



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗΝ ΚΟΛΙΣΤΙΝΗ ΣΕ ΣΤΕΛΕΧΗ
ESCHERICHIA COLI ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΑΠΟ ΠΕΡΙΤΤΩΜΑΤΑ ΥΓΙΩΝ
ΚΡΕΟΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΟΡΝΙΘΙΩΝ ΚΑΙ ΑΥΓΟΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΟΡΝΙΘΩΝ**

*DETECTION OF COLISTIN RESISTANCE GENES IN
ESCHERICHIA COLI STRAINS ISOLATED FROM FECES OF
HEALTHY BROILERS AND LAYING HENS*

ΤΣΙΑΜΗ ΕΛΕΝΗ

ΛΑΡΙΣΑ, 2022

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Πετρίδου Ευανθία (Επιβλέπουσα) : Καθηγήτρια Μικροβιολογίας & Λοιμωδών Νοσημάτων των ζώων, στο Τμήμα Κτηνιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης

Μόσιαλος Δημήτριος (Συνεπιβλέπων) : Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Καρπούζας Δημήτριος (Μέλος) : Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας και Πρόεδρος του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων του Τμήματος Κτηνιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και σηματοδοτεί την ολοκλήρωση των προπτυχιακών μου σπουδών στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Ευανθία Πετρίδου, Καθηγήτρια Μικροβιολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων στο Τμήμα Κτηνιατρικής ΑΠΘ που μου έδωσε την ευκαιρία να συνεργαστώ με την ίδια και το υπόλοιπο προσωπικό του εργαστηρίου καθώς και για την άριστη συνεργασία που είχαμε. Θα ήθελα να ευχαριστήσω την διδάκτορα του Τμήματος Κτηνιατρικής του ΑΠΘ, κ. Άννα Ξεξάκη, την οποία θεωρώ μια εξαιρετική επιστήμονα και άνθρωπο, για την άριστη συνεργασία που είχαμε, την συμβολή της στην πτυχιακή μου εργασία καθώς και για την εξάισια διδακτορική έρευνα που έχει κάνει, χωρίς την οποία δεν θα υπήρχε η σημερινή εργασία. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων του τμήματος Κτηνιατρικής, κ. Σπυρίδων Κρήτα για την ευκαιρία που μου δόθηκε να συνεργαστώ μαζί του καθώς και με το υπόλοιπο προσωπικό του εργαστηρίου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα του Τμήματος Βιολογίας του ΑΠΘ, κ. Δημήτρη Παπαδόπουλο για την άριστη συνεργασία που είχαμε, για τη υπομονή του αλλά και για τις γνώσεις που πρόσφερε. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μόσιαλο Δημήτριο, Καθηγητή του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και τον κ. Καρπούζα Δημήτριο, Καθηγητή και Πρόεδρος του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, που αποτέλεσαν μέλη της τριμελούς επιτροπής μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την στήριξη, την υπομονή και την αγάπη που μου έδωσαν σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου και εξακολουθούν να μου δίνουν. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου για την κατανόηση, τη στήριξη, την αγάπη, τις εμπειρίες, τις στιγμές χαράς και χαλάρωσης που μου πρόσφεραν όλα τα χρόνια των σπουδών μου, ειδικότερα την περίοδο της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας, και που συνεχίζουν να μου προσφέρουν. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την αδερφή μου

Κέλλυ, η οποία αποτελούσε και εξακολουθεί να αποτελεί το πρότυπο μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	8
---------------	---

ABSTRACT.....	9
---------------	---

ΜΕΡΟΣ Ι

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 ΓΕΝΙΚΑ	11
------------------	----

1.1.1 Χαρακτηριστικά	11
----------------------------	----

1.1.2 Κυτταρικό Τοίχωμα.....	13
------------------------------	----

1.1.3 Παθογόνος Δράση	15
-----------------------------	----

1.1.4 Αντιγόνα.....	16
---------------------	----

1.2 ΠΑΘΟΥΤΥΠΙΕΣ ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΕΣ	17
---------------------------------------	----

1.2.1 Στελέχη που προκαλούν γαστρεντερικές λοιμώξεις	17
--	----

i) Εντεροπαθογόνα <i>E.coli</i> (EPEC).	17
---	----

ii) Εντεροαιμορραγικά <i>E.coli</i> (EHEC).	17
---	----

iii) Εντεροτοξινογόνα <i>E.coli</i> (ETEC).	18
---	----

iv) Εντεροπροσκολλητικά <i>E.coli</i> (EAAEC).	19
--	----

v) Διάχυτης προσκόλλησης <i>E.coli</i> (Diffusely Adherent <i>E.coli</i> , DAEC).	19
---	----

vi) Εντεροδιδεισδυτικά (Enteroinvasive <i>E.coli</i> , EIEC).	20
---	----

vii) Διδεισδυτικής προσκόλλησης (Adherent Invasive <i>E.coli</i> , AIEC).....	20
--	----

1.2.2 Στελέχη που προκαλούν εξωγαστρεντερικές λοιμώξεις (Extraintestinal Pathogenic <i>E.coli</i> , ExPEC)	21
---	----

i) Ουροπαθογόνα <i>E.coli</i> (UroPathogenic <i>E.coli</i> , UPEC).	21
---	----

ii) Σχετιζόμενα με σηψαιμία και μηνιγγίτιδα <i>E.coli</i> (MNEC).	21
--	----

iii) Πτηνοπαθογόνα (Avian Pathogenic <i>E.coli</i> , APEC).	22
---	----

1.3 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΤΟΧΗ	23
1.3.1 Είδη Μικροβιακής Αντοχής	24
1.4 ΜΕΤΑΘΕΤΑ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	26
1.4.1 Πλασμίδια	27
1.4.2 Τρανσποζόνια (Transposons, Tn)	28
1.4.3 Ιντεγκρόνια (Integrans, Int)	29
1.5 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ	30
1.5.1 Μηχανισμοί Δράσης των αντιμικροβιακών ουσιών	30
1.5.2 Μηχανισμοί αντοχής των βακτηρίων στις αντιμικροβιακές ουσίες	30
i) Μεταβολή στους στόχους δράσης των αντιμικροβιακών ουσιών.....	31
ii) Αλλαγή της διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών στις αντιμικροβιακές ουσίες.....	32
iii) Ενεργή εκροή αντιμικροβιακών ουσιών από το κυτταρόπλασμα.....	32
iv) Αδρανοποίηση – Τροποποίηση της αντιμικροβιακής ουσίας	33
v) Αλλαγές της μεταβολικής οδού των βακτηρίων λόγω δράσης των αντιμικροβιακών ουσιών.....	33
1.6 ΠΟΛΥΜΥΞΙΝΕΣ	34
1.6.1 Μηχανισμός δράσης	35
1.6.2 Αντιβακτηριακή δράση πολυμυξίνης	36
1.6.3 Αντοχή στην πολυμυξίνη στη τάξη Enterobacterales	37

1.7 ΚΟΛΙΣΤΙΝΗ	39
1.7.1 Γενικά Χαρακτηριστικά της κολιστίνης	40
1.7.2 Χρήση στην ιατρική.....	41
1.7.3 Χρήση στην Κτηνιατρική.....	41
1.7.4 Μηχανισμοί αντοχής στη κολιστίνη	42
1.7.5 Αντοχή στη κολιστίνη – γονίδια MCR	46
i) Μεταβολισμός και <i>mcr-1</i>	47
ii) <i>mcr-2</i>	47

ΜΕΡΟ ΙΙ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ- ΤΕΧΝΙΚΕΣ

2.1 ΣΚΟΠΟΣ	51
2.2 ΥΛΙΚΑ	52
2.2.1 Υλικά για την ανακαλλιέργεια των δειγμάτων.....	52
2.2.2 Υλικά για την απομόνωση του γενετικού υλικού των δειγμάτων.....	53
2.2.3 Υλικά για τη διενέργεια της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης- PCR	54
2.2.4 Υλικά για την διενέργεια ηλεκτροφόρησης	54
2.3 ΜΕΘΟΔΟΙ	54
2.3.1 Ανακαλλιέργεια των δειγμάτων και λήψη νέων μεμονωμένων αποικιών.....	54
2.3.2 Απομόνωση γενετικού υλικού-DNA των δειγμάτων	55

2.3.3 Δοκιμασία αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης – PCR56

2.3.4 Ηλεκτροφόρηση DNA58

ΜΕΡΟΣ III

3.1 Αποτελέσματα.....60

3.2 Συμπεράσματα61

3.3 Δημοσιεύσεις- Ανακοινώσεις63

3.4 Βιβλιογραφία64

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ακόλουθη εργασία έχει ως κύριο θέμα τα αρνητικά κατά Gram (-) βακτήρια ,συγκεκριμένα τα εντεροβακτηριοειδή και την ανθεκτικότητα που παρουσιάζουν στις αντιμικροβιακές ουσίες. Επικεντρώνεται στην αντοχή που φαίνεται να έχει το εντεροβακτήριο *Escherichia coli* (*E.coli*) όταν φέρει πλασμίδιο το οποίο περιέχει το γονίδιο ανθεκτικότητας στην κολιστίνη. Η έρευνα έχει στηριχτεί σε προηγούμενη εργαστηριακή έρευνα.[49].Η κολιστίνη αποτελεί ισχυρή αντιμικροβιακή ουσία , η χρήση της οποίας είναι αρκετά διαδεδομένη στο τομέα της κτηνιατρικής. Ωστόσο, έχουν βρεθεί βακτήρια τα οποία φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας στη συγκεκριμένη αντιμικροβιακή ουσία . Τα γονίδια ανθεκτικότητας είναι πιθανών μεταλλάξεις του *mcr-1* ,του πρώτου γονιδίου που ανιχνεύθηκε. Τα γονίδια περιέχονται στα πλασμίδια των βακτηρίων και μεταφέρονται, προσδίδοντας ανθεκτικότητα και σε άλλες βακτηριακές αποικίες. Στη συγκεκριμένη εργασία, με τη χρήση στελεχών από την προηγούμενη εργαστηριακή έρευνα καλούμαστε να εξακριβώσουμε την ύπαρξη γονιδίων ανθεκτικότητας στη κολιστίνη, τον αριθμό των θετικών για τα γονίδια καθώς και ποια γονίδια φέρουν. Για την πραγματοποίησή του, τα στελέχη θα ανακαλλιεργηθούν, θα απομονωθεί το γενετικό τους υλικό , θα ενισχυθεί μέσω PCR το επιθυμητό γονίδιο και εν τέλει μέσω ηλεκτροφόρησης θα εξακριβωθεί η ύπαρξη ή όχι του γονιδίου ανθεκτικότητας καθώς και το τύπο του.

ABSTRACT

The project has as its main topic Gram (-) negative bacteria, specifically enterobacteria and their resistance to antibiotics. It focuses on the resistance *E. coli* appears to have when they carry a plasmid containing the colistin resistance gene. The research has been based on previous laboratory research. [49]. Colistin is a powerful antibiotic, its use is quite widespread in the field of veterinary medicine. However, bacteria have been found that carry resistance genes to this antibiotic. The genes are contained in the plasmids of the bacteria and are transferred, conferring resistance to other bacterial colonies. In this project, we are using samples from previous laboratory research we are asked to ascertain the existence of colistin resistance genes, the number of those who are positive for the genes, and which type of genes they carry. To carry it out, the samples will be precultured, their genetic material will be isolated, the desired gene will be amplified through PCR and finally, through electrophoresis, the existence or not of the resistance gene and its type will become apparent.

ΜΕΡΟΣ Ι

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 ΓΕΝΙΚΑ

Η *Escherichia coli* (*E. coli*) αποτελεί μέλος της οικογένειας των Εντεροβακτηρίων, (οικογένεια *Enterobacteriaceae*). Τα Εντεροβακτήρια χαρακτηρίζονται ως Gram (-) βακτήρια , προαιρετικά αναερόβια ,αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του γαστρεντερικού σωλήνα , τόσο του ανθρώπου και άλλων θερμόαιμων ζώων [1]. Το συμβιωτικό βακτήριο εντοπίζεται κυρίως στο βλεννώδες επιθηλιακό στρώμα του παχέος εντέρου των θηλαστικών. Παρόλο που αποτελεί μέρος της φυσιολογικής εντερικής χλωρίδας , έχουν παρατηρηθεί στελέχη της *E .coli* που φέρουν παθογόνο δράση , ικανά να προκαλέσουν γαστρεντερικές και εξωγαστρεντερικές λοιμώξεις [2]. Η *E. coli* αποτελεί έναν από τους πιο χρησιμοποιημένους μικροοργανισμούς στο τομέα της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA [1]. Χαρακτηρίζεται από την ικανότητα της να μεταφέρει γενετικά ανθεκτικά χαρακτηριστικά σε μικροοργανισμούς με τους οποίους συμβιώνει στο ίδιο περιβάλλον καθώς και να γίνεται δέκτης γονιδίων ανθεκτικότητας. Συνεπώς ,τα βακτήρια της γαστρεντερικής χλωρίδας αποτελούν δέκτες και δότες μικροβιακής αντοχής [3].Ακόμη, χρησιμοποιείται διεθνώς ως δείκτης αντοχής (indicator bacteria) λόγω του μεγάλου ποσοστού ανάκτησης της από κόπρανα ζώων και της ενσωμάτωσης των γονιδίων αντοχής [4]. Ως δείκτες χρησιμοποιούνται μικροοργανισμοί, όπως βακτήρια, που δεν είναι παθογόνα, είναι ανιχνεύσιμα σε χαμηλές συγκεντρώσεις και ευρέως διαδεδομένα στο περιβάλλον [3].

1.1.1Χαρακτηριστικά

Η *Escherichia coli* ταξινομείται στο γένος *Escherichia* (το οποίο πήρε το όνομα του μετά την ανακάλυψη από τον Theodor Escherich), στην οικογένεια των *Enterobacteriaceae* , τάξη των *Enterobacteriales*, κλάση των *Gammaproteobacteria* και φύλου των *Proteobacteria*. Το γένος της *Escherichia* αποτελείται από επτά είδη, σπανίως είναι παθογόνα για τον άνθρωπο, όπως την *E. Blattae*, την *E. fergusonii*, την *E. hermanii*, την *E. marmotae*, την *E. vulneris*, την *E. Alberti* και την *E. coli*. Η *E. coli* αποτελεί αντιπροσωπευτικό είδος της οικογένειας των Εντεροβακτηριδίων. Περιγράφεται ως ένα Gram (-) αρνητικό, μη σπορογόνο, προαιρετικά αναερόβιο, ραβδόμορφο βακτήριο με πάχος 1,1-1,5 μm και μήκος 2-6 μm. Επιπλέον, χαρακτηρίζεται από την ικανότητα να κινείται πλευρικά ή με τη χρήση μιας εξωβακτηριακής δομής, του μαστιγίου αλλά και να παραμένει ακίνητο. Ακόμη, φέρει πρωτεϊνικές δομές οι οποίες εκβάλλουν έξω από την βακτηριακή μεμβράνη και συμβάλλουν στην προσκόλληση του βακτηρίου σε άλλα κύτταρα ή ιστούς του ξενιστή.

Η *E. coli* αποικίζει κυρίως το γαστρεντερικό σωλήνα των νεογέννητων ελάχιστες ώρες μετά τη γέννηση και χαρακτηρίζεται από την ικανότητα του να συνυπάρχει αρμονικά με τον ξενιστή του. Αποτελεί την πολυπληθέστερη ομάδα προαιρετικών αναερόβιων βακτηρίων που εντοπίζεται στην ανθρώπινη εντερική μικροχλωρίδα και συγκεκριμένα στο βλεννογόνο του εντέρου. Η *E. coli* φέρει την ευθύνη για τη σύνθεση της βιταμίνης K2, γνωστή και ως μενακινόνη, η οποία αποτελεί μέρος της αναπνευστικής αλυσίδας του κυττάρου [6]. Ως πηγή ενέργειας χρησιμοποιεί κυρίως πηγές άνθρακα, γλυκόζης και οξικού οξέος. Χαρακτηρίζεται από την απώλεια του ενζύμου οξειδάση [5]. Έχει την ικανότητα να απομονώνεται εύκολα από κλινικά δείγματα, ασχέτως την σύστασης του θρεπτικού υλικού που εντοπίζεται, ενώ οι συνθήκες άριστης ανάπτυξης είναι στους 37 °C υπό αερόβιες συνθήκες [5]. Σε εργαστηριακή καλλιέργεια, οι αποικίες έχουν σκούρο χρώμα με μια πράσινη γυαλάδα, όταν έχουν καλλιεργηθεί σε υπόστρωμα άγαρ -ηωσίνης με μπλε του μεθυλενίου. Τα βακτήρια ζυμώνουν τη λακτόζη εντός 48 ωρών. Το συγκεκριμένο άγαρ αποτελείται από πεπτόνη, λακτόζη, σακχαρόζη, περιέχει ηωσίνη και μπλε του μεθυλενίου για την επιλογή και τη διάκριση μεταξύ των βακτηρίων που ζυμώνουν τη λακτόζη και των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, που δεν ζυμώνουν λακτόζη [6].

Το βακτήριο αποτελείται από το βακτηριακό χρωμόσωμα, ένα δίκλωνο και κυκλικό μόριο DNA με μήκος μεγαλύτερο από 1000 μm και μπορεί να φέρει ένα ή περισσότερα πλασμίδια. Το χρωμοσωμικό DNA έχει μια συμπυκνωμένη, οργανωμένη μορφή που ονομάζεται νουκλεοειδή και δεν περικλείεται από πυρηνική μεμβράνη. Είναι συμπυκνωμένο και λειτουργικά οργανωμένο ώστε διαδικασίες όπως η αντιγραφή, ο ανασυνδυασμός και η μεταγραφή να μπορούν να διεξαχθούν επιτυχώς. Ακόμη, τα βακτήρια διαθέτουν μια ομάδα πρωτεϊνών που δεσμεύουν το DNA, πρωτεΐνες σχετιζόμενες με νουκλεοειδή (NAPs), η λειτουργία τους είναι παρόμοια με των ιστονών των ευκαρυωτών. Στην *E. coli* εντοπίζονται 15 διαφορετικές πρωτεΐνες NAPs [7]. Τα στελέχη της *E. coli* εμφανίζουν ποσοστό ομοιότητας στο γονιδίωμα κοντά στο 70% και φέρουν την ίδια ταξινόμηση των χαρακτηριστικών τους. Η κύρια διαφοροποίηση τους οφείλεται στα αντιγόνα που εκφράζονται στην εξωτερική τους μεμβράνη [9].

Ορισμένα στελέχη της *E. coli* εμπλέκονται σε εξωγαστρεντερικές λοιμώξεις (ExPEC) όπως η λοίμωξη του ουροποιητικού συστήματος. Σύμφωνα με φυλογενετικές αναλύσεις, τα στελέχη της *E. coli* κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις κύριες ομάδες (A, B1, B2 και D). Τα παθογόνα που προκαλούν εξωγαστρεντερικές λοιμώξεις ανήκουν στην ομάδα B2 ενώ σε μικρότερο βαθμό στην ομάδα D. Στελέχη της ομάδας A και B1 χαρακτηρίζονται από μειωμένη παθογόνο δράση και αυξημένη ικανότητα συμβίωσης [8].

1.1.2 Κυτταρικό Τοίχωμα

Το περίβλημα των βακτηρίων αποτελεί μια πολύπλοκη πολυστρωματική δομή με κύριο σκοπό την προστασία των βακτηρίων από το περιβάλλον. Για την επιβίωση τους έχουν αναπτύξει ένα πολύπλοκο κυτταρικό περίβλημα το οποίο παρέχει προστασία ενώ ταυτόχρονα επιτρέπει τη διέλευση θρεπτικών συστατικών και την αποβολή άχρηστων ουσιών [11]. Το κυτταρικό τοίχωμα συμμετέχει στη λειτουργία του βακτηρίου όπως στη προστασία του, στη μεταφορά του και στη παραγωγή ενέργειας [10]. Τα περισσότερα βακτήρια ανήκουν σε μία από τις δύο μεγάλες ομάδες, Gram (-) αρνητικά και Gram (+) θετικά βακτήρια. Αρχικά, το περίβλημα των θετικών κατά Gram (+) βακτηρίων διαφέρει από το αρνητικό κατά Gram (-). Πρώτον, η εξωτερική μεμβράνη απουσιάζει. Συνήθως, τα θετικά κατά Gram(+) βακτήρια αναπτύσσονται σε μη φιλικό περιβάλλον απουσία εξωτερικής μεμβράνης. Αντίθετα, στα Gram (-) αρνητικά βακτήρια η εξωτερική μεμβράνη παρέχει προστασία από το περιβάλλον, συμβάλει στη σταθερότητα της εσωτερικής μεμβράνης και του βακτηρίου. Δεύτερον, τα θετικά κατά Gram (+) βακτήρια περιβάλλονται από στρώματα πεπτιδογλυκάνης παχύτερα σε σχέση με το λεπτό στρώμα που φέρουν τα Gram (-) αρνητικά βακτήρια. Η χημική δομή της πεπτιδογλυκάνης, τόσο στα θετικά κατά Gram (+) βακτήρια όσο και στα αρνητικά είναι παρόμοια. Η διαφοροποίηση των βακτηρίων γίνεται με βάση τη χρώση κατά Gram η οποία βασίζεται στις θεμελιώδεις δομικές διαφορές στη περιοχή του κυτταρικού τοιχώματος που φέρουν οι δύο ομάδες βακτηρίων [11]. Η *E.coli* περιβάλλεται από ένα πολύπλοκο κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο αποτελείται από δύο διπλοστοιβάδες λιπιδίων [10].

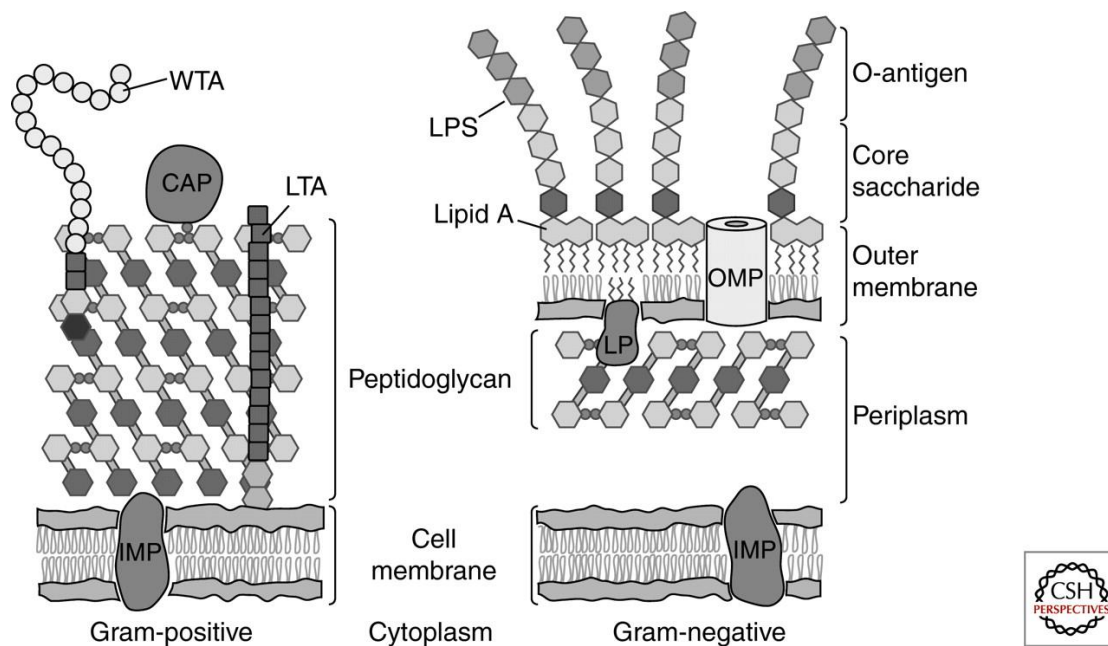
Υπάρχουν τρία κύρια στρώματα στο κυτταρικό τοίχωμα:

η εξωτερική μεμβράνη (OM), το στρώμα πεπτιδογλυκάνης και η εσωτερική μεμβράνη (IM). Η OM αποτελεί μια χαρακτηριστική δομή που φέρουν μόνο τα Gram (-) αρνητικά βακτήρια. Η εξωτερική μεμβράνη είναι μια σύνθεση λιποπολυσακχαριτών, δηλαδή λιπίδια τα οποία είναι συνδεδεμένα με μια αλυσίδα πολυσακχαριτών με το σχηματισμό ενός ομοιοπολικού δεσμού [10]. Συγκεκριμένα, αποτελείται από μια διπλοστοιβάδα λιπιδίων ενώ η εξωτερική πλευρά του OM αποτελείται από ολιγοσακχαρίτες που αποτελούν μέρος της σύνθεσης του λιποπολυσακχαρίτη LPS. Ο LPS διαδραματίζει βασικό ρόλο στο φραγμό της OM, αποτελείται από ένα δισακχαρίτη γλυκοζαμίνης (λιπίδιο A), έναν κεντρικό πολυσακχαρίτη-πυρήνα και μια εκτεταμένη αλυσίδα πολυσακχαρίτη που ονομάζεται O-αντιγόνο. Ο LPS είναι υπεύθυνος για την σηψαιμία που προκαλείται από Gram (-) αρνητικά βακτήρια. Οι πρωτεΐνες της OM μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες, τις λιποπρωτεΐνες και τις πρωτεΐνες (OMP). Οι λιποπρωτεΐνες δεν χαρακτηρίζονται ως διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Οι OMPs ή πορίνες σχηματίζουν δίαυλους για τη μετακίνηση ουσιών προς το εσωτερικό και το εξωτερικό του κυττάρου. Οι OMPs περιορίζουν την διάχυση μεγάλων υδρόφιλων μορίων και αυξάνουν το φραγμό της OM [11].

