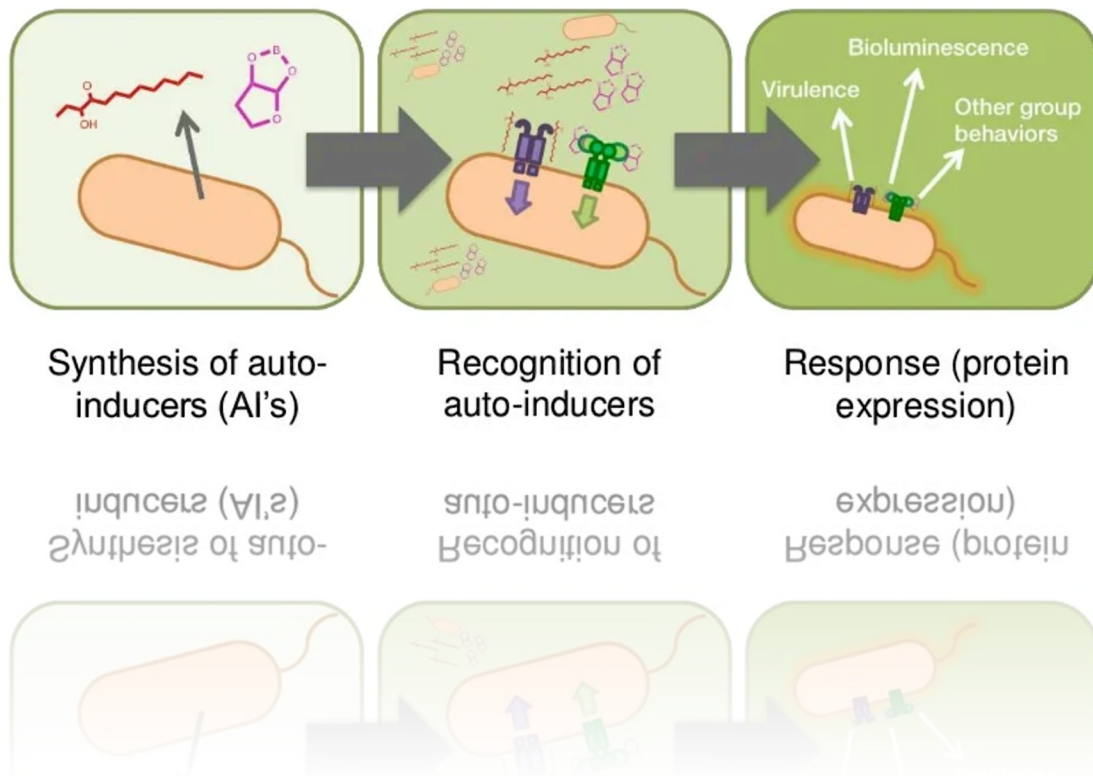




Διπλωματική Εργασία

Διερεύνηση του 'Quorum Sensing' συστήματος σε κλινικά δείγματα της *Pseudomonas* *aeruginosa*

Αικατερίνη Αποστολάκη του Χρήστου



Θέμα Διπλωματικής εργασίας

«Διερεύνηση του ‘Quorum Sensing’ συστήματος σε κλινικά δείγματα της
Pseudomonas aeruginosa»

Αικατερίνη Χ. Αποστολάκη

Diploma Thesis

“Investigation of the ‘Quorum Sensing’ system in *Pseudomonas aeruginosa*
clinical samples”

Aikaterini C. Apostolaki

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

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

Κωνσταντίνος Ματθιόπουλος (συνεπιβλέπων), Καθηγητής Μοριακής
Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευθυμία Πετεινάκη, Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας-Κλινικής
Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περιεχόμενα

	Σελ.
Ευχαριστίες	6
Περίληψη	7
Abstract	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
1.1.1 Ταξινόμηση και γενικά χαρακτηριστικά της <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
1.1.2 Ονοματολογία	11
1.1.3 Μορφολογία	11
1.1.4 Καλλιέργεια	11
1.1.5 Κλινική σημασία	11
1.2 Λοιμογόνοι παράγοντες	12
1.2.1 Λιποπολυσακχαρίτες (LPS) και πρωτεΐνες εξωτερικής μεμβράνης (OMP)	13
1.2.2 Σχηματισμός Βιοφίλμ	14
1.2.3 Κινητικότητα	16
1.2.4 Πρωτεϊνικά συστήματα εκροής (Secretion Systems)	16
1.2.5 Κυτταροτοξικότητα	16
1.2.6 Quorum Sensing (QS) συστήματα	17
i. Las system	
ii. Rhl system	
iii. Pqs system	
iv. Iqs system	
1.2.7 Ιεραρχία Quorum Sensing συστημάτων	21
1.2.8 Αλληλεπίδραση Quorum Sensing συστημάτων με το περιβάλλον	22
1.3 Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά	24
1.3.1 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά	25
i. Ενδογενείς μηχανισμοί	
ii. Επίκτητοι μηχανισμοί	
iii. Προσαρμοστικοί μηχανισμοί	
2 ΣΚΟΠΟΣ	31
3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	32
3.1 Λήψη δειγμάτων από ασθενείς	32
3.2 Καλλιέργεια κλινικών δειγμάτων από τα οποία έγινε απομόνωση των στελεχών <i>P. aeruginosa</i>	33
3.3 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA (DNA extraction)	33
3.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	34
3.4.1 Ανάλυση της μεθόδους Αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)	34

3.4.2	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ανίχνευση γονιδίων παθογονικότητας	36
	1. Γονίδιο <i>pslA</i>	
	2. Γονίδιο <i>toxA</i>	
	3. Γονίδιο <i>phzM</i>	
	4. Las σύστημα: Γονίδια <i>lasR</i> και <i>lasI</i>	
	5. Rhl σύστημα: Γονίδια <i>rhlR</i> και <i>rhlI</i>	
	6. Γονίδιο <i>lasB</i>	
	7. Γονίδιο <i>algD</i>	
3.5	Blastn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)	38
3.6	Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	39
3.7	Σχηματισμός και ανίχνευση βιοφίλμ	39
3.8	Έλεγχος σχηματισμού βιοφίλμ παρουσία ερυθρομυκίνης	40
3.9	Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβιοτικά	40
	3.9.1 Αναστολή παραγωγής πυοκυανίνης	40
	3.9.2 Αναστολή ανάπτυξης σε υγρή καλλιέργεια παρουσία αντιβιοτικών.	42
3.10	Απομόνωση RNA (RNA extraction)	42
3.11	Καθαρισμός RNA και καταστροφή DNA	43
3.12	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Αντίστροφης Μεταγραφής σε πραγματικό χρόνο (Real Time RT – PCR)	43
3.13	Κανονικοποίηση δεδομένων της RT – PCR	46
4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	47
4.1	Έλεγχος με PCR για την παρουσία γονιδίων παθογονικότητας στα δείγματα	47
	1. <i>pslA</i>	
	2. <i>toxA</i>	
	3. <i>phzM</i>	
	4. <i>lasI</i>	
	5. <i>lasR</i>	
	6. <i>rhlI</i>	
	7. <i>rhlR</i>	
	8. <i>lasB</i>	
	9. <i>algD</i>	
4.2	Έλεγχος παραγωγής πυοκυανίνης παρουσία και απουσία αντιβιοτικών	50
	4.2.1 Παραγωγή πυοκυανίνης απουσία αντιβιοτικών	50
	4.2.2 Παραγωγή πυοκυανίνης παρουσία ερυθρομυκίνης	52
	4.2.3 Παραγωγή πυοκυανίνης παρουσία άλλων αντιβιοτικών	53
	1. Κλαριθρομυκίνη	
	2. Αζιθρομυκίνη	
	3. Ριφαμπικίνη	

4. Κολιστίνη	
5. Λινεζολίδη	
6. Τομπραμυκίνη	
7. Κεφτριαξόνη	
8. Σιπροφλοξασίνη	
4.3 Αναστολή ανάπτυξης σε υγρή καλλιέργεια παρουσία αντιβιοτικών	60
i. Ερυθρομυκίνη	
ii. Μεροπενέμη	
iii. Ερυθρομυκίνη και Μεροπενέμη	
4.4 Παραγωγή Βιοφίλμ	63
4.4.1 Έλεγχος παραγωγής βιοφίλμ απουσία αντιβιοτικού	63
4.4.2 Έλεγχος παραγωγής βιοφίλμ παρουσία ερυθρομυκίνης	63
4.5 Έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης παρουσία ερυθρομυκίνης με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR)	64
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	67
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	70

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με την πλειοψηφία των πειραμάτων να πραγματοποιείται το διάστημα Φεβρουαρίου – Ιουλίου του 2022.

Πάνω από όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή της πτυχιακής μου εργασίας, Επίκουρο Καθηγητή Ιατρικής Μικροβιολογίας, κ. Παπαγιαννίτση Κωνσταντίνο. Η καθοδήγηση, η βοήθεια, οι συμβουλές και η συμμετοχή του σε όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας ήταν απαραίτητες για την πραγματοποίηση της διπλωματικής μου εργασίας. Στο διάστημα που πέρασα στο εργαστήριο υπήρχε άψογο κλίμα συνεργασίας και βοήθειας, το οποίο είναι απαραίτητο σε κάθε εργασιακό και εκπαιδευτικό χώρο. Ελπίζω πραγματικά όλες οι μελλοντικές μου συνεργασίες να είναι τόσο αποδοτικές και ευχάριστες.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μαθιόπουλο Κωνσταντίνο, Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, ως συνεπιβλέπων καθηγητής της πτυχιακής μου εργασίας.

Ακολούθως, οφείλω να ευχαριστήσω και την κ. Πετεινάκη Ευθυμία, η οποία ως καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας-Κλινικής Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής συνέβαλε στην επίτευξη του project.

