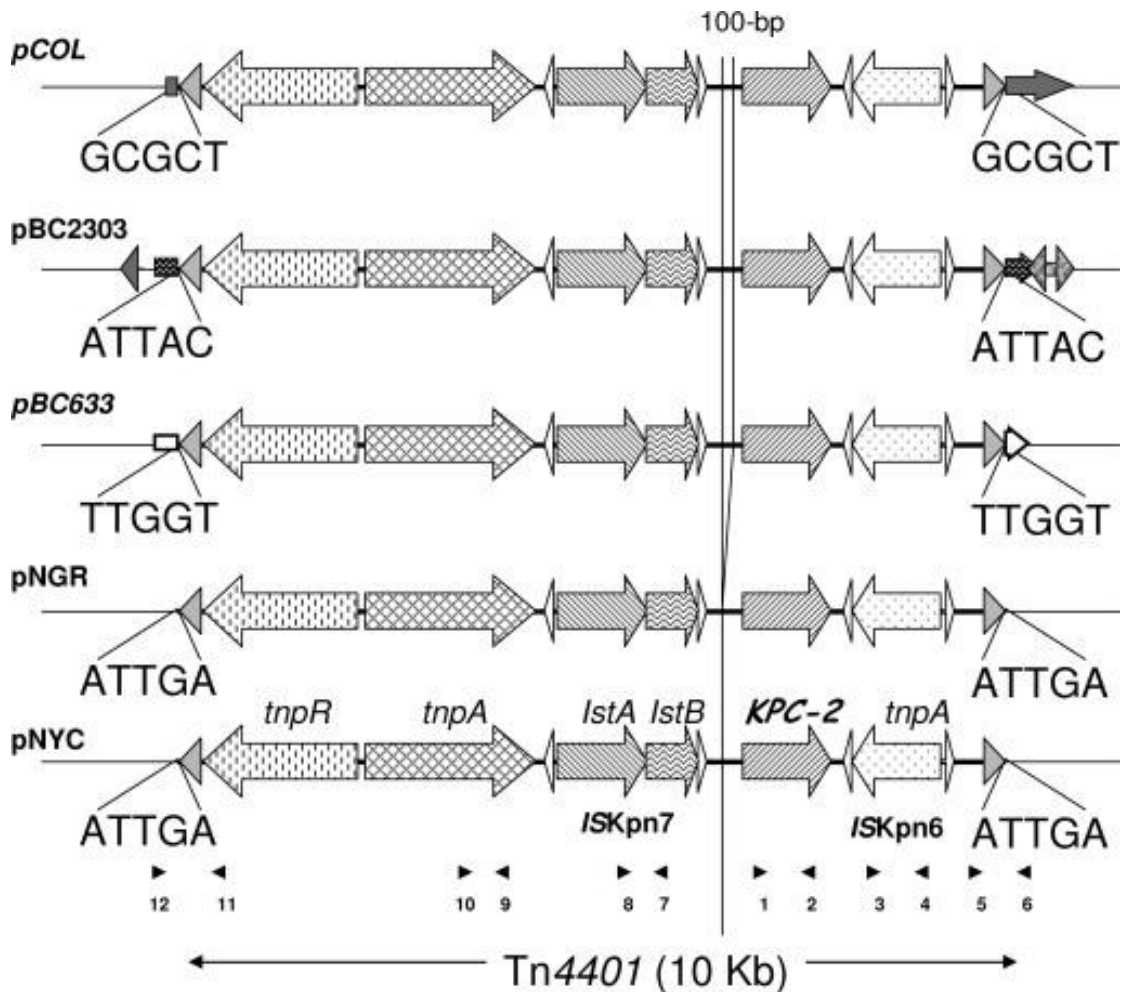
Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR walking του Tn4401 είναι αυτοί του πίνακα 4. Στην εικόνα 7 φαίνεται η θέση τους επάνω στο τρανσποζόνιο καθώς και η κατεύθυνσή τους. Επίσης στην ίδια εικόνα φαίνονται οι δύο ισομορφές του τρανσποζονίου.

Πίνακας 4:

Primer name	No. in Fig.	Sequence (5'-3')
KpcA	1	CTGTCTTGTCTCTCATGGCC
KpcB	2	CCTCGCTGTGCTTGTTCATCC
4281	3	GGCACGGCAAATGACTA
4714	4	GAAGATGCCAAGGTCAATGC
SeqRIout	5	ACGACCACGCACGCACAAAC
3'EndYC	6	GCATCAAACGGAAGCAAAAG
3781L	7	GCTTTCTTGCTGCCGCTGTG
3098U	8	TGACCCTGAGCGGCGAAAGC
905L	9	GCGACCGGTCAGTTCCTTCT
816U	10	CACCTACACCACGACGAACC
141R-6	11	TCACCGGCCCTCACCTTTGG
5'endYC	12	CTTAGCAAATGTGGTGAACG

(Naas et al)

Εικόνα 7:



(Naas et al)

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την MLST (multilocus sequence typing) ήταν οι εξής:

adkF: 5'-ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG-3'

adkR: 5'-CCGTCAACTTTCGCGTATTT-3'

fumCF: 5'-TCACAGGTCGCCAGCGCTTC-3'

fumCR: 5'-GTACGCAGCGAAAAAGATTC-3'

gyrBF: 5'-TCGGCGACACGGATGACGGC-3'

gyrBR: 5'-ATCAGGCCTTCACGCGCATC-3'

icdF: 5'-ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA-3'

icdR: 5'-GGACGCAGCAGGATCTGTT-3'

**Ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *Escherichia coli* στη
Θεσσαλία: μοριακή επιδημιολογία και μηχανισμοί ανθεκτικότητας**

mdhF: 5'-ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCTGCTGGCGG-3'

mdhR: 5'-TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGATATCTTTCTT-3'

purAF: 5'-CGCGCTGATGAAAGAGATGA-3'

purAR: 5'-CATACGGTAAGCCACGCAGA-3'

recAF: 5'-CGCATTCGCTTTACCCTGACC-3'

recAR: 5'-TCGTCGAAATCTACGGACCGGA-3'

Το πρόγραμμα στο οποίο εκτελέστηκαν οι PCR αντιδράσεις για τον έλεγχο του γονιδίου KPC είναι το εξής:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλος
Αποδιάταξη	95°C	5min	1
Αποδιάταξη	95°C	30sec	30
Υβριδισμός	55°C	30sec	
Πολυμερισμός	72°C	1min	
Τελικός πολυμερισμός	72°C	10min	1
Διατήρηση	4°C	-	-

Το πρόγραμμα στο οποίο εκτελέστηκαν οι PCR αντιδράσεις για τον έλεγχο του γονιδίου VIM είναι το εξής:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλος
Αποδιάταξη	95°C	5min	1
Αποδιάταξη	95°C	1min	35
Υβριδισμός	56°C	1min	
Πολυμερισμός	72°C	1min	
Τελικός πολυμερισμός	72°C	5min	1
Διατήρηση	4°C	-	-

Ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *Escherichia coli* στη Θεσσαλία: μοριακή επιδημιολογία και μηχανισμοί ανθεκτικότητας

Το πρόγραμμα στο οποίο εκτελέστηκαν οι αντιδράσεις PCR mapping είναι το εξής:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλος
Αποδιάταξη	95°C	5min	1
Αποδιάταξη	95°C	1min	35
Υβριδισμός	68°C	1min	
Πολυμερισμός	72°C	5min	
Τελικός πολυμερισμός	72°C	10min	1
Διατήρηση	4°C	-	-

Το πρόγραμμα στο οποίο εκτελέστηκαν οι PCR αντιδράσεις των γονιδίων *recA*, *mdh*, *gyrB* της MLST είναι το εξής:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλος
Αποδιάταξη	95°C	2min	1
Αποδιάταξη	95°C	1min	35
Υβριδισμός	58°C	1sec	
Πολυμερισμός	72°C	1min	
Τελικός πολυμερισμός	72°C	5min	1
Διατήρηση	4°C	-	-

Το πρόγραμμα στο οποίο εκτελέστηκαν οι PCR αντιδράσεις των γονιδίων *purA*, *icd*, *adk*, *fumC* της MLST είναι το εξής:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλος
Αποδιάταξη	95°C	2min	1
Αποδιάταξη	95°C	1min	35
Υβριδισμός	60°C	1sec	
Πολυμερισμός	72°C	1min	
Τελικός πολυμερισμός	72°C	7min	1
Διατήρηση	4°C	-	-

2.3.3 Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική, σχετικά γρήγορη και απλή. Αποτελεί μέθοδο διαχωρισμού, κατά την οποία φορτισμένα μόρια μετακινούνται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου στο εσωτερικό πηκτωμάτων ή διαλυμάτων. Η ηλεκτροφορητική ικανότητα εξαρτάται κυρίως από το καθαρό φορτίο των φορτισμένων μορίων, το μέγεθος και το σχήμα των μορίων και την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου. Ως υπόστρωμα για τη μελέτη νουκλεϊκών οξέων μπορεί να χρησιμοποιηθεί πηκτή αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδιου. Σημαντικό στάδιο αποτελεί η χρώση των διαχωρισθέντων κλασμάτων, με πιο συχνή χρησιμοποιούμενη χρώση το βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο φθορίζει όταν ακτινοβοληθεί με υπεριώδες φως.

Με τη χρήση της ηλεκτροφόρησης μπορούμε να ελέγξουμε την επιτυχία του πολλαπλασιασμού του DNA κατά την PCR.

Υλικά:

- Πιπέτες
- Tips
- Το πιατακι
- Κωνική φιάλη
- Εκμαγείο και χτενάκια για τη στερεοποίηση του πηκτώματος

Αντιδραστήρια:

- WFI (H₂O στείρο)
- TBE Buffer 10X
- SeaKem LE Agarose
- Βρωμιούχο αιθίδιο 10mg/ml
- 6X DNA Loading Dye Solution
- GeneRuler 100bp Ladder (δείκτης μοριακού βάρους)

Όργανα:

- Φούρνος μικροκυμάτων
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Τροφοδοτικό τάσης
- Λάμπα UV

Διαδικασία:

- Παρασκευάζουμε την πηκτή αγαρόζης προσθέτουμε σε κωνική φιάλη 10 ml TBE Buffer 10X και 90 ml WFI (H₂O στείρο) και στη συνέχεια 2g αγαρόζης και αναδεύουμε.

Ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *Escherichia coli* στη Θεσσαλία: μοριακή επιδημιολογία και μηχανισμοί ανθεκτικότητας

- Τοποθετούμε το μίγμα σε φούρνο μικροκυμάτων για δύο λεπτά περίπου, μέχρι να λιώσει η αгарόζη και να διαλυθεί.
- Τοποθετούμε την κωνική φιάλη κάτω από τρεχούμενο νερό για να κρυσταλλώσει ελαφρώς.
- Προσθέτουμε 6 μl βρωμιούχο αιθίδιο
- Χύνουμε προσεκτικά το διάλυμα αгарόζης στο εκμαγείο που έχουμε τοποθετήσει τα χτενάκια.
- Όταν η αгарόζη στερεοποιηθεί αφαιρούμε τα χτενάκια και παίρνουμε το πήκτωμα.
- Τοποθετούμε το πήκτωμα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Σε ένα πηγαδάκι φορτώσαμε 6 μl από τον Ladder και στα υπόλοιπα πηγαδάκια 10 μl των προϊόντων της PCR αναμειγμένα με 2 μl χρωστικής, ομοίως και για τους μάρτυρες.
- Τρέχουμε τα δείγματα σε 100 volts για μια ώρα περίπου και τοποθετούμε την πηκτή στην πηγή υπεριώδους φωτός για την παρατήρηση των αποτελεσμάτων.
- Συγκρίνουμε τα δείγματα με τον θετικό μάρτυρα, που φυσιολογικά εμφανίζει μπάντα, καθώς και με τον αρνητικό μάρτυρα, ο οποίος φυσιολογικά δεν εμφανίζει μπάντα. Τα δείγματα θεωρούνται θετικά όταν έχουν μπάντα όμοια με αυτή του θετικού μάρτυρα. Σε περίπτωση που ο αρνητικός μάρτυρας εμφανίσει μπάντα, υπάρχει πιθανότητα επιμόλυνσης των δειγμάτων.