Η OM και η IM οριοθετούν ένα υδάτινο κυτταρικό διαμέρισμα που ονομάζεται περίπλασμα ή περιπλασματικός χώρος. Ο περιπλασματικός χώρος συγκροτείται από πεπτιδογλυκάνη και μικρές διαλυτές πρωτεΐνες [10]. Η πεπτιδογλυκάνη είναι μια αλυσίδα πολυσακχαριτών, με εννέα επαναλήψεις δισακχαριτών που φέρουν διασταυρούμενη σύνδεση. Συγκεκριμένα, αποτελείται από δύο παράγωγα γλυκόζης,

τη Ν-ακετυλογλυκοζαμίνη (NAG) και το Ν-ακετυλομουραμικό οξύ (NAM), που εναλλάσσονται σε μακριές αλυσίδες. Οι αλυσίδες συνδέονται μεταξύ τους με ένα τετραπεπίδιο που εκτείνεται από τη μονάδα σακχάρου NAM και επιτρέπει το σχηματισμό μια δομής που μοιάζει με πλέγμα. Τα τέσσερα αμινοξέα που συνθέτουν το τετραπεπίδιο είναι: η L-αλανίνη, η D-γλουταμίνη, η L-λυσίνη ή μεσο-διαμινοπιμελικό οξύ (DPA) και η D-αλανίνη. Το πλέγμα της πεπτιδογλυκάνης αλληλεπιδρά με τις λιποπρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης και συντελούν το κύριο δομικό στήριγμα του κυτταρικού τοιχώματος. Η σύνδεση του πλέγματος με τις πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης καταλύεται από τρανσπεπτιδάσες (PBPs) οι οποίες δημιουργούν πεπτιδικούς δεσμούς μεταξύ των κάθετων αλυσίδων των πενταπεπτιδίων. Συγκεκριμένα, το τετραπεπίδιο συνδέεται με ένα τετραπεπίδιο σε μια άλλη αλυσίδα NAG-NAM. Οι πεπτιδικοί δεσμοί συμβάλλουν στην αύξηση της κυτταρικής αντοχής [10]. Ακόμη, η πεπτιδογλυκάνη, λόγω της άκαμπτης μορφής της, καθορίζει το σχήμα των κυττάρων. Αν και τα εντεροβακτήρια χαρακτηρίζονται από ραβδοειδές σχήμα, τα μεγέθη τους μπορεί να ποικίλλουν. Παράγοντες όπως ένζυμα και αντιβιοτικά βλάπτουν το πλέγμα πεπτιδογλυκάνης με αποτέλεσμα την αλλαγή της βακτηριακού σχήματος. Τα βακτηριακά κύτταρα που στερούνται πεπτιδογλυκάνη ονομάζονται σφαιροπλάστες [11]. Οι περιπλασματικές πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν μικρά μόρια και έπειτα να τα οδηγούν στους μεταφορείς της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Κάποιες πρωτεΐνες που υπάρχουν στον περιπλασματικό χώρο χαρακτηρίζονται ως δεσμευτικές όπως οι PBPs ή υδρολυτικά ένζυμα όπως η αλκαλική φωσφατάση και η RNAάση.

Η εσωτερική μεμβράνη (IM) αποτελείται από πρωτεΐνες που συμβάλουν σε λειτουργίες του βακτηριακού κυττάρου, όπως η σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης [10]. Αρκετές από τις μεμβρανικές πρωτεΐνες συμβάλλουν στην παραγωγή ενέργειας, στη βιοσύνθεση λιπιδίων, στην έκκριση πρωτεΐνης, στη μεταφορά ουσιών και εντοπίζονται στο IM των βακτηρίων. Το IM περιγράφεται ως μια διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων. Στην *E. coli*, τα κύρια φωσφολιπίδια που την απαρτίζουν είναι η φωσφατιδυλοιοιθανολαμίνη και η φωσφατιδυλογλυκερόλη. Για την βιογένεση του κυτταρικού τοιχώματος και τη σύνθεση της λιπιδιακής διπλοστοιβάδας, θα πρέπει τα περιπλασματικά συστατικά να απελευθερώνονται από το IM, το πλέγμα πεπτιδογλυκάνης να διασπαστεί, να απελευθερωθεί και να πολυμεριστεί η πεπτιδογλυκάνη καθώς και τα συστατικά της OM να μεταφερθούν μέσω του υδάτινου παχύρρευστου περιπλάσματος στη θέση σύνθεσης της [11].



Εικόνα 1. Απεικόνιση θετικών και αρνητικών κατά Gram κυτταρικών μεμβρανών: CAP : ομοιοπολικά συνδεδεμένη πρωτεΐνη, IMP: ενσωματωμένη πρωτεΐνη μεμβράνης. LP: λιποπρωτεΐνη, LPS: λιποπολυσακχαρίτης, LTA: λιποτεϊχικό οξύ, OMP: πρωτεΐνη εξωτερικής μεμβράνης. Πηγή:[11]

1.1.3 Παθογόνος Δράση

Η *E.coli* φέρει παθογόνα στελέχη που προκαλούν νόσο σε υγιή άτομα, όπως εντερικές λοιμώξεις, λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος (UTIs) αλλά σήψη και μηνιγγίτιδα. Τα παθογόνα εντερικά στελέχη υπάγονται σε επτά κατηγορίες : Τα εντεροπαθογόνα *E.coli* (EPEC), τα εντεροαιμορραγικά *E.coli* (EHEC), τα εντεροτοξινογόνα *E.coli* (ETEC), τα εντεροπροσκολλητικά *E.coli* (EAEC), τα εντεροδιεισδυτικά *E.coli* (EIEC), διάχυτης προσκόλλησης *E.coli* (DAEC) και διεισδυτικής προσκόλλησης *E.coli* (AIEC). Παρατηρήθηκε πως τα στελέχη EHEC και ETEC έχουν την ικανότητα να προσβάλουν και να μολύνουν ζώα χρησιμοποιώντας τους ίδιους λοιμογόνους παράγοντες που εντοπίστηκαν σε ανθρώπινα στελέχη.

Οι εξωγαστρεντερικές λοιμώξεις οφείλονται τη δράση τριών παθογόνων στελεχών της *E. coli*. Οι ουρολοιμώξεις είναι αποτέλεσμα της δράσης των ουροπαθογόνων στελεχών *E. coli* (UPEC) ενώ η εμφάνιση μηνιγγίτιδας και σηψαιμίας προκαλούνται από τα στελέχη MNEC *E. coli* που σχετίζονται με τη μηνιγγίτιδα. Επίσης, τα παθογόνα στελέχη της *E.coli* (APEC) προκαλούν λοιμώξεις του αναπνευστικού και σηψαιμία στα πτηνά.

Τα παθογόνα στελέχη της *E. coli* χρησιμοποιούν ένα πολύπλοκο σύστημα έκφρασης της παθογόνου δράσης τους. Αρχικά, τα στελέχη αποικίζουν το βλεννογόνο, διεκφεύγουν από την άμυνα του ξενιστή, πολλαπλασιάζονται, εκφράζουν την παθογόνο δράση τους και προκαλούν φλεγμονή στον ξενιστή. Τα περισσότερα από τα παθογόνα στελέχη *E. coli* παραμένουν εξωκυτταρικά. Αντίθετα, το στέλεχος EIEC χαρακτηρίζεται ως ένα ενδοκυτταρικό παθογόνο, που φέρει την ικανότητα εισβολής και αναπαραγωγής εντός των επιθηλιακών κυττάρων και των μακροφάγων. Κι άλλα στελέχη *E. coli* εισέρχονται στα επιθηλιακά κύτταρα αλλά δεν έχουν την ικανότητα αναπαραγωγής ενδοκυτταρικά [2]. Ακόμη, διαθέτουν συγκεκριμένους παράγοντες προσκόλλησης που τους επιτρέπουν να αποικίσουν εξωγαστρεντερικές περιοχές όπως η ουρήθρα. Οι προσκολλητίνες σχηματίζουν διακριτές μορφολογικές δομές που ονομάζονται κροσσοί ή ινίδια. Οι κροσσοί είναι ραβδοειδείς δομές διαμέτρου 5-10 nm και διαφέρουν από τα μαστίγια. Τα ινίδια είναι τριχοειδείς σχηματισμοί, μικρότερα των βλεφαρίδων με 2-4 nm διάμετρο ενώ περιγράφονται ως μακριά και εύκαμπτα. Αποτελούν όργανα προσκόλλησης καθώς διευκολύνουν την πρόσδεση των βακτηρίων στα κύτταρα του ξενιστή αλλά και ως όργανα μεταφοράς γενετικού υλικού. [2]

1.1.4 Αντιγόνα

Τα παθογόνα στελέχη της *E. coli* τείνουν να είναι ομάδες που χαρακτηρίζονται από κοινά αντιγόνα όπως το αντιγόνο O, ένα πολυσακχαρίτη που είναι μέρος του λιποπολυσακχαρίτη LPS και το πρωτεϊνικό αντιγόνο H. Τα συγκεκριμένα αντιγόνα ορίζουν την ορολογική ομάδα (μόνο αντιγόνο O) ή τον ορότυπο (O και H αντιγόνα). Το αντιγόνο O αποτελεί τμήμα του λιποπολυσακχαρίτη LPS της εξωτερικής μεμβράνης. Ο πολυσακχαρίτης ή αντιγόνο O, είναι συνδεδεμένο ομοιοπολικά με τον πυρήνα του πολυσακχαρίτη λιπιδίου A. Τα αντιγόνα O διακρίνονται για την ικανότητα του να μεταφέρτε σε άλλα βακτήρια. Έχουν αναφερθεί πάνω από 170 διαφορετικές ομάδες του αντιγόνου O [3]. Επιπλέον, υπάρχει το αντιγόνο K, ένας πολυσακχαρίτης που αποτελεί μέρος του κυτταρικού τοιχώματος.

Ο πολυσακχαρίτης K χαρακτηρίζεται ως όξινος και θερμικά ασταθής. Ταυτοποιήθηκαν τρία διαφορετικά αντιγόνα K: A, B και L, τα οποία απενεργοποιούνται σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Ακόμη, το αντιγόνο K αποτελεί μέσο ταυτοποίησης βακτηρίων λόγω της σύνδεσής τους με παθογόνα στελέχη εντεροβακτηριδίων. [2].

Το αντιγόνο H αποτελεί μέρος των μαστιγίων και εντοπίζεται μόνο στα κινούμενα στελέχη της *E. coli*. Τα περισσότερα βακτήρια *E. coli* κινούνται μερικώς ή καθόλου. Αρχικά, τα τρία αντιγόνα χρησιμοποιήθηκαν για να ορίσουν ένα συγκεκριμένο ορότυπο *E. coli*. Πλέον για τη περιγραφή έχει επικρατήσει η χρήση του αντιγόνου H και O. Το αντιγόνο H είναι συνδεδεμένο με το αντιγόνο O, επομένως, αποτελεί μια εξαιρετικά διακριτική μέθοδος τυποποίησης για τη διάκριση διαφόρων στελεχών

E. coli. Οι ορότυποι O:H μπορούν να ταξινομηθούν σε διάφορες παθογόνες ομάδες (π.χ., εντεροπαθογόνο *E.coli* (EPEC)). Επίσης, κατηγοριοποιούνται σε σχέση με το ξενιστή που εντοπίστηκαν.[2].

1.2 ΠΑΘΟΤΥΠΙΕΣ ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΕΣ

1.2.1 Στελέχη που προκαλούν γαστρεντερικές λοιμώξεις

i) Εντεροπαθογόνα *E.coli* (EPEC).

Τα στελέχη EPEC ήταν τα πρώτα παθογόνα στελέχη *E.coli* που απομονώθηκαν. Το 1945, η αύξηση της βρεφικής διάρροιας στο Ηνωμένο Βασίλειο οδήγησε τον Bray, στη περιγραφή μιας ομάδας *E.coli* από στελέχη που απομονώθηκαν από παιδιά που παρουσίασαν διάρροια. Τα βακτήρια συνδέονται στενά με τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και προκαλούν κυτταροσκελετικές αλλαγές καθώς και συσσώρευση πολυμερισμένης ακτίνης κάτω από τα προσκολλημένα βακτήρια. Οι μικρολάχνες του εντέρου εξαφανίζονται ενώ η πρόσδεση των βακτηρίων γίνεται μέσω της δράσης της προσκολλητίνης. Συνήθως δεν είναι απαραίτητη η έκκριση εντεροτοξίνης για να προκληθεί διάρροια [2,9,5]. Ακόμη, η διάρροια μπορεί να προκληθεί από την ενεργή έκκριση ιόντων, την αυξημένη εντερική διαπερατότητα, την προκληθείσα φλεγμονή του εντέρου και την απώλεια απορροφητικής επιφάνειας που εμφανίζεται στη περιοχή των μικρολαχνών λόγω της εξάλειψής τους [2]. Τα στελέχη EPEC προκαλούν διάρροια κυρίως σε παιδιά, ιδιαίτερα υπό συνθήκες κακής υγιεινής, αλλά και στα ζώα [1,5].

ii) Εντεροαιμορραγικά *E.coli* (EHEC).

Τα στελέχη EHEC αναγνωρίστηκαν για πρώτη φορά το 1982. Προκαλούν αιμορραγική διάρροια (αιμορραγική κολίτιδα), μη αιμορραγική διάρροια και το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (HUS). Αρχικά, εντοπίστηκαν στην γαστρεντερική οδό των βοοειδών και τα πρώτα κρούσματα σχετίστηκαν με την κατανάλωση μη σωστά

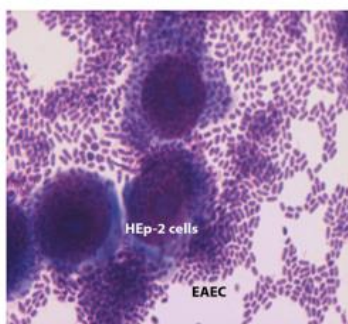
ψημένου κρέατος. Για την πρόκληση μόλυνσης, απαιτείται χαμηλή συγκέντρωση του παθογόνου στελέχους. Ο βασικός παράγοντας παθογόνου δράσης για τα στελέχη EHEC είναι το *Stx*, γνωστό ως βεροκυτοτοξίνη (VT). Το *Stx* παράγεται στο κόλον, μεταφέρετε μέσω της κυκλοφορίας του αίματος στο νεφρό όπου προσβάλλει τα νεφρικά ενδοθηλιακά κύτταρα. Η τοξικότητα του *Stx* αποφράσσει τα μικροαγγεία, επάγει την τοπική παραγωγή κυτοκίνης και χημειοκίνης και οδηγεί στην εμφάνιση νεφρικής φλεγμονής. Η φλεγμονή που παρουσιάζετε μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση HUS, μιας ασθένειας που χαρακτηρίζεται από αιμολυτική αναιμία, θρομβοπενία και οξεία νεφρική ανεπάρκεια. Ακόμη, το *Stx* προκαλεί απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου και τοπική φλεγμονή στο παχέος έντερο, με αποτέλεσμα την εμφάνιση αιμορραγικής διάρροιας, αιμορραγικής κολίτιδας, τη νέκρωση και τη διάτρηση του εντέρου [2,9]. Συνεπώς, τα στελέχη EHEC μεταδίδονται μέσω τροφής και προκαλούν αιμορραγική κολίτιδα ή HUS. Τυπικά στελέχη EHEC παράγουν τοξίνες τύπου *Shiga* (ονομάζονται *Shiga toxin producing E.coli*, STEC) παρόμοια με αυτά που παράγονται από τη *Shigella dysenteriae* και χαρακτηρίζονται ως τα πιο παθογόνα στελέχη *E. coli* που προκαλούν γαστρεντερικές λοιμώξεις [1,5].

iii) Εντεροτοξινογόνα *E.coli* (ETEC).

Τα στελέχη ETEC προκαλούν υδαρή διάρροια, η οποία μπορεί να κυμαίνεται από ήπια έως σοβαρή. Αποτελεί σημαντική αιτία της παιδικής διάρροιας καθώς και των ταξιδιωτών στις αναπτυσσόμενες χώρες. Τα στελέχη ETEC αποικίζουν επιφάνειες του βλεννογόνου του λεπτού εντέρου και εκκρίνουν εντεροτοξίνες, οι οποίες προκαλούν γαστρεντερικές εκκρίσεις. Η δημιουργία αποικιών πραγματοποιείται με τη συμβολή ενός ή περισσότερων πρωτεϊνικών κροσσών ή με δράση των αποικιστικών παραγόντων (CFs). Επιπλέον, αποτελούν αιτία εμφάνισης της διαρροϊκής νόσου στα ζώα. Τα ζωικά παθογόνα στελέχη ETEC, εκφράζουν κροσσοτούς εντερικούς παράγοντες αποικισμού, που δεν εντοπίζονται στα ανθρώπινα στελέχη ETEC και κωδικοποιούνται από πλασμίδια που σχετίζονται με τη θερμοσταθερή εντεροτοξίνη (EAST1). Οι εντεροτοξίνες ETEC ανήκουν σε μία από τις δύο ομάδες: τις θερμικά ασταθείς εντεροτοξίνες (LTs) και τις θερμοσταθερές εντεροτοξίνες (STs). Τα στελέχη ETEC μπορεί να εκφράζουν μόνο ένα LT, μόνο ένα ST, ή και τα δύο LT και ST. Τα LTs αποτελούν μια κατηγορία εντεροτοξινών που φέρουν κοινά δομικά αλλά και λειτουργικά χαρακτηριστικά με την εντεροτοξίνη της χολέρας (CT), που εκφράζεται στο *Vibrio cholerae* [2]. Οπότε, τα ETEC είναι τα πιο κοινά παθογόνα στελέχη *E.coli* που προκαλούν διάρροια στους ταξιδιώτες με ήπια έως σοβαρή υδαρή διάρροια σε ανθρώπους όλων των ηλικιών [1,5].

iv) Εντεροπροσκολλητικά *E.coli* (EAEC).

Τα στελέχη EAEC αποτελούν συχνή αιτία της επίμονης διάρροιας σε παιδιά και ενήλικες. Η διάρροια μπορεί να διαρκέσει έως και 14 μέρες. Τα στελέχη EAEC ορίζονται ως στελέχη της *E. coli* που δεν εκκρίνουν εντεροτοξίνες, δηλαδή LT ή ST, και προσκολλώνται στα επιθηλιακά κύτταρα HEp-2. Τα βακτήρια προσκολλώνται μεταξύ τους και σχηματίζουν μια δομή που θυμίζει «στοιβαγμένα τούβλα». Η βασική στρατηγική της μόλυνσης των στελεχών EAEC, περιλαμβάνει τον αποικισμό του εντερικού βλεννογόνου, κυρίως του παχέος εντέρου, και την έκκριση κυτταροτοξινών. Παρατηρήθηκε πως η φλεγμονή που προκαλείται στα ζώα είναι πιο ήπια. Τα στελέχη EAEC, βρίσκονται συχνά στο έντερο ασυμπτωματικών φορέων και χαρακτηρίζονται ως η κύρια αιτία διάρροιας των ταξιδιωτών παγκοσμίως. Ακόμη συνδέονται με την εμφάνιση διάρροιας σε παιδιά στις αναπτυσσόμενες χώρες και σε ασθενείς με HIV [1,2,5,9,12].



Εικόνα 2. Το πρότυπο προσκόλλησης του εντεροπροσκολλητικού *E.coli* (EAEC) στα κύτταρα HEp-2. Η EAEC προσκολλάται σε κύτταρα HEp-2 σε ένα μοτίβο γνωστό ως *auto-aggregative*, στο οποίο τα βακτήρια προσκολλώνται μεταξύ τους σαν στοιβαγμένα τούβλα. Πηγή:[12]

v) Διαχυτής προσκόλλησης *E.coli* (Diffusely Adherent *E.coli*, DAEC)

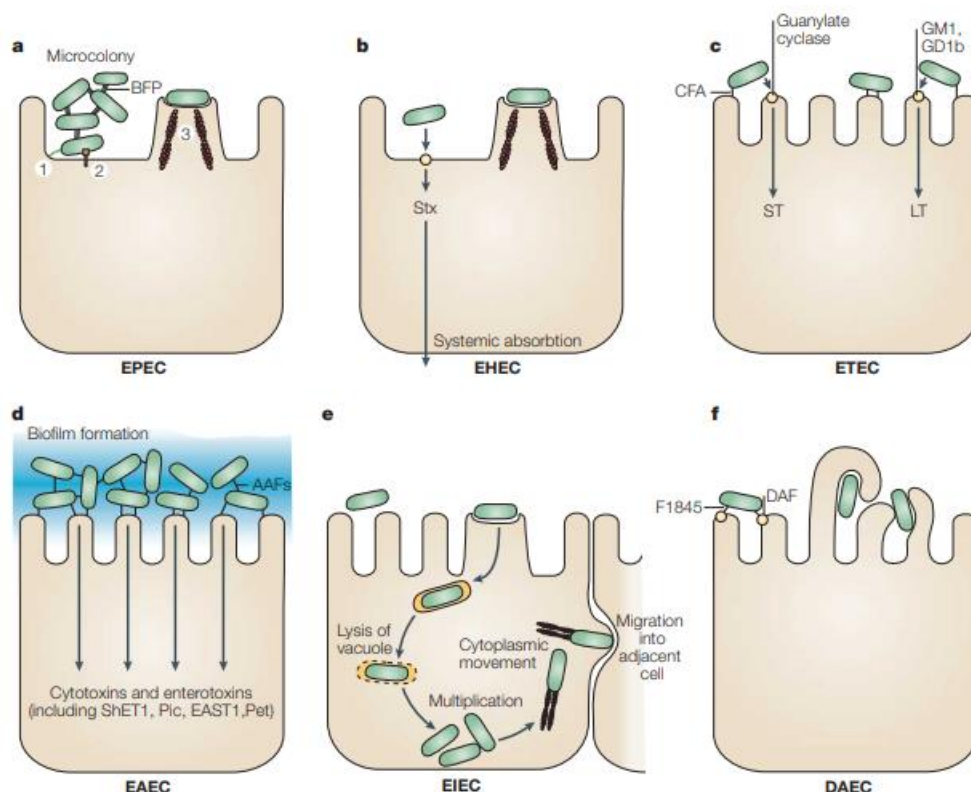
Τα στελέχη DAEC χαρακτηρίζονται από τη παρουσία ενός διάχυτου μοτίβου προσκόλλησης σε μονοστοιβάδες κυττάρων HEp-2. Σε αρκετές μελέτες, αποτελεί αιτία για τη εμφάνιση διάρροιας, συγκεκριμένα σε παιδιά ηλικίας >12 μηνών. Τα στελέχη DAEC φέρουν ένα αποτέλεσμα που χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη μακρών κυτταρικών προεξοχών οι οποίες περικλείουν και δεσμεύουν τα προσκολλημένα βακτήρια. [12].

vi) Εντεροδιδεισδυτικά(Enteroinvasive *E.coli*, EIEC)

Αποτελούν συχνή αιτία εμφάνισης υδαρούς διάρροιας αλλά και δυσεντερίας τόσο στα παιδιά όσο και στους ενήλικες. Τα στελέχη EIEC σχετίζονται στενά με το *Shigella spp.*, τόσο βιοχημικά όσο και γενετικά. Φέρουν την ικανότητα να διεισδύουν στα κύτταρα βλεννογόνου του έντερου, κυρίως του παχέος έντερου. Έπειτα, πολλαπλασιάζονται και κινούνται πλευρικά στα γειτονικά κύτταρα με αποτέλεσμα την πρόκληση φλεγμονής και τη καταστροφή του βλεννογόνου, χαρακτηριστικά της βακτηριακής δυσεντερίας.[13]

vii) Διδεισδυτικής προσκόλλησης (Adherent Invasive *E. coli*, AIEC)

Χαρακτηρίζεται ως ένα νέο παθογόνο στέλεχος το οποίο σχετίζεται με τις βλάβες που προκαλεί η νόσος του Crohn. Προκαλεί φλεγμονή του εντερικού βλεννογόνου. Τα στελέχη εισβάλλουν και αναπαράγονται στο εσωτερικό των μακροφάγων. Με την απελευθέρωση του παράγοντα TNF-α προκαλείται εντερική φλεγμονή χωρίς όμως να επάγεται η καταστροφή των μακροφάγων .