Περίληψη

Η *P. aeruginosa* είναι ένας οπορτουμιστικά παθογόνος Gram-αρνητικός μικροοργανισμός, ο οποίος είναι υπεύθυνος για ένα μεγάλο ποσοστό λοιμώξεων σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Το βακτήριο διαθέτει μια πληθώρα γονιδίων παθογονικότητας, τα οποία παράγουν τοξίνες, όπως η πυοκυανίνη, αλλά και μια πρωτοφανή ανθεκτικότητα σε πολλά από τα συνηθισμένα αντιβιοτικά. Ταυτόχρονα, η δυνατότητα παραγωγής βιοφίλμ επιτρέπει στο βακτήριο να δημιουργεί αποικίες σε ιατρικές συσκευές και επιφάνειες αυξάνοντας την πιθανότητα μόλυνσης. Η έκφραση των γονιδίων παθογονικότητας αλλά και η παραγωγή βιοφίλμ στις αποικίες της *P. aeruginosa* καθοδηγούνται από συστήματα αλληλεπίδρασης και επικοινωνίας μεταξύ των μικροβίων, τα οποία ονομάζονται 'Quorum Sensing'. Στην *P. aeruginosa* έχουν βρεθεί τέσσερα 'Quorum Sensing' συστήματα, τα οποία έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση και να ρυθμίζονται τόσο το ένα από το άλλο όσο και από το περιβάλλον.

Στόχος της παρούσας ερευνητικής μελέτης ήταν η διερεύνηση του ρόλου των 'Quorum Sensing' συστημάτων στην έκφραση των γονιδίων παθογονικότητας και η πιθανή χρήση των συστημάτων για την καταπολέμηση πολυανθεκτικών στελεχών της *P. aeruginosa*. Ειδικότερα, 62 στελέχη ελέγχθηκαν με PCR για την ύπαρξη 9 γονιδίων παθογονικότητας που σχετίζονται με την κυτταροτοξικότητα της *P. aeruginosa*, την έκφραση των 'Quorum Sensing' συστημάτων και την παραγωγή βιοφίλμ. Δοκιμάστηκε, επίσης, η δυνατότητα παραγωγής πυοκυανίνης σε 9 αντιβιοτικά, ο ρυθμός ανάπτυξης, η ικανότητα παραγωγής βιοφίλμ παρουσία και απουσία ερυθρομυκίνης και η διαφορική έκφραση των γονιδίων παρουσία ερυθρομυκίνης μέσω RT-PCR.

Στην πλειονότητα των στελεχών βρέθηκαν αρκετά γονίδια παθογονικότητας, με κάποιους κλώνους να διαθέτουν στελέχη με αρκετά γονίδια και άρα να είναι πιο παθογόνοι από άλλους. Από τα αντιβιοτικά, μόνο οι μακρολίδες (ερυθρομυκίνη, κλαριθρομυκίνη και αζιθρομυκίνη) κατάφεραν να αναστείλουν την παραγωγή πυοκυανίνης, με την κλαριθρομυκίνη να είναι πιο αποτελεσματική στην αναστολή σε στελέχη, τα οποία δεν επηρεάστηκαν από τα άλλα 2 αντιβιοτικά. Τα υπόλοιπα αντιβιοτικά δεν επηρέασαν την παραγωγή πυοκυανίνης, εκτός ελαχίστων εξαιρέσεων. Κατά την ανάπτυξη σε καλλιέργεια παρουσία ερυθρομυκίνης και μεροπενέμης, 20/21 δείγματα παρουσίασαν αναστολή ανάπτυξης. Σε 6/20 η αναστολή ήταν μεγαλύτερη από αυτή που προκάλεσε κάθε αντιβιοτικό μεμονωμένα, κάτι που υποδεικνύει ότι η ταυτόχρονη χρήση των 2 αντιβιοτικών είναι πιο αποτελεσματική για την θεραπεία της λοίμωξης. Επιπλέον, το 72% των στελεχών είχε τη δυνατότητα παραγωγής βιοφίλμ, η οποία δεν επηρεάστηκε από την χρήση ερυθρομυκίνης. Τέλος, η ερυθρομυκίνη είχε ως αποτέλεσμα μείωση της έκφρασης των γονιδίων των 'Quorum Sensing' συστημάτων, με μεγαλύτερη μείωση στην έκφραση του συστήματος Rhl, και κατ' επέκταση μείωση στην έκφραση των γονιδίων παθογονικότητας που ελέγχονται από αυτά. Κάποια γονίδια μείωσαν την έκφραση τους περισσότερο από άλλα, όπως τα *phzM* και *algD*, υποδεικνύοντας ότι τα γονίδια αυτά επηρεάζονται περισσότερο από τα 'Quorum Sensing' συστήματα. Συνεπώς, οι μακρολίδες, όπως η ερυθρομυκίνη, λειτουργούν σαν αναστολείς των 'Quorum Sensing' συστημάτων και ο συνδυασμός τους με άλλα αντιβιοτικά τελευταίας γραμμής, όπως οι καρβαπενέμες (μεροπενέμη), είναι πιθανό να συμβάλλει στην επίλυση του προβλήματος της πολυανθεκτικότητας της *P. aeruginosa*.

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is an opportunist Gram-negative pathogen which is responsible for a variety of infections in immune compromised individuals. *P. aeruginosa* possesses an abundance of virulence factors and toxins like pyocyanin along with a strong resistance to most conventional antibiotics. The problem is further compounded by the ability of the pathogen to form a biofilm matrix in medical appliances and equipment which helps it spread and makes the treatment even more difficult. The expression of virulence genes and the formation of biofilm are guided by cell density-based intercellular communication systems called 'Quorum Sensing'. *P. aeruginosa* has four 'Quorum Sensing' systems that can modify gene expression and help the pathogen adjust in different circumstances. These systems can be regulated by each other and also by the environment of the pathogen.

The purpose of this study was to investigate the role of 'Quorum Sensing' in the expression of virulence genes and the possible use of the systems in order to control the spread of multi-resistant strains of *P. aeruginosa*. A collection of 62 strains was studied using PCR to identify the presence of 9 virulence genes associated with cytotoxicity, 'Quorum Sensing' and biofilm formation. In addition, the production of pyocyanin was tested in the presence of 9 antibiotics along with the production of biofilm with and without erythromycin and the growth rate with only erythromycin or meropenem and with both antibiotics. Lastly, using RT-PCR the differential expression of the 9 genes was checked in the presence of erythromycin.

The results show that a lot of virulence genes were found in the majority of the samples. Some clones consisted of strains that had many virulence genes proving that these clones were more pathogenic than others. As for the antibiotics, only macrolides (erythromycin, clarithromycin and azithromycin) had as a result the suppression of pyocyanin production in the samples. Among the macrolides, clarithromycin was more effective in the suppression of pyocyanin in strains that were not affected by the other macrolides. The rest of the antibiotics were not effective in most of the cases. The growth rate analysis in the presence of erythromycin and meropenem showed that 20/21 samples decreased their growth rate. According to the results, 6/20 had a greater reduction when using both antibiotics compared to the reduction when using each antibiotic individually. 72% of the samples had the ability to produce biofilm and this production was not suppressed in the presence of erythromycin. At last, the use of erythromycin decreased the expression of the genes involved in the 'Quorum Sensing' systems while affecting more the genes of the 'Quorum Sensing' system Rhl. The downregulation of those genes had an impact in the expression of the other virulence genes that are regulated by the 'Quorum Sensing' systems. However, some genes like *phzM* and *algD* decreased their expression more than others leading to the conclusion that those genes are more affected by the 'Quorum Sensing' systems. In summary, macrolides like erythromycin can be characterized as 'Quorum Sensing' inhibitors and therefore the use of macrolides along with other antibiotics such as carbapenems like meropenem may provide a solution to the problem of multi-resistant strains of *P. aeruginosa*.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

1.1.1 Ταξινόμηση και γενικά χαρακτηριστικά της *Pseudomonas aeruginosa*

Η *Pseudomonas aeruginosa* ανήκει στο ευρύτερο γένος των *Pseudomonas*, το οποίο αποτελεί τον βασικότερο εκπρόσωπο των αζυμωτικών βακτηρίων και προτάθηκε από τον Γερμανό βοτανολόγο Walter Migula, το 1894 (Πίνακας 1). Στο γένος αυτό, έχουν, μέχρι σήμερα, ενταχθεί 160 είδη ψευδομονάδων, εκ των οποίων λίγα μόνο εμπλέκονται σε νόσους του ανθρώπινου σώματος και άρα αποτελούν αντικείμενα μελέτης της Κλινικής Μικροβιολογίας (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. alcaligenes* και *P. pseudoalcaligenes*). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η *P. aeruginosa* ήταν από τα πρώτα βακτήρια του γένους που απομονώθηκαν, από τον Carle Gessard το 1882. Η απομόνωση έγινε από πληγές στρατιωτών που εμφάνιζαν το χαρακτηριστικό πράσινο ή μπλε χρώμα των αποικιών των συγκεκριμένων βακτηρίων (Moore, 2011). Ειδικότερα για το είδος, πρόκειται για οπορτουμιστικά παθογόνους μικροοργανισμούς, προαιρετικά αερόβιους και αρνητικούς κατά Gram. Κάποια επιπλέον στοιχεία σχετικά με την *P. aeruginosa* είναι ότι δεν έχει τη δυνατότητα παραγωγής σπορίων αλλά μπορεί να μετακινείται μέσω μαστίγιων, καταστρέφεται σε θερμοκρασία 55°C σε διάστημα 1 ώρας ενώ μπορεί να διατηρηθεί στο ψυγείο για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Μπορεί να ζήσει στο νερό για πολλούς μήνες αλλά και να διατηρηθεί και να πολλαπλασιαστεί σε μια πληθώρα υγρών διαλυμάτων, όπως υγρές επιφάνειες, θεραπευτικά υγρά ακόμα και αντισηπτικά σκευάσματα (Αρσένη, 1994).