2.3.4 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR

Για τον καθαρισμό των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήθηκε το PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen). Είναι διαδικασία απαραίτητη προκειμένου να μπορέσουν τα προϊόντα να αλληλουχηθούν με επιτυχία. Το DNA καθαρίζεται από τους εκκινητές, τα dNTPs, τα ένζυμα και τα άλατα, χάρη στην επιλεκτική σύνδεσή του σε μεμβράνη πυριτίου υπό την επίδραση χαοτροπικών αλάτων.

Υλικά:

- Πιπέτες
- Tips
- Στήλες
- Σωληνάρια συλλογής
- Σωληνάρια Eppendorf

Αντιδραστήρια:

Ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *Escherichia coli* στη Θεσσαλία:μοριακή επιδημιολογία και μηχανισμοί ανθεκτικότητας

- Ισοπροπανόλη
- Αιθανόλη
- Binding Buffer
- Wash Buffer
- Elution Buffer

Όργανα:

- Φυγόκεντρος

Διαδικασία:

- Προσθέτουμε στο Binding Buffer 48 ml ισοπροπανόλη και στο Wash Buffer 160 ml αιθανόλης πριν τη χρήση τους.
- Προσθέτουμε σε έναν όγκο προϊόντος PCR (40 μl) τετραπλάσιο όγκο Binding Buffer (160μl) και αναδεύουμε με τη βοήθεια της πιπέτας και τοποθετούμε το μίγμα στη στήλη που έχουμε πρώτα τοποθετήσει σε ένα σωληνάριο συλλογής.
- Φυγοκεντρούμε για δύο λεπτά σε 11000 rpm
- Πετάμε το διήθημα και τοποθετούμε εκ νέου τη στήλη στο σωληνάριο.
- Προσθέτουμε στη στήλη 650μl Wash Buffer και φυγοκεντρούμε σε 11000rpm για δύο λεπτά.
- Πετάμε το διήθημα και φυγοκεντρούμε σε 13400 για 4 λεπτά.
- Μεταφέρουμε τη στήλη στο Eppendorf στο οποίο θα αποθηκεύσουμε το DNA
- Προσθέτουμε στη στήλη 30-50μl Elution Buffer, επωάζουμε για 13 λεπτά και τέλος φυγοκεντρούμε για 4 λεπτα σε 13400 rpm.
- Ελέγχουμε την ύπαρξη καθαρού προϊόντος (χωρίς παραπροϊόντα) με την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων μετά το πέρας της διαδικασίας.

2.3.5 Αλληλούχιση

Με τη διαδικασία της αλληλούχισης μπορούμε να αποκρυπτογραφήσουμε την αλληλουχία ενός τμήματος DNA. Όλες οι σύγχρονες τεχνικές είναι βασισμένες στη μέθοδο Sanger. Η μέθοδος Sanger βασίζεται στη χρήση διδεόξυ-τριφωσφορικών-νουκλεοτιδίων (ddNTPs) κατά την αντίδραση επέκτασης εκκινήτη, τα οποία μόλις εισαχθούν σταματούν την επέκταση, κάθε φορά σε διαφορετικό σημείο, καθώς δεν περιέχουν την υδροξυλομάδα που είναι απαραίτητη για την προσθήκη του επόμενου dNTP. Η μέθοδος του Sanger αναφέρεται και ως μέθοδος τερματισμού της αλυσίδας. Η αλληλούχιση του DNA με τη μέθοδο τερματισμού της αλυσίδας βασίζεται στο ότι τα μονόκλιωνα DNA που διαφέρουν μόνο κατά ένα νουκλεοτίδιο

Ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *Escherichia coli* στη Θεσσαλία:μοριακή επιδημιολογία και μηχανισμοί ανθεκτικότητας

μπορούν να διαχωριστούν το ένα από το άλλο μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

Με τη μέθοδο Sanger κατά την ηλεκτροφόρηση το πήκτωμα δεν έχει την ικανότητα ανάλυσης τμημάτων με μήκος μεγαλύτερο των 800 βάσεων. Για να αυξηθεί ο αριθμός των ζευγών βάσεων που διαβάζονται σε μια αντίδραση πρέπει οι συγκεντρώσεις των πρόωρα τερματισμένων τμημάτων του DNA που αλληλουχείται να εμφανίζουν μικρή διακύμανση. Η ομοιομορφία αυτή είναι δύσκολη διότι για αλυσίδες διαφορετικού μεγέθους απαιτούνται διαφορετικές συγκεντρώσεις των 2-3 ddNTPs (νουκλεοτίδια που επιφέρουν τον τερματισμό σύνθεσης της αλυσίδας). Κάθε ddNTP περιλαμβάνει ένα μόριο ριβόζης που φέρει μια φωσφορική ομάδα στην 5' θέση και μια βάση στην 1' θέση. Όμως στην 3' θέση δεν υπάρχει OH, προκαλείται έτσι τερματισμός σύνθεσης της αλυσίδας.

Η ενζυμική μέθοδος Sanger απαιτεί μονόκλωνο DNA.