Εικόνα 3. Παθογόνο σχήμα *E. coli* που προκαλεί γαστρεντερικές λοιμώξεις. Έξι κατηγορίες, η καθεμία φέρει μοναδικά χαρακτηριστικά. Α) το EPEC προσκολλάται στα εντερικά κύτταρα του λεπτού εντέρου, καταστρέφει την αρχιτεκτονική των αυλών του και οδηγεί σε φλεγμονή και διάρροια. 1. Αρχική προσκόλληση, 2. Μετατόπιση πρωτεΐνης με έκκριση τύπου III, 3. Σχηματισμός βάθρου. Β) το EHEC προσκολλάται στο παχύ έντερο, αναπτύσσεται η τοξίνη Shiga (Stx) και η συνεχή απορρόφηση της οδηγεί σε επιπλοκές. Γ) το ETEC προσκολλάται στα κύτταρα του λεπτού εντέρου, προκαλεί υδαρή διάρροια εξαιτίας της έκκρισης θερμικά ασταθών (LT) και θερμοσταθερών (ST)

εντεροτοξινών. D) Το EAEC προσκολλάται στα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού αλλά και του παχέος εντέρου, επεξεργάζεται τις εκκρινόμενες εντεροτοξίνες και κυτταροτοξίνες. E) το EIEC εισβάλλει στα επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου, λύει το φαγόσωμα και κινείται μέσω του κυττάρου. Μπορούν να μετακινηθούν πλευρικά ή να εξέρχονται και να εισέρχονται από τη βασοπλευρική πλασματική μεμβράνη. F) το DAEC προκαλεί ένα φαινόμενο μεταγωγής σήματος στα κύτταρα του λεπτού εντέρου και αναπτύσσονται μακριές κυτταρικές προεξοχές οι οποίες μοιάζουν με δάχτυλα, και τυλίγουν τα βακτήρια γύρω τους. Πηγή : [2]

1.2.2 Στελέχη που προκαλούν εξωγαστρεντερικές λοιμώξεις (Extraintestinal Pathogenic *E.coli*, ExPEC)

Τα στελέχη ExPEC συνδέονται συχνά με νοσοκομειακές λοιμώξεις , εμφανίζουν ομοιότητες στις ορολογικές ομάδες και στους παράγοντες παθογόνου δράσης.

i) Ουροπαθογόνα *E.coli* (UroPathogenic *E.coli*, UPEC)

Το ουροποιητικό σύστημα αποτελεί ένα κοινό μέρος βακτηριακής μόλυνσης και η *E. coli* ο πιο κοινός μολυσματικός του παράγοντας. Τα στελέχη UPEC, προκαλούν μη επιλεγμένη κυστίτιδα και οξεία πυελονεφρίτιδα. Η *E. coli* χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένους ορότυπους για παράδειγμα έξι ομάδες O αντιγόνων προκαλούν το 75% των ουρολοιμώξεων. Φέρει φαινοτύπους που σχετίζονται επιδημιολογικά με τη κυστίτιδα και την οξεία πυελονεφρίτιδα στο ουροποιητικό σύστημα, περιλαμβάνει την έκφραση προσκολλητικών ινιδίων ή κροσσών P, αιμολυσίνης και αεροβακτίνης. Πιθανόν, η μόλυνση αρχίζει με τον αποικισμό ουροπαθογόνων στελεχών στο έντερο, τη μεταφορά και τη δημιουργία αποικίας στην περιουρηθρική περιοχή, στην ουρήθρα και στην κύστη [2]. Τα στελέχη UPEC είναι διαφορετικά από τα κοινά στελέχη *E. coli* στο μονοπάτι μόλυνσης που ακολουθούν , στους παράγοντες παθογόνου δράσης και αποτελούν τα πιο κοινά στελέχη βακτηρίων που προκαλούν ουρολοιμώξεις (UTIs) στον άνθρωπο [1,5].

ii) Σχετιζόμενο με σηψαιμία και μηνιγγίτιδα *E.coli* (MNEC)

Το παθογόνο στέλεχος (MNEC) της *E. coli* είναι το πιο κοινό Gram (-) αρνητικό βακτήριο το οποίο προκαλεί νεογνική μηνιγγίτιδα και σηψαιμία, με ποσοστό

θνησιμότητας 15 – 40% και δημιουργία σοβαρών νευρολογικών προβλημάτων στους επιζώντες. Τα στελέχη MNEC μεταφέρονται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Οπότε, τα βακτήρια μεταφέρονται από το αίμα στο κεντρικό νευρικό σύστημα ,χωρίς να εμφανίζεται βλάβη στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, το οποίο υποδηλώνει μια διαδικασία διακυττάρωσης . Αρκετό μεγάλο ποσοστό των στελεχών *E. coli* που προκαλούν τη μηνιγγίτιδα φέρουν το αντιγόνο ελύτρου K1 [2,5]. Τέλος, έχει παρατηρηθεί σημαντική αύξηση στα πολυανθεκτικά στελέχη MNEC [5].

iii)Πτηνοπαθογόνα (Avian Pathogenic *E.coli*, APEC).

Τα παθογόνα στελέχη *E.coli* (APEC), προσβάλλουν τα πτηνά, περιγράφονται ως εξωγαστρεντερικά παθογόνα στελέχη *E.coli* (ExPEC), προκαλούν ποικίλες τοπικές και συστηματικές λοιμώξεις στα πτηνά, συμπεριλαμβανομένων των ορνίθων και άλλων ειδών πτηνών. Αποτελεί μέρος της εντερικής μικροχλωρίδας των υγιών πτηνών ενώ η λοίμωξη οφείλεται στην αυξημένη ευαισθησία του ξενιστή. Οι πιο συχνές λοιμώξεις που προκαλούνται είναι η αεροσακουλίτιδα, η περικαρδίτιδα, η περιτονίτιδα, η ομφαλίτιδα και η οστεομυελίτιδα. Τέλος, η κολιβακίλωση που είναι μια από τις κύριες αιτίες θνησιμότητας (έως 20%) και νοσηρότητας στα πτηνά. Διακρίνεται σε δύο μορφές : κολοβακτηριδιακή σηψαιμία και εντερική κολοβακτηριδίαση [14].

Table 1. *E. coli* pathogenic types.

Pathotype (acronym)	Diseases	Symptoms	Virulence factors	Ref.
Enteric <i>E. coli</i>				
Enteropathogenic <i>E. coli</i> (EPEC)	Diarrhoea in children	Watery diarrhoea and vomiting	Bfp, Intimin, LEE	[1]
Enterohaemorrhagic <i>E. coli</i> (EHEC)	Haemorrhagic colitis, HUS	Bloody diarrhoea	Shiga toxins, Intimin, Bfp	[1,3]
Enterotoxigenic <i>E. coli</i> (ETEC)	Traveler's diarrhoea	Watery diarrhoea and vomiting	Heat-labile and sheat-stable toxins, CFAs	[4,5]
Enteraggregative <i>E. coli</i> (EAEC)	Diarrhoea in children	Diarrhoea with mucus and vomiting	AAFs, cytotoxins	[6,7]
Diffusely Adherent <i>E. coli</i> (DAEC)	Acute diarrhoea in children	Watery diarrhoea, recurring UTI	Daa, AIDA	[8]
Enteroinvasive <i>E. coli</i> (EIEC)	Shigellosis-like	Watery diarrhoea; dysentery	Shiga toxin, hemolysin, Cellular invasion, Ipa	[1,7]
Adherent Invasive <i>E. coli</i> (AIEC)	Associated with Crohn disease	Persistent intestinal inflammation	Type 1 fimbriae, Cellular invasion	[9,10]
Extraintestinal <i>E. coli</i> (ExPEC)				
Uropathogenic <i>E. coli</i> (UPEC)	Lower UTI and systemic infections	Cystitis, pyelonephritis	Type 1 and P fimbriae; AAFs, hemolysin	[1,11]
Neonatal Meningitis <i>E. coli</i> (NMEC)	Neonatal meningitis	Acute meningitis, sepsi	S fimbriae; K1 capsule	[12,13]
Avian Pathogenic <i>E. coli</i> (APEC)	Probable source of food-borne disease	-	Type 1 and P fimbriae; K1 capsule	[14,15]

Bfp: Bundle-forming pili; LEE: Locus for enterocyte effacement; HUS: haemolytic-uraemic syndrome; CFA: colonization factor antigen; AAF: aggregative adherence fimbria; Daa: diffuse adhesin; AIDA: adhesin involved in diffuse adherence; Ipa: Invasion plasmid antigen.

Εικόνα 4. Πίνακας με όλα τα παθογόνα στελέχη *E. coli*. Πηγή:[1]

1.3 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΤΟΧΗ

Η μικροβιακή αντοχή αποτελεί ένα αυξανόμενο και άκρως σημαντικό παγκόσμιο πρόβλημα. Η αυξημένη κατανάλωση αντιμικροβιακών παραγόντων καθώς και η συνεχής μετανάστευση ανθρώπων μεταξύ χωρών οδήγησε στην δημιουργία και στην εξάπλωση πολυανθεκτικών στελεχών. Επίσης, η εκτεταμένη χρήση αντιβιοτικών και η δημιουργία ανθεκτικών βακτηρίων παρατηρείται τόσο στα νοσοκομεία όσο και στη κοινωνία [21]. Τα ανθεκτικά βακτήρια χαρακτηρίζονται από την ικανότητα τους να προσβάλουν τον άνθρωπο είτε με την άμεση επαφή είτε με τη κατανάλωση τροφίμων ζωικής προέλευσης [1].

Η χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων στη ζωική παραγωγή, στις υδατοκαλλιέργειες και στην αγροτική παραγωγή έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ανθεκτικών βακτηρίων στις σύνηθες αντιμικροβιακές ουσίες, καθώς φέρουν γονίδια που τους προσδίδουν ανθεκτικότητα. Για παράδειγμα, σε ζώα και τρόφιμα βρέθηκαν βακτηριακές αποικίες ανθεκτικές σε αντιμικροβιακές ουσίες όπως τα β-λακταμικά, οι καρβαπενέμες και η κολιστίνη, με την οποία θα ασχοληθούμε στη συνέχεια[21].

Τα πολυανθεκτικά στελέχη ευνοούνται και αυξάνονται από την ύπαρξη γονιδίων σε κινητά γενετικά στοιχεία όπως τα πλασμίδια, τα τρανσποζόνια και τα ιντεγκρόνια [1]. Επιπλέον, ο συνδυασμός αυτών των γονιδίων με τα γονίδια αντοχής που βρίσκονται στο κυρίως γενετικό υλικό του βακτηρίου συχνά φέρει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ανθεκτικών βακτηρίων σε διάφορες διαθέσιμες αντιμικροβιακές ουσίες. [1]. Ακόμη, τα αντιβιοτικά στα οποία αναφερόμαστε, είναι φυσικές, συνθετικές ή ημι-συνθετικές ουσίες που παρεμβαίνουν στην ανάπτυξη και οδηγούν στην θανάτωση μικροοργανισμών, ειδικά βακτηρίων. Χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ή την πρόληψη λοιμώξεων τόσο σε ανθρώπους όσο και στα ζώα [21].

1.3.1 Είδη Μικροβιακής Αντοχής

Η μικροβιακή αντοχή των βακτηρίων διακρίνεται σε φυσική ή ενδογενής και σε επίκτητη. Οι παραπάνω δύο κύριοι βιολογικοί οδοί εμπλέκονται στην εξέλιξη και στην ανάπτυξη της AMR (antimicrobial resistance).

Η φυσική αντοχή (Intrinsic resistance) εξαρτάται από το είδος των βακτηρίων και καθορίζεται γενετικά . Η αντοχή μπορεί να προκληθεί από την ύπαρξη ενός προϋπάρχοντα φαινοτύπου σε βακτηριακούς πληθυσμούς. Κατά την εξελικτική διαδικασία, τα βακτηριακά κύτταρα συσσωρεύουν γενετικά σφάλματα στα υπάρχοντα γονίδια (στο χρωμόσωμα ή το πλασμίδιο) και μεταφέρουν τα ανθεκτικά γονίδια στους απογόνους τους μέσω κάθετης μεταφοράς γονιδίων (VGT) , με αποτέλεσμα την απόκτηση εγγενής ή φυσικής αντοχής. Ακόμα, η φυσική αντοχή, καθορίζεται γενετικά με την απουσία ενός υποδοχέα - στόχου της αντιμικροβιακής ουσίας ή αδυναμίας της αντιμικροβιακής ουσίας να προσελκύσει το στόχο της. Για παράδειγμα , η αντοχή των Gram (-) αρνητικών βακτηρίων στη βανκομυκίνη οφείλεται στην δυσκολία που φέρει η βανκομυκίνη να διαπεράσει την εξωτερική μεμβράνη[1][21][44].

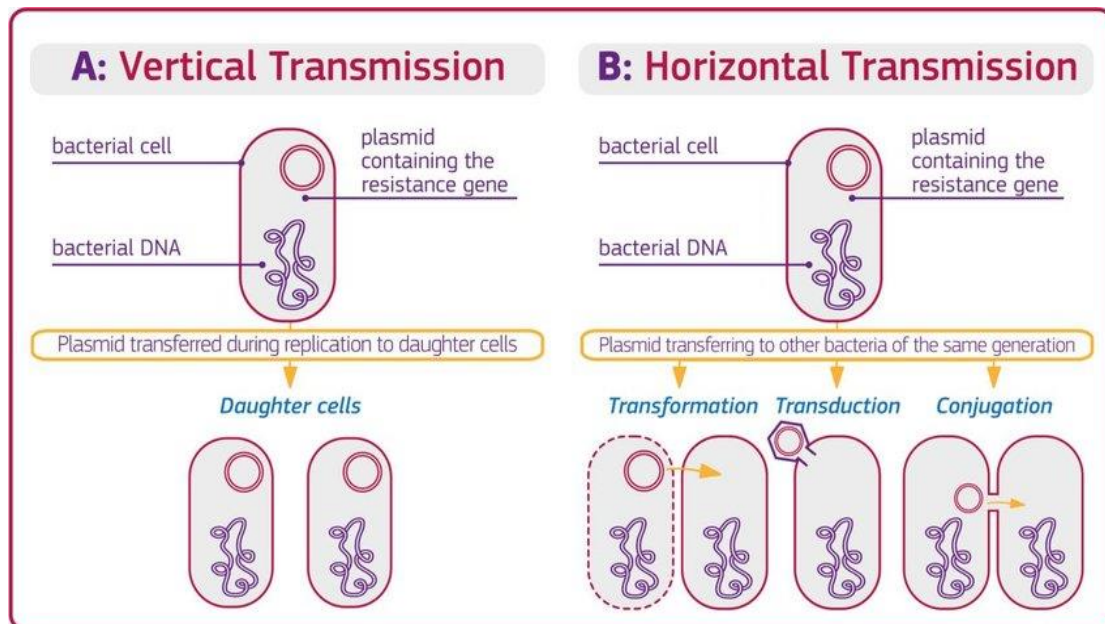
Η επίκτητη αντοχή (acquired resistance) αναπτύσσεται σε ευαίσθητα βακτήρια με διάφορους μηχανισμούς. Μπορεί να οφείλεται είτε σε αλλαγές-μεταλλάξεις στο χρωμοσωμικό DNA είτε στην απόκτηση γενετικού υλικού από άλλα βακτήρια. Αν και αρκετοί παράγοντες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επίκτητη αντοχή στις αντιμικροβιακές ουσίες, ο κύριος παράγοντας είναι η υπερβολική χρήση αντιμικροβιακών ουσιών. Η επίκτητη αντοχή εμφανίζεται με έναν από τους δύο τρόπους, είτε μέσω μεταλλάξεων βακτηριακών γονιδίων είτε μέσω της απόκτησης ξένου DNA που κωδικοποιεί γονίδια αντοχής. Τα βακτήρια μπορούν να

αναπαραχθούν γρήγορα και να οδηγηθούν σε εξελικτικές αλλαγές μέσω τυχαίων γενετικών μεταλλάξεων . Η έκθεση σε αντιμικροβιακές ουσίες δημιουργεί μια εξελικτική πίεση στα βακτήρια και παρέχει ένα πλεονέκτημα επιβίωσης στα βακτήρια που φέρουν μεταλλάξεις που τους προσφέρουν αντοχή. Εναλλακτικά, τα βακτήρια μπορούν να μεταφέρουν γενετικό υλικό από ένα κύτταρο σε ένα άλλο με μια διαδικασία γνωστή ως οριζόντια μεταφορά γονιδίων.

Η οριζόντια μεταφορά γονιδίων (HGT) οδηγεί στην απόκτηση νέων ανθεκτικών γονιδίων που υπάρχουν σε κινητά γενετικά στοιχεία, όπως πλασμίδια, τρανσποζόνια, αλληλουχίες εισαγωγής και στοιχεία που σχετίζονται με τους φάγους [21]. Υπάρχουν 3 διαδικασίες οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων :

- 1) Μεταμόρφωση (transformation)
- 2) Σύζευξη (conjugation)
- 3) Μεταγωγή (transduction)

Πρώτον, η μεταμόρφωση ορίζεται ως η άμεση πρόσληψη ελεύθερου γενετικού υλικού από το περιβάλλον, το οποίο έχει προκύψει από τη λύση άλλων βακτηρίων. Δεύτερον, η σύζευξη ορίζεται ως η μεταφορά γενετικού υλικού μέσω μεταθετών στοιχείων (mobile genetic elements, MGEs). Τα μεταθετά στοιχεία μπορεί να είναι πλασμίδια, δηλαδή κυκλικά μόρια DNA σχετικά μικρού μεγέθους ικανά να ενσωματώνουν γονίδια σε βακτηριακά χρωμοσώματα. Τρίτον, η μεταγωγή είναι η διαδικασία κατά την οποία μέσω βακτηριοφάγων μεταφέρεται γενετικό υλικό από ένα βακτήριο σε ένα άλλο γίνεται μέσω των βακτηριοφάγων [17]. Η HGT ευνοεί τη δημιουργία νέων βακτηριακών πληθυσμών, οι οποίοι φέρουν νέα ανθεκτικά γονίδια και μηχανισμούς αντοχής με αποτέλεσμα την έκφραση διαφορετικών προφίλ ανθεκτικότητας [21]. Ακόμη, η επίκτητη αντοχή αποτελεί παράδειγμα της ικανότητας των βακτηρίων να προσαρμόζονται ταχύτατα σε ένα νέο οικοσύστημα [15,17]. Τέλος, τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια μπορούν να λειτουργήσουν ως δεξαμενή AMR (Antimicrobial Resistance) για άλλα βακτήρια, τα οποία μπορούν να επιβιώσουν μέσα στο βακτηριακό πληθυσμό, ακόμη και χωρίς να φέρουν αντοχή για τα συγκεκριμένα αντιβιοτικά [21][44].



Εικόνα 5. Μηχανισμός κάθετης και οριζόντιας μεταφοράς στα βακτήρια. Α) Κάθετη μεταφορά. Κατά τη διάρκεια της αντιγραφής τα βακτήρια μεταφέρουν το γονίδιο αντίστασης που περιέχεται στο πλασμίδιο από το γονικό κύτταρο στην επόμενη γενιά. Β) Οριζόντια μεταφορά. Στα βακτήρια μπορεί να διαμεσολαθήσει από 3 μηχανισμούς: τη μεταμόρφωση, τη μεταγωγή και τη σύζευξη. Πηγή: [15]

1.4 ΜΕΤΑΘΕΤΑ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Η ύπαρξη πλασμιδίων και τρανσποζονίων ευθύνεται για την ικανότητα των Gram(-) βακτηρίων να αποκτούν γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιμικροβιακές ουσίες, καθώς και για τη διάδοση τους σε πολλά βακτηρικά είδη. Για παράδειγμα, τα γονίδια ανθεκτικότητας που εντοπίζονται στα τρανσποζόνια μπορούν να διαδοθούν σε διάφορα πλασμίδια. Κατόπιν το πλασμίδιο, μέσω οριζόντιας μεταφοράς προσβάλλει ένα άλλο βακτήριο και μεταφέρει το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αντιμικροβιακή ουσία. Εάν το πλασμίδιο φέρει την ικανότητα μεταφοράς σε περισσότερα από ένα βακτηριακά είδη, θα μπορούσε να συμβεί οριζόντια μεταφορά σε νέα είδη. Υπάρχει ακόμα ένα σύστημα για τη μεταφορά των γονιδίων ανθεκτικότητας. Αποτελείται από μια οικογένεια κινητών γενετικών μονάδων που ονομάζονται γονιδιακές κασέτες, η καθεμία περιέχει μόνο ένα γονίδιο (για ανθεκτικότητα έναντι αντιμικροβιακών ουσιών), φέρουν υποκινητή για την έκφραση των γονιδίων και το ένζυμο ευθύνεται για την κίνηση των γονιδίων [26].

1.4.1 Πλασμίδια

Τα πλασμίδια είναι εξωχρωμοσωματικά, κυκλικά, δίκλινα μόρια DNA που φέρουν την ικανότητα να αντιγράφονται αυτόνομα σε αντίθεση με το βακτηριακό χρωμόσωμα. Διακρίνονται σε:

- Συζευκτικά - αυτομεταβιβάσιμα: μεταβίβαση πλασμιδίου μεταξύ των βακτηριακών κυττάρων (Βακτηριακή σύζευξη)
- Μη συζευκτικά πλασμίδια: αδυναμία μεταβίβασης πλασμιδίου μεταξύ των βακτηριακών κυττάρων.

Η ενσωμάτωση του πλασμιδιακού γονιδιώματος στο χρωμόσωμα δημιουργεί τα επισώματα. Ακόμη, τα πλασμίδια φέρουν γονίδια υπεύθυνα για τη μεταφορά τους από ένα βακτηριακό κύτταρο σε άλλο. Στη συζευκτική μεταφορά των πλασμιδίων, συμμετέχει το σύμπλεγμα γονιδίων *tra*.

Τα πλασμίδια φέρουν γονίδια για:

- α) την αναπαραγωγή του πλασμιδίου
- β) το σχηματισμό συζευκτικών ινιδίων (*sex pilli*)
- γ) την ικανότητα σύζευξης και μεταφοράς DNA σε άλλο βακτήριο
- δ) την αντοχή στις αντιμικροβιακές ουσίες
- ε) την παραγωγή βακτηριοσινών
- στ) τη σύνθεση τοξινών
- ζ) την ανθεκτικότητα σε βαρέα μέταλλα.

Ο πολλαπλασιασμός πραγματοποιείται μόνο μέσα σε ένα κύτταρο ξενιστή. Ο αριθμός των αντιγράφων του πλασμιδίου επηρεάζει τα χαρακτηριστικά που μεταδίδονται όπως η ανθεκτικότητα στις αντιμικροβιακές ουσίες.

Η ταξινόμηση των πλασμιδίων γίνεται με βάση τις ομάδες ασυμβατότητας (*Incompatibility groups, Inc*). Ως ομάδα ασυμβατότητας ορίζεται η συνύπαρξη δυο πλασμιδίων γενετικά συγγενή στο ίδιο βακτήριο - (ίδια ομάδα *Inc*). Ωστόσο, τα πλασμίδια που ανήκουν στην ίδια ομάδα μπορεί να μην είναι συμβατά. Επιπλέον, με βάση τη γενετική συγγένεια που φέρουν, οι ομάδες ασυμβατότητας έχουν υποομαδοποιηθεί σε τέσσερις μεγάλες ομάδες:

- ομάδα *IncF* (*IncF, IncS, IncC, IncD, IncJ*)
- ομάδα *IncP* (*IncP, IncU, IncM, IncW*)
- ομάδα *Ti* (*IncX, IncH, IncN, IncT*)
- ομάδα *Incl* (*Incl, IncB και IncK*)

Τα πλασμίδια που προσδίδουν αντοχή στα αντιβιοτικά ονομάζονται R-πλασμίδια (παλαιότερος όρος είναι ο παράγοντας R) και έχουν παρόμοια χαρακτηριστικά.

Τα R-πλασμίδια είναι μέτριου έως μεγάλου μεγέθους και υπάρχουν σε ένα έως δύο αντίγραφα ανά κύτταρο ξενιστή. Η ενσωμάτωση τους είναι εφικτή σε μεμονωμένα γονίδια ανθεκτικότητας, τρανσποζόνια ή ιντεγκρόνια. Επίσης, υπεύθυνες για την αλλοίωση του αντιμικροβιακού στόχου θεωρούνται, οι χρωμοσωμικές μεταλλάξεις. Η ανθεκτικότητα στους αντιμικροβιακούς στόχους προσφέρει τη δυνατότητα επιλογής κυττάρων που φέρουν πλασμίδιο με γονίδιο ανθεκτικότητας από τα υπόλοιπα, με τη χρήση συγκεκριμένης αντιμικροβιακής ουσίας. [27,28]

1.4.2 Τρανσποζόνια (Transposons, Tn)

Τα τρανσποζόνια περιγράφονται ως μια ομάδα κινητών γενετικών στοιχείων - DNA αλληλουχιών. Χαρακτηρίζονται από την ικανότητα τους να μεταπηδούν σε διαφορετικά σημεία του γονιδιώματος. Ορισμένα τρανσποζόνια μπορούν να διατηρήσουν την θέση εισαγωγής στο γονιδίωμα ωστόσο τα περισσότερα αδρανοποιούνται και χάνουν την ικανότητα μετακίνησης τους. Τα τρανσποζόνια χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες: ρετροτρανσποζόνια (κατηγορία I) και τρανσποζόνια DNA (κατηγορία II). Κύριο ένζυμο είναι η τρανσποζάση (Tase).

Τα ρετροτρανσποζόνια (RTns) εντοπίζονται σε ευκαρυώτες, έχουν την ικανότητα μετακίνησης τόσο στο ίδιο το DNA και σε άλλα μόρια. Αρκετά Tns φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιμικροβιακές ουσίες, ενισχύοντας τη βακτηριακή αντοχή. Παρόλο που δεν έχουν την ικανότητα αντιγραφής, μέσω της αντίστροφης μεταγραφής ενισχύονται οι αλληλουχίες . Τα ρετροτρανσποζόνια ταξινομούνται σε 5 κατηγορίες ανάλογα με τη δομή και το τύπο μεταφοράς του μεταθετού στοιχείου:

- LTR (long terminal repeat): Μακρά τερματική επανάληψη, ζεύγος πανομοιότυπων αλληλουχιών
- LINE (Long interspersed nuclear elements): Μακρόχρονα πυρηνικά στοιχεία, μήκος περίπου 7.000 ζεύγη βάσεων
- SINE (Short interspersed nuclear element): Βραχυπρόθεσμα πυρηνικά στοιχεία, μη κωδικοποιητικά στοιχεία με μήκος κοντά στα 100-700 ζεύγη βάσεων
- DIRS (Diverse transposable elements)
- PLE (Penelope retrotransposons)

Οι ακολουθίες ανεστραμμένων επαναλήψεων (IRs) καθώς και το γονίδιο που ευθύνεται για την κωδικοποίηση του ενζύμου τρανσποζάσης εντοπίζονται στα δύο άκρα της αλληλουχίας DNA. Τόσο κατά την διάρκεια αποκοπής της αλληλουχίας αλλά και της προσθήκης της, οι ακολουθίες των IR αναγνωρίζονται από την τρανσποζάση.

Τα DNA τρανσποζόνια (DNA Tns) εντοπίζονται τόσο σε ευκαρυώτες όσο και σε προκαρυώτες. Στο βακτήριο εντοπίζονται τα DNA τρανσποζόνια που αποτελούν φορείς γονιδίων για την απόκτηση ανθεκτικότητας σε αντιμικροβιακές ουσίες. Απώτερος σκοπός Τα τρανσποζόνια χαρακτηρίζονται από την ικανότητα μεταφοράς από πλασμίδιο σε πλασμίδιο ή από χρωμοσωμικό DNA σε πλασμίδιο και αντίστροφα, με σκοπό τη μετάδοση γονιδίων ανθεκτικότητας. Οι θεραπείες βακτηριακών λοιμώξεων παρουσιάζουν επιπλοκές που οφείλονται στην ανθεκτικότητα στις αντιμικροβιακές ουσίες που φέρουν τα βακτήρια εξαιτίας της δράσης των τρανσποζονίων.