Κατά την ταξινόμηση των στελεχών της *P. aeruginosa* προέκυψε ότι όλα τα στελέχη παρουσιάζουν τις παρακάτω κοινές ιδιότητες (Δημητρακόπουλος, 1954):

- Παραγωγή οξειδάσης
- Παραγωγή καταλάσης
- Αδυναμία ζύμωσης γλυκόζης
- Αδυναμία παραγωγής H₂S
- Αδυναμία διάσπασης λακτόζης και μαλτόζης
- Διάσπαση της γλυκόζης μέσω οξείδωσης και χωρίς παραγωγή κάποιου αερίου
- Διάσπαση γλυκονικού καλίου μέσω οξείδωσης

Ενώ η πλειονότητα των στελεχών έχει την δυνατότητα:

- Υδρόλυσης αργινίνης (96-98%)
- Παραγωγής πυοκυανίνης (>90%), πρόκειται για την χρωστική που προσδίδει το χαρακτηριστικό μπλε ή πράσινο χρώμα στα στελέχη *P. aeruginosa*

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

Είδος	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Συνώνυμο	<i>Bacterium aeruginosum</i>

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

1.1.2 Ονοματολογία

Όσον αφορά στην ονοματολογία, το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa* παίρνει το όνομα *Pseudomonas* από την ελληνική λέξη ψευδομονάδα (ψευδές + «μονάς» [μονάδα]) ενώ το *aeruginosa* έχει λατινική προέλευση και σημαίνει «σκουριά χαλκού», κάτι που προκύπτει από το χρώμα των αποικιών που προσομοιάζει αυτό της σκουριάς του χαλκού (Henry 2012). Στην ελληνική γλώσσα, η *P. aeruginosa* είναι επίσης γνωστή με τα ονόματα «βακτήριο του κυανού» ή «ψευδομονάδα η πυοκυανική», για τους ίδιους λόγους. Ο όρος «πυοκυανική» αναφέρεται στην χρωστική που είναι υπεύθυνη για το κυανό χρώμα, η οποία ονομάζεται πυοκυανίνη.



Εικόνα 1: Ανάπτυξη *P. aeruginosa* σε θρεπτικό υλικό
(Zhu, 2020)

1.1.3 Μορφολογία

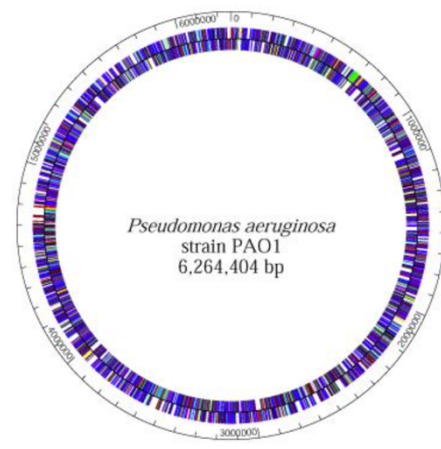
Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των βακτηρίων του είδους, τα οποία είναι παρόμοια για όλες τις ψευδομονάδες είναι:

- Σώμα ραβδοειδές ελαφρώς κεκαμμένο
- Μήκος 0,2 – 0,6 μm
- Διατεταγμένα είτε το κάθε μόνο του (μονάς) είτε σε ζεύγη
- Πολικά μαστίγια που βοηθούν στην κίνηση (Εικόνα 2)

Το γονιδίωμα τους αποτελείται από ένα κυκλικό χρωμόσωμα μήκους περίπου 5,5-7 Mbp και περιεκτικότητα G-C 65 – 67%, καθώς και από μια πληθώρα πλασμιδίων, (Remier, 2019). (Εικόνα 3)



Εικόνα 2: *P. aeruginosa* εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) (Centers of Disease Control and Prevention)



Εικόνα 3: Γονιδίωμα του στελέχους PAO1 (*Pseudomonas* Genome Database)

1.1.4 Καλλιέργεια

Το βακτήριο μπορεί να αναπτυχθεί σε εργαστηριακή κλίμακα σε διάφορα θρεπτικά μέσα όπως σε MacConkey agar, Mueller-Hinton (MH) agar και Αιματούχο (Blood) agar. Το εύρος της θερμοκρασίας που παρατηρείται ανάπτυξη της καλλιέργειας είναι 7°C (minimum) - 44°C (maximum), με ιδανική τους 37°C, ενώ το εύρος του pH είναι 5-9 (Remier, 2019). Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, οι *P. aeruginosa* πεθαίνουν στους 55°C.

1.1.5 Κλινική σημασία

Το μεγάλο ενδιαφέρον της Κλινικής Μικροβιολογίας σχετικά με την *P. aeruginosa* είναι αποτέλεσμα του γεγονότος ότι αποτελεί την πιο συχνή αιτία μόλυνσης στο αίμα, στους πνεύμονες και σε άλλα μέρη του σώματος, σε ασθενείς ύστερα από κάποια χειρουργική επέμβαση. Η σημαντική πλειονότητα των λοιμώξεων από το συγκεκριμένο βακτήριο λαμβάνει χώρα εντός του νοσοκομείου σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς ενώ σπάνια προσβάλλει υγιή άτομα τα οποία δεν νοσηλεύονται. Ειδικότερα, ασθενείς που πάσχουν από κυστική ίνωση, χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια ή και άλλες πνευμονοπάθειες και ασθενείς με ανοιχτές πληγές, αποτελούν τους βασικούς στόχους μόλυνσης από την ψευδομονάδα. Η μετάδοση θεωρείται ότι συμβαίνει με την χρήση μολυσμένων ιατρικών συσκευών και οργάνων καθώς έχουν βρεθεί αποικίες της ψευδομονάδας σε ιατρικά όργανα όπως καθετήρες, αναπνευστήρες, ενδοσκόπια και άλλα ή και μέσω του νοσηλευτικού προσωπικού. Κάποια επιπλέον στατιστικά στοιχεία που επιβεβαιώνουν την σοβαρότητα των μολύνσεων από το συγκεκριμένο βακτήριο είναι ότι η *P. aeruginosa* είναι υπεύθυνη για το 10% των λοιμώξεων που προκαλούνται από Gram-αρνητικά βακτήρια ενώ σε μια έρευνα που αφορά την Αμερική, το βακτήριο βρέθηκε στο 47% των ασθενών με κυστική ίνωση (Jurado-Martín, 2021).

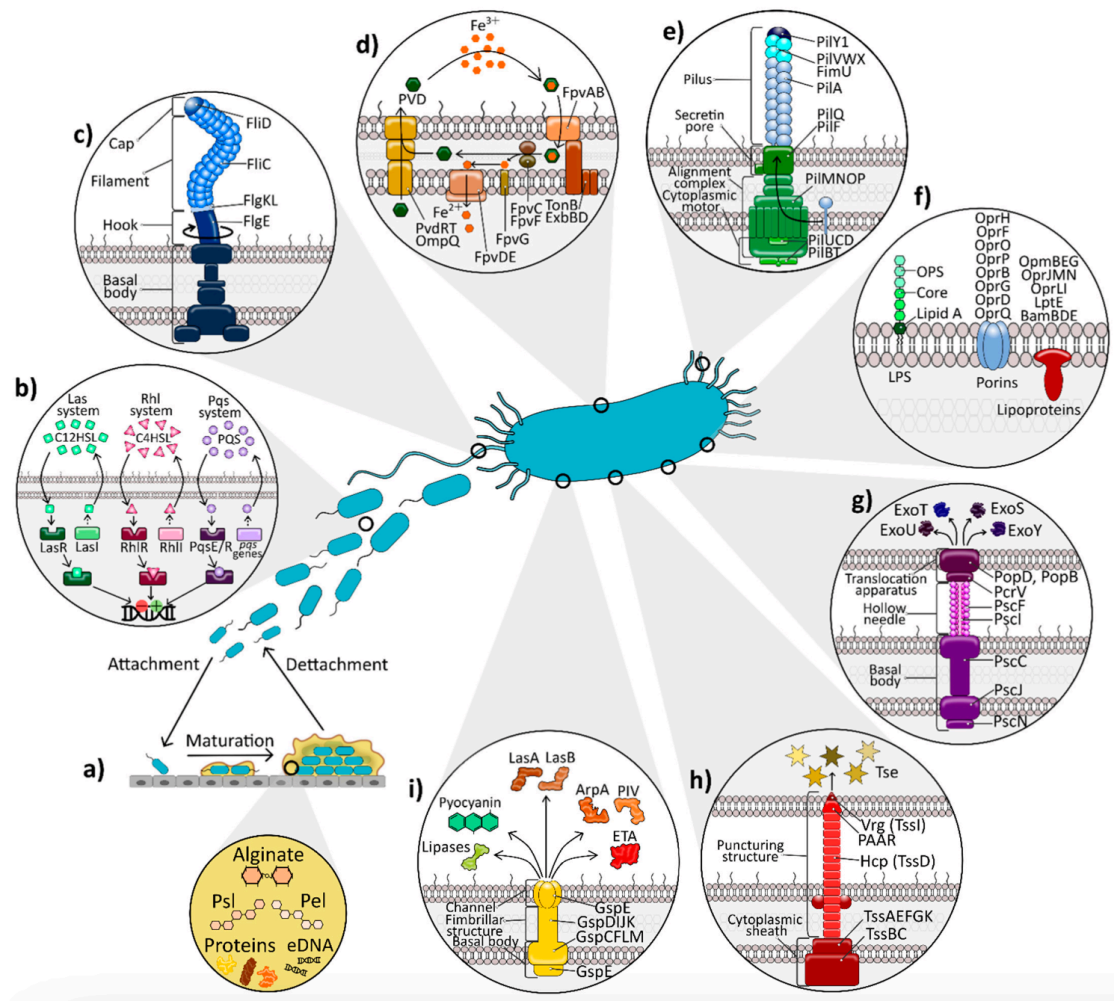
Η μεγάλη θνησιμότητα που είναι αποτέλεσμα της λοίμωξης από το βακτήριο οφείλεται σε τέσσερις παράγοντες (Pollack, 1995) (Carmelli, 1999):