- i. Η μονόκλωνη αλυσίδα χρησιμοποιείται ως μήτρα για τη σύνθεση μιας ραδιοσημασμένης αλυσίδας *in vitro*.
- ii. Για τη σύνθεση του κλώνου παρασκευάζονται 2-3 ddNTPs για κάθε μια από τις τέσσερις βάσεις. Τα ddNTPs μπορούν να ενσωματωθούν από την DNA πολυμεράση σε ένα μόριο DNA αλλά δεν μπορούν να σχηματίσουν φωσφοδιεστερικούς δεσμούς.
- iii. Η αντίδραση πραγματοποιείται με την DNA πολυμεράση, με την παρουσία τεσσάρων dNTPs εκ των οποίων το καθένα είναι σημασμένο με διαφορετική χρωστική.
- iv. Επίσης χρησιμοποιείται και ένα συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο που είναι συμπληρωματικό στη μήτρα DNA και χρησιμεύει ως εκκινητής.
- v. Πραγματοποιούνται έτσι οι τέσσερις αντιδράσεις σύνθεσης μέσω προσθήκης των 2-3 dNTPs.
- vi. Η προσθήκη ενός ddNTP στο 3' άκρο μιας αντιγραφόμενης αλυσίδας σταματά την περαιτέρω σύνθεση.
- vii. Ο λόγος ddNTP/dNTP είναι ρυθμιζόμενος ώστε να μην γίνεται ολοκλήρωση της αντίδρασης όπου συναντάται η βάση N. Η ποσότητα των dNTPs είναι μεγαλύτερη από εκείνη των ddNTPs ώστε να μην τερματίζεται γρήγορα η σύνθεση του κλώνου.
- viii. Συνεπώς σε κάθε αντίδραση περιέχεται μείγμα αλυσίδων που έχουν όλες διαφορετική βάση τερματισμού.
- ix. Για να προσδιοριστεί η αλληλουχία προσδιορίζεται το ddNTP που υπάρχει στο τέλος του κάθε κλώνου. Στον προσδιορισμό βοηθά το πήκτωμα της πολυακρυλαμίδης.
- x. Τα μόρια διαχωρίζονται με βάση το μήκος τους στο πήκτωμα και στη συνέχεια ανιχνεύονται τα ddNTPs από ανιχνευτή φθορισμού.

(Ανασυνδυασμένο DNA, James Watson, Amy Caudy, Richard Myers, Jan Witkowski)

Ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *Escherichia coli* στη Θεσσαλία: μοριακή επιδημιολογία και μηχανισμοί ανθεκτικότητας

Διαδικασία:

Η διαδικασία της αλληλούχισης διενεργήθηκε από την εταιρία Cemía, επί της οδού Μακρυγιάννη 31, στη Λάρισα. Αποστέλλουμε δείγμα από το καθαρισμένο προϊόν της PCR, καθώς και τους εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε, αραιωμένους σε αναλογία 1:20.