Το DNA Tns αναγνωρίζει τα διαφορετικά IR και χωρίζεται σε τρεις ομάδες με βάση το μηχανισμό δράσης: κοπή και επικόλληση του μεταθετού στοιχείου, μεταβλητός κύκλος, και αυτοσυνθετικά. Τα TE (μεταθετά στοιχεία της DNA Tns) διακρίνονται σε τέσσερις κατηγορίες στα βακτήρια:

- αλληλουχία εισαγωγής (IS),
- σύνθετη Tns,
- μη σύνθετη Tns(πχ. οικογένεια Tn3)
- ο μετατιθέμενος φάγος Mu

Τα κινητά στοιχεία (όπως το DNA Tns) μπορούν να προκαλέσουν την εξάπλωση της αντοχής στις αντιμικροβιακές ουσίες των βακτηρίων, ειδικά των Gram (-) αρνητικών βακτηρίων. Ακόμη, υπάρχουν και απλές μορφές του μεταθετού γενετικού στοιχείου, παρουσία μόνο του γονιδίου τρανσποζάσης.[25]

1.4.3 Ιντεγκρόνια(Integrons, Int)

Τα ιντεγκρόνια περιγράφονται ως γενετικά στοιχεία που χαρακτηρίζονται από δυο συντηρημένες περιοχές DNA, τις 5' και 3' συντηρημένες περιοχές (conserved regions, CNEs). Χαρακτηρίζονται ως μεταθετά γενετικά στοιχεία ικανά να αναγνωρίζουν και να ενσωματώνουν γονιδιακές κασέτες. Τα ιντεγκρόνια αποτελούνται από τρία δομικά στοιχεία: την ιντεγκράση, την ειδική θέση ανασυνδυασμού (*attI*) για την ενσωμάτωση της γονιδιακής κασέτας και τον κοινό υποκινητή (P) για την έκφραση των ενσωματωμένων γονιδιακών κασετών. Οι γονιδιακές κασέτες σχηματίζουν μια οικογένεια κινητών-μεταθετών στοιχείων, αρκετά διαφορετική από αυτή των τρανσποζονίων. Κάθε κασέτα περιλαμβάνει μόνο ένα γονίδιο και μια θέση ανασυνδυασμού (*attC*). Στην προκειμένη περίπτωση, τα ιντεγκρόνια διαφέρουν από τα τρανσποζόνια καθώς δεν οριοθετούνται από ανεστραμμένες επαναλήψεις ούτε κωδικοποιούν ένζυμο υπεύθυνο για τη μεταφορά τους. Τα ιντεγκρόνια περιέχουν μια θέση ανασυνδυασμού, που ονομάζεται *attI*, η οποία λειτουργεί ως θέση υποδοχέα για τις γονιδιακές κασέτες ενώ ταυτόχρονα ενεργοποιούν την ιντεγκράση *IntI*. Η ικανότητα των Gram (-) αρνητικών βακτηρίων να αποκτούν γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά και η μεταφορά τους σε πολλά βακτηριακά είδη οφείλεται στην ύπαρξη πλασμιδίων και τρανσποζονίων. [26].

1.5 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ

1.5.1 Μηχανισμοί Δράσης των αντιμικροβιακών ουσιών

Για να είναι ένα αντιβιοτικό αποτελεσματικό κατά των βακτηρίων:

- 1) πρέπει να υπάρχει ένας ευαίσθητος στα αντιβιοτικά στόχος στο κύτταρο,
- 2) το αντιβιοτικό πρέπει να μπορεί να φτάσει στο στόχο σε επαρκή ποσότητα,
- 3) το αντιβιοτικό πρέπει να μην αδρανοποιηθεί ή τροποποιηθεί.

Μηχανισμοί δράσης αντιμικροβιακών ουσιών:

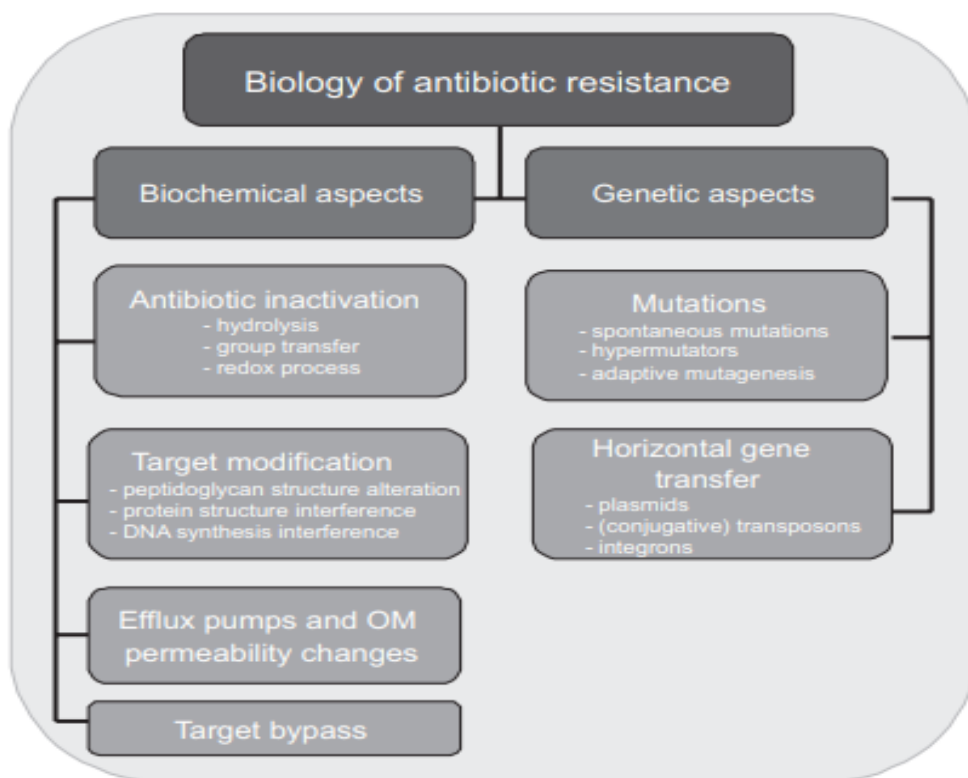
- 1) Παρεμπόδιση της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος
Για παράδειγμα, οι β-λακτάμες όπως η πενικιλίνη, εμποδίζουν τα ένζυμα που απαιτούνται για τη σύνθεση της
- 2) Αναστολή της πρωτεϊνσύνθεσης
Παραδείγματος χάριν, οι αμινογλυκοσίδες και οι τετρακυκλίνες αναστέλλουν την έναρξη της πρωτεϊνικής σύνθεσης με την πρόσδεση τους στην 30S ριβοσωμική υπομονάδα.
- 3) Παρεμπόδιση της σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων
Όπως, οι κινολόνες που διαταράσσουν τη σύνθεση του DNA παρεμβαίνοντας στις τοποϊσομεράσες τύπου II και στις τοποϊσομεράσες τύπου IV κατά τη διάρκεια της αντιγραφής, προκαλώντας αποσυσπείρωση της διπλής έλικας του βακτηριακού DNA.
- 4) Αναστολή της μεταβολικής οδού
Για παράδειγμα, οι σουλφοναμίδες παρεμποδίζουν την σύνθεση φολικού οξέος, που είναι απαραίτητο στο μονοπάτι βιοσύνθεσης νουκλεοτιδίων.
- 5) Αποδιοργάνωση της κυτταρικής μεμβράνης
Όπως, η δαπτομυκίνη η οποία συνδέεται με την κυτταροπλασματική μεμβράνη και οδηγεί σε αυξημένη εκροή καλίου και εν τελεί στον θάνατο του βακτηρίου[22].

1.5.2 Μηχανισμοί αντοχής των βακτηρίων στις αντιμικροβιακές ουσίες:

Οι μηχανισμοί αυτοί έχουν πιθανώς εξελιχθεί από γονίδια που υπάρχουν στους οργανισμούς που παράγουν αντιβιοτικά. Σε γενικές γραμμές, υπάρχουν 5 τύποι μηχανισμών αντοχής.

Αυτοί οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν:

- i. Μεταβολή στους στόχους δράσης των αντιμικροβιακών ουσιών
- ii. Αλλαγή της διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών στις αντιμικροβιακές ουσίες
- iii. Ενεργή εκροή αντιμικροβιακών ουσιών από το κυτταρόπλασμα (pumps)
- iv. Αδρενοποίηση-τροποποίηση αντιμικροβιακής ουσίας
- v. Αλλάγες της μεταβολικής οδού των βακτηρίων λόγω δράσης των αντιμικροβιακών ουσιών[16,18,19,22]



Εικόνα 6. Βιοχημικές και γενετικές πτυχές της μικροβιακής αντοχής στα αντιβιοτικά. Πηγή:[22]

i) Μεταβολή στους στόχους δράσης των αντιμικροβιακών ουσιών

Η αλληλεπίδραση της αντιμικροβιακής ουσίας και του στόχου είναι ειδική. Η τροποποίηση του μοριακού στόχου θα επηρεάσει τη δέσμευση του αντιβιοτικού στο στόχο. Ουσιαστικά, γίνεται η τροποποίηση της θέσης στόχου του αντιβιοτικού έτσι ώστε το αντιβιοτικό να μην μπορεί να συνδεθεί σωστά και διατηρηθεί η κυτταρική του λειτουργία. Οι τροποποιήσεις επιτυγχάνονται με χημικές αλλαγές για τη προστασία του αντιβιοτικού στόχου και με τη μεταβολή άλλων ευαίσθητων στόχων. Συμπεριλαμβάνεται η αλλαγή στόχων ή θέσεων δέσμευσης, όπως αλλαγή πρωτεϊνών που δεσμεύουν την πενικιλίνη ή την αλλοίωση των πρωτεϊνών που δεσμεύουν τα ριβοσώματα. Για παράδειγμα, η μετάλλαξη της DNA γυράσης-τοποισομεράση II και της τοποισομεράσης IV προσδίδουν αντοχή στις φθοριοκινολόνες, οι β-λακτάμες τροποποιούν τις πρωτεΐνες που δεσμεύουν την πενικιλίνη ενώ η ριφαμικίνη προκαλεί μεταλλάξεις στο γονίδιο της β-υπομονάδας της RNA πολυμεράσης. Ακόμη, είναι συχνό φαινόμενο οι μηχανισμοί αντοχής να οφείλονται σε φυσικές παραλλαγές ή επίκτητες αλλαγές που γίνονται στις θέσεις στόχους των αντιμικροβιακών ουσιών και εμποδίζουν τη δέσμευση του φαρμάκου. Οι αλλαγές στη θέση-στόχο μπορούν να προκύψουν από μια αυθόρμητη μετάλλαξη ενός βακτηριακού γονιδίου στο γονιδίωμα. Δεδομένου ότι η αλληλεπίδραση του αντιβιοτικού με το μόριο στόχο είναι αρκετά ειδική, μια μικρή αλλοίωση της θέσης-στόχου μπορεί να έχει σημαντική επίδραση στη δέσμευση των αντιβιοτικών. Για παράδειγμα, η μεθυλίωση του ριβοσώματος, επεμβαίνοντας στη διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης, μπορεί να

οδηγήσει σε αντοχή στα αντιμικροβιακά MLS, τα οποία είναι μακρολίδια, λινκοσαμίδες και στρεπτογραμίνες. Ένα άλλο παράδειγμα αποτελεί η παραγωγή πρωτεϊνών που δεσμεύονται στο ριβόσωμα αλλά δεν επεμβαίνουν στην πρωτεινοσύνθεση. Ταυτόχρονα, προσφέρουν προστασία από την τετρακυκλίνη. Τέλος, έχουμε και την τροποποίηση των RBPs, δηλαδή των πρωτεϊνών που συνδέονται με τις πενικιλίνες, που έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μειωμένης συγγένειας με τα αντιμικροβιακά της β-λακτάμης [18,19,20,22].

ii) Αλλαγή της διαπερατότητας των κυττάρων μεμβρανών στις αντιμικροβιακές ουσίες

Η μειωμένη συσσώρευση αντιμικροβιακού φαρμάκου δημιουργείται είτε λόγω μειωμένης διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης είτε λόγω της αυξημένης εκροής ενεργών αντιμικροβιακών φαρμάκων στην κυτταρική επιφάνεια, όπως θα δούμε και στη συνέχεια. Κυριαρχεί η μειωμένη μεταφορά μέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, παραδείγματα αποτελούν οι αμινογλυκοσίδες, οι β-λακτάμες και οι φθοροκινολόνες [20,22].

iii) Ενεργή εκροή αντιμικροβιακών ουσιών από το κυτταρόπλασμα

Η εκροή ενεργών αντιβιοτικών εκτός κυττάρου οφείλεται στη συχνή χρήση αντλιών εκροής πολλαπλών φαρμάκων που είναι δομικά παρόμοιες με την Ρ-γλυκοπρωτεΐνη, η οποία βρίσκεται στα κύτταρα θηλαστικών. Εξαιρετικά παραδείγματα αποτελούν οι πρωτεΐνες αντλίας μεταφοράς/εκροής που εξάγουν τετρακυκλίνες και φθοροκινολόνες.

Οι αντλίες εκροής είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που εξάγουν τα αντιβιοτικά από το κύτταρο και διατηρούν τις ενδοκυτταρικές του συγκεντρώσεις σε χαμηλά επίπεδα. Υπάρχουν στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, σε αντίθεση με τις πορίνες που είναι παρόντες στην εξωτερική μεμβράνη. Η μειωμένη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης (OM) εξαιτίας των πορινών, οδηγεί σε μειωμένη λήψη αντιβιοτικών. Η μειωμένη πρόσληψη και η ενεργός εκροή οδηγούν σε χαμηλό επίπεδο αντοχής σε πολλά κλινικά βακτήρια.

Ακόμη, οι αντλίες εκροής επηρεάζουν όλες τις κατηγορίες αντιβιοτικών, ιδιαίτερα τις μακρολίδες, τις τετρακυκλίνες και τις φθοροκινολόνες, επειδή αυτά τα αντιβιοτικά αναστέλλουν διαφορετικές πτυχές της βιοσύνθεσης πρωτεϊνών και DNA και επομένως πρέπει να είναι ενδοκυττάρια για να ασκήσουν την επίδρασή τους. Είναι υπεύθυνες επαγωγίμες αντλίες εκροής πολλαπλών φαρμάκων, οφείλονται για την εγγενή αντίσταση στα αντιβιοτικά πολλών οργανισμών και τη μετάλλαξη των ρυθμιστικών στοιχείων που ελέγχουν την παραγωγή αντλιών εκροής και μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση αντοχής στα αντιβιοτικά. Για παράδειγμα, η αντλία MexAB-OrfM στο *Pseudomonas aeruginosa* κανονικά ρυθμίζεται θετικά από την παρουσία

φαρμάκων, αλλά μεταλλάξεις στον ρυθμιστή του (mexR) οδηγούν στην υπερέκφραση του MexAB-OprM, το οποίο προσδίδει αυξημένη αντοχή σε αντιβιοτικά όπως οι β-λακτάμες. Και τα δύο Gram (+) θετικά και (-) αρνητικά βακτήρια μπορούν να διαθέτουν για ένα μόνο φάρμακο, πολλαπλές αντλίες εκροής [22]. Ακόμη, τα μόρια του φαρμάκου μπορούν να μεταφερθούν σε ένα κύτταρο με διάχυση μέσω των πορινών, μέσω της διπλής στιβάδας και έπειτα με επαναπρόσληψη. Τα κανάλια πορίνης εντοπίζονται στην ΟΜ αρνητικών κατά Gram (-) βακτηρίων. Τα μικρά υδρόφιλα μόρια (β-λακτάμες και κινολόνες) μπορούν να διασχίσουν την ΟΜ μόνο μέσω των πορινών. Η μείωση του πληθυσμού διαύλων πορίνης μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη είσοδο αντιβιοτικού β-λακτάμης στο κύτταρο, επομένως στην δημιουργία αντοχής στο αντιβιοτικό [20].

iv) Αδρανοποίηση & Τροποποίηση αντιμικροβιακών ουσιών

Απενεργοποίηση αντιβιοτικού είναι η άμεση αδρανοποίηση του ενεργού μορίου αντιβιοτικού. Η απενεργοποίηση ή τροποποίηση του φαρμάκου πραγματοποιείται μέσω παραγωγής ενζύμων που είτε καταστρέφουν είτε τροποποιούν το αντιβιοτικό, καθιστώντας το αναποτελεσματικό. Τα κύρια ένζυμα που αδρανοποιούν τα αντιβιοτικά είναι: οι β-λακταμάσες, τα ένζυμα τροποποίησης και η ακετυλοτρανσφεραση χλωραμφενικόλης (AACs). Για παράδειγμα, οι β-λακταμάσες έχουν την ικανότητα να υδρολύουν τα αντιβιοτικά β-λακτάμης. Χαρακτηρίζονται από την παρουσία εστέρα με αμιδικό δεσμό και υπάρχουν πάνω από 300. Οι β-λακταμάσες ταξινομούνται σε τέσσερις ομάδες με βάση τα λειτουργικά χαρακτηριστικά που φέρουν. Χωρίζεται στις κατηγορίες πενικιλινάσες, μεταλλο-β-λακταμάσες και κεφαλοσπορινάσες. Ένα άλλο παράδειγμα είναι τα ένζυμα τροποποίησης όπως των αμινογλυκοσιδίων. Στις αμινογλυκοσιδάσες ανήκουν οι ακετυλοτρανσφεράσες, φωσφοτρανσφεράσες και νουκλεοτιδυλοτρανσφεράσες. Αυτά τα ένζυμα τροποποιούν τις αμινογλυκοσίδες (AMEs) ,μειώνουν τη συγγένεια ενός τροποποιημένου μορίου, εμποδίζουν τη σύνδεση με τη 30S ριβοσωμική υπομονάδα και της ακετυλοτρανσφεράση χλωραμφαινικόλης, η οποία τροποποιεί τη χλωραμφενικόλη σε ανενεργή μορφή. Η ακετυλοτρανσφεραση χλωραμφενικόλης (AACs) βρίσκεται σε λίγα Gram (+) θετικά και Gram (-) αρνητικά βακτήρια. Ακετυλιώνουν τις υδροξυλομάδες της χλωραμφενικόλης με αποτέλεσμα να είναι αδύνατη η σύνδεση της στη ριβοσωμική υπομονάδα 50S. Οι αμυντικοί μηχανισμοί, στην κατηγορία της αδρανοποίησης των αντιβιοτικών, περιλαμβάνουν την παραγωγή ενζύμων που υποβαθμίζουν ή τροποποιούν το φάρμακο. Ακόμη, είναι οι μηχανισμοί υδρόλυσης, μεταφοράς ομάδας και οξειδοαναγωγής. Γενικά, πολλά αντιβιοτικά έχουν χημικούς δεσμούς που εύκολα υδρολύονται (π.χ. εστέρες και αμίδια) με αποτέλεσμα να δρουν ένζυμα που καταστρέφουν τη δράση των αντιβιοτικών στοχεύοντας σε αυτούς τους δεσμούς όπως η β-λακταμάση.

v) Αλλαγές της μεταβολικής οδού των βακτηρίων λόγω δράσης αντιμικροβιακών ουσιών

Αναφέρεται στην αλλοίωση των μεταβολικών οδών, όπως η ικανότητα των εντερόκοκκων να απορροφούν το φολικό οξύ από το περιβάλλον, το οποίο τους

επιτρέπει να παρακάμπτουν τις επιδράσεις της τριμεθοπριμη σουλφαμεθοξαζόλης [16,18]. Ένα παράδειγμα αυτού είναι η αντίσταση στην τριμεθοπρίμη που εμφανίζεται με την απόκτηση ανθεκτικής μορφής στα φάρμακα διυδροφολικής αναγωγής, που είναι ο στόχος της τριμεθοπρίμης. Συγκεκριμένα αυτό επιτυγχάνεται με την παράκαμψη της αναστολής της διυδροφολικής αναγωγής (DHFR) που κανονικά αναστέλλεται παρουσία τριμεθοπρίμης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να έχουμε αρκετά στελέχη ανθεκτικά στην τριμεθοπρίμη και στη σουλφοναμίδη.

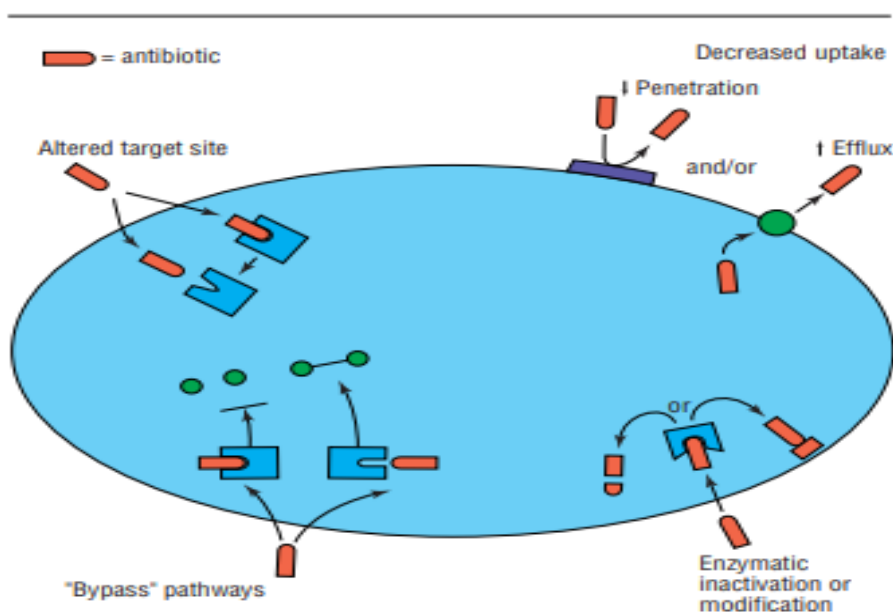


Fig 1 Four major biochemical mechanisms of antibiotic resistance

Εικόνα 7. Τέσσερις από τους πέντε κύριους βιοχημικούς μηχανισμούς αντίστασης στα αντιβιοτικά που εντοπίστηκαν στα βακτήρια. Πηγή: [16].

1.6 ΠΟΛΥΜΥΞΙΝΕΣ

Οι πολυμυξίνες είναι μεγάλα μόρια, περίπου 1200 Da. Δομικά αποτελούνται από ένα κυκλικό επταπεπτιδίο συνδεδεμένο με ένα τριπεπτιδίο ακυλιωμένο στον αμινοτελικό (NH₂) άκρο και μια αλυσίδα λιπαρού οξέος μεταβλητού μήκους. Η πολυμυξίνη Β και η κολιστίνη είναι κατιονικά αντιμικροβιακά λιποπεπτιδία που παράγονται από τα θετικά κατά Gram (+) βακτήρια *Paenibacillus polymyxa* και εντοπίστηκε για πρώτη φορά το 1947. Η πολυμυξίνη Β φέρει μια φαινυλαλανίνη στη θέση 6 του κυκλικού επταπεπτιδίου, ενώ η κολιστίνη μια λευκίνη.

Τα εμπορικά σκευάσματα πολυμυξινών, όπως πολυμυξίνη Β1, Β2 και κολιστίνη Α, Β, είναι πολλαπλών συστατικών, διαφέρουν μεταξύ τους στην Ν-τελική αλυσίδα λιπαρών οξέων. Στη πολυμυξίνη Β1 και στη κολιστίνη Α υπάρχει 6-μεθυλοοκτανοϊκό οξύ ενώ για τη πολυμυξίνη Β2 και κολιστίνη Β έχει 6-μεθυλοεπτανοϊκό οξύ. Οι πολυμυξίνες δεν διεισδύουν στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ή στην υπεζωκοτική και περιτοναϊκή κοιλότητα και δεν έχουν την ικανότητα να διαχέονται στους ιστούς [29].

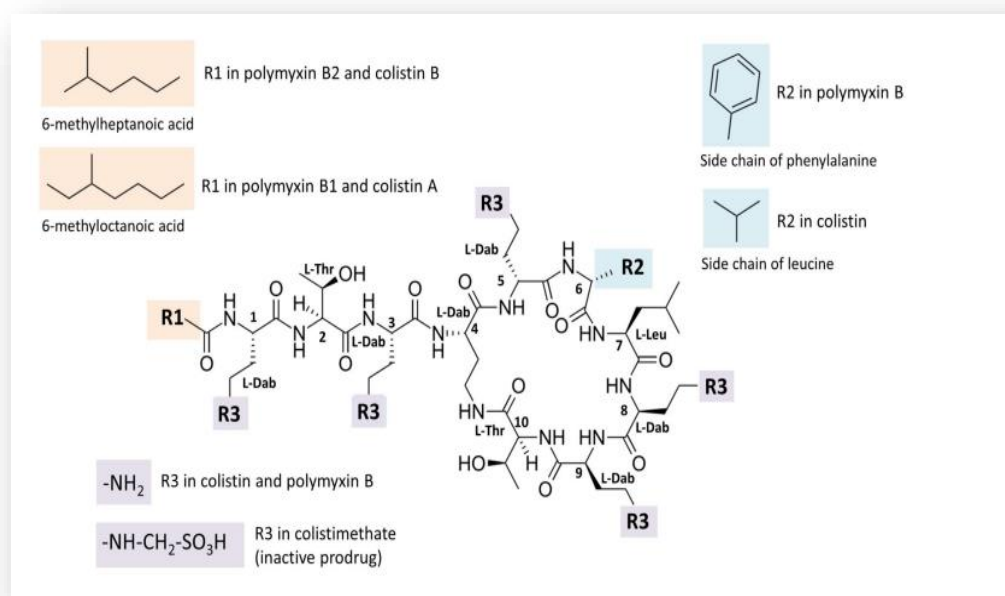
1.6.1 Μηχανισμός δράσης

Οι πολυμυξίνες στοχεύουν την εξωτερική μεμβράνη των αρνητικών (-) Gram βακτηρίων. Συγκεκριμένα, η δράση τους πραγματοποιείται μέσω της ηλεκτροστατικής αλληλεπίδραση μεταξύ του διαμινοβουτυρικού οξικού (Dab) υπολείμματος της θετικά φορτισμένης πολυμυξίνης και των φωσφορικών ομάδων στην μία πλευρά της και της αρνητικά φορτισμένης μεμβράνης του λιπιδίου A του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) στην άλλη πλευρά. Οι αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες εκτοπίζουν τα δισθενή κατιόντα (Ca_2 και Mg_2) της λιπιδιακής μεμβράνης. Επομένως, ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS) αποσταθεροποιείται, αυξάνεται η διαπερατότητα της βακτηριακής μεμβράνης με αποτέλεσμα την διαρροή του κυτταροπλασματικού περιεχομένου και εν τέλει το βακτηριακό θάνατο.