- Παραγωγή βιοφίλμ, ενός έξω-πολυσακχαρίτη που προστατεύει το βακτήριο από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή
- Παραγωγή πολλών ενζύμων και τοξινών που συμβάλουν στην επιτυχημένη μόλυνση του ξενιστή από το βακτήριο
- Κατεσταλμένο ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή
- Εμφάνιση νοσοκομειακών στελεχών με αυξημένη ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά

Τα στελέχη *P. aeruginosa* παρουσιάζουν φυσική αντοχή σε ένα μεγάλο φάσμα αντιβιοτικών, γεγονός που καθιστά περίπλοκη τη θεραπεία των λοιμώξεων που προκαλούν. Το βακτήριο χαρακτηρίζεται από μεταβολική ευελιξία, έχει δηλαδή την ικανότητα να αλλάζει τον μεταβολισμό του ανάλογα με το περιβάλλον και τις απειλές που δέχεται από αυτό την εκάστοτε στιγμή. Επίσης, σε ασθενείς που είχαν μολυνθεί αρχικά από ένα στέλεχος του βακτηρίου παρατηρήθηκε ότι ύστερα από κάποιο χρονικό διάστημα τα στελέχη *P. aeruginosa* που απομονώθηκαν από αυτούς διέφεραν τόσο γενετικά όσο και μορφολογικά από τα αρχικά στελέχη. Το γεγονός αυτό αποτελεί την απόδειξη ότι το βακτήριο έχει τη δυνατότητα να προσαρμόζεται και να εξελίσσεται εντός του ξενιστή, αποκτώντας νέα χαρακτηριστικά, όπως για παράδειγμα η ανθεκτικότητα σε ένα αντιβιοτικό, που καθιστούν ακόμα πιο δύσκολη τη θεραπεία (Jurado-Martín, 2021). Για τους λόγους αυτούς, η *P. aeruginosa* αποτελεί εδώ και χρόνια αντικείμενο εντατικής έρευνας.

1.2 Λοιμογόνοι παράγοντες

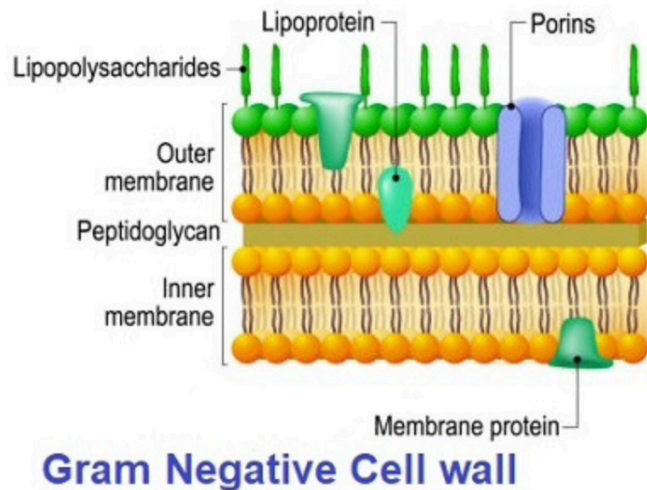
Όπως αναφέρθηκε ήδη, η *P. aeruginosa* έχει ένα ισχυρό οπλοστάσιο με παράγοντες παθογονικότητας που την προστατεύουν τόσο από τα άλλα βακτήρια που ανταγωνίζεται όσο και από τα αντιβιοτικά, ενώ ταυτόχρονα συμβάλλουν στη διαδικασία πρόκλησης λοίμωξης. Σε αυτό το σημείο, θα γίνει μια αναφορά στους πιο σημαντικούς από αυτούς τους παράγοντες (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση των βασικών συστημάτων που εμπλέκονται στην πρόκληση λοίμωξης από την *P. aeruginosa* (Jurado-Martín, 2021)

1.2.1 Λιποπολυσακχαρίτες (LPS) και πρωτεΐνες εξωτερικής μεμβράνης (OMP)

Η κυτταρική μεμβράνη της *P. aeruginosa* αποτελείται από ένα στρώμα πεπτιδογλυκάνης, όπως σε όλα τα Gram-αρνητικά βακτήρια, το οποίο όμως καλύπτεται από την εξωτερική μεμβράνη που περιλαμβάνει φωσφολιπίδια προς το εσωτερικό της και λιποπολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες προς το εξωτερικό (Εικόνα 5). Η δομή του κυτταρικού τοιχώματος παρέχει, αρχικά, προστασία στο βακτήριο από άλλα γειτονικά βακτήρια και από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού του ξενιστή, ενώ παράλληλα μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση του βακτηρίου με τα κύτταρα του ξενιστή για την πρόκληση τοξικότητας και την καταστροφή των ιστών. Οι λιποπολυσακχαρίτες συμμετέχουν, στην παραγωγή βιοφίλμ και κυστιδίων που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επικοινωνία μεταξύ των βακτηρίων. Αντίστοιχα, οι πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης είναι κατά κανόνα πορίνες με βασικό ρόλο την διατήρηση της εξωτερικής μεμβράνης ώστε να μην είναι διαπερατή από παράγοντες που πρόκειται να βλάψουν στο βακτήριο και την ανταλλαγή ιόντων και άλλων στοιχείων. Εμφανίζουν, όμως, και κυτταροτοξική δράση καθώς συμβάλλουν στην προσκόλληση του βακτηρίου σε άλλα βακτήρια ή σε κύτταρα του ξενιστή, επισπεύδοντας την διαδικασία της μόλυνσης (Jurado-Martín, 2021) (Εικόνα 4 (f)).



Εικόνα 5: Δομή κυτταρικού τοιχώματος Gram-αρνητικών βακτηρίων
(By Clip Art Illustrations)

1.2.2 Σχηματισμός βιοφίλμ

Η *P. aeruginosa* αποτελεί τον οργανισμό μοντέλο για την μελέτη της παραγωγής βιοφίλμ. Το βιοφίλμ είναι μία μήτρα από εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες (EPS), οι οποίες παράγονται από τα βακτήρια και δημιουργούν ένα περιβάλλον γύρω από αυτά που τα προστατεύει και τα μονώνει από τις εξωτερικές συνθήκες. Η ύπαρξη βιοφίλμ διαπιστώθηκε για πρώτη φορά το 1978 (Costerton, 1978). Με αυτό τον τρόπο, τα βακτήρια προστατεύονται από εχθρικά κύτταρα αλλά και από μη ευνοϊκές συνθήκες θερμοκρασίας ή οξύτητας. Ένα βιοφίλμ μπορεί να περιέχει βακτήρια ακόμα και διαφορετικού γένους, στα οποία παρέχει τη δυνατότητα ανταλλαγής γονιδίων μέσω πλασμιδίων, κάτι που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή καλύτερα προσαρμοσμένων και πιο εξελιγμένων βακτηρίων. Τέλος, το βιοφίλμ αποτελεί την πιο συνηθισμένη πηγή μόλυνσης καθώς μπορεί να εδράζει πάνω σε ιατρικά εργαλεία, με στοιχεία να υποδεικνύουν πως πάνω από το 65% των μολύνσεων από *P. aeruginosa* προέρχονται από αυτό (Rajkumaria, 2018) (Εικόνα 4 (a)).

Όσον αφορά στην *P. aeruginosa*, το βιοφίλμ που παράγει αποτελείται κυρίως από εξωπολυσακχαρίτες (*Psl* και *Pel*), αλγινικό οξύ, εξωκυτταρικό DNA (eDNA), λιπίδια και πρωτεΐνες, με την ποσότητα eDNA στο ώριμο βιοφίλμ να είναι έξι φορές μεγαλύτερη από αυτή των πρωτεϊνών (Olivares, 2020).

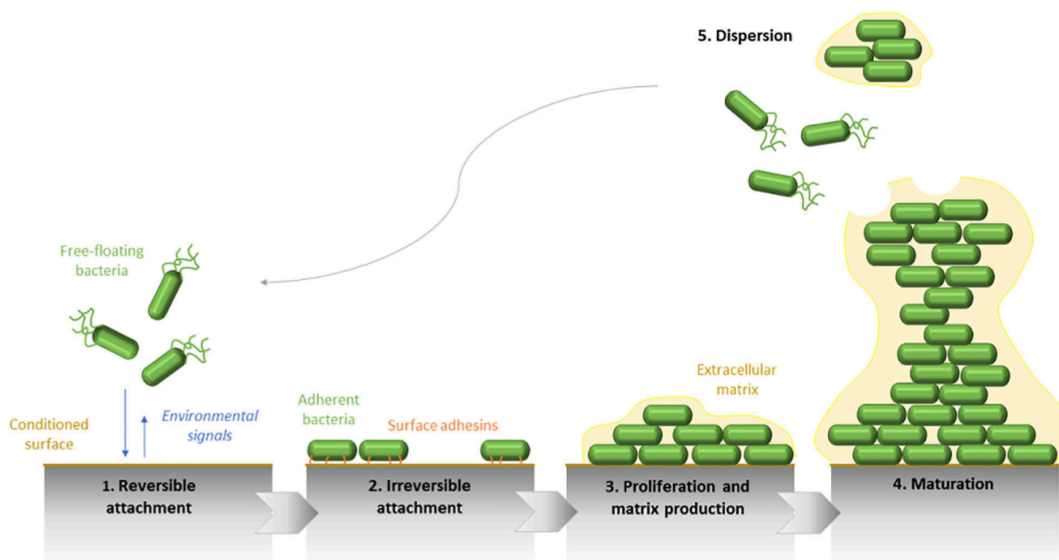
Αφού έγινε μία σύντομη αναφορά στα πλεονεκτήματα που παρέχει το βιοφίλμ στα βακτήρια, ακολουθεί η διαδικασία παραγωγής του, η οποία αποτελείται από πέντε βασικά βήματα (Εικόνα 6).