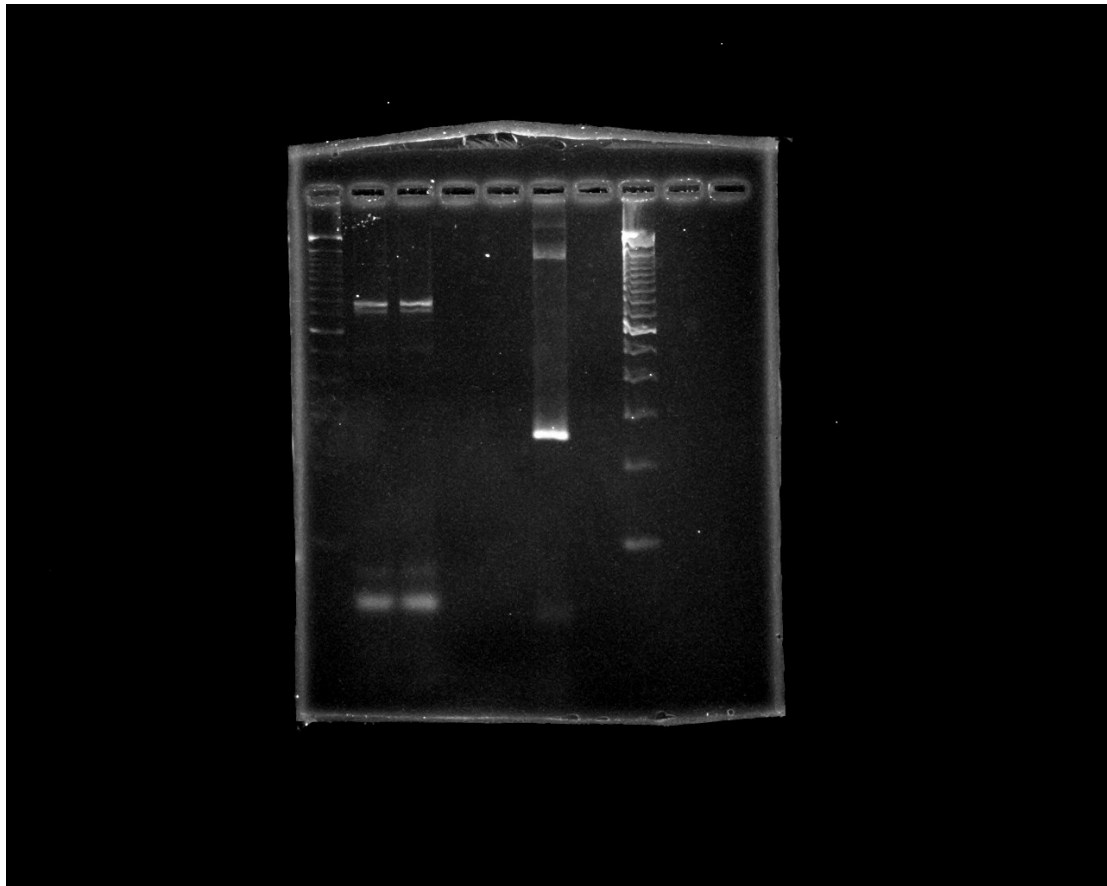
3. Αποτελέσματα

Στην παρούσα εργασία το υλικό που εξετάσαμε ήταν τρία στελέχη *E. coli* που απομονώθηκαν τον Απρίλιο του 2013 από δείγματα αίματος πύου και κατάκλισης από τρεις ασθενείς σε τρεις κλινικές του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Μετά την απομόνωσή τους ακολούθησε έλεγχος της αντοχής τους στα αντιβιοτικά και τα στελέχη αυτά βρέθηκαν να είναι ανθεκτικά στις καρβαπενέμες. Στη συνέχεια έγινε έλεγχος για την ύπαρξη των γονιδίων KPC και VIM που εκφράζουν καρβαπενεμάσες καθώς επίσης και μελέτη του γενετικού περιβάλλοντος των καρβαπενεμασών και μοριακή τυποποίηση των στελεχών με τη μέθοδο MLST.

Από το αντιβιογράμμα φαίνεται ότι και τα τρία στελέχη ήταν ευαίσθητα στην αμικασίνη και στην κεφεπίμη, ενώ εμφάνιζαν αντοχή σε όλες τις άλλες τάξεις των αντιμικροβιακών φαρμάκων.

Η διαδικασία της PCR και ηλεκτροφόρησης ακολουθήθηκε για την ανίχνευση και ενίσχυση των γονιδίων KPC και VIM. Και τα τρία στελέχη βρέθηκαν θετικά για το KPC και αρνητικά για το VIM, όπως φαίνεται στην εικόνα 9.

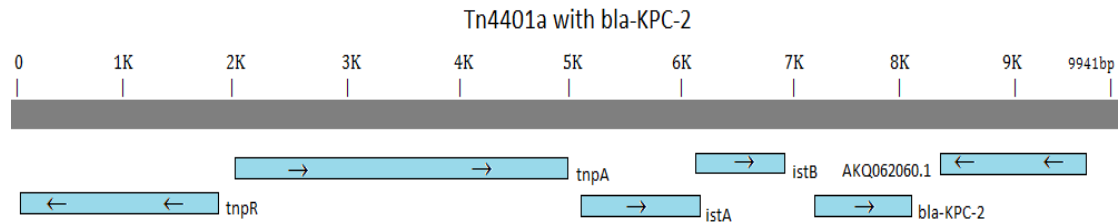
Εικόνα 8:



Ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *Escherichia coli* στη Θεσσαλία: μοριακή επιδημιολογία και μηχανισμοί ανθεκτικότητας

Και στα τρία στελέχη ανιχνεύθηκε η παρουσία του τρανσποζονίου Tn4401 με PCR mapping. Αυτό σημαίνει ότι ο φορέας του KPC γονιδίου είναι το εν λόγω τρανσποζόνιο.

Εικόνα 9:



Στην εικόνα 9 φαίνεται το τρανσποζόνιο, όπως αυτό προέκυψε από την αλληλούχιση, μαζί με τα γονίδια που φέρει. Από αριστερά προς τα δεξιά: tnpR (178-1893 bp, εκφράζει την ρεσολβάση με δράση ρεκομπινάσης και έχει ρόλο στη μεταφορά του στοιχείου μέσω ανασυνδυασμού), tnpA (2003-5032 bp, εκφράζει την τρανσποζάση, που καταλύει τη μετακίνηση του στοιχείου), τα istA και istB (5139-6164 και 6161-6940 bp αντίστοιχα, προϊόντα των οποίων είναι οι υποθετικές τρανσποζάσες ISKpn7 και ISKpn6), το γονίδιο bla-KPC-2 (7228-8109 bp, που εκφράζει την καρβαπενεμάση) και ένα ακόμη γονίδιο τρανσποζάσης (8359-9678 bp). Τα βελάκια δείχνουν τη φορά προς την οποία γίνεται η μεταγραφή.