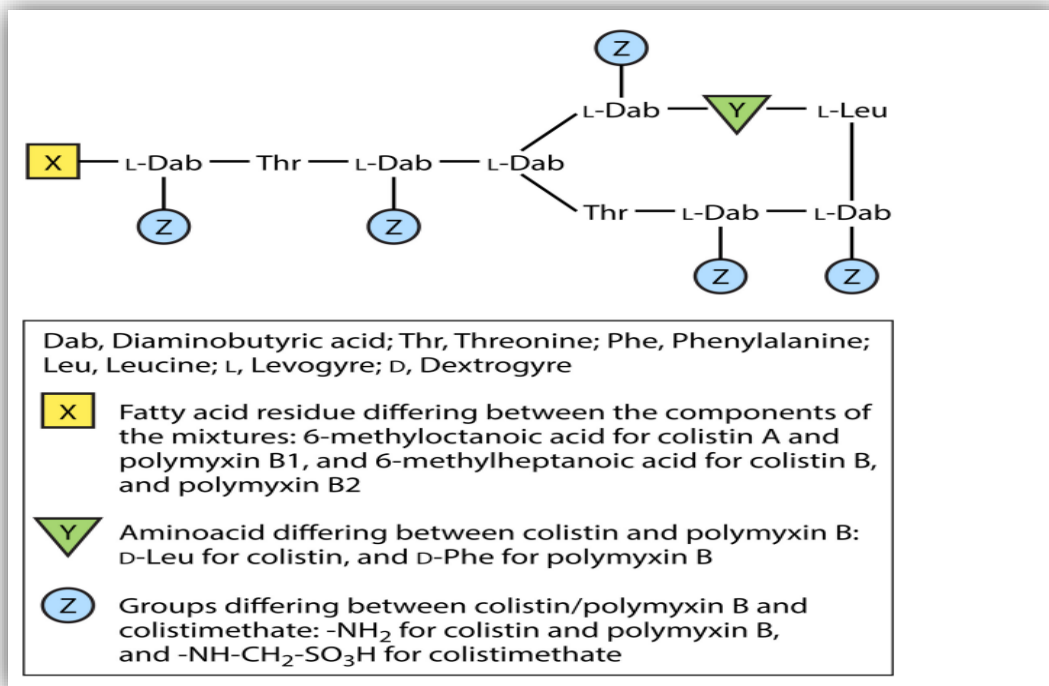
Ένας άλλος αντιβακτηριακός μηχανισμός είναι η δράση της ενδοτοξίνης. Η ενδοτοξίνη των Gram αρνητικών (-) παθογόνων αντιστοιχεί στο τμήμα λιπιδίου A του LPS. Οι πολυμυξίνες έχουν την ικανότητα σύνδεσης και εξουδετέρωσης αυτού του μορίου LPS που απελευθερώνεται κατά την κυτταρική λύση.

Τέλος, οι πολυμυξίνες μπορούν να αναστείλουν τη δράση ενός αναπνευστικού ενζύμου, της αφυδρογονάσης NADH (αναστολή τύπου II αφυδρογονάση NADH [NDH-2]) στην εσωτερική μεμβράνη των βακτηριδίων.

Αξίζει να σημειωθεί πως οι πολυμυξίνες χαρακτηρίζονται από στενό βακτηριακό φάσμα, δρουν κυρίως έναντι κοινών Gram (-) αρνητικών βακτηρίων.



Εικόνα 7. Δομές κολιστίνης A και B, πολυμυξίνης B1 και B2, και κολιστιμεθάτης. Πηγή: [32]



Εικόνα 8. Δομές κολιστίνης Α και Β, κολιστιμεθάτης Α και Β και πολυμυξίνης Β1 και Β2. Πηγή: [33]

1.6.2 Αντιβακτηριακή δράση πολυμυξίνης

Κλινική χρήση πολυμυξίνης

Τη δεκαετία του 1950, στις ΗΠΑ εφαρμόστηκε η κλινική χορήγηση της κολιστίνης. Ωστόσο, η χρήση της επανεξετάστηκε λόγω της νεφροτοξικότητας που προκαλούσε. Από τα μέσα του 1970 αντικαταστάθηκε από λιγότερους τοξικούς παράγοντες. Ωστόσο, η αυξανόμενη συχνότητα εμφάνισης πολυανθεκτικών βακτηρίων (MDR) και η απουσία νέων αντιβιοτικών οδήγησαν στην επανεισαγωγή των πολυμυξινών στις αρχές του 21ου αιώνα και η χρήση της θεωρείται η έσχατη επιλογή. Οι πολυμυξίνες απορροφούνται ελάχιστα από την πεπτική οδό με αποτέλεσμα να χορηγούνται από το στόμα προκειμένου να διατηρήσουν την ενεργότητα τους και να δράσουν στα βακτήρια του γαστρεντερικού συστήματος.

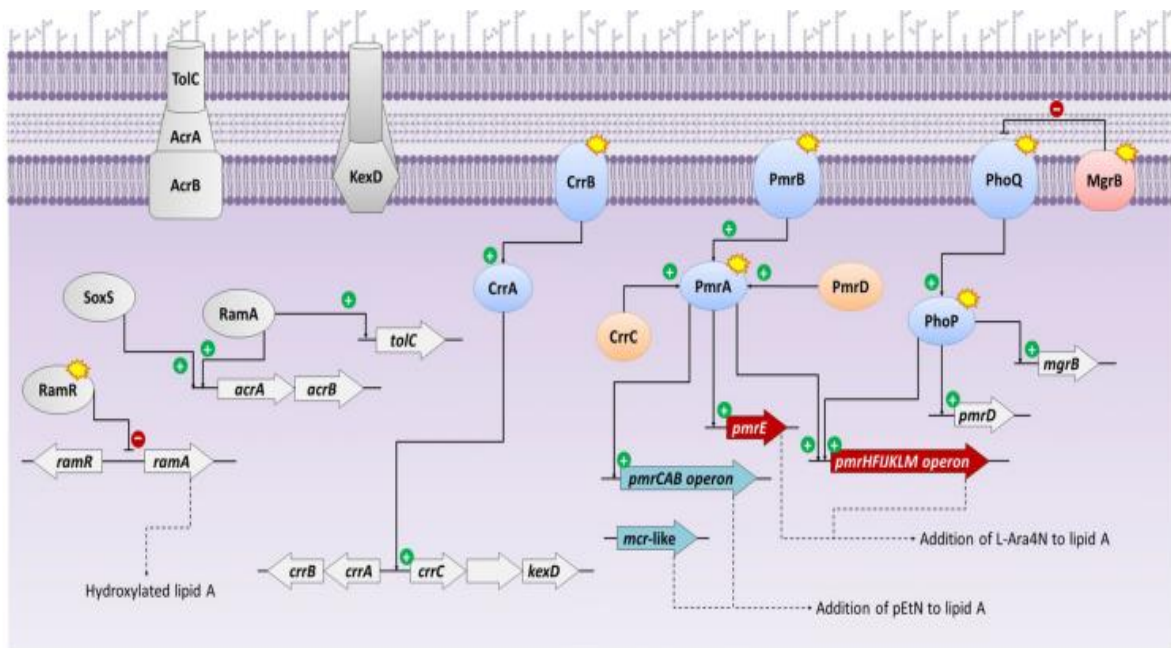
Η πολυμυξίνη Β χορηγείται παρεντερικά με τη μορφή θειικού άλατος. Κλινικές μελέτες επίσης προτείνουν ότι η πολυμυξίνη Β είναι λιγότερο νεφροτοξική από την κολιστίνη.

1.6.3 Αντοχή στην πολυμυξίνη στη τάξη Enterobacterales

Η ενεργοποίηση προσαρμοστικών μηχανισμών του βακτηρίου με στόχο την επιβίωση του σε δυσμενείς συνθήκες όπως η έκθεση σε κατιονικά αντιμικροβιακά πεπτίδια, το χαμηλό pH, οι χαμηλές συγκεντρώσεις Mg^{2+} και υψηλές Fe^{3+} , οι συγκεντρώσεις Al^{3+} και η φαγοκυττάρωση από μακροφάγα. Οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν την τροποποίηση του LPS η οποία επιτυγχάνεται με τη μείωση του αρνητικού φορτίου του μέσω κατιονικής υποκατάστασης. Η ρύθμιση των προσαρμοστικών μηχανισμών πραγματοποιείται με τη μεσολάβηση δύο συστατικών συστημάτων (TCS), κυρίως των PhoP/PhoQ και PmrA/PmrB. Οι μεταλλάξεις των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα των συστημάτων TCS, οδηγούν στην υπερέκφραση γονιδίων και οπερονίων που συμμετέχουν στην τροποποίηση του LPS. Με αποτέλεσμα την προσθήκη κατιονικών ομάδων στις φωσφορικές ομάδες των λιπιδίων A του λιποπολυσακχαρίτη LPS. Η παραπάνω διαδικασία έχει ως στόχο την μείωση αρνητικού φορτίου του LPS, συνεπώς την απώλεια συγγένειας με τις πολυμυξίνες και την εμφάνιση ενός ανθεκτικού φαινοτύπου. Οι κύριες τροποποιήσεις χαρακτηρίζονται από τη προσθήκη φωσφοαιθανολαμίνης (pEtN) και του 4-αμινο 4-δεοξυ-1-αραβινόζης (1-Ara4N) στο λιποπολυσακχαρίτη. Οι παραπάνω προσθήκες προσφέρουν ανθεκτικότητα στη πολυμυξίνη στα βακτήρια της τάξης Enterobacterales. Η παραπάνω διαδικασία αποτελεί παράδειγμα επίκτητης αντοχής. Στην παρακάτω εικόνα, απεικονίζονται ορισμένα γονιδιακά συστήματα καθώς και οπερονίων που κωδικοποιούν ένζυμα-ρυθμιστές. Τα συγκεκριμένα ένζυμα συμμετέχουν στην τροποποίηση του λιποπολυσακχαρίτη LPS και στην εμφάνιση ανθεκτικότητας στην πολυμυξίνη.[33]

Η απόκτηση αντοχής στη πολυμυξίνη, σε Gram (-) αρνητικά βακτήρια οφείλεται σε τροποποιήσεις των λιποπολυσακχαριτών (LPS) μέσω διαφόρων οδών, όπως :

1. Με την προσθήκη κατιονικών ομάδων για τη μείωση του αρνητικού φορτίου του LPS και την αποτροπή της σύνδεσης πολυμυξινών
2. Με την απώλεια του LPS και άρα την απώλεια του στόχου πολυμυξίνης
3. Με την υπερπαραγωγή του πολυσακχαρίτη κάψουλας (CPS) που φέρει θέσεις δέσμευσης πολυμυξίνης
4. Με την απελευθέρωση των μορίων CPS- πολυμυξίνες



Εικόνα 9. Σχήμα των μηχανισμών επίκτητης αντοχής στις πολυμυξίνες σε *Enterobacteriales*. Οι μεταλλάξεις που σχετίζονται με την αντοχή στη πολυμυξίνη απεικονίζονται με κίτρινα αστέρια. Πηγή: [32]

- **pmrCAB**

Το οπερόνιο *pmrCAB* κωδικοποιεί την τρανσφεράση φωσφοαιθανολαμίνης PmrC (η οποία ονομάζεται και ErtA), η οποία προσθέτει pEtN στο λιπίδιο A του λιποπολυσακχαρίτη LPS. Η κινάση τυροσίνης PmrB και ο ρυθμιστής απόκρισης tor PmrA, συνθέτουν το PmrAB TCS. Το PmrB ενεργοποιεί το PmrA με φωσφορυλίωση και το PmrA με τη σειρά του ενεργοποιεί τη μεταγραφή των οπερονίων *pmrCAB* και *pmrHFJKLM* και του γονιδίου *pmrE*. Έχουν περιγραφεί μεταλλάξεις στα γονίδια *pmrA* και *pmrB* που ευθύνονται για την ενεργοποίηση του PmrAB TCS.

- **qseBC**

Το TCS *qseBC* ρυθμίζει την έκφραση για πάνω από 50 γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες του μαστιγίου όπως οι πρωτεΐνες κινητήρα, και τις πρωτεΐνες με παθογόνο δράση, ως απόκριση στις περιβαλλοντικές αλλαγές. Το *qseB* χαρακτηρίζεται ως ένας μη συγγενής ρυθμιστής απόκρισης του PmrB.

- **pmrHFJKLM και pmrE**

Αυτό το οπερόνιο (γνωστό και ως *arnBCADTEF*) και το γονίδιο *pmrE* (ονομάζεται και *ugd*), κωδικοποιούν μια σειρά ενζύμων που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση l-Ara4N από τη διφωσφορική ουριδίνη γλυκουρονικού οξέος και τη σύνδεση του στο λιπίδιο A.

- **phoPQ**

Το οπερόνιο κωδικοποιεί τη ρυθμιστική πρωτεΐνη PhoP και την κινάση PhoQ. Η κινάση PhoQ ενεργοποιεί το PhoP με τη δημιουργία φωσφορικού δεσμού, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί το οπερόνιο *pmgHF IJKLM* και το *PmgA*. Αρκετές μεταλλάξεις στα γονίδια *phoP* και *phoQ* οφείλονται για την ενεργοποίηση του PhoPQ TCS και την απόκτηση αντοχής στις πολυμυξίνες.

- **mgrB**

Το ενεργοποιημένο PhoP αυξάνει την παραγωγή της πρωτεΐνης MgrB, η οποία εισχωρεί στην εσωτερική μεμβράνη και καταστέλλει το PhoQ. Το αποτέλεσμα είναι η μείωση της ρύθμισης του PhoPQ TCS. Το γονίδιο *mgrB* έχει αναφερθεί και στο βακτήριο *Klebsiella*.

Οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας στην πολυμυξίνη μπορούν να αναγνωριστούν με την αλληλούχηση των συγκεκριμένων γονιδίων. Ωστόσο, πρέπει να ληφθεί υπόψη πως πολλοί μηχανισμοί αντίστασης δεν μπορούν ακόμα να ερμηνευτούν. Πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στους ήδη γνωστούς μηχανισμούς μπορούν να διαφοροποιηθούν με αποτέλεσμα να είναι άγνωστος ο τρόπος με τον οποίο συμμετέχουν στη βιοσύνθεση του LPS και στην απόκτηση ανθεκτικότητας στη πολυμυξίνη. Επίσης, η ποσότητα των πρωτεϊνών μπορεί να επηρεάσει το επίπεδο βακτηριακής αντοχής [33].

1.7 ΚΟΛΙΣΤΙΝΗ

1.7.1 Γενικά Χαρακτηριστικά της κολιστίνης

Η απομόνωση της κολιστίνης από το βακτήριο *Paenibacillus polymyxa subsp. Colistinus*, έλαβε χώρα το 1947 για πρώτη φορά. Η κολιστίνη (γνωστή και ως πολυμυξίνη E) είναι μια πολυπεπτιδική κατιονική αντιμικροβιακή ουσία. Το μόριο της πολυμυξίνης αποτελείται από ένα πεπτιδίο και ένα λιπαρό υπόλειμμα οξέος. Με βάση την αλληλουχία αμινοξέων του πεπτιδίου, πέντε παραλλαγές πολυμυξίνης (A – E) μπορούν να διακριθούν, αλλά μόνο δύο παραλλαγές χρησιμοποιούνται στην ιατρική, η B και η E (κολιστίνη). Η κολιστίνη είναι δραστική μόνο έναντι των αρνητικών κατά Gram (-) βακτηρίων (GNB), όπως τα αερόβια βακτήρια της τάξης *Enterobacterales*. Χρησιμοποιείται για τη θεραπεία λοιμώξεων από εντεροβακτηρίδια (CRE) ανθεκτικά στις καρβαπενέμες που ανήκουν σε πολυανθεκτικές απομονώσεις στελεχών.

Η κολιστίνη και η πολυμυξίνη Β ανήκουν στην κατηγορία των πολυμυξινών, η οποία χαρακτηρίζεται ως η κατηγορία αντιβιοτικών με τη μεγαλύτερη δράση έναντι των περισσότερων αρνητικών κατά Gram (-) βακτηρίων.

Ο αντιβακτηριδιακός μηχανισμός του βασίζεται στην ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση μεταξύ αμινομάδων κολιστίνης και υπομονάδων λιπιδίου Α λιποπολυσακχαρίτη (LPS). Τα ιόντα Mg^{2+} και Ca^{2+} εκτοπίζονται από το LPS, με αποτέλεσμα να παρουσιάζονται διαταραχές στη δομή της εξωτερικής μεμβράνης του κυττάρου. Αυτό έχει ως συνέπεια την αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης και, κατά συνέπεια, επέρχεται ο βακτηριακός θάνατος.

Η αντιβακτηριακή δράση της κολιστίνης εξαρτάται από τη συγκέντρωση της, είναι εξαιρετικά γρήγορη καθώς τα αποτελέσματα της δράσης της εμφανίζονται 5 λεπτά μετά την χορήγηση.

Η αντοχή κάνει την επιλογή και τη χρήση αντιμικροβιακών παραγόντων δύσκολη έναντι μικροβίων ανθεκτικών στην κολιστίνη καθώς εξαρτάται από την ευαισθησία των βακτηρίων, τον φαινότυπο τους, τον τύπο και τη θέση μόλυνσης και τις αντιμικροβιακές ιδιότητες που φέρουν [33-40].

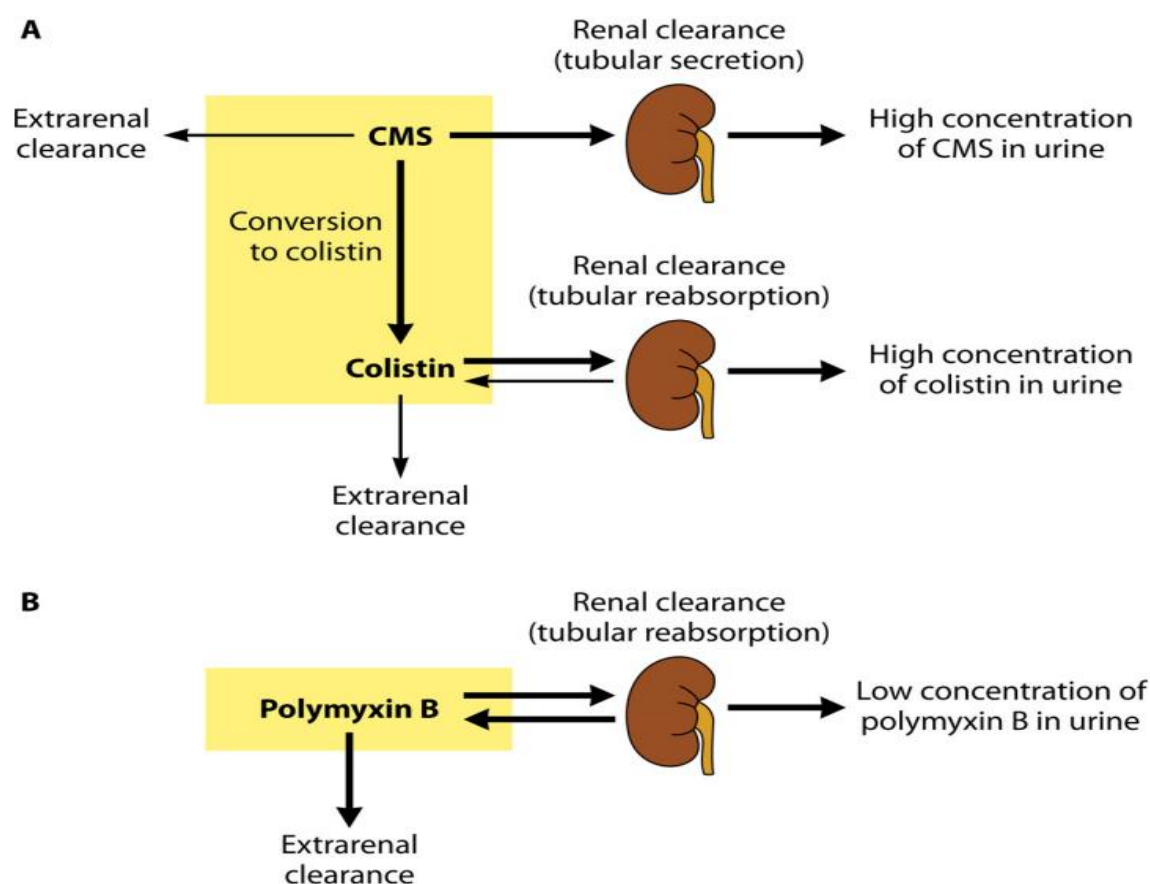
1.7.2 Χρήση στην ιατρική

Η κολιστίνη έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως εδώ και δεκαετίες για τη θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από αρνητικά κατά Gram (-) βακτήρια. Ωστόσο, τη δεκαετία του 1970, λόγω της τοξικότητάς της, ιδιαίτερα της νεφροτοξικότητας, η χρήση της επανεξετάστηκε. Στη συνέχεια αντικαταστάθηκε από νέες, πιο δραστικές και λιγότερο τοξικές αντιμικροβιακές ουσίες όπως οι αμινογλυκοσίδες, οι κινολόνες και οι λακτάμες. Έγινε χρήση νεφροτοξικής κολιστίνης μόνο σε ασθενείς με κυστική ίνωση. Η κολιστίνη επί του παρόντος αποτελεί τη μόνη αποτελεσματική αντιμικροβιακή ουσία κατά των πολυανθεκτικών μικροοργανισμών, ιδιαίτερα ανθεκτικών βακτηρίων στην καρβαπενεμάση. Εμφανίζει αρκετές παρενέργειες όπως νεφροτοξικότητα και νευροτοξικότητας και αποτελεί αντένδειξη η χρήση σε ασθενείς με βεβαρυσμένο ιστορικό. Φυσικές μορφές της κολιστίνης είναι διαθέσιμες, η θειική κολιστίνη (CS) για στοματική και τοπική χρήση και μεθανοσουλφονική κολιστίνη (CMS) για παρεντερική χρήση.

Το πιο κοινό εμπορικά διαθέσιμο παρεντερικό σκεύασμα του προφαρμάκου κολιστίνης, είναι η μεθανοσουλφονική κολιστίνη (CMS) γνωστή και ως Colomycin. Η θειική κολιστίνη (CS) μπορεί να χορηγηθεί από το στόμα ως δισκίο και τοπικά για την θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων του δέρματος. Τόσο η θειική κολιστίνη (CS) όσο και η μεθανοσουλφονική κολιστίνη (CMS) μπορεί να χορηγηθεί με τη χρήση εισπνοών.

Η κολιστίνη δεν μπορούσε να διαφοροποιηθεί λόγω έλλειψης κατάλληλων τεχνικών, άλλο ένα εμπόδιο που περιορίζει την πρόοδο σε αυτόν τον τομέα. Η πρόσφατη ανάπτυξη μεθόδων χρωματογραφίας, επιτρέπουν την ποσοτική αξιολόγηση κάθε

ένωσης ξεχωριστά. Η κολιστίνη αποβάλλεται κυρίως με μη νεφρικό τρόπο λόγω της εκτεταμένης νεφρικής της δράσης στη σωληναριακή επαναρρόφηση (11, 40). Αν και η κολιστίνη απεκκρίνεται ελάχιστα στα ούρα, η συγκέντρωσή της μπορεί να είναι σχετικά υψηλή μετά τη χορήγηση του CMS λόγω της μετατροπής του CMS (που απεκκρίνεται σε μεγάλο βαθμό από τα νεφρά) σε κολιστίνη εντός του ουροποιητικού συστήματος. Η χορηγούμενη δόση καθορίζει την αποτελεσματικότητα και τη τοξικότητα της κολιστίνης. Προτεινόμενη δοσολογία ορίζεται αυτή που μεγιστοποιεί την αντιμικροβιακή της δράση και ελαχιστοποιεί την πιθανότητα εμφάνισης επιπτώσεων καθώς και την ανάπτυξη αντοχής.[33,40]



Εικόνα 10. Απεικόνιση των φαρμακοκινητικών οδών για την κολιστιμεθάτη (CMS) και την κολιστίνη (A) και για πολυμυξίνη Β (B). Το πάχος των βελών δείχνουν τα σχετικά μεγέθη που αντιστοιχούν στις οδούς κάθαρσης όταν η νεφρική λειτουργία είναι φυσιολογική. Το CMS περιλαμβάνει τα πλήρως και μερικά μεθανοσουλφονούχα της κολιστίνης. Πηγή[33]

1.7.3 Χρήση στην Κτηνιατρική

Σε αντίθεση με την ιατρική, στην κτηνιατρική η κολιστίνη χρησιμοποιείται εκτενώς για δεκαετίες για τη θεραπεία και την πρόληψη μολυσματικών ασθενειών. Η πλειονότητα της πολυμυξίνης που χορηγείται γίνεται δια του στόματος σε διάφορες μορφές όπως μίγμα, σκόνη ή πόσιμα διαλύματα. Η κύρια χρήση της σχετίζεται με

εντεροβακτηριακές γαστρεντερικές λοιμώξεις, που προκαλούνται από *E.coli* σε πτηνά και χοίρους.