1. Αρχικά ελεύθερα βακτήρια εντοπίζουν μέσω σημάτων μια επιφάνεια, η οποία παρέχει τις ιδανικές συνθήκες (pH, οξυγόνο, θερμοκρασία, ώσμωση κλπ.) και προσκολλώνται σε αυτήν μέσω φυσικοχημικών και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Η προσκόλληση σε αυτή τη φάση είναι αντιστρεπτή.
2. Στο 2^ο βήμα, οι δεσμοί μεταξύ των βακτηρίων και της επιφάνειας γίνονται ισχυρότεροι καθώς εμπλέκονται και άλλα βακτηριακά συστατικά όπως η πύλη τύπου

IV που σταθεροποιεί την προσκόλληση ώστε να μην είναι πλέον αντιστρεπτή (Εικόνα 4 (e)).

3. Στη συνέχεια, τα βακτήρια που βρίσκονται προσκολλημένα στην επιφάνεια, ξεκινούν την παραγωγή των έξω-πολυσακχαριτών που θα δημιουργήσουν το βιοφίλμ ενώ ταυτόχρονα πολλαπλασιάζονται. Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα μέσω σημάτων που παράγονται από τα βακτήρια. Τα σήματα βοηθούν τα βακτήρια να επικοινωνήσουν μεταξύ τους ώστε να ρυθμιστεί η γονιδιακή έκφραση για την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων που εξυπηρετούν την παραγωγή βιοφίλμ.
4. Ακολουθεί η προσκόλληση επιπλέον βακτηρίων και η δημιουργία του ώριμου βιοφίλμ. Οι εξωκυτταρικές αποφύσεις του βιοφίλμ δρουν σαν αισθητήρες, οι οποίοι, με τα σήματα που παράγουν, οδηγούν στην μείωση της κινητικότητας των ελεύθερων βακτηρίων και τελικά στην προσκόλληση τους στο βιοφίλμ. Το ώριμο βιοφίλμ, εκφράζει διαφορετικά γονίδια ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξής του ή και ανάλογα με το μέρος (επιφάνεια ή κέντρο).
5. Σαν τελευταίο βήμα θα μπορούσε να θεωρηθεί η αποδιάταξη του βιοφίλμ, η οποία είναι δυνατό να προκύψει ύστερα από μηχανικές διαταραχές, έλλειψη θρεπτικών συστατικών ή ακόμα και μεγάλη αύξηση του πληθυσμού. Στην περίπτωση αυτή, τμήματα του βιοφίλμ «ξεκολλούν» από την επιφάνεια και απελευθερώνονται στο περιβάλλον όπου πρόκειται να βρουν μια νέα επιφάνεια προσκόλλησης, με στόχο τη διασπορά των βακτηρίων (Olivares, 2020).

Όπως γίνεται σαφές, ο ρόλος του βιοφίλμ στην μετάδοση λοιμώξεων από βακτήρια όπως η *P. aeruginosa* είναι καίριος. Για τον λόγο αυτό, εντατικές μελέτες λαμβάνουν χώρα με σκοπό την ανεύρεση τρόπων ώστε να εμποδιστεί η παραγωγή του βιοφίλμ από τα βακτήρια και άρα αυτά να είναι εκτεθειμένα στο περιβάλλον για την ευκολότερη στόχευση τους από τα διάφορα αντιβιοτικά.



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση των 5 βημάτων παραγωγής βιοφίλμ (Olivares, 2020)

1.2.3 Κινητικότητα

Ένα ακόμα χαρακτηριστικό της *P. aeruginosa* που συμβάλει στην πρόκληση λοίμωξης είναι η ευκινησία της, η οποία επιτυγχάνεται μέσω του μαστίγιου που διαθέτει. Τα διάφορα σήματα από το περιβάλλον γίνονται αντιληπτά μέσω του μαστίγιου και προσανατολίζουν χημειοτακτικά το βακτήριο είτε προς τα κύτταρα του ξενιστή ώστε να προκληθεί μόλυνση, όπως στην περίπτωση των επιθηλιακών κυττάρων των ασθενών με κυστική ίνωση, είτε προς ένα ήδη υπάρχον βιοφίλμ. Επιπλέον, πειράματα έχουν επιβεβαιώσει ότι μεταλλάξεις της *P. aeruginosa* που έχουν ως αποτέλεσμα την απουσία των πρωτεϊνών του μαστίγιου, οδηγούν σε λιγότερο ανθεκτικά στελέχη που είναι ευάλωτα σε κάποιες πρωτεΐνες του ανοσοποιητικού του ξενιστή (Jurado-Martín, 2021) (Εικόνα 4 (c)).

1.2.4 Πρωτεϊνικά συστήματα εκροής (Secretion Systems)

Η *P. aeruginosa* διαθέτει πέντε συστήματα εκροής που χρησιμεύουν για την απελευθέρωση πλήθους τοξινών και υδρολυτικών ενζύμων ώστε να επιτεθούν στον ξενιστή. Τα συστήματα εκροής τύπου 1 και 5 (T1SS, T5SS) έχουν την πιο απλή δομή και εκκρίνουν αρκετές τοξίνες ενώ το σύστημα εκροής τύπου 2 (T2SS) είναι το πιο διαδεδομένο και έχει τις περισσότερες χρήσεις. Το σύστημα εκροής τύπου 3 (T3SS) διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην καταστροφή των κυττάρων του ξενιστή καθώς έχει τη δυνατότητα να εκκρίνει τοξίνες απευθείας μέσα στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Αντίθετα, τα συστήματα εκροής τύπου 1, 2 και 5 ελευθερώνουν τις τοξίνες πρώτα στο περίπλασμα και στη συνέχεια στο κυτταρόπλασμα. Πρόσφατα ανακαλύφθηκε το σύστημα εκροής τύπου 6 (T6SS), το οποίο λειτουργεί με παρόμοιο τρόπο με το T3SS με τη διαφοροποίηση ότι εστιάζει κυρίως στην καταστροφή βακτηρίων χλωρίδας του ξενιστή (Jurado-Martín, 2021) (Εικόνα 4 (g,h,i)).

1.2.5 Κυτταροτοξικότητα

Σε αυτό το σημείο θα γίνει αναφορά στις βασικότερες τοξίνες και ένζυμα που εμπλέκονται στη διαδικασία της μόλυνσης.

- **Εξωτοξίνη A (*toxA*):** Πρόκειται για μια τοξίνη με δράση ADP-ριβοζυλοτρανσφεράσης, η οποία απελευθερώνεται από το εκκριτικό σύστημα τύπου 2 και εισάγεται στα κύτταρα του ξενιστή μέσω ενδοκύτωσης. Εντός του κυττάρου, διακόπτει την πρωτεϊνοσύνθεση και εγείρει την απόπτωση.
- **Πρωτεολυτικά ένζυμα:** Ένα παράδειγμα τέτοιων ενζύμων είναι η ελαστάση (*lasB*), η οποία υδρολύει την ελαστίνη και το κολλαγόνο του ξενιστή και εκκρίνεται από το εκκριτικό σύστημα τύπου 2 υπό την επίδραση σημάτων. Εκτός από τις δύο πρωτεΐνες, υδρολύει και άλλες πρωτεΐνες που παράγονται από το ανοσοποιητικό του ξενιστή προσφέροντας προστασία στα βακτήρια. Θεωρείται η πιο άφθονη πρωτεάση.
- **Λιπολυτικά ένζυμα:** Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι λιπάσες, οι οποίες «κόβουν» τα λιπίδια απελευθερώνοντας λιπαρά οξέα και γλυκερόλη. Η φωσφολιπάση C, για παράδειγμα, εκκρίνεται από το εκκριτικό σύστημα τύπου 2 και διασπά τα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης των ευκαρυωτικών κυττάρων οδηγώντας σε κυτταρική λύση.
- **Πυοκυανίνη:** Είναι μια φαιναζίνη που προσδίδει στις αποικίες των βακτηρίων μπλε – πράσινο χρώμα. Απελευθερώνεται από το εκκριτικό σύστημα τύπου 2 και συνδέεται

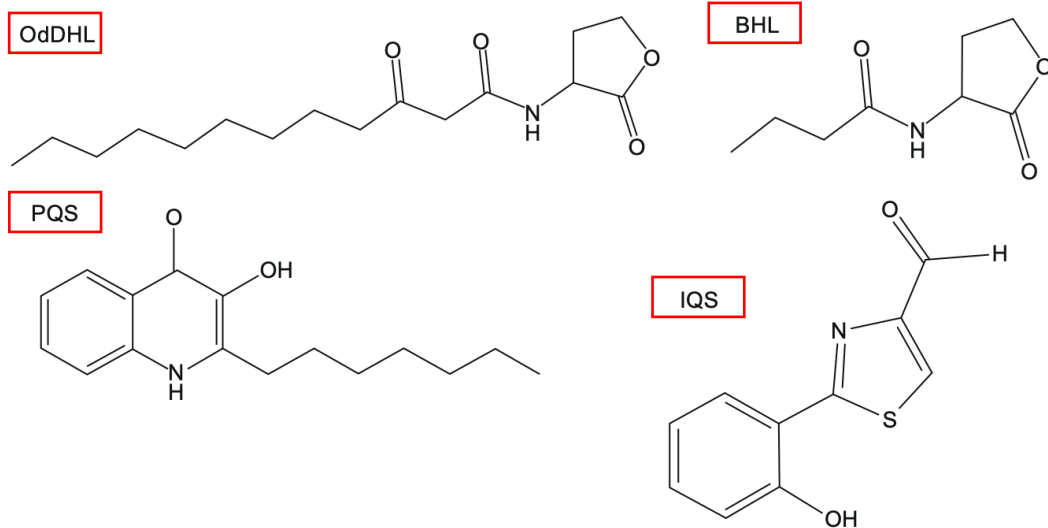
σε μεγάλο βαθμό με την σοβαρότητα της μόλυνσης ιδιαίτερα στους πνεύμονες. Ο ρόλος της κατά την μόλυνση του κυττάρου είναι η αύξηση του οξειδωτικού στρες με την αύξηση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) και του H_2O_2 , καταστρέφοντας πολλά συστατικά του κυττάρου και οδηγώντας το σε λύση.