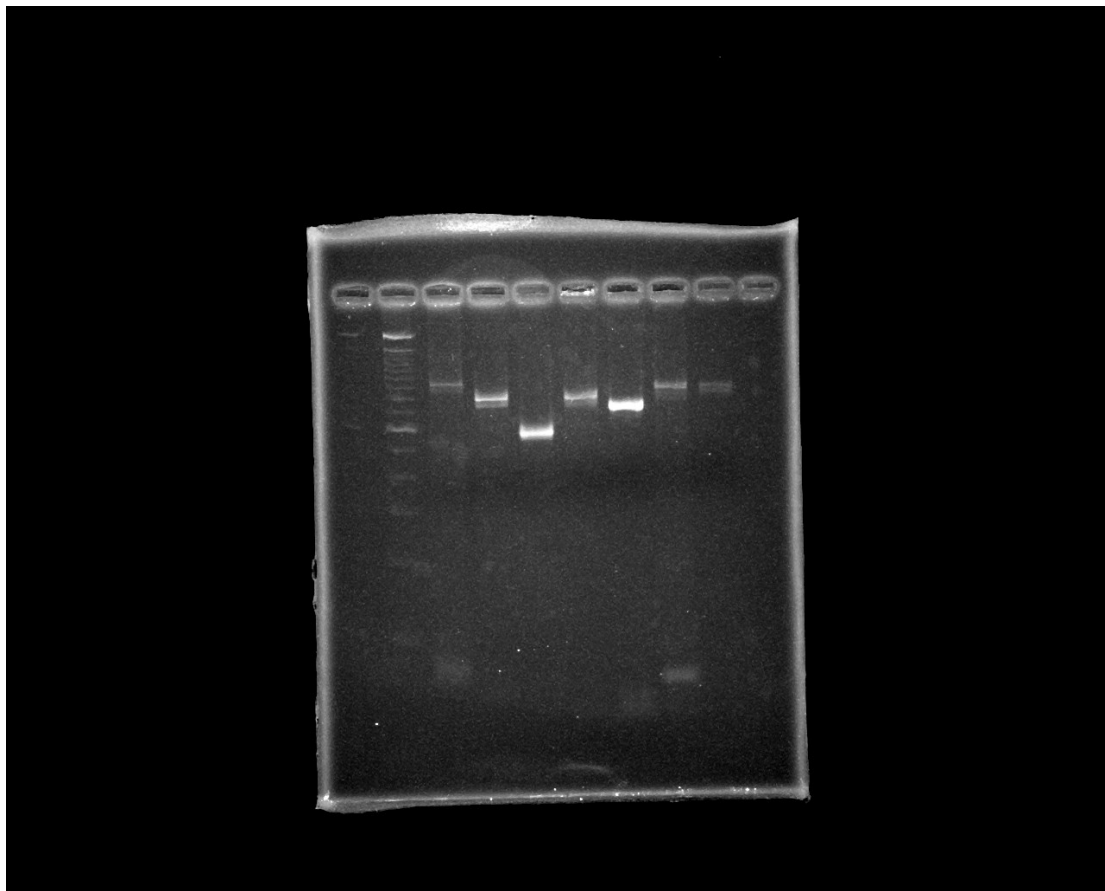
Για να προσδιορίσουμε την πλήρη αλληλουχία του τρανσποζονίου, αλληλουχήθηκαν τα 4 τμήματα που προέκυψαν από την αντίδραση PCR με τους δοθέντες εκκινητές σύμφωνα με τη μέθοδο walking (ζεύγη εκκινητών 10/2, 4/8, 1/6 και 9/12, όπως φαίνονται στον πίνακα παραπάνω) και στη συνέχεια τα συναρμολογήσαμε με βάση την αλληλεπικάλυψή τους, με τη βοήθεια στιγμοπινάκων (dot plots) του προγράμματος Omega, κι έτσι προκύπτει η πλήρης αλληλουχία του τρανσποζονίου. Όπως φαίνεται και στην εικόνα, το Tn4401 απαντάται σε δύο ισομορφές, την Tn4401a, οποία περιέχει μια απαλοιφή 100 ζευγών βάσεων περίπου σε σχέση με την άλλη ισομορφή, Tn4401b. Με βάση την αλληλουχία των συναρμολογημάτων μας διαπιστώνουμε ότι και τα τρία στελέχη περιέχουν το γονίδιο KPC-2, το οποίο έχει ως φορέα το τρανσποζόνιο Tn4401a.

Σύμφωνα με τη μοριακή τυποποίηση βάσει της MLST, τα δύο από τα τρία στελέχη *E. coli* ανήκαν στον ST131 και το ένα από τα τρία στον ST410. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 5:

Πίνακας 5:

	recA	gyrB	Mdh	purA	Icd	Adk	fumC	ST
A	29	47	36	28	13	53	40	131
B	7	12	20	18	1	6	4	410
Γ	29	47	36	28	13	53	40	131

Εικόνα 10:



4. Συζήτηση

Τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες εντεροβακτηριοειδή (carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, CRE) αποτελούν μια οικογένεια μικροβίων που είναι δύσκολο να καταπολεμηθούν εξ αιτίας της αντοχής τους σε διάφορες τάξεις αντιμικροβιακών φαρμάκων. Τα είδη της *Klebsiella* και *E. coli* αποτελούν παραδείγματα Εντεροβακτηριοειδών που εμφάνισαν επίκτητη αντοχή στις καρβαπενέμες. Τύποι CRE συχνά περιέχουν τα γονίδια KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), ή NDM (New Delhi Metallo-beta-lactamase), ή VIM (Verona Integron-Mediated Metallo-beta-lactamase), τα οποία παράγουν ένζυμα τα οποία καταστρέφουν τις καρβαπενέμες και τις αδρανοποιούν.

Οι άνθρωποι που ζουν σε εξωνοσοκομειακό περιβάλλον έχουν μικρότερες πιθανότητες να μολυνθούν από κάποιο CRE, πράγμα που συμβαίνει συχνότερα σε ασθενείς σε νοσοκομεία. Ασθενείς των οποίων η νοσηλεία απαιτεί συσκευές όπως αναπνευστήρες, ουροκαθετήρες ή φλεβοκαθετήρες, καθώς και ασθενείς που λαμβάνουν μακρόχρονες θεραπείες με αντιβιοτικά κινδυνεύουν περισσότερο από μολύνσεις από CRE. Κάποια από αυτά τα βακτήρια έχουν αποκτήσει ανθεκτικότητα στα περισσότερα διαθέσιμα αντιβιοτικά. Λοίμωξη από αυτά τα βακτήρια είναι πολύ δύσκολο να ιαθεί και μπορεί να προκαλέσουν και θάνατο. Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι μπορούν να οδηγήσουν στο θάνατο το 50% των ασθενών.

Σε κλινικά στελέχη της οικογένειας των Εντεροβακτηριοειδών, μεταξύ αυτών και της *E. coli*, η παρουσία της KPC δεν οδηγεί πάντα σε ανθεκτικότητα στις καρβαπενέμες *in vitro*. Αντιθέτως, οι MICs, παρόλο που είναι υψηλές, μπορεί ακόμα να βρίσκονται στη ζώνη ευαισθησίας (Naas et al). Μια μελέτη έχει δείξει ότι ανάμεσα σε στελέχη με παραπλήσιες MICs για τη ντοριπενέμη, η δραστηριότητα της ντοριπενέμης ήταν μεγαλύτερη σε στελέχη bla-KPC-2-αρνητικά σε σχέση με τα KPC-2-θετικά (Hagihara M et al).