Εντεροβακτηριακές λοιμώξεις οι οποίες δεν θεραπεύτηκαν με την χορήγηση κολιστίνης αποτελούν εξαίρεση. Το αποτέλεσμα αυτό οφείλεται στην πρόσφατη ταυτοποίηση των γονιδίων *mcr-1/mcr-2* που φέρουν το υπεύθυνο πλασμίδιο, τα προϊόντα των οποίων προσδίδουν αντοχή στη κολιστίνη. Ταυτοποίηση αυτών των γονιδίων μπορεί να θεωρείται ένδειξη αντοχής ή μειωμένης ευαισθησίας στις πολυμυξίνες. Ακόμη μεταλλάξεις πορινών και υπερέκφραση γονιδίων σχετιζόμενα με το σύστημα αντλία – εκροή μπορούν να επιφέρουν αντοχή στη κολιστίνη. Πιθανόν, η φαινοτυπική αντίσταση στις κολιστίνες να είναι αποτέλεσμα του συνδυασμού διάφορων μηχανισμών αντοχής (π.χ. ελαττώματα στις εξωτερικές πρωτεΐνες της μεμβράνης σε συνδυασμό με τη δομική τροποποίηση του LPS).

Επίσης, η θεϊκή κολιστίνη ήταν σε μεγάλο βαθμό γνωστή για δεκαετίες στην κτηνιατρική για τη θεραπεία εντερικών λοιμώξεων σε χοίρους, πτηνά και βοοειδή, οι οποίες προκλήθηκαν από στελέχη της τάξης *Enterobacterales*, *E.coli* και *Salmonella spp.* [33,40]

1.7.4 Μηχανισμοί αντοχής στη κολιστίνη

Η πιο σύνηθες τροποποίηση είναι του λιποπολυσακχαρίτη LPS μέσω κατιονικής υποκατάστασης, παρόμοια με αυτή που παρατηρείται σε βακτήρια με αντοχή στις πολυμυξίνες. Μέχρι στιγμή γνωστός είναι μόνο ο παρακάτω μηχανισμός αντίστασης αλλά έχουν εντοπιστεί κι άλλοι που κωδικοποιούνται χρωμοσωμικά.

Σε στελέχη που εκ φύσεως φέρουν ανθεκτικότητα στην κολιστίνη, παρατηρήθηκε προσθήκη κατιονικών ομάδων (L-Ara4N και pEtN) στο LPS, η οποία είναι υπεύθυνη για την απόκτηση αντοχής στη κολιστίνη στα Εντεροβακτηρίδια. Ακόμη, για την ποιοτική τροποποίηση των λιποπολυσακχαριτών LPS, δρα μια μεγάλη ομάδα γονιδίων και οπερονίων. Τα γονίδια και τα οπερόνια κωδικοποιούν ένζυμα που οφείλονται για την τροποποίηση του LPS. Για παράδειγμα, γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση των κατιονικών ομάδων και της προσθήκης τους στο LPS, όπως το γονίδιο *pmrC*, το γονίδιο *pmrE* και το οπερόνιο *pmrHFJKLM*. Ακόμα, συμπεριλαμβάνονται ρυθμιστικά γονίδια, όπως αυτά που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στα συστήματα *PmrAB* και *PhoPQ*.

Παρακάτω αναφέρονται ορισμένα από τα γνωστά γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα που τροποποιούν το LPS.

- Το γονίδιο *pmrC*

Το οπερόνιο *pmrCAB* κωδικοποιεί τρεις πρωτεΐνες, τη φωσφοτρανσφεράση *PmrC* της φωσφοαιθανολαμίνης (pEtN), τον ρυθμιστή απόκρισης *PmrA* (ονομάζεται και *BasR*) και την πρωτεϊνική κινάση. Η φωσφοτρανσφεράση *PmrC* προσθέτει μια ομάδα φωσφοαιθανολαμίνης (pEtN) στο λιποπολυσακχαρίτη LPS.

- Το οπερόνιο *pmrHFJKLM* και το γονίδιο *pmrE*

Το οπερόνιο *pmrHFJKLM* (ονομάζεται και οπερόνιο *arnBCADTEF* ή *pbgPE*) κωδικοποιεί συνολικά επτά πρωτεΐνες. Το γονίδιο *pmrE* και το οπερόνιο *pmrHFJKLM*

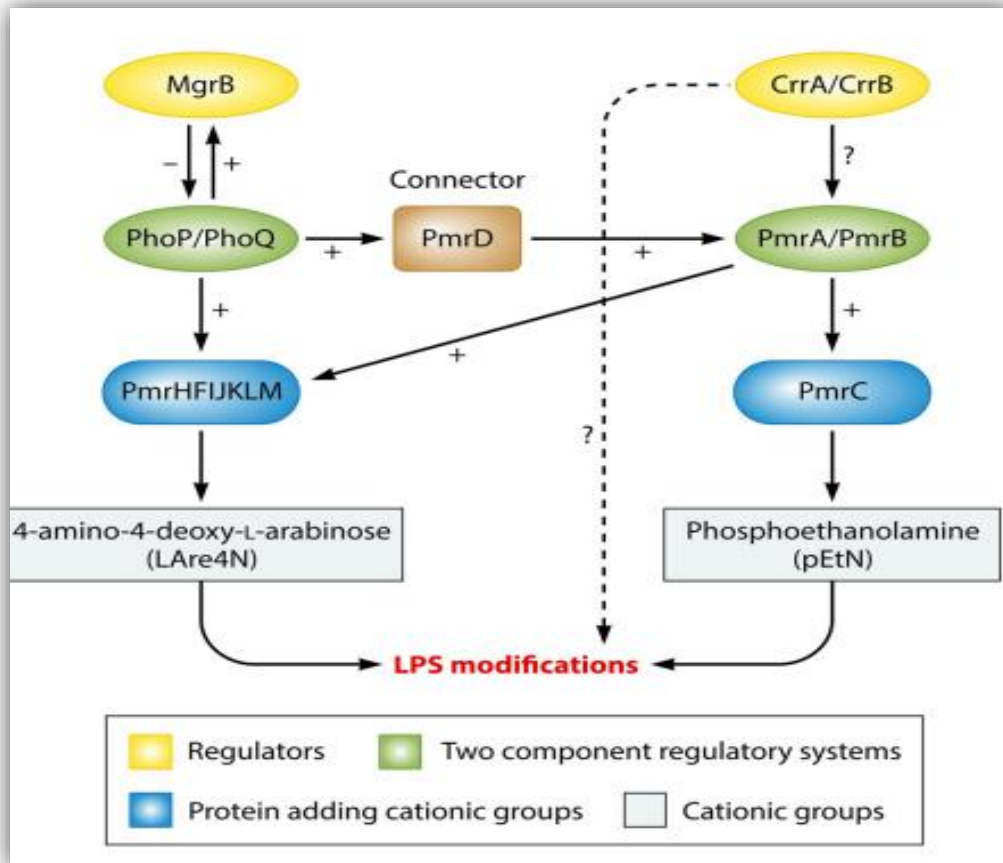
είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση της Ομάδα L-αμινοαραβινόζης (L-Ara4N) και τη σύνδεση της στο λιπίδιο A.

- Τα γονίδια *pmrA* και *pmrB*

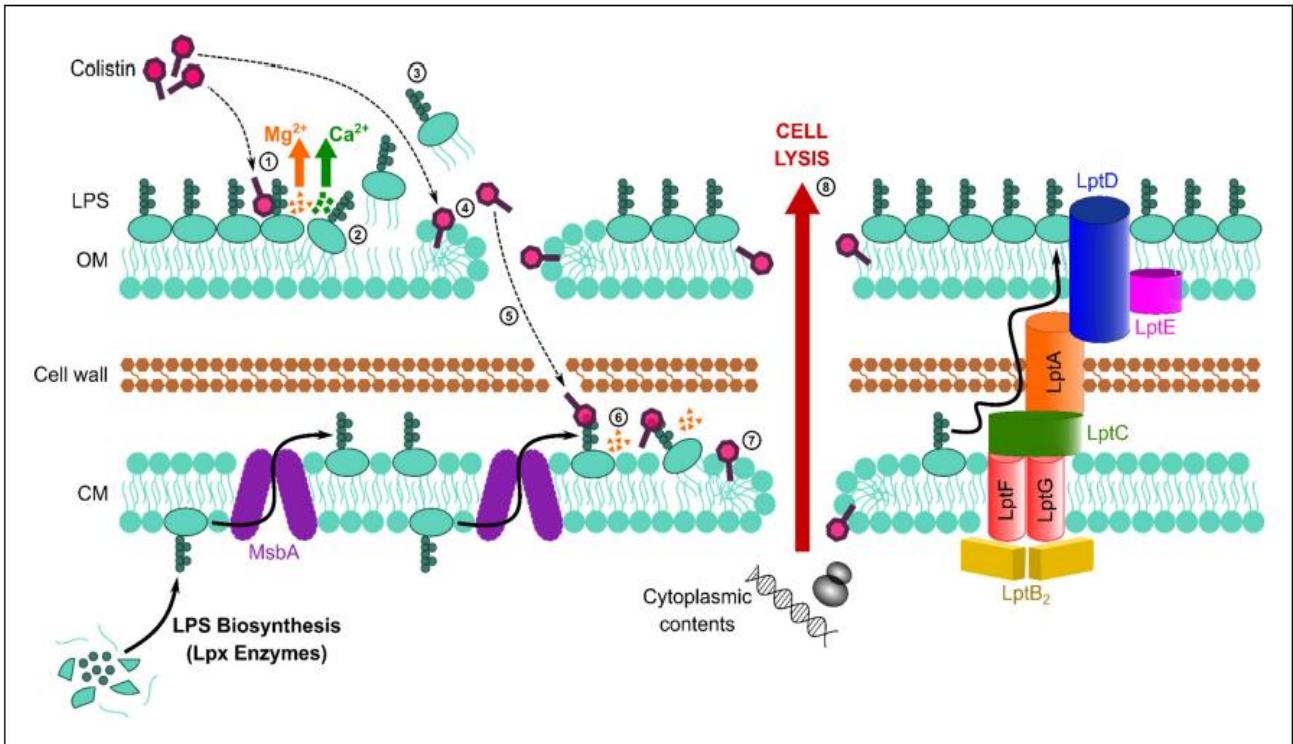
Τα παραπάνω γονίδια κωδικοποιούν το σύστημα δύο συστατικών *PmrAB*. Η ενεργοποίηση του *PmrB* επιτυγχάνεται από την εμφάνιση περιβαλλοντικών ερεθισμάτων όπως η εμφάνιση φαγοσωμάτων, μακροφάγων, σιδήρου (Fe^3), αλουμινίου (Al^3) και χαμηλού pH (π.χ. pH 5,5). Τα δύο συστατικά *PmrAB* και *PhoPQ* του συστήματος ενεργοποιούνται από την βακτηριακή φαγοκυτάρωση από μακροφάγα και επιτρέπουν την επιβίωση των βακτηρίων. Το *PmrB* είναι μια πρωτεΐνη με δραστηριότητα κινάση τυροσίνης που ενεργοποιεί το *PmrA* με φωσφορυλίωση. Το *PmrA* με τη σειρά του ενεργοποιεί τη μεταγραφή του οπερονίου *pmrCAB*, του οπερονίου *pmrHFIJKLM* και του γονιδίου *pmrE* που εμπλέκεται στην τροποποίηση του LPS με τη προσθήκη *pEtN* και L-Ara4N. Ακόμα, η ύπαρξη πολυμορφισμού στα γονίδια *pmrAB*, του ανθεκτικού βακτηρίου *E. coli* στην κολιστίνη, και η εμπλοκή αυτών των μεταλλάξεων οφείλονται για την αντίσταση στην κολιστίνη.

- Τα γονίδια *phoP* και *phoQ*

Τα παραπάνω γονίδια, κωδικοποιούν το σύστημα δύο συστατικών *PhoPQ*. Το οπερόνιο *phoPQ* κωδικοποιεί δύο πρωτεΐνες, δηλαδή τη ρυθμιστική πρωτεΐνη *PhoP* και τη πρωτεϊνική κινάση *PhoQ*. Περιβαλλοντικά ερεθίσματα, όπως τα μακροφάγα φαγοσώματα, το χαμηλό μαγνήσιο (Mg_2) και το χαμηλό pH (π.χ. pH 5,5), μεσολαβούν στην ενεργοποίηση του *PhoQ* μέσω της περιπλασματικής περιοχής του. Το σύστημα δύο συστατικών *PhoPQ* επιτρέπει την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν τη μεταφορά μαγνησίου (Mg_2) καθώς και ένζυμων που τροποποιούν το λιποπολυσακχαρίτη LPS ώστε να επιτραπεί η ανθεκτικότητα σε κατιονικά αντιμικροβιακά πεπτιδία. Ακόμη, επιτρέπει τη δράση ενζύμων που ελαττώνουν το κυτταρικό στρες που μπορεί να οφείλεται σε όξινο pH ή λοιμογόνους παράγοντες. Οπότε, το σύστημα συμβάλει στην επιβίωση των βακτηρίων σε συνθήκες χαμηλού μαγνησίου (Mg_2), όξινου pH ή παρουσία κατιονικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων. Το *PhoQ* είναι μια πρωτεΐνη με δραστηριότητα κινάση-τυροσίνης και φωσφορυλιώνει το *PhoP* για να το ενεργοποιήσει. Το *PhoP* ενεργοποιεί τη μεταγραφή του οπερονίου *pmrHFIJKLM*, για να γίνει η προσθήκη L-Ara4N στο λιποπολυσακχαρίτη LPS. Επιπλέον, το *PhoP* έχει την ικανότητα ενεργοποίησης της πρωτεΐνης *PmrA*, είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω της πρωτεΐνης *PmrD*, με αποτέλεσμα τη προσθήκη *pEtN* στο λιποπολυσακχαρίτη LPS. Επίσης, έχει αναφερθεί μετάλλαξη που εμπλέκεται στην ανθεκτικότητα της κολιστίνης σε στελέχη *E. coli*. Αυτές οι μεταλλάξεις είναι υπεύθυνες για τη ενεργοποίηση του συστήματος δύο συστατικών *PhoPQ*, που οδηγεί σε ρύθμιση του οπερονίου *pmrHFIJKLM*, στη σύνθεση του L-Ara4N και τη μεταφορά του στο λιπίδιο A. [33,38]



Εικόνα 11. Μονοπάτια ρύθμισης των τροποποιήσεων του LPS. Πηγή : [33]



Η κολιστίνη σκοτώνει τα βακτήρια στοχεύοντας το λιπολυσακχαρίτη LPS τόσο στην εξωτερική όσο και στην κυτταροπλασματική μεμβράνη με αποτέλεσμα τη διάσπαση του κυτταρικού φακέλου και τη βακτηριακή λύση. Η κολιστίνη συνδέεται με το LPS στο OM (1), μετατοπίζονται τα κατιόντα που σχηματίζουν γέφυρες μεταξύ των μορίων LPS, γεγονός που οδηγεί σε αποσταθεροποίηση του OM (2). Αποτέλεσμα της αποδυνάμωσης των διαμοριακών δεσμών στη μονοστιβάδα LPS, εμφανίζεται με την απελευθέρωση του LPS από την βακτηριακή επιφάνεια (3), επιτρέποντας στην κολιστίνη να δράσει περαιτέρω στο OM μέσω της πολυμυξινικής ουράς λιπιδίων που φέρει (4). Οπότε, η κολιστίνη έχει πρόσβαση στο περίπλασμα και αλληλεπιδρά με το LPS στο CM (5) που αναμένει τη μεταφορά του στο OM. Ο μηχανισμός LptABCDEF μόλις συντεθεί στο κυτταρόπλασμα, διαφεύγει στην εξωτερική πλευρά του CM από το MsbA. Έτσι, η δέσμευση με το LPS έχει ως αποτέλεσμα την μετατόπιση των κατιόντων και τη διακοπή της CM (6), την οποία διαπερνά (7), με αποτέλεσμα την απώλεια κυτταροπλασματικού περιεχομένου, τη κυτταρική λύση και εν τέλει το βακτηριακό θάνατο.

Εικόνα 11. Δράση της κολιστίνης στα βακτήρια. Πηγή: [38]

1.7.5 Αντοχή στη κολιστίνη – γονίδια *mcr*

Για τα γονίδια αντοχής στη κολιστίνη είναι γνωστό πως:

- (i) η εξάπλωση του *mcr-1* δεν αποτελεί πρόσφατο γεγονός, φέρει παγκοσμίου εύρους εξάπλωση, πιθανών λόγω της θέσης του σε συζευκτικά πλασμίδια.
- (ii) η *E. coli* αποτελεί τη κύρια δεξαμενή του γονιδίου αντοχής κολιστίνης της μεταξύ ανθρώπων, ζώων και περιβάλλοντος
Να σημειωθεί πως ο WHO έχει πλέον συμπεριλάβει την κολιστίνη στον κατάλογο με τις αντιμικροβιακές ουσίες ύψιστης κρίσιμης σημασίας.

Η προέλευση του *mcr-1* είναι ζωική. Σύμφωνα με αναφορές ο αριθμός ζωικών δειγμάτων που φέρουν το γονίδιο είναι υψηλός ωστόσο υπάρχει έντονη χρήση της κολιστίνης στο τομέα της κτηνιατρικής.

Η βακτηριακή αντίσταση στην κολιστίνη μπορεί να κωδικοποιηθεί με μεταθετά γενετικά στοιχεία, κυρίως πλασμίδια με *mcr* γονίδια. Μέχρι στιγμής, έχουν εντοπιστεί εννέα παραλλαγές των γονιδίων *mcr*, *mcr-1* – *mcr-9*. Το μεσολαβούμενο από πλασμίδιο, γονίδιο *mcr-1*, εύθυνεται για την οριζόντια μεταφορά του γονιδίου αντοχής στη κολιστίνη και περιεγράφηκε πρώτη φορά από απομονώσεις *E. coli* και *K. pneumoniae* στην Κίνα μεταξύ 2011 και 2014. Η κωδικοποιημένη πρωτεΐνη MCR-1 είναι μέλος της οικογένειας ενζύμων τρανσφεράσης φωσφοαιθανολαμίνης. Η δράση της φέρει την προσθήκη φωσφοαιθανολαμίνης (pEtN) στο λιπίδιο A, και κατά συνέπεια το σχηματισμό ενός πιο κατιονικού λιποπολυσακχαρίτη LPS. Συνολικά, η παραγωγή MCR-1 στο *E. coli* οδηγεί σε 4 έως 8 φορές αύξηση των MIC των πολυμυξινών. Επομένως, απουσία πρόσθετων μηχανισμών αντίστασης, η παραγωγή του MCR-1 είναι αρκετή για να προσδώσει ανθεκτικότητα στην κολιστίνη στο *E. coli*. Παρά το γεγονός ότι οι πολυμυξίνες μοιράζονται τον ίδιο μηχανισμό δράσης με αυτόν των κατιονικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων (CAMPs), όπως η καθελιδίνη L (L-37), η defensin 5 (HD5) και η defensin 3 (HDB3), που είναι φυσιολογικά συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος, δεν παρατηρήθηκε ανθεκτικότητα στα CAMPs. Η γενετική απόκτηση του γονιδίου *mcr-1* έχει διερευνηθεί εκτενώς. Το γονίδιο βρέθηκε σε διάφορα πλασμίδια όπως IncI2, IncHI2, IncP, IncX4, IncFI, και IncFIB, διαφόρων μεγεθών (58 έως 251 kb). [33].

Το γονίδιο *mcr-2* αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά από τον Xavier και τους συν., σε στελέχη *E. coli* και απομονώθηκε από μόσχους και χοίρους στο Βέλγιο. Ακόμη, παρατηρήθηκε πως η διάδοση του γονιδίου *mcr-1* μεσολαβείται από πλασμίδια, τα οποία μπορούν να διαφέρουν μεταξύ τους. Γονίδια *mcr* σε βακτήρια που έχουν απομονωθεί από διάφορες πηγές τροφίμων όπως κρέας και λαχανικά καθώς και από το περιβάλλον (συμπεριλαμβανομένου του νερού ποταμών και λιμνών), ασθενείς, και ασυμπτωματικούς φορείς. Η ανίχνευση των γονιδίων μικροβιακής αντοχής είναι απαραίτητη για την πρόληψη της εξάπλωσης της βακτηριακής αντοχής καθώς η αντοχή που φέρουν τα Gram (-) βακτήρια στις αντιμικροβιακές ουσίες, αποτελεί σοβαρό πρόβλημα για τη δημόσια υγεία [29-33][40].

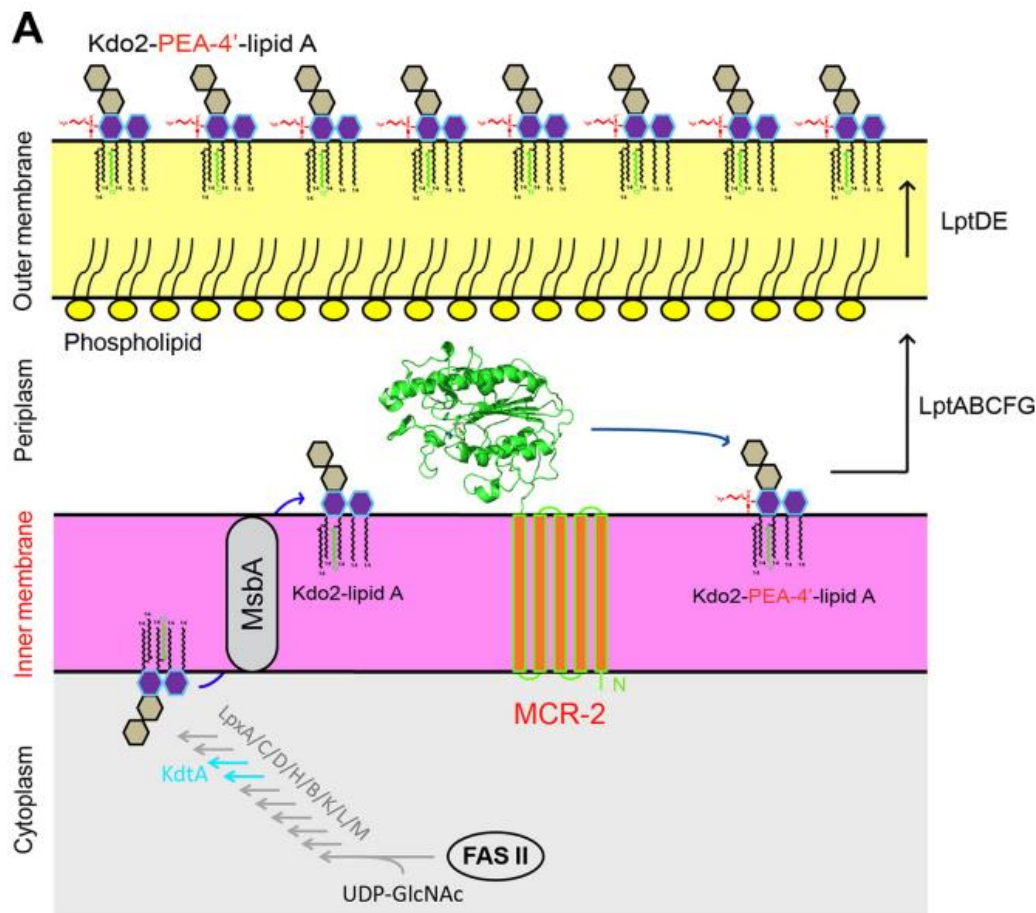
i) Μεταβολισμός και *mcr-1*

Το γονίδιο *mcr-1* κωδικοποιεί μια τρανσφεράση φωσφοαιθανολαμίνης, μια εσωτερική μεμβρανική πρωτεΐνη η οποία χαρακτηρίζεται από την ικανότητα της να προσθέτει μια φωσφοαιθανολαμίνη (pEtN) στο λιπίδιο A με σκοπό τη μείωση της ευαισθησίας του κυττάρου στις πολυμυξίνες. Με την έκφραση του *mcr-1* διαπιστώθηκαν αλλαγές στον μεταβολισμό του κυττάρου. Επίσης, η ακεραιότητα της μεμβράνης και η βιωσιμότητα του κυττάρου επηρεάζεται από την υπερέκφραση της πρωτεΐνης MCR-1. Εξαιτίας της υπερβολικής έκφρασης του γονιδίου υπεύθυνο για τη πρωτεΐνη, και της επίδρασης του στη βιωσιμότητα του βακτηρίου, το βακτήριο ανέπτυξε ένα μηχανισμό αναστολής της έκφρασης του γονιδίου *mcr-1*. Ακόμη, η υπερέκφραση του *mcr-1* διαταράσσει τον μεταβολισμό των λιπιδίων, αμινοξέων υδατανθράκων και νουκλεοτιδίων. Για παράδειγμα, παρατηρήθηκε πως σε βακτήρια που υπερκφράζουν το *mcr-1*, εντοπίζεται έντονη διαφοροποίηση του μεταβολισμού των λιπιδίων, της βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων, της επιμήκυνση τους καθώς της βιοσύνθεσης και αποδόμησης του γλυκεροφωσφολιπίδιο (GPL). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα γλυκεροφωσφολιπίδια είναι λιπίδια της βακτηριακής μεμβράνης και φέρουν ζωτικό ρόλο στις κυτταρικές λειτουργίες, όπως είναι η ρύθμιση των διαδικασιών μεταφοράς, η πρωτεϊνική λειτουργίας και η μεταγωγής σήματος. Επιπλέον, τα γλυκεροφωσφολιπίδια αποτελούν απαραίτητα συστατικά των λιποπρωτεϊνών τα οποία επηρεάζουν τη λειτουργία και το μεταβολισμό τους. Οι αλλαγές που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος αποδεικνύουν τον τρόπο με τον οποίο η υπερέκφραση του *mcr-1* επεμβαίνει στη σύνθεση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος. Το αποτέλεσμα της παρέμβασης στη σύνθεση του βακτηριακού τοιχώματος επιφέρει βλάβες στη μεμβράνη και ελάττωση της βιωσιμότητας της. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη MCR-1 προσδένεται ισχυρά στην εσωτερική μεμβράνη και διαταράσσει την ακεραιότητα της μεμβράνης. Το αποτέλεσμα είναι η εμφάνιση μειωμένης ποσότητας φωσφατιδυλαιθανολαμίνης (PE) και φωφφατιδυλογλυκερόλη (PG) καθώς και η μείωση του μεταβολισμού των γλυκεροφωσφολιπιδίων (GPL). Αξίζει να σημειωθεί πως η λιπιδική σύνθεση της μεμβράνης δεν είναι απαραίτητα σταθερή καθώς υπό δυσμενείς συνθήκες συντίθεται μεγάλη ποικιλία λιπιδίων με σκοπό την προσαρμογή του βακτηρίου. Ακόμα, η υπερέκφραση του *mcr-1* μειώνει τα επίπεδα πουρινών και πυριμιδινών, αμινοσακχάρων, υδατανθράκων, νουκλεοτιδίων και δευτερογενών μεταβολιτών [33-35][43].