- **Σιδηροφόρα:** Τα μόρια που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία έχουν την δυνατότητα να διασπούν πρωτεΐνες του ξενιστή και να συλλέγουν τον Fe προς όφελος του βακτηρίου. Βασικό σιδηροφόρο μόριο αποτελεί η πυοβερδίνη, η οποία προσδίδει ένα κίτρινο χρώμα στις αποικίες βακτηρίων που την παράγουν. Εκτός από την συλλογή Fe, έχει επίσης την δυνατότητα παραγωγής ROS με αποτέλεσμα την πρόκληση κυτταροτοξικότητας (*Jurado-Martín, 2021*) (Εικόνα 4 (d)).

1.2.6 Quorum Sensing (QS) συστήματα

Ο όρος 'Quorum Sensing' προτάθηκε για πρώτη φορά το 1994 και αφορούσε στην επικοινωνία μεταξύ των βακτηρίων που βασίζεται στην πυκνότητα του πληθυσμού, μέσω της οποίας ρυθμίζεται η γονιδιακή τους έκφραση ώστε να αντιδρούν σε ερεθίσματα του περιβάλλοντος (*Castric, 1994*). Τα ερεθίσματα αυτά μπορούν να είναι επιθετικά, δηλαδή η επίθεση σε κύτταρα του ξενιστή ώστε να προκληθεί λοίμωξη, ή και αμυντικά, όπως η προστασία από τους αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή. Έχουν βρεθεί αρκετά 'Quorum Sensing' συστήματα σε διάφορα παθογόνα, τα οποία κατά κανόνα ρυθμίζουν την έκφραση παραγόντων παθογονικότητας και την παραγωγή βιοφίλμ. Αυτό που συμβαίνει κατά την επικοινωνία αυτή είναι ότι τα βακτήρια παράγουν μικρά χημικά μόρια που λειτουργούν σαν σήματα, τα οποία μπορούν να συνδεθούν σε συγκεκριμένους υποδοχείς και να οδηγήσουν σε μια γονιδιακή ρύθμιση. Τα σήματα αυτά, όταν παράγονται από λίγα μόνο βακτήρια, δεν είναι τόσο ισχυρά ώστε να οδηγήσουν σε γονιδιακή ρύθμιση. Όσο αυξάνεται, όμως, η πυκνότητα ενός πληθυσμού βακτηρίων, τόσο αυξάνεται και η ποσότητα του σήματος. Συνεπώς, σε μεγάλους πληθυσμούς το σήμα είναι επαρκές ώστε να προκαλέσει αλλαγές στην έκφραση ορισμένων γονιδίων (*Lee, 2015*).

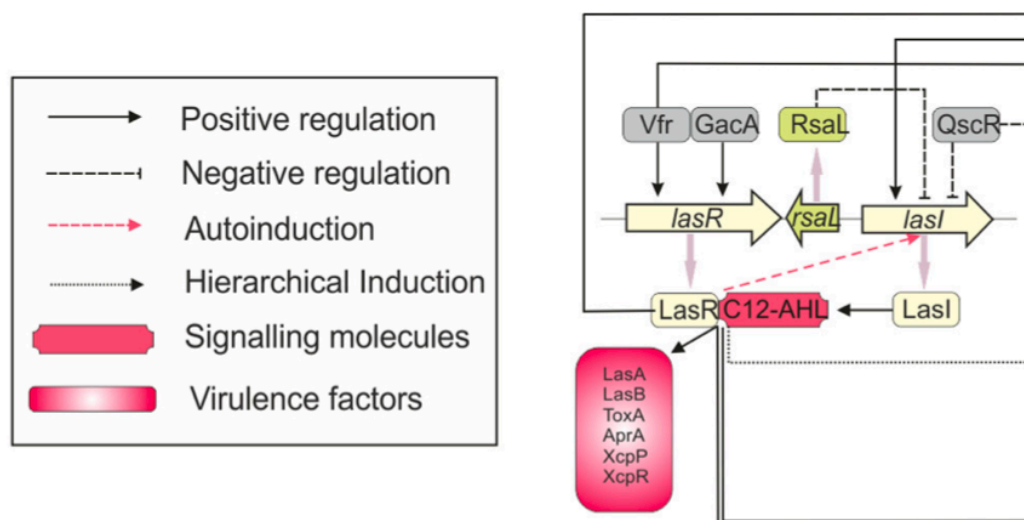
Στην περίπτωση της *P. aeruginosa*, μεγάλο ενδιαφέρον υπάρχει σχετικά με τα 'Quorum Sensing' συστήματα και το πώς αυτά αλληλεπιδρούν βοηθώντας το βακτήριο να προσαρμοστεί σε διαφορετικές συνθήκες, ενίοτε στρεσογόνες. Οι πληροφορίες από τις έρευνες αυτές θα οδηγήσουν στην παραγωγή θεραπευτικών σκευασμάτων που θα στοχεύουν στην αναστολή των 'Quorum Sensing' συστημάτων. Έχουν ανακαλυφθεί τέσσερα βασικά 'Quorum Sensing' συστήματα στην *P. aeruginosa*.



Εικόνα 7: Δομές από τα 4 σηματοδοτικά μόρια των Quorum Sensing συστημάτων της *P. aeruginosa* (Lee, 2015)

i. Las system

Στο σύστημα Las, το γονίδιο *lasI* κωδικοποιεί μια αυτοεπαγόμενη συνθάση που παράγει το χημικό σήμα C12HSL, μια λακτόνη της N-3 οξοδωδεκανοϋλομόσερινης (*N-3-oxododecanoyl-L-homoserine lactone (OdDHL)*), χαρακτηριστικό αυτού του συστήματος (Εικόνα 7). Το χημικό σήμα C12HSL συνδέεται στο προϊόν του γονιδίου *lasR*, πρόκειται για έναν μεταγραφικό ενεργοποιητή, δημιουργώντας ένα σύμπλοκο, το οποίο ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων παθογονικότητας που εξαρτώνται από αυτό. Χαρακτηριστικά γονίδια που ρυθμίζονται από το σύστημα αυτό είναι τα *lasA*, *lasB* και *toxA*, στα οποία έγινε αναφορά και νωρίτερα. Παράλληλα, το σύμπλοκο ενισχύει την μεταγραφική έκφραση του γονιδίου *lasI*, δημιουργώντας έναν κύκλο θετικής ανατροφοδότησης, ενώ υπάρχει και ένα άλλο γονίδιο, το *RsaL*, το οποίο αναστέλλει την παραγωγή του *lasI* και άρα και του C12HSL (Εικόνα 8) (Jack, 2018).



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση των γονιδίων και των αλληλεπιδράσεων τους στο σύστημα Las (Jack, 2018)

Γενικά, το σύστημα Las καθώς και τα γονίδια που ρυθμίζονται από αυτό, είναι υπεύθυνο για τα παρακάτω: (Jack, 2018)

- Μείωση της σύνθεσης του *pel* πολυσακχαρίτη
- Ρύθμιση παραγωγής του εκκριτικού συστήματος τύπου 6 (T6SS)
- Απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων των αεραγωγών
- Πρόκληση κυτταρικού θανάτου των κυττάρων του ανοσοποιητικού του ξενιστή
- Και γενικότερα την ενίσχυση του πληθυσμού των ανθεκτικών βακτηρίων *P. aeruginosa* που έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση βαριάς και χρόνιας μόλυνσης

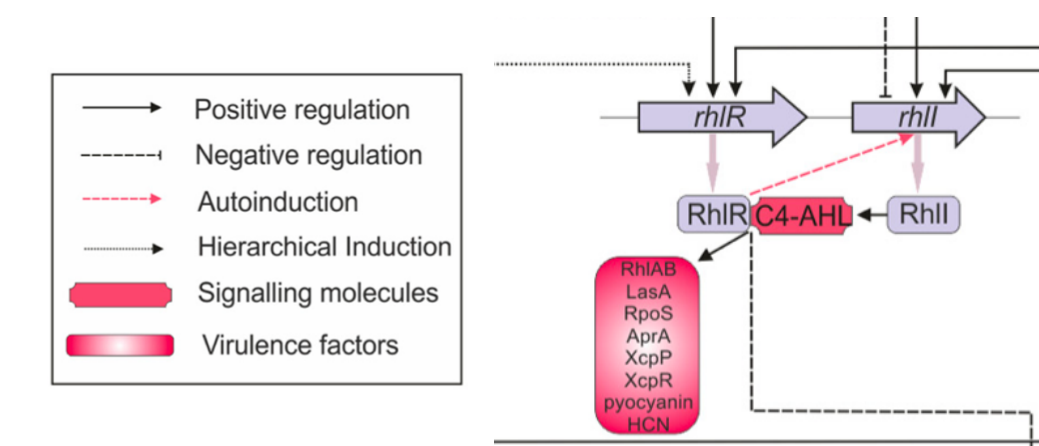
ii. Rhl system

Το σύστημα Rhl ακολουθεί μία παρόμοια φιλοσοφία με αυτή του Las. Ειδικότερα, υπεύθυνο για το σήμα είναι το γονίδιο *rhlI* που παράγει, επίσης, μια λακτόνη της ακυλο-ομοσερίνης (AHL), η οποία σε αυτή την περίπτωση είναι η C4HSL, λακτόνη της N-βουτυριλίνης-L-ομοσερίνης (*N-butyryl-L-homoserine lactone (BHL)*) (Εικόνα 7). Το χημικό σήμα συνδέεται με τον μεταγραφικό ενεργοποιητή *RhlR* και ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων που εξαρτώνται από αυτό (Εικόνα 9). Ένα ακόμα στοιχείο που παρουσιάζει ενδιαφέρον είναι ότι ο αναστολέας του συστήματος Las, *RsaL*, έμμεσα επάγει την έκφραση του *rhlI*, ενισχύοντας την λειτουργία του συστήματος Rhl (Jack, 2018).