Τα παθογόνα μικρόβια που παράγουν KPC αποτελούν μεγάλο κίνδυνο για τη δημόσια υγεία. Ασθενείς που έχουν μολυνθεί από αυτά έχουν μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης νοσηρότητας και θνησιμότητας. Επιπλέον, αυτά τα παθογόνα αποτελούν πρόκληση για τα κέντρα υγείας λόγω της δυσκολίας που ενέχεται στην ανίχνευση όλων των στελεχών που παράγουν KPC μέσω των δοκιμασιών ρουτίνας για την παρουσία καρβαπενεμασών. Τα ένζυμα KPC παρόλο που συχνότερα εμφανίζονται στην *Klebsiella pneumoniae*, έχουν ανιχνευθεί και σε πολλούς άλλους Gram-αρνητικούς μικροοργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των *E. coli*, *Enterobacter species*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Acinetobacter baumannii*. Οι μικροοργανισμοί αυτοί έχουν συσχετισθεί με ανθεκτικότητα έναντι πολλών β-λακταμικών, μεταξύ αυτών και των καρβαπενεμών. Αυτό, σε συνδυασμό με την έλλειψη νέων αντιμικροβιακών με δράση ενάντια σε Gram-αρνητικούς μικροοργανισμούς, οδηγεί

Ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *Escherichia coli* στη Θεσσαλία:μοριακή επιδημιολογία και μηχανισμοί ανθεκτικότητας

τους θεράποντες να χρησιμοποιήσουν για τη θεραπεία αντιβιοτικά που είναι πιθανώς τοξικά, όπως πολυμυξίνες. Η ραγδαία εξάπλωση της KPC β-λακταμάσης σε πολλά διαφορετικά είδη Gram-αρνητικών παθογόνων, η έλλειψη κατάλληλων θεραπευτικών αγωγών και η δυσκολία των εργαστηρίων να εντοπίζουν τα στελέχη αυτά, καθιστούν την εξάπλωση αυτών των παθογόνων ιδιαίτερο κίνδυνο (Nancy D. Hanson et al).

Το Tn4401, το οποίο αποτελεί τον φορέα της KPC β-λακταμάσης, θα μπορούσε να είναι η αιτία της παγκόσμιας εξάπλωσης αυτού του αναδυόμενου γονιδίου ανθεκτικότητας. Η πρώτη εμφάνιση του bla-KPC-2 στην *E. coli* μοριακού τυπου ST131 στη Γαλλία τον Μάιο του 2009 το bla-KPC-2 βρέθηκε να σχετίζεται με την Tn4401a ισομορφή (Naas et al). KPC-θετικά *E. coli* στελέχη έχουν αναφερθεί στις Ηνωμένες Πολιτείες(Landman D., et al), στο Ισραήλ (Navon-Venezia S., et al), και στη Βραζιλία (D'Alincourt Carvalho-Assef A. P., et al.)

Η ανθεκτικότητα της *E. coli* στις καρβαπενέμες δεν είναι συχνή. Έχουν καταγραφεί περιπτώσεις μέταλλο-β-λακταμασών πλασμιδίων που υδρολύουν τις καρβαπενέμες στην *E. coli*, αλλά η πρώτη περίπτωση στην οποία εμπλέκεται καρβαπενεμάση κλάσης A και συγκεκριμένα την KPC-3, αφορούσε ασθενή στις ΗΠΑ στον οποίο χορηγήθηκε θεραπεία με ιμιπενέμη (Shiri Navon-Venezia). Από δείγμα αίματος απομονώθηκαν στελέχη *E. coli* και *Klebsiella pneumoniae* που ήταν θετικά για το γονίδιο bla-KPC-2 . Η πρώτη περίπτωση αφορά ασθενή στη Γαλλία, που είχε νοσηλευτεί προηγουμένως σε νοσοκομείο του Ισραήλ (Stephanie Petrella et al). Επιπλέον, περιγράφηκε μεταφορά της KPC-2 από την *K. pneumoniae* στην *E. coli* για μια ασθενή στην Ιταλία. (Sara N. Richter et al).

Ο χάρτης της εικόνας 11 δείχνει χώρες στις οποίες έχει περιγραφεί η παρουσία εντεροβακτηριακών που παράγουν bla-KPC σύμφωνα με δημοσιευμένες εκθέσεις που διατίθενται από τις 11 Φεβρουαρίου 2011. Λόγω της έλλειψης συστηματικής παρακολούθησης για αυτούς τους οργανισμούς, στις χώρες που δε σημαίνονται στο σχήμα αυτό θα μπορούσαν επίσης να έχουν εντοπιστεί Εντεροβακτηριοειδή που παράγουν blaKPC. (Robert et al)

Εικόνα 11:



Τον Μάρτιο του 2012 στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο της Λαρίσας εντοπίστηκαν 15 στελέχη *E. coli* ανθεκτικά στις καρβαπενέμες. 14 από αυτά ανήκουν στον μοριακό τύπο ST410, σύμφωνα με την MLST. Τα στελέχη απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα 7 ασθενών νοσηλευόμενων στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, 10 σε κέντρο αποκατάστασης της περιοχής και ένα σε νοσοκομείο της Αθήνας. Το γονίδιο βρέθηκε στην Tn4401a ισομορφή του τρανσποζονίου με την απαλοιφή 100 ζεύγη βάσεων ανοδικά του blaKPC-2, μαζί με τη χαρακτηριστική ρεσολβίαση, τρανσποζίαση και τις δομές ISKpn7 and ISKpn6. Πρόκειται για την πρώτη περιγραφή KPC-2-θετικών *E. coli* στην Ελλάδα (Petinaki et al)

Η μικροβιακή αντοχή αποτελεί μείζον πρόβλημα στη χώρα μας και επιβάλλει δέσμη μέτρων που να περιλαμβάνουν τόσο τη γρήγορη ανίχνευση πολυανθεκτικών στελεχών όσο και τον τρόπο ελέγχου της διασποράς τους.