ii) *mcr-2*

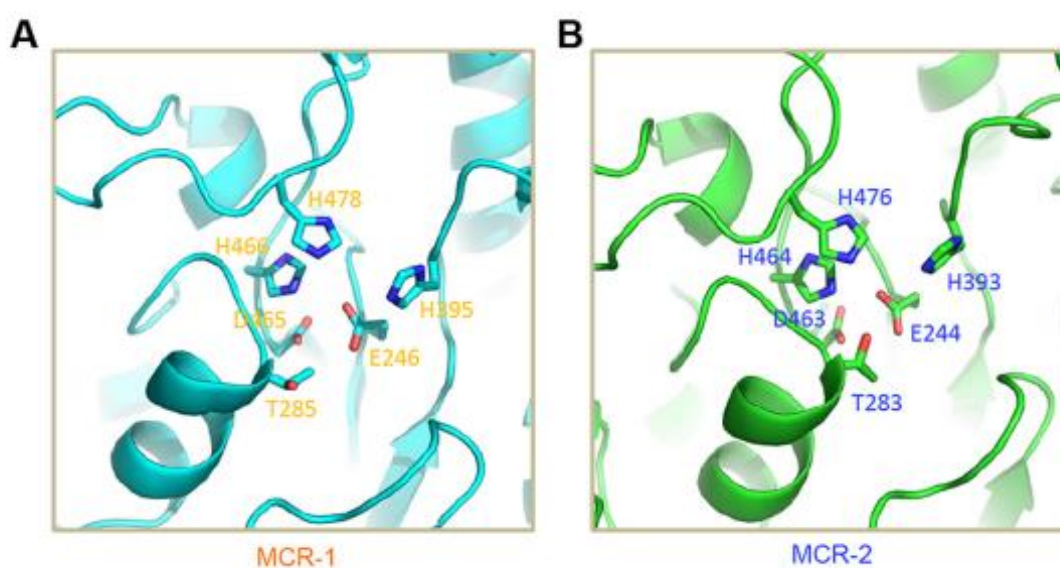
Πρόσφατα, εντοπίστηκε ένα νέο γονίδιο αντοχής στην κολιστίνη, το γονίδιο *mcr-2* από τον Xavier και τους συν. σε στελέχη *E. coli* που απομονώθηκαν από μόσχους και χοίρους στο Βέλγιο. Το *mcr-2*, εμφανίζει περίπου 76,7% νουκλεοτιδική ομοιότητα με το γονίδιο, *mcr-1*. Η ανίχνευση των γονιδίων μικροβιακής αντοχής είναι απαραίτητη και αναγκαία για την πρόληψη της εξάπλωσης της βακτηριακής αντοχής. Η ανθεκτικότητα που φέρουν τα Gram (-) βακτήρια φέρει μεγάλο αντίκτυπο στη

δημόσια υγεία. Οι διαφορετικές γειτονικές αλληλουχίες που εντοπίζονται πλησίον του γονιδίου *mcr-2* από αυτές του *mcr-1* δίνουν τη δυνατότητα της ενσωμάτωσης, της απόκτησης και διάδοσης των δύο γονιδίων αντίστασης στην κολιστίνη με ποικίλους τρόπους. Για την δράση της πρωτεΐνης MCR-2 και την απόκτηση ανθεκτικότητας στη κολιστίνη σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η περιπλασματική θέση της πρωτεΐνης MCR-2. Για τη σύνθεση του λιπιδίου A του λιποπολισακχαρίτη LPS χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα UDP-GlcNAc και η σύνθεση λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα της *E. coli*. Ακόμα, η σύνθεση των λιπαρών οξέων τύπου II (FAS II) παρέχει τα ενδιάμεσα λιπαρά οξέα που εισέρχονται στη οδό σύνθεσης του λιπιδίου A και περιλαμβάνει εννέα ένζυμα, τα οποία είναι: LpxA, LpxC, LpxD, LpxH, LpxB, LpxK, LpxL, LpxM, και KdtA. Σε βακτήρια που φέρουν το γονίδιο ανθεκτικότητας *mcr-2* παρατηρείται η ακόλουθη αλλαγή στη σύνθεση του λιπιδίου A του λιποπολισακχαρίτη LPS. Το νεοσχηματιζόμενο λιπίδιο A μετατοπίζεται με τη δράση του μεταφορέα ABC, MsbA, από το κυτταρόπλασμα προς τον περιπλασματικό χώρο. Η πρωτεΐνη MCR-2 εντοπίζεται στο περιπλασματικό χώρο. Το λιπίδιο A τροποποιείται με την πρόσδεση του ένζυμου MCR-2 και συνθέτει το τελικό προϊόν το PEA-4-λιπίδιο A. Η αντικατάσταση του λιπιδίου A με το PEA-4-λιπίδιο A, μειώνει το αρνητικό φορτίο της μεμβράνης, με αποτέλεσμα τη μειωμένη συγγένεια της μεμβρανικής επιφάνειας για την κολιστίνη αλλά και για τις πολυμιξίνες. Συνεπώς, το βακτήριο απέκτησε ανθεκτικότητα στη κολιστίνη [48]. Επομένως, η υποκυτταρική θέση της πρωτεΐνης MCR-2 (και/ή MCR-1) στο βακτηριακό περιπλασματικό χώρο συμβάλει στην καταλυτική του δράση και στην ανθεκτικότητα στην κολιστίνη.



Εικόνα 12. Μηχανισμός ανθεκτικότητας στη κολιστίνη που προκαλείται από το MCR-2. Πηγή: [48]

Οι πρωτεΐνες MCR-2 και MCR-1, είναι διαμεμβρανικές, με πέντε περιπλασματικές διαμεμβρανικές έλικες. Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν πως η MCR-1 είναι μια συντηρημένη πρωτεΐνη που έχει υποστεί μικρή εξελικτική πίεση. Σύμφωνα με τη φυλογένεση, τα MCR-2 και MCR-1 πιθανών μοιράζονται κοινή εξελικτική πορεία για την απόκτηση ανθεκτικότητας στην κολιστίνη. Η δράση του MCR-1 και του MCR-2 σχετίζεται με τη θέση της πρωτεΐνης στο περιπλασματικό χώρο. Τέλος, η κατανόηση του συστήματος αναδιαμόρφωσης με βάση το φορτίο μεμβράνης που χρησιμοποιείται για την απόκτηση της βακτηριακής αντοχής στις αντιμικροβιακές ουσίες, μπορεί να παρέχει γνώσεις για το σχεδιασμό νέων ενώσεων που στοχεύουν στην αναστροφή της ανθεκτικότητας στην κολιστίνη MCR-2/MCR-1.[29-33][40][48]



Εικόνα 13. Α) Δομική απεικόνιση των έξι υπολειμμάτων τα οποία είναι κρίσιμα για τη δράση της μεταφοράς MCR-1 PEA-λιπιδίου Α. Β) δομική απεικόνιση των 6 υπολειμμάτων που συγκροτούν το καταλυτικό μοτίβο για τη μεταφορά MCR-2 PEA λιπιδίου Α. Πηγή: [48]

ΜΕΡΟΣ ΙΙ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ- ΤΕΧΝΙΚΕΣ

2.1 ΣΚΟΠΟΣ

Η εργαστηριακή έρευνα η οποία έλαβε μέρος στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων της Κτηνιατρικής του ΑΠΘ έθεσε ως υπόβαθρο την διδακτορική έρευνα της διδακτορικού Άννας Ξεξάκης με τίτλο «Εκτίμηση του επιπολασμού για την παρουσία ανθεκτικών σε Β-λακτάμες δεικτών *Escherichia coli* σε υγιή πτηνά εκτροφών αυγοπαραγωγών ορνίθων και κρεοπαραγωγών ορνιθίων»». Τα δείγματα τα οποία είχε συλλέξει η κ. Ξεξάκη από την διδακτορική της έρευνα είχαν αποθηκευτεί σε καταψύκτες υπό κατάλληλες θερμοκρασίες για την σωστή συντήρησή τους. Στην παραπάνω έρευνα, βρέθηκαν δείγματα τα οποία ήταν θετικά στο γονίδιο αντοχής της κολιστίνης σύμφωνα με τα αντιβιογράμματα τα οποία έγιναν. Συγκεκριμένα, τα δείγματα τα οποία βρέθηκαν θετικά στο γονίδιο αντοχής είναι δείγματα κρεοπαραγωγικών ορνιθίων και συγκεκριμένα 11 από τα 301 δείγματα. Ωστόσο, ελέγχθηκαν δείγματα τα οποία ήταν ύποπτα, εκτός από τα 11 τα οποία έχουν ταυτοποιηθεί θετικά, τα οποία ανήκουν και στις δύο κατηγορίες πτηνών.

Σκοπός της έρευνας είναι η ταυτοποίηση των δειγμάτων ως θετικά με την μέθοδο της PCR αλλά και η εύρεση του τύπου γονιδίου κολιστίνης που φέρουν. Έγινε έλεγχος για την ύπαρξη δύο γονιδίων αντοχής της κολιστίνης *mcr-1* και *mcr-2*, καθώς αποτελούν τα πιο σύνηθη και διαδεδομένα γονίδια αντοχής κολιστίνης που επικρατούν στην κτηνοτροφική παραγωγή παγκοσμίως. Όπως έχει ήδη αναφερθεί η κολιστίνη αποτελεί ένα ισχυρό αντιβιοτικό το οποίο χρησιμοποιείτε στην κτηνιατρική και η εμφάνιση στελεχών τα οποία φέρουν αντοχή σε αυτό θα επηρεάσει την χρήση της στην κτηνιατρική. Η εμφάνιση στελεχών που φέρουν αντοχή έχει ήδη αναφερθεί, με τη πρώτη εμφάνιση του γονιδίου αντοχής στην Κίνα και στη συνέχεια στην Ευρώπη. Ωστόσο, το γονίδιο έχει κάνει την εμφάνισή του και στον ελληνικό χώρο, σύμφωνα με την διδακτορική έρευνα η οποία έχει διεξαχθεί, και στην συνέχεια θα αναφερθεί ο τύπος του γονιδίου ανθεκτικότητας *mcr* που επικρατεί.

2.2 ΥΛΙΚΑ

Από τα 2853 δείγματα τα οποία είχαν συλλεχθεί , επιλέχθηκαν 46 συγκεκριμένα δείγματα τα οποία πιθανόν φέρουν το γονίδιο αντοχής στη κολιστίνη και χαρακτηρίζονται ως ύποπτα. Τα δείγματα αφαιρέθηκαν από την κατάψυξη, στην οποία βρίσκονταν σε συντήρηση σε συνθήκες βαθιάς κατάψυξης (-80 °C) και παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για ελάχιστο χρόνο προκειμένου να συλλεχθεί το δείγμα στη κατάλληλη μορφή.

2.2.1 Υλικά για την ανακαλλιέργεια των δειγμάτων

Για την ανακαλλιέργεια των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν πετρί με MacConkey άγαρ, αιματούχο άγαρ και TBX άγαρ .

- MacConkey άγαρ (Biolife, Milan , Italy)

Χαρακτηρίζεται ως εκλεκτικό και διαφοροποιητικό μέσο καλλιέργειας για βακτήρια. Έχει σχεδιαστεί για να την επιλεκτική απομόνωση αρνητικών κατά Gram (-) και εντερικών βακτηρίων. Οι ζυμωτές λακτόζης γίνονται κόκκινοι ή ροζ στο άγαρ McConkey και οι μη ζυμωτές δεν αλλάζουν χρώμα. Το μέσο αναστέλλει την ανάπτυξη θετικών κατά Gram (+) βακτηρίων με τη παρουσία του κρυσταλλικού ιώδες και των χολικών αλάτων, επιτρέποντας την επιλογή και την απομόνωση των Gram (-) αρνητικών βακτηρίων. Ο δείκτης ουδέτερο ερυθρό αλλάζει χρώμα με τη διάσπαση της λακτόζης.

- Αιματούχο άγαρ (Biolife, Milan, Italy)

Χαρακτηρίζεται ως ένα εμπλουτιστικό θρεπτικό υλικό, περιέχει όλα τα θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη μια μεγάλης ποικιλίας μικροβίων. Παρασκευάζεται από αιματούχο άγαρ με προσθήκη αίματος σε τελική συγκέντρωση 5-10%. Το αίμα προέρχεται από άλογο, από άνθρωπο ή από πειραματόζωα και περιέχει θρεπτικές ουσίες, αυξητικούς παράγοντες και ένζυμα απαραίτητα για την ανάπτυξη μικροβίων.

- TBX (Tryptone Bile X-glucuronide Agar) (Biolife, Milan, Italy)

Αποτελεί ένα εκλεκτικό υπόστρωμα για την απομόνωση των ανθεκτικών στελεχών *E. coli*. Η παρουσία του χρωμογόνου παράγοντα – Χ-γλυκουρονιδίου (X-GLUC, 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-beta-D-glucuronide), ο οποίος ανιχνεύει τη δράση της γλυκουρονιδάσης, καθιστά το TBX ιδιαίτερα εξειδικευμένο για την ανίχνευση της *E. coli*. Η όλη διεργασία προσδίδει ένα χαρακτηριστικό μπλε / πράσινο χρώμα στις αποικίες της *E. coli*.

2.2.2 Υλικά την απομόνωση του γενετικού υλικού των δειγμάτων

Για την απομόνωση του γενετικού υλικού χρησιμοποιήθηκε το DNA Mini Kit της QIAGEN.

Το DNA kit περιέχει 2 Buffer λύσης, buffer ALT και buffer AL. Το Buffer ALT είναι διάλυμα λύσης για ιστούς- κύτταρα και το Buffer AL είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα λύσης.

Περιέχει πρωτεϊνάση K, η οποία βοηθάει στην αποικοδόμηση των κυτταρικών συστατικών καθώς καταστρέφει γλυκοπρωτεΐνες και απενεργοποιεί RNAασες/DNAασες.

Ακόμα, περιέχει δύο wash buffer concentrate, τα Buffer Aw1 και Aw2 για τον διαχωρισμό και την απομάκρυνση των μετουσιωμένων πρωτεϊνών από το DNA.

2.2.3 Υλικά για τη διενέργεια της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης- PCR

Για την διενέργεια της PCR χρησιμοποιήθηκαν ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές (primers) για τα δυο γονίδια *mcr*.

Το FastGene® Taq ReadyMix (2X) της NIPPON Genetics EUROPE, είναι ένα έτοιμο προς χρήση κοκτέιλ που περιέχει όλα τα συστατικά για PCR, εκτός από τους εκκινητές και τη πρότυπη αλληλουχία DNA. Το 2X ReadyMix περιέχει FastGene® Taq DNA Πολυμεράση (1 U ανά 50 μl αντίδραση), ρυθμιστικό διάλυμα FastGene® Taq (1X), dNTPs (0,2 mM από κάθε dNTP στο 1X), MgCl₂ (1,5 mM σε 1X) και σταθεροποιητές. Το FastGene® Taq ReadyMix συνοδεύεται από δύο αδρανείς βαφές παρακολούθησης που επιτρέπουν την άμεση φόρτωση προϊόντων PCR σε πηκτώματα αγαρόζης για ανάλυση με ηλεκτροφόρηση, χωρίς την ανάγκη προσθήκης διαλύματος φόρτωσης DNA.

Primer name	Sequence (5'-3')	Target gene	Size (bp)	Positive control strain
<i>mcr1_320bp_fw</i>	AGTCCGTTTGTCTTGTGGC	mcr-1	320	<i>Escherichia coli</i> 2012-60-1176-27 [22]
<i>mcr1_320bp_rev</i>	AGATCCTTGGTCTCGGCTTG			
<i>mcr2_700bp_fw</i>	CAAGTGTGTTGGTCGCAGTT	mcr-2	715	<i>E. coli</i> KP37 [11]
<i>mcr2_700bp_rev</i>	TCTAGCCCCACAAGCATACC			

Εικόνα 13. Εκκινητές των 2 γονιδίων ανθεκτικότητας *mcr*. Πηγή:[36]

2.2.4 Υλικά για την διενέργεια ηλεκτροφόρησης

A) Πηκτή αγαρόζης

Για τη παρασκευή της πηκτής αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα TBE 1X και σκόνη αγαρόζης 1,5 % (w/v).

Το διάλυμα TBE (Tris/Borate/EDTA) χαρακτηρίζεται κατάλληλο για τον καλό διαχωρισμό του DNA 0.1-3 kb με χρήση τάσης >150V στην ηλεκτροφόρηση .

Πραγματοποιείται προσθήκη αγαρόζης υψηλής καθαρότητας (HT Biotechnology Ltd,UK).

B) Προσθήκη Midori Green Xtra (NIPPON Genetic Europe). Χαρακτηρίζεται ως μια υπερευαίσθητη χρώση DNA για την ανίχνευση DNA/RNA σε πηκτώματα αγαρόζης, μπορεί να προστεθεί στο πήκτωμα τόσο πριν όσο και μετά και είναι μια ασφαλής εναλλακτική για την αντικατάσταση του βρωμιούχου αιθιδίου.

Γ) Διαλύμα-Buffer

Για τη παρασκευή του διαλύματος χρησιμοποιείται απεσταγμένο H₂O και TAE .

Το TAE είναι μια σύνθεση από Tris, Acetate και EDTA. Χαρακτηρίζεται από μικρότερη ρυθμιστική ικανότητα, απαιτεί χαμηλότερη τάση και περισσότερο χρόνο ωστόσο φέρει καλύτερα αποτελέσματα.

Δ) Μοριακός δείκτης

Χρήση του GeneRuler 100bp DNA Ladder της Thermo Scientific™ ως μοριακό δεικτη. Συνιστάται για τον προσδιορισμό του μεγέθους και τον κατά προσέγγιση ποσοτικό προσδιορισμό ενός δίκλωνου DNA στην περιοχή από 100 bp έως 1.000 bp σε πηκτώματα αγαρόζης ή πολυακρυλαμιδίου.

2.3 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.3.1 Ανακαλλιέργεια των δειγμάτων και λήψη μεμονωμένων νέων αποικιών

Αρχικά, πραγματοποιείται απόψυξη 46 δειγμάτων από συνθήκες βαθιάς κατάψυξης (-80 °C), συλλογή δείγματος με τη χρήση ενός αποστειρωμένου μικροβιολογικού κρίκου 1 ml μιας χρήσης και πραγματοποίηση ενοφθαλισμού σε θρεπτικό υλικό για την λήψη μεμονωμένων αποικιών.

Τα δείγματα επιστρώθηκαν για αρχή σε τριβλία πετρί με αιματούχο άγαρ και επώστηκαν στον κλίβανο σε θερμοκρασία 37 βαθμών κελσίου για 24-48 ώρες. Η επιλογή του αιματούχου άγαρ έχει ως σκοπό τον επιτυχή εμβολιασμό του μικροβίου και την ανάπτυξη μεγάλων μεμονωμένων αποικιών .

Έπειτα, πραγματοποιείται συλλογή αποικίας από κάθε καλλιέργεια, με τη χρήση μικροβιολογικού κρίκου , και εμβολιασμός σε πετρί με TBX άγαρ για την ανάπτυξη της *E.coli*. Μετά τον εμβολιασμό εφαρμόζεται επώση των δειγμάτων στον κλίβανο στους 44 βαθμούς κελσίου για 24- 48 ώρες. Οι αποικίες χρώματος κυανού είναι αποικίες θετικές στη β-γλουκουρονιδάση και χαρακτηρίζονται ως *E.coli*.

Εάν , κατά τη διάρκεια συλλογής της αποικίας από το πετρί που φέρει το αιματούχο ή το TBX παρατηρείται μια αλλαγή στο χρώμα ή στη μορφολογία της αποικίας, η οποία φανερώνει την ύπαρξη και την ανάπτυξη ενός άλλου μικροβίου δηλαδή μιας επιμόλυνσης. Το δείγμα θα υποστεί καθαρισμό με τον εμβολιασμό του σε άγαρ MacConkey. Έπειτα, η αποικία απομονώνεται και τοποθετείται σε άγαρ TBX για την ανάπτυξη της *E.coli*.

Ο χώρος στον οποίο πραγματοποιούνται οι ανακαλλιέργειες αλλά και τα θρεπτικά υλικά είναι αποστειρωμένα.

2.3.2 Απομόνωση γενετικού υλικού-DNA των δειγμάτων

1) Τοποθετείται σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρου δείγμα της υπό εξέταση αποικίας Ακολουθούσε, προσθήκη 180 μl ρυθμιστικού διαλύματος ATL και 20 μl πρωτεϊνάσης K, ανάμειξη με vortex και επώση στους 56°C για 1–3 ώρες, με ενδιάμεσα διαστήματα ανάδευσης ώστε να διευκολυνθεί η λύση.

2) Προσθήκη 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος AL και ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα σε vortex.

3) Επώση στους 70°C για 10 λεπτά και έπειτα γρήγορη φυγοκέντρωση ώστε να συγκεντρωθεί το μείγμα στο πυθμένα του σωληναρίου.

4)Μεταφορά του μείγματος στη στήλη περιστροφής QIAamp Mini spin σε σωληνάριο συλλογής 2 ml. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 6000 x g (8000 rpm) για 1 λεπτό και απόρριψη του φυγοκεντρισμένου υγρού.

5)Μεταφορά της στήλης QIAamp Mini spin σε νέο σωληνάριο συλλογής 2 ml και προσθήκη 500 μl Buffer AW1. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 6000 x g (8000 rpm) για 1 λεπτό και απόρριψη του φυγοκεντρισμένου υγρού.

6) Μεταφορά της στήλης QIAamp Mini spin σε ένα νέο σωλήνα συλλογής 2 ml και προσθήκη 500 μl Buffer AW2. Ακολούθησε φυγοκέντρωση σε πλήρη ταχύτητα 20.000 x g (14.000 rpm) για 3 λεπτά. Απόρριψη του σωληναρίου συλλογής.

7) Η στήλη QIAamp Mini spin τοποθετείται σε νέο σωληνάριο 2 ml και φυγοκέντρωση σε πλήρη ταχύτητα για 1 λεπτό για την πλήρη εξάλειψη του buffer AW2.

8) Τοποθέτηση της στήλης QIAamp Mini spin σε νέο σωλήνα μικροφυγοκέντρησης, προσθήκη 200 μl Buffer AE και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό. Τέλος, φυγοκεντρείται στα 6000 x g (8000 rpm) για 1 λεπτό για την πλήρη έκλυση του DNA.

Ακολούθησε φωτομέτρηση του DNA μετά την απομόνωσή του σε φασματοφωτόμετρο. Σε ένα σωληνάκι errendorf γίνεται ανάμιξη 5 μl διαλύματος DNA και 495μl H₂O ώστε η τελική αραίωση να είναι 1:100. Για την φωτομέτρηση, έγινε μεταφορά του διαλύματος σε κυψελίδα, η οποία τοποθετείται σε ειδική εσοχή του φασματοφωτομέτρου και πραγματοποιείται η φωτομέτρηση. Το φωτόμετρο ρυθμίζεται στα 260 nm για την εκτίμηση της οπτικής πυκνότητας του δείγματος και 280nm για τη καθαρότητα του δείγματος.

Για τη θέρμανση των δειγμάτων χρησιμοποιούμε θερμικά μπλοκ, τα δείγματα επωάζονται σε δύο θερμοκρασίες, 56 °C και 70 °C. Στην όλη διαδικασία χρησιμοποιούνται αποστειρωμένα υλικά και ο εργαστηριακός χώρος έχει απολυμανθεί ώστε να μην υπάρχει η πιθανότητα κάποιας επιμόλυνσης.

2.3.3 Δοκιμασία αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης – PCR

Αρχικά θα γίνει παρασκευή δύο mastermix , ξεχωριστά για το κάθε γονίδιο mcr-1 και mcr-2.

Για το mastermix 1 :

Υλικά	Ποσότητα (μl)	Αριθμός Δειγμάτων	Τελικός Όγκος (μl)
FastGene	5	X 48 (46 είναι τα δείγματα ωστόσο υπολογίζουμε λίγο παραπάνω για να είναι επαρκής η ποσότητα)	240
<i>mcr-1</i> εκκινητής R (right)	0,25	X 48	12
<i>mcr-1</i> εκκινητής L (left)	0,25	X 48	12
H ₂ O	3,6	X 48	172,8

Σε κάθε Eppendorf με τη χρήση πιπέτας, τοποθετείται 9,1 μl από το mastermix 1 και 0,9μl DNA από το κάθε δείγμα.

Για το mastermix 2 :

Υλικά	Ποσότητα (μl)	Αριθμός Δειγμάτων	Τελικός Όγκος (μl)
FastGene	5	X 48 (46 είναι τα δείγματα ωστόσο υπολογίζουμε λίγο παραπάνω για να είναι επαρκής η ποσότητα)	240
<i>mcr-2</i> εκκινητής R (right)	0,25	X 48	12
<i>mcr-2</i> εκκινητής L (left)	0,25	X 48	12
H ₂ O	3,6	X 48	172,8

Σε κάθε Eppendorf με τη χρήση πιπέτας, τοποθετείται 9,1 μl από το mastermix 1 και 0,9μl DNA από το κάθε δείγμα.