Το σύστημα Rhl: (Jack, 2018)

- Επηρεάζει την έκφραση των παραγόντων παθογονικότητας *lasA*, *lasB* καθώς και άλλων
- Ενισχύει την παραγωγή ραμνολιπιδίων
- Ενισχύει την παραγωγή βιοφίλμ
- Καταστέλλει το εκκριτικό σύστημα τύπου 3 (T3SS)
- Ενισχύει την παραγωγή πυοκυανίνης

Γενικά, η ανάλυση της έκφραση ολόκληρου του γονιδιώματος της *P. aeruginosa* οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το 10% των γονιδίων της ελέγχεται από τα συστήματα Las και Rhl (Schuster, 2003).

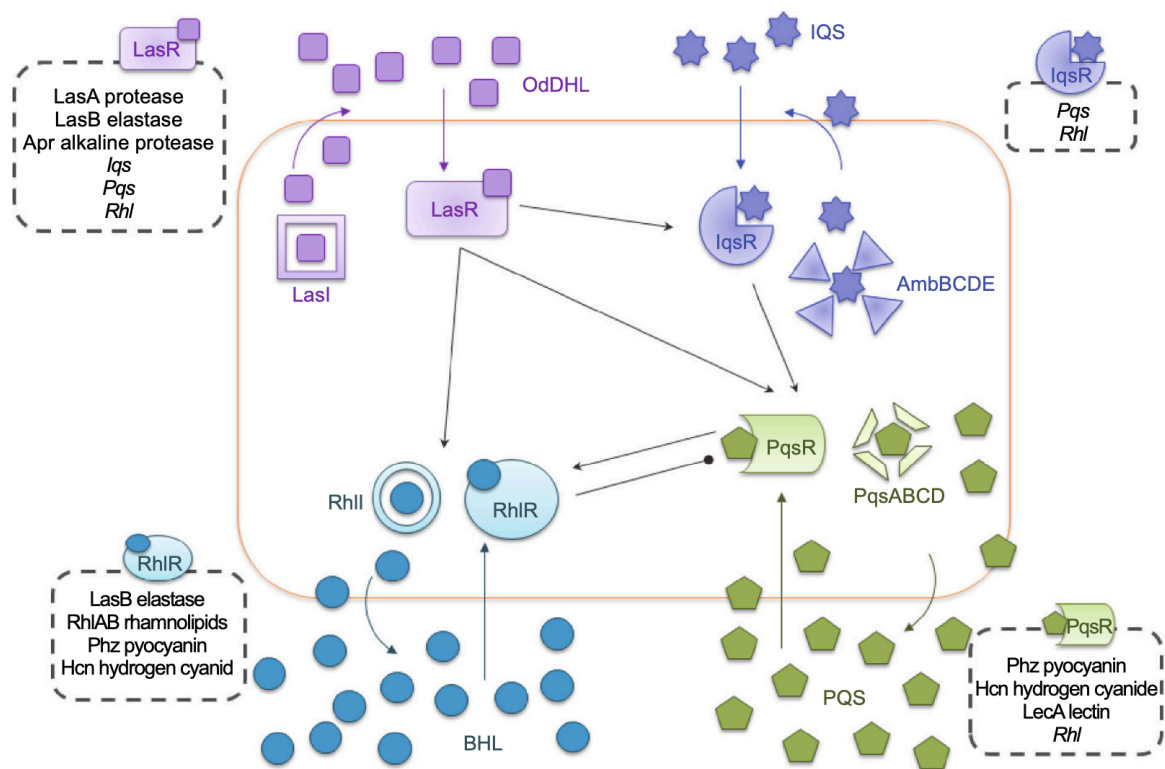


Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση των γονιδίων και των αλληλεπιδράσεων τους στο σύστημα Rhl (Jack, 2018)

Rhl δεν ήταν λειτουργικά. Όσον αφορά τη σχέση σου με το σύστημα Las, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις πως ελέγχεται από αυτό (Lee, 2013). Παράλληλα, έχει αποδειχθεί πως επηρεάζει θετικά την παραγωγή πυοκυανίνης, ραμνολιπιδίων και ελαστάσης ενώ ταυτόχρονα αντιλαμβάνεται την έλλειψη φωσφορικών ιόντων από το περιβάλλον και ενεργοποιεί την έκφραση κατάλληλων γονιδίων. Εντός των κυττάρων του ξενιστή, προκαλεί κυτταρικό θάνατο μέσω υπονόμησης των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA (Wang, 2019).

1.2.7 Ιεραρχία των συστημάτων Quorum Sensing

Τα τέσσερα συστήματα 'Quorum Sensing' αλληλεπιδρούν και ρυθμίζονται το ένα από το άλλο δημιουργώντας ένα πολυεπίπεδο σύστημα επικοινωνίας με μεγάλη πολυπλοκότητα. Η πολυπλοκότητα αυτή είναι υπεύθυνη για την προσαρμογή του βακτηρίου σε πολλά περιβάλλοντα και την έκφραση των κατάλληλων γονιδίων σε κάθε χρονική στιγμή ενώ παράλληλα συμβάλλει στην αλληλεπίδραση μεταξύ διαφορετικών βακτηρίων και την συνεργατική τους δράση προς το μεγαλύτερο τους όφελος.



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση των τεσσάρων 'Quorum Sensing' συστημάτων της *P. aeruginosa* και της μεταξύ τους διασύνδεσης (Lee, 2015)

Σύμφωνα με την Εικόνα 11, στην κορυφή της ιεραρχίας βρίσκεται το σύστημα Las, το οποίο μέσω του συμπλόκου μεταγραφικού ενεργοποιητή *lasR* – C12HSL επάγει την έκφραση των *rhIR*, *rhII*, *iqsR*, *pqsR* και *pqsH*. Απουσία είτε του γονιδίου *lasI* είτε του *lasR*, το σύστημα IQS παύει να λειτουργεί. Παράλληλα, η απουσία του *lasR* είχε ως αποτέλεσμα μια καθυστερημένη παραγωγή του PQS και όχι την διακοπή λειτουργίας του, όπως θα αναμενόταν. Το σύμπλοκο *lasR* – C12HSL ρυθμίζει, επίσης θετικά, την έκφραση του *lasI*,

δημιουργώντας ένα κύκλο θετικής ανατροφοδότησης. Δεν υπάρχουν δεδομένα που να υποστηρίζουν ότι το σύστημα Las ρυθμίζεται από κάποιο άλλο σύστημα (Lee, 2015).

Όσον αφορά το σύστημα Rhl, δέχεται ισχυρή επίδραση από όλα τα άλλα συστήματα. Το RhlR διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αυξορύθμιση του *lasI* και άρα και στην παραγωγή C12HSL. Ενδιαφέρον είναι ότι στην περίπτωση που απουσιάζει το *lasR* και γίνει υπερέκφραση του *rhIR*, μπορεί να αλλάξει η ιεραρχική κλίμακα και να λειτουργήσουν φυσιολογικά όλα τα άλλα συστήματα ακόμα και απουσία του Las (Dekimpe, 2009).

Γενικά, το σύστημα Pqs ελέγχεται από το Las και το Iqs και το ίδιο ελέγχει το Rhl. Συγκεκριμένα, ενισχύει την έκφραση του *rhII* και άρα και την παραγωγή του σηματοδοτικού μορίου BHL, όμως ο λόγος συγκεντρώσεων C12HSL και BHL παίζει αποφασιστικό ρόλο στην ρύθμιση του συστήματος Pqs. Το σύμπλοκο *lasR*-C12HSL επάγει την έκφραση όλων των γονιδίων του Pqs και, όπως ήδη αναφέρθηκε, απουσία του Iqs το σύστημα παύει να λειτουργεί (Jack, 2018).

Τέλος, το Iqs σύστημα ελέγχεται από το Las και ελέγχει τα υπόλοιπα δύο συστήματα. Όμως, σε συνθήκες έλλειψης φωσφόρου η έκφραση του συστήματος αυτού αυξάνεται σημαντικά και η ιεραρχία των συστημάτων αλλάζει ξανά (Lee, 2001). Σε μια μελέτη ανακαλύφθηκε ότι το Iqs μπορεί να αντικαταστήσει το Las σε συνθήκες που προσμοιάζουν την μόλυνση του ξενιστή (Lee, 2013). Το γεγονός αυτό καθιστά σαφές το ότι η ύπαρξη των συστημάτων εξυπηρετεί την προσαρμογή του βακτηρίου στις εκάστοτε περιβαλλοντικές συνθήκες, οπότε η αλλαγή των συνθηκών ρυθμίζει και την ιεραρχία των συστημάτων.