5. Βιβλιογραφία

Franklin T.J. and Snow G.A. Biochemistry and Molecular Biology of Antimicrobial Drug Action Kluwer Academic Publishers

Madigan Michael T. , Martinko John M. , Parker Jack , Brock Biology of Microorganisms

Page, Curtis, Sutter, Walker, Hoffman Φαρμακολογία. Ιατρικές εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης

Patrinou George, Ansorge Wilhelm: Μοριακή Διαγνωστική, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου

Persing David H., Tenover Fred C., Versalovic James, Tang Yi-Wei, Unger Elizabeth R., Relman David A., White Thomas J.: Molecular Microbiology, Diagnostic Principles and Practice

Tortora Gerard J. , Berdell R. Funke, Christine L. Case Εισαγωγή στη Μικροβιολογία. Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης

Watson James, Caudy Amy, Myers Richard, Witkowski Jan: Ανασυνδυασμένο DNA Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Μπάσδρα

Αντιγόνη Αρσένη Κλινική μικροβιολογία και εργαστηριακή διάγνωση λοιμώξεων Ζήτα Ιατρικές Εκδόσεις

D'Alincourt Carvalho-Assef A. P., et al (2010) *Escherichia coli* producing KPC-2 carbapenemase: first report in Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 68:337–338.

Hagihara M, Crandon JL, Urban C, Nicolau DP (2013) Efficacy of doripenem and ertapenem against KPC-2-producing and non-KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* with similar MICs

Hanson ND, Roth AL1, Lister PD (2013) Effect of drug treatment options on the mobility and expression of *bla*KPC

Landman D., et al. (2010). Susceptibility profiles, molecular epidemiology, and detection of KPC-producing *Escherichia coli* isolates from the New York City vicinity.

Meier-Kolthoff JP, Hahnke RL, Petersen J, Scheuner C, Michael V, Fiebig A, Rohde C, Rohde M, Fartmann B, Goodwin LA, Chertkov O, Reddy T, Pati A, Ivanova NN, Markowitz V, Kyrpides NC, Woyke T, Göker M, Klenk HP (2014) Complete genome sequence of DSM 30083T, the type strain (U5/41T) of *Escherichia coli*, and a proposal for delineating subspecies in microbial taxonomy

Naas T., Cuzon G., Villegas M.V., Lartigue M.F., Quinn J., Nordmann P. (2008) Genetic Structures at the Origin of Acquisition of the β -Lactamase blaKPC Gene

Naas T, Cuzon G, Nordmann P. (2011) Functional Characterization of Tn4401, a Tn3-Based Transposon Involved in blaKPC Gene Mobilization

Naas T, Cuzon G, Gaillot O, Courcol R, and Nordmann P (2011) When Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase KPC Meets *Escherichia coli* ST131 in France

Navon-Venezia S., et al. (2006) Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem-resistant *Escherichia coli* clones in Israel. Antimicrob. Agents Chemother.

Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA (2011) Carbapenems: Past, Present, and Future

Petinaki E., Mavroidi A, Miriagou V, Malli E, Stefos A, Dalekos GN, Tzouvelekis LS (2012) Emergence of *Escherichia coli* sequence type 410 (ST410) with KPC-2 β -lactamase.

Petrella S, Ziental-Gelus N, Mayer C, Renard M, Jarlier V, Sougakoff W. (2008) Genetic and Structural Insights into the Dissemination Potential of the Extremely Broad-Spectrum Class A β -Lactamase KPC-2 Identified in an *Escherichia coli* Strain and an *Enterobacter cloacae* Strain Isolated from the Same Patient in France

Richter Sn, Frasson I, Bergo C, Parisi S, Cavallaro A, Palu G (2011) Transfer of KPC-2 Carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* in a Patient: First Case in Europe

Robert A. Weinstein, Neil Gupta, Brandi M. Limbago, Jean B. Patel, Alexander J. Kallen Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: Epidemiology

Ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *Escherichia coli* στη
Θεσσαλία: μοριακή επιδημιολογία και μηχανισμοί ανθεκτικότητας

Shiri Navon-Venezia,* Inna Chmelnitsky, Azita Leavitt, Mitchell J. Schwaber, David Schwartz, and Yehuda Carmeli (2006) Plasmid-Mediated Imipenem-Hydrolyzing Enzyme KPC-2 among Multiple Carbapenem-Resistant *Escherichia coli* Clones in Israel

Queenan A.M., Bush K. (2007), Carbapenemases: the Versatile beta-Lactamases

Διαδουκτιακές πηγές:

[HTTP://WWW.VETBACT.ORG/VETBACT/?ARTID=68](http://www.vetbact.org/vetbact/?artid=68)

[HTTP://WWW.STANDARDSINGENOMICS.COM/CONTENT/9/1/2](http://www.standardsingenomics.com/content/9/1/2)

[HTTP://ACADEMIC.PGCC.EDU/~KROBERTS/WEB/COLONY/COLONY.HTM](http://academic.pgcc.edu/~kroberts/web/colony/colony.htm)

[HTTP://AMRLS.CVM.MSU.EDU/PHARMACOLOGY/ANTIMICROBIALS/ANTIBIOTICS-OF-VETERINARY-IMPORTANCE/BETA-LACTAM-ANTIBIOTICS](http://amrls.cvm.msu.edu/pharmacology/antimicrobials/antibiotics-of-veterinary-importance/beta-lactam-antibiotics)

[HTTP://WWW.CDC.GOV/ECOLI/](http://www.cdc.gov/ecoli/)