Συνθήκες PCR

Για το *mcr-1*:

Θερμοκρασίες	Χρόνος (sec)	Κύκλοι
95 °C	3,45 X 60	1
94 °C	30	38
54,5 °C	33	38
75 °C	31	38
75 °C	5 X 60	1
8 °C	Infinite	-

Για το *mcr-2*:

Θερμοκρασίες	Χρόνος (sec)	Κύκλοι
95°C	3,45 X 60	1
94 °C	36	38
54,5 °C	35	38
75°C	53	38
75°C	8 X 60	1
8°C	Infinite	-

Οι θερμοκρασίες της PCR :

- 95°C για την ενεργοποίηση του ενζύμου και την αρχική αποδιάταξη του DNA
- 94°C για την αποδιάταξη του DNA
- 54,5°C για την υβριδοποίηση των εκκινητών
- 75°C για την επιμήκυνση
- 8 °C για συντήρηση του δείγματος

2.3.4 Ηλεκτροφόρηση DNA

Με την ολοκλήρωση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης , ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε γέλη πηκτής αγαρόζης. Για τη παρασκευή της πηκτής , χρησιμοποιήθηκαν 120 ml TBE 1X και 1,5g σκόνη αγαρόζης. Έπειτα από την ανάμιξη των υλικών καθώς και μια ήπια ανάδευση, ακολούθησε θέρμανση. Στη συνέχεια, μείωση της θερμοκρασίας και προσθήκη 5,5 ml χρωστικής midori. Το μείγμα της πηκτής τοποθετήθηκε με προσοχή στη πλάκα της συσκευής αφού πρώτα έχουν τοποθετηθεί τα χτενάκια για τη να δημιουργία βοθρίων .

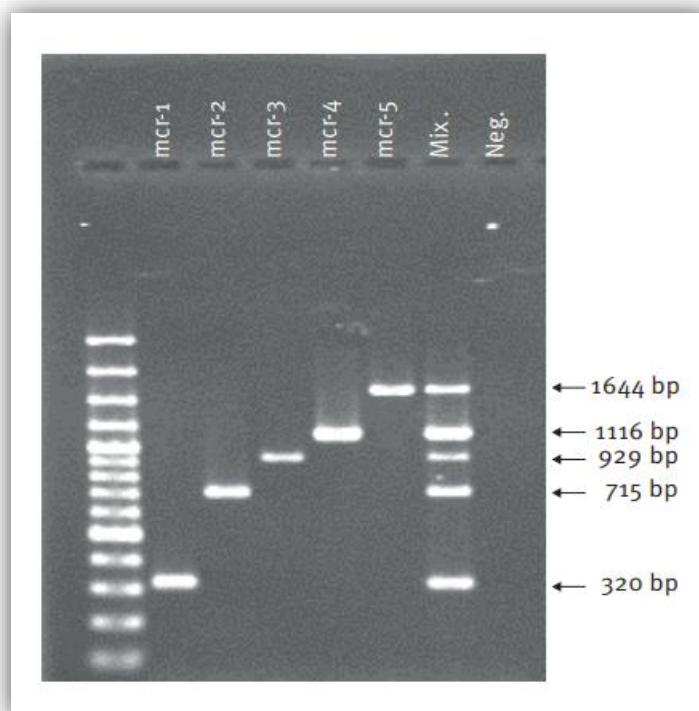
Η πλάκα αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου ή τοποθετείται στο ψυγείο για ελάχιστο χρόνο.

Μόλις το μείγμα στερεοποιηθεί, αφαιρούνται τα χτενάκια και η πηκτή τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Έπειτα, γίνεται προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος -running buffer, μέχρι να καλυφθεί η πηκτή και με τη χρήση πιπέτας τοποθετούνται τα δείγματα στα βοθρία . Κάθε βοθρίο περιέχει 5 μl μείγματος DNA και DNA-ladder. Στο πρώτο βοθρίο γίνεται προσθήκη DNA Ladder που αποτελεί δείκτης για την πηκτή. Μετά τη εισαγωγή όλων των δειγμάτων, εφαρμόζοταν ηλεκτρικό πεδίο 110 V ,με την τοποθέτηση ηλεκτρόδιων στη συσκευή, για 60-70 λεπτά. Έπειτα, αφαιρείται η πηκτή προσεκτικά και εκτίθεται σε UV προκειμένου να γίνουν ορατές οι ζώνες.

ΜΕΡΟΣ ΙΙΙ

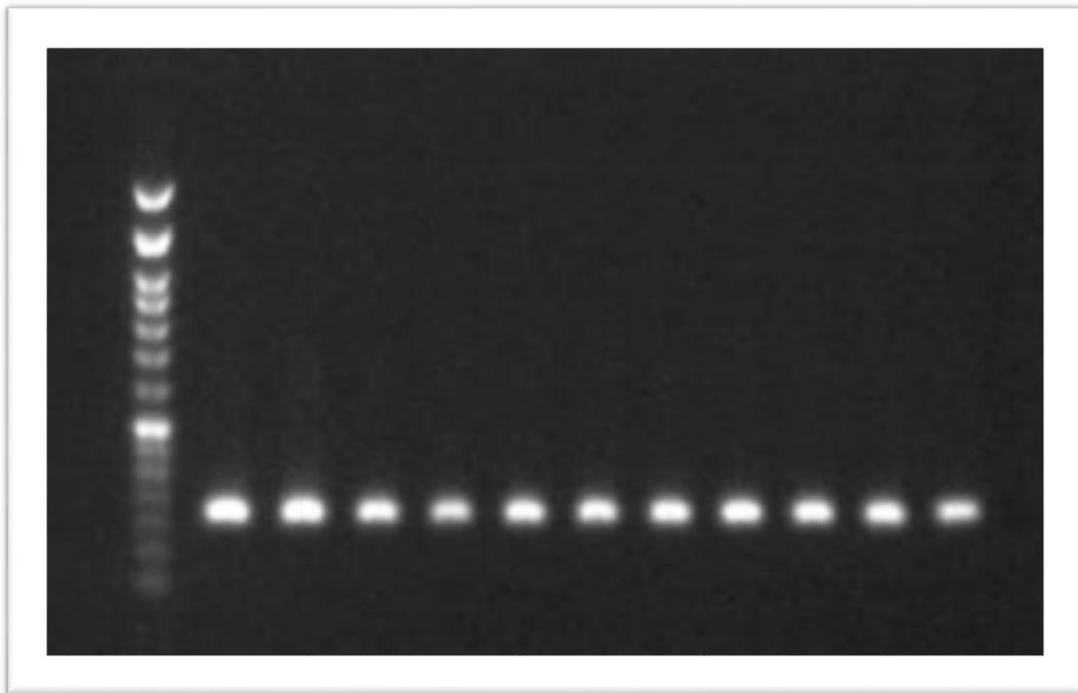
3.1 Αποτελέσματα

Η ερευνητική εργασία η οποία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης στο Τμήμα Κτηνιατρικής, είχε ως στόχο τη διερεύνηση γονιδίων αντοχής της κολιστίνης σε υγιή δείγματα πτηνών και την εύρεση του τύπου γονιδίου *mcr* που φέρουν. Η εύρεση των γονιδίων αντοχής πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης και με την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της. Τα αποτελέσματα ανέδειξαν την ύπαρξη μόνο ενός γονιδίου αντοχής, του *mcr-1* στα 11 από τα 46 δείγματα. Τα θετικά δείγματα ανήκουν σε κρεοπαραγωγικά ορνίθια. Να σημειωθεί πως όλα τα δείγματα εξετάστηκαν για τα δύο γονίδια αντοχής, *mcr 1 & 2*. Το αποτέλεσμα είναι σύμφωνο με το αντιβιογράμμα που είχε πραγματοποιηθεί στη προηγούμενη έρευνα, η οποία αποτέλεσε βάση για την διεξαγωγή αυτής. Παρακάτω επισυνάπτεται εικόνα στην οποία απεικονίζονται και τα πέντε γονίδια *mcr* που έχουν βρεθεί ένα gel ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 3 Gel ηλεκτροφόρησης γονιδίων MCR. Πηγή: [36]

Στη συνέχεια επισυνάπτεται η εικόνα από το gel ηλεκτροφόρησης της έρευνας, αποδεικνύοντας την ύπαρξη του γονιδίου *mcr-1* και στα έντεκα δείγματα των κρεοπαραγωγών ορνιθίων.



Εικόνα 4. Gel ηλεκτροφόρησης που απεικονίζει τα 11 θετικά δείγματα στο γονίδιο *mcr-1*

3.2 Συμπεράσματα

Οι αντιμικροβιακές ουσίες ορίζονται ως οι ουσίες που δρουν εναντίον των παθογόνων βακτηρίων. Η δράση τους έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξης τους ή την επίσπευση του βακτηριακού θανάτου τους. Η συστηματική χρήση αντιβακτηριακών ουσιών σε επαρκής ποσότητες έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση βακτηριακών στελεχών ανθεκτικών σε αυτές. Ωστόσο, η συνεχής χρήση ισχυρών αντιμικροβιακών ουσιών και η χορήγηση τους σε μεγάλες ποσότητες για την πρόληψη ή την θεραπεία μια μολυσματικής ασθένειας οδηγεί στην εμφάνιση βακτηριακής ανθεκτικότητας. Η πολυμυξίνη που αναφέραμε παραπάνω ανήκει σε μια ισχυρή ομάδα αντιμικροβιακών ουσιών η οποία δρα στα Gram (-) αρνητικά βακτήρια. Η δράση τους έχει ως στόχο την εξωτερική μεμβράνη των Gram (-), τις λιποπολυσακχαρίτες που την απαρτίζουν. Με την δράση τους διαταράσσουν την ακεραιότητα της μεμβράνης και επιφέρουν τη βακτηριακή λύση. Οι πολυμυξίνες και συγκεκριμένα η κολιστίνη χρησιμοποιούνται από το τομέα της κτηνιατρικής εκτενώς. Η κολιστίνη δρα σε Gram (-) βακτήρια, κυρίως εντεροβακτήρια τα οποία εμφανίζουν ανθεκτικότητα τις καρβαπενέμες. Η εύρεση βακτηρίων ανθεκτικών σε ισχυρές αντιμικροβιακές ουσίες όπως η κολιστίνη αναδεικνύουν την συνεχόμενη χρήση της, και την πιθανότητα να έγινε υπερβολική χρήση της. Με την εύρεση ανθεκτικών βακτηρίων καθώς και τον εντοπισμό των γονιδίων ανθεκτικότητας αναδείχθηκε ένα

μείζον πρόβλημα το οποίο απαιτεί άμεση λύση. Η δημιουργία νέων αντιμικροβιακών ουσιών με διαφορετικό στόχο δράσης και μειωμένες παρενέργειες θα μπορούσε να αποτελέσει μια λύση. Ακόμα, ο εντοπισμός των γονιδίων ανθεκτικότητας, όπως της κολιστίνης τα γονίδια *mcr*, σε παγκόσμιο επίπεδο, η μελέτη των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν καθώς και ο τρόπος δράσης τους. Η εύρεση των γονιδίων ανθεκτικότητας σε κατηγορίες αντιμικροβιακών ουσιών, η αλληλούχηση τους και η σύγκριση τους. Η επεξήγηση του μηχανισμού δράσης τους και επιβολής της ανθεκτικότητας θα συνεισφέρουν στην κατανόηση της δράσης των κωδικοποιημένων πρωτεϊνών αλλά και στο σχεδιασμό νέων πιο εξειδικευμένων αντιμικροβιακών ουσιών. Τέλος, τόσο ο κλάδος της κτηνιατρικής αλλά και των φαρμάκων συνίσταται να εκπαιδεύει τους επιστήμονες της και να τους ενημερώνει για οποιαδήποτε νέα εύρεση αντιμικροβιακής ουσίας ή γονιδίων ανθεκτικότητας καθώς και να περιορίσει την εύκολη και συστηματική χρήση ισχυρών αντιμικροβιακών ουσιών. Με αυτόν τον τρόπο θα μειωθεί η εκτενή και ασήμαντη χρήση των αντιμικροβιακών ουσιών.

Συνοψίζοντας, οι πολυμυξίνες κεντρίζουν το ενδιαφέρον των επιστημών λόγω της τρέχουσας κατάστασης, με τα MDR Gram (-) αρνητικά βακτήρια να εξαπλώνονται παγκοσμίως και με ελάχιστα νέα αντιβιοτικά να κυκλοφορούν στο εμπόριο. Η αντοχή στην κολιστίνη σε μέλη των Enterobacteriales αποτελεί ένα παγκόσμιο πρόβλημα υγείας το οποίο απαιτεί περαιτέρω έρευνα και παρακολούθηση. Η αξιολόγηση της έκτασης διασποράς των γονιδίων αντοχής τόσο στη κτηνιατρική όσο και στην ιατρική, θα μπορούσε να αποτελέσει μια αρχή για την επίλυση του προβλήματος. Ακόμη, η εξέταση των επιπτώσεων που μπορούν να προκαλέσουν και στους δύο τομείς αλλά και η σύνδεση που φέρουν μεταξύ τους. Επιπλέον, ο περιορισμός της χρήσης αντιβιοτικών μεγάλου εύρους όπως είναι η κολιστίνη, αντιβιοτικών που παρουσιάζουν αντοχή τα ανθεκτικά βακτήρια καθώς και η χρήση νέων αντιβιοτικών. Για την επίτευξη αυτού του στόχου θα πρέπει να δοθεί έμφαση στον τρόπο με τον οποίον επιτυγχάνεται η εξάπλωση των γονιδίων αντοχής τόσο μεταξύ ίδιων και διαφορετικών ειδών καθώς και ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο δρουν στο βακτήριο.

Δημοσιεύσεις -Ανακοινώσεις

- Η παραπάνω έρευνα έλαβε μέρος στο 41ο ετήσιο συνέδριο της SOMED (Society of Microbial Ecology in Health and Disease) με τη μορφή Poster, με τίτλο << Molecular detection of colistin resistance mcr-1 and mcr-2 genes in Escherichia Coli strains isolated from poultry farms in Greece>>

Βιβλιογραφία

1. Nerino Allocati , Michele Masulli , Mikhail F. Alexeyev and Carmine Di Ilio, Review Escherichia coli in Europe: An Overview , Department of Experimental and Clinical Sciences ,2013
2. James B. Kaper, James P. Nataro and Harry L. T. Mobley. PATHOGENIC ESCHERICHIA, NATURE REVIEWS, MICROBIOLOGY,2004, p.123-140
3. Amir M. Motlagh,Zhengjian Yang, Detection and occurrence of indicator organisms and pathogens, Department of Civil Engineering, California State University, Sacramento, California,2019
4. J. L. Smith, D. J. V. Drum, Y. Dai, J. M. Kim, S. Sanchez, J. J. Maurer, C. L. Hofacre, and M. D. Lee, Impact of Antimicrobial Usage on Antimicrobial Resistance in Commensal Escherichia coli Strains Colonizing Broiler, Poultry Diagnostic and Research Center and Athens Diagnostic Laboratory College of Veterinary Medicine, University of Georgia, College of Agriculture and Environmental Sciences, University of Georgia, Griffin, 2006
5. CA Batt, Escherichia coli, Cornell University, Ithaca, NY, USA, 2014
6. W. John Ingledew and Robert K. Poole, The Respiratory Chains of Escherichia coli, Department of Biochemistry and Microbiology, University of St. Andrews, St. Andrews KY16 9AL, Scotland,' and Department of Microbiology, Queen Elizabeth College University of London,1984
7. Subhash C. VermaID, Zhong Qian, Sankar L. AdhyaID, Architecture of the Escherichia coli nucleoid, Laboratory of Molecular Biology, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, United States of America,2019
8. Saralaya V. Adhikari P, Shenoy S, Baliga S , Hegde A, Characterization of Escherichia coli Phylogenetic Groups Associated with Extraintestinal Infections in South Indian Population Chakraborty , Department of Microbiology Moti Lal Nehru Medical College , Allahabad, Uttar Pradesh, Departments of Microbiology and Medicine, Kasturba Medical College, Manipal University, Mangalore, Karnataka, India,2015
9. Schaechter M., Escherichia Coli, San Diego State University, USA,2009
David S. Goodsell, Miniseries: Illustrating the Machinery of Life Escherichia coli, From the Department of Molecular Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, California,2009
10. Thomas J. Silhavy, Daniel Kahne, and Suzanne Walker, The Bacterial Cell Envelope,Department of Molecular Biology, Princeton University, Princeton, Department of Chemistry and Chemical Biology, Harvard University, Cambridge, and Department of Biological Chemistry and Molecular Pharmacology, Harvard Medical School, Boston, 2010
11. Fernando Navarro-Garcia, Waldir P Elias, Jose Flores, and Pablo C Okhuysen, Enteroaggregative Escherichia coli,Department of Cell Biology, Laboratory of Bacteriology, Instituto ,Division of Infectious Diseases, The University of Texas at Houston Medical School, Houston, Texas, USA, 2010
12. Roland Stenutz, Andrej Weintraub & Goran Widmalm ,The structures of Escherichia coli O-polysaccharide antigens, Department of Organic Chemistry, Arrhenius

Laboratory, Stockholm University; and Karolinska Institutet, Department of Laboratory Medicine, Division of Clinical Bacteriology, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden,2006

13. Kathayat, Dhanashree Lokesh, Sochina Ranjit and Gireesh Rajashekara , Avian Pathogenic Escherichia coli (APEC): An Overview of Virulence and Pathogenesis Factors, Zoonotic Potential, and Control Strategies Dipak,2021
14. Isabella Sanseverino, Anna Navarro Cuenc a, Robert Loos, Dimitar Marinov and Teresa Lettieri, State of the Art on the Contribution of Water to Antimicrobial Resistance,2018
15. Jose M. Munita and Cesar A. Arias, Mechanisms of Antibiotic Resistance,Department of Internal Medicine, Division of Infectious Diseases, University of Texas Medical School at Houston, Houston, TX 2 International Center for Microbial Genomics, Universidad El Bosque, Bogota, Colombia 3Molecular Genetics and Antimicrobial Resistance Unit, Universidad El Bosque, Bogota, Colombia 4Clinica Alemana de Santiago, Universidad del Desarrollo School of Medicine, Santiago, Chile,16
16. Peter M Hawkey ,The origins and molecular basis of antibiotic resistance , BMJ VOLUME 317 , 1998 www.bmj.com
17. Otto Cars & Dusan Jasovsky,Antibiotic resistance (ABR) - no sustainability without antibiotics, ReAct – Action on Antibiotic Resistance,2015
18. Lindsay Morrison, Teresa R. Zembower,Antimicrobial Resistance Lindsay Morrison, MD*, Teresa R. Zembower, Gastrointest Endoscopy ,2020
19. A. Dowling, J. O' Dwyer and C.C. Adley, Antibiotics: Mode of action and mechanisms of resistance
20. Garima Kapoor, Saurabh Saigal , Ashok Elongavan,Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians,2017
21. Luria Leslie Founou, Raspail Carrel Founo and Sabiha Yusuf Essack, Antibiotic Resistance in the Food Chain: A Developing Country-Perspective,2016
22. Senka D`idi, Jagoda and Bla`enka Kos, Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects, 2007
23. JP Coleman and CJ Smith, Microbial Resistance, East Carolina University, Greenville, ,NC, USA,2014,
24. Isabella Sanseverino, Anna Navarro Cuenc a, Robert Loos, Dimitar Marinov and Teresa Lettieri State of the Art on the Contribution of Water to Antimicrobial Resistance,2018
25. Sajad Babakhani, Mana Oloomi Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria, Journal of basic microbiology,2018
26. Ruth M. Hall, Mobile gene cassettes and integrons: moving antibiotic resistance genes in Gram-negative bacteria, Division of Biomolecular Engineering, 1997
27. David P.Clark Nanette J.Pazdernik Michelle R.McGehee, Molecular Biology (Third Edition), Pages 712-748,Chapter 23 – Plasmids,2019
28. Mutai, Peter G. Waiyaki , Samuel Kariuki and Anne W. T. Muigai ,Plasmid profiling and incompatibility grouping of multidrug resistant Salmonella enterica serovar Typhi isolates in Nairobi, Kenya , 2019
29. Stefaniuk & Tyski,Colistin Resistance in Enterobacterales Strains – A Current View,2019
30. Evan Brennan, Marta Martins, Matthew P. McCusker, Juan Wang, Bruno Martins Alves, Daniel Hurley, Multidrug-Resistant Escherichia coli in Bovine Animals, Europe, 2016
31. Laurent Poirel and Patrice Nordmann,Emerging plasmid-encoded colistin resistance: the animal world as the culprit, 2016
32. J. Rodríguez-Santiago, P. Cornejo-Juárez, J. Silva-Sánchez, U. Garza-Ramos,

- Review Polymyxin resistance in Enterobacterales: overview and epidemiology in the Americas,2016
33. Poirel,Aurélie Jayol, Patrice Nordmanna, Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes Laurent, 2017
 34. Schwarz & Johnson, Transferable resistance to colistin: a new but old threat, Journal of antimicrobial chemotherapy,2016
 35. Yi-Yun Liu, Yan Zhu , Hasini Wickremasinghe, Phillip J. Bergen , Jing Lu , Xiao-Qing Zhu, Qiao-Li Zhou , Mohammad Azad , Sue C. Nang, Mei-Ling Han , Tao Lei, Jian Li, Jian-Hua Liu, Metabolic Perturbations Caused by the Over-Expression of mcr-1 in Escherichia coli ,Frontiers in microbiology,2020
 36. Rebelo, Valeria Bortolaia, S Kjeldgaard, K Pedersen Pimlapas Leekitcharoenphon, M Hansen, Beatriz Guerra, Burkhard Malorny, Maria Borowiak, Jens Andre Hammerl, Antonio Battisti, Alessia Franco, Patricia Alba, Agnes Perrin-Guyomard ,Sophie A Granier, Cristina De Frutos Escobar, Surbhi Malhotra-Kumar,Laura Villa, Alessandra Carattoli, Rene S Hendriksen, Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes , www.eurosurveillance.org,2018
 37. Perrin-Guyomard , M Bruneau , P Houée , K Deleurme , P Legrandois , C Poirier , C Soumet ,P Sanders,Prevalence of mcr-1 in commensal Escherichia coli from French livestock, Laboratoire de Fougères, Fougères, France,2016
 38. Akshay Sabnis , Katheryn LH Hagart , Anna Klo, Michele Becce, Lindsay E Evans, R Christopher Furniss , Despoina Al Mavridou, Ronan Murphy Mo,Ily M Stevens,Jane C Davies, Larrouy-Maumus, Thomas B Clarke, Andrew M Edwards, Colistin kills bacteria by targeting lipopolysaccharide in the cytoplasmic membrane ,2021
 39. Alberto Quesada, M. Concepcio´n Porrero, Sonia Te´llez,Gonzalo Palomo, Maria Garcia and Lucas Dominguez,Polymorphism of genes encoding PmrAB in colistin-resistant strains of Escherichia coli and Salmonella enterica isolated from poultry and swine, Journal of antimicrobial chemotherapy,2015
 40. Matthew E. Falagas and Sofia K. Kasiakou, Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections ,Alfa Institute of Biomedical Sciences (AIBS) and Department of Medicine, “Henry Dunant” Hospital, Athens, Greece; and 3 Tufts University School of Medicine, Boston, Massachusetts, 2005
 41. Gabhan Chalmers, Kristin E. Davis, Zvonimir Poljak, Robert Friendship, Michael R. Mulvey, Anne E. Deckert, Richard J. Reid-Smith, Patrick Boerlin, A method to detect Escherichia coli carrying the colistin-resistance genes mcr-1 and mcr-2 using a single real-time polymerase chain reaction and its application to chicken cecal and porcine fecal samples , The Canadian Journal of Veterinary Research,2018
 42. Md Bashir Uddin , Mohammad Nurul Alam , Mahmudul Hasan , S. M. Bayejed Hossain , Mita Debnath , Ruhena Begum , Mohammed A. Samad , Syeda Farjana Hoque , Md. Shahidur Rahman Chowdhury , Md. Mahfujur Rahman , Md. Mukter Hossain , Mohammad Mahmudul Hassan , Åke Lundkvist , Josef D. Järhult , Mohamed E. El Zowalaty and Syed Sayeem Uddin Ahmed ,Molecular Detection of Colistin Resistance mcr-1 Gene in Multidrug-Resistant Escherichia coli Isolated from Chicken ,2022
 43. Hui Li , Yingyu Wang , Qingshi Mengc , Yang Wang d, Guoliang Xia e , Xi Xiaa, Jianzhong Shena, Comprehensive proteomic and metabolomic profiling of mcr-1-

mediated colistin resistance in *Escherichia coli* , International Journal of Antimicrobial Agents ,2019

44. Morrison & Zembower, Antimicrobial Resistance , MD, MPH
45. Yi-Yun Liu, Yang Wang, Timothy R Walsh, Ling-Xian Yi, Rong Zhang, James Spencer, Yohei Doi, Guobao Tian, Baolei Dong, Xianhui Huang, Lin-Feng Yu, Danxia Gu, Hongwei Ren, Xiaojie Chen, Luchao Lv, Dandan He, Hongwei Zhou, Zisen Liang, Jian-Hua Liu, Jianzhong Shen, Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study, www.thelancet.com/infection ,2016
46. Rongsui Gao, Yongfei Hu, Zhencui Li, Jian Sun, Qingjing Wang, Jingxia Lin, Huiyan Ye, Fei Liu, Swaminath Srinivas , Defeng Li, Baoli Zhu , Ya-Hong Liu ,Tian, Youjun Feng,Dissemination and Mechanism for the MCR-1 Colistin Resistance, PLOS Pathogens 2016
47. Paitan,Current Trends in Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli*,2018
48. (Sun et al., 2017) Sun, Yongchang, Rongsui Gao,Jingxia Lin,Wenhui Wei,Swaminath Srinivas,Defeng Li, Run-Shi Yang, Xing-Ping Li,Xiao-Ping Liao,Ya-Hong Liu, Youjun Fenga, Deciphering MCR-2 Colistin Resistance, [mBio Journal Homepage \(asm.org\)](http://mBioJournalHomepage(asm.org)) ,2017
49. Anna A. Xexaki, Georges Filioussis, Theofilos Papadopoulos, Evangelia N. Sossidou, Evanthia Petridou ,Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from poultry farms in Greece