1.2.8 Αλληλεπίδραση Quorum Sensing συστημάτων με το περιβάλλον

Στη συνέχεια, θα αναλυθούν κάποιες περιβαλλοντικές συνθήκες και πως αυτές επηρεάζουν την έκφραση των 'Quorum Sensing' συστημάτων και ενίοτε αλλάζουν το ιεραρχικό πρότυπο (Εικόνα 12).

Stress λόγω έλλειψης P: Σε συνθήκες έλλειψης P, έχει παρατηρηθεί μεγάλη αύξηση της κυτταροτοξικότητας της *P. aeruginosa* και επίσπευση του θανάτου σε *C. elegans* τους οποίους έχει μολύνει (Zaborin, 2009). Αυτό είναι αποτέλεσμα της αύξησης της έκφρασης του συστήματος Iqs, το οποίο αντιλαμβάνεται άμεσα την έλλειψη P στο περιβάλλον και ενεργοποιεί το σύστημα Pqs, το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιεί το Rhl. Οι λοιμογόνοι παράγοντες που εκφράζονται και από τα τρία συστήματα είναι υπεύθυνοι για την αυξημένη κυτταροτοξικότητα (Lee, 2013).

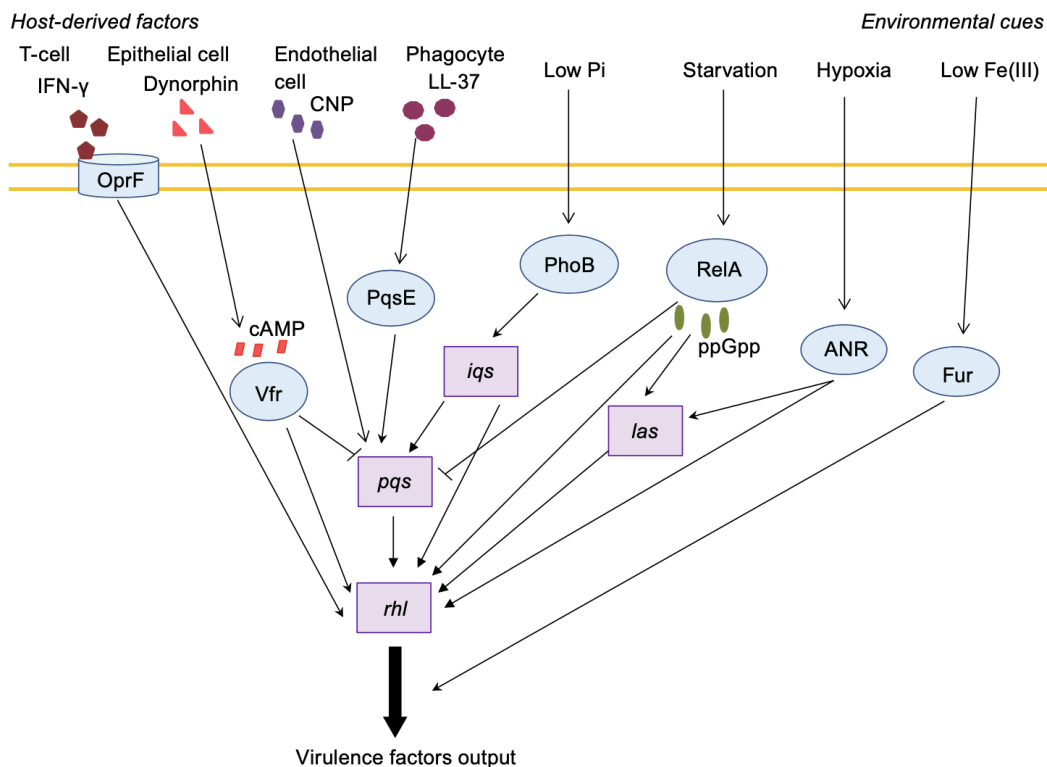
Stress λόγω έλλειψης Fe: Σε αυτή την περίπτωση αυξάνεται η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την δέσμευση και την μεταφορά Fe (σιδηροφόρα), ενζύμων που λύνουν πρωτεΐνες του ξενιστή ώστε να αυξηθεί η πρόσληψη Fe (ελασάση) και τοξινών (εξωτοξίνη A). Τα γονίδια αυτά υπόκεινται σε ρύθμιση από διαφορετικά συστήματα της *P. aeruginosa*. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι αυτά συνδέονται με την αυξορύθμιση του συστήματος Pqs, χωρίς όμως αυτό να έχει επιβεβαιωθεί.

Stress λόγω έλλειψης O: Η χαμηλή συγκέντρωση O στο περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή HCN, ενός πολύ βλαβερού παράγοντα παθογονικότητας. Αύξηση της

βιοσύνθεσης HCN έχει παρατηρηθεί, επίσης, όταν αυξάνεται η πυκνότητα ενός πληθυσμού βακτηρίων, γεγονός που αποτελεί απόδειξη ότι υπάρχει κάποιο ‘Quorum Sensing’ σύστημα που σχετίζεται με αυτό (Castric, 1979). Ύστερα από μελέτες, έγινε αντιληπτό ότι ένας μεταγραφικός παράγοντας (ANR) που επηρεάζει την βιοσύνθεση HCN, συνδέεται στον υποκινητή σε συνθήκες έλλειψης O, μαζί με το σύμπλεγμα LasR-OddHL ή RhlR- BHL (Greenberg, 2006).

Stress λόγω έλλειψης θρεπτικών συστατικών: Σε περίπτωση έλλειψης θρεπτικών συστατικών από το περιβάλλον παράγεται ένα χημικό σήμα (πενταφωσφορική γουανοσίνη (*ppGpp*)) από το βακτήριο, το οποίο έχει σκοπό την μείωση της πρωτεϊνοσύνθεσης. Ύστερα από έναν καταρράκτη σηματοδοτικών μονοπατιών, το σήμα καταστέλλει την σύνθεση HHQ και PQS και ενισχύει την έκφραση των RhlR και LasR (Baysse, 2005) (van Delden, 2001).

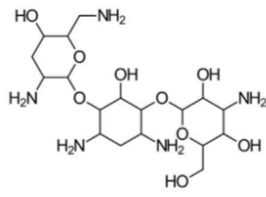
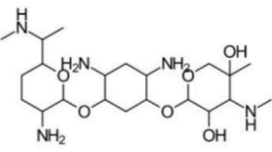
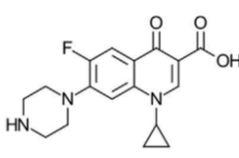
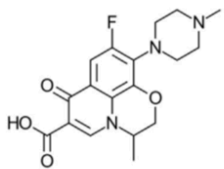
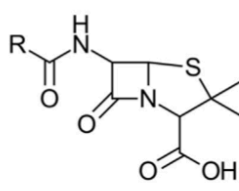
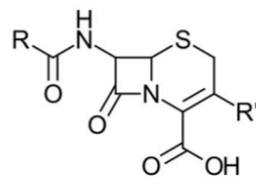
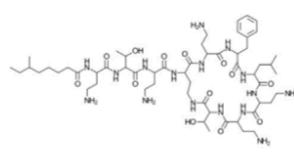
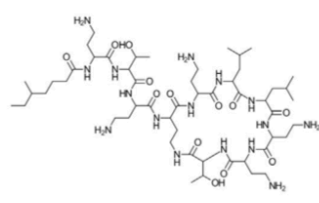
Αλληλεπίδραση με τα κύτταρα του ξενιστή: Κατά τη διαδικασία της μόλυνσης, το βακτήριο έρχεται σε επαφή με τα κύτταρα του ξενιστή και σε αυτή την περίπτωση ενεργοποιούνται διαφορετικά συστήματα ανάλογα με το κύτταρο. Πιο συγκεκριμένα, μια πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης (OprF) της *P. aeruginosa* αναγνωρίζει και συνδέεται με την IFN- γ των T-κυττάρων, ενεργοποιώντας το Rhl σύστημα. Ένα άλλο παράδειγμα είναι η δυσορφίνη, η οποία έχει βρεθεί ότι μπορεί να διαπερνά την βακτηριακή μεμβράνη και οδηγεί σε αναστολή του συστήματος Pqs και ενεργοποίηση του Rhl (Lee, 2015).



Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση των QS συστημάτων που ενεργοποιούνται ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες και την αλληλεπίδραση με τον ξενιστή (Lee, 2015)

1.3 Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά

Εκτός από το πλήθος μηχανισμών πρόκλησης λοίμωξης που καθιστούν την *P. aeruginosa* πολύ επικίνδυνη για τη δημόσια υγεία, η θεραπεία της μόλυνσης από το συγκεκριμένο βακτήριο αποτελεί μεγάλη πρόκληση καθώς πρώτον τα στελέχη είναι ανθεκτικά σε πολλά από τα αντιβιοτικά που διατίθενται σήμερα και δεύτερον η χρήση πολλών αντιβιοτικών ταυτόχρονα ενδεχομένως να αυξήσει την ικανότητα επιβίωσης του βακτηρίου και άρα να προκαλέσει την ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών. Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται συνήθως έναντι των ψευδομονάδων ανάγονται στις β-λακτάμες, κινολόνες, αμινογλυκοσίδες και πολυμυξίνες (Πίνακας 2).

Antibiotics used to treat <i>P. aeruginosa</i>	Examples and Chemical Structures	
Aminoglycoside	 <p>Tobramycin</p>	 <p>Gentamicin</p>
Quinolone	 <p>Ciprofloxacin</p>	 <p>Levofloxacin</p>
β-lactam	 <p>Penicillin</p>	 <p>Cephalosporin</p>
Polymyxin	 <p>Polymyxin B</p>	 <p>Polymyxin E (Colistin)</p>

Πίνακας 2: Παραδείγματα και χημικές μορφές των αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται συνήθως στην αντιμετώπιση της *P. aeruginosa* (Pang, 2019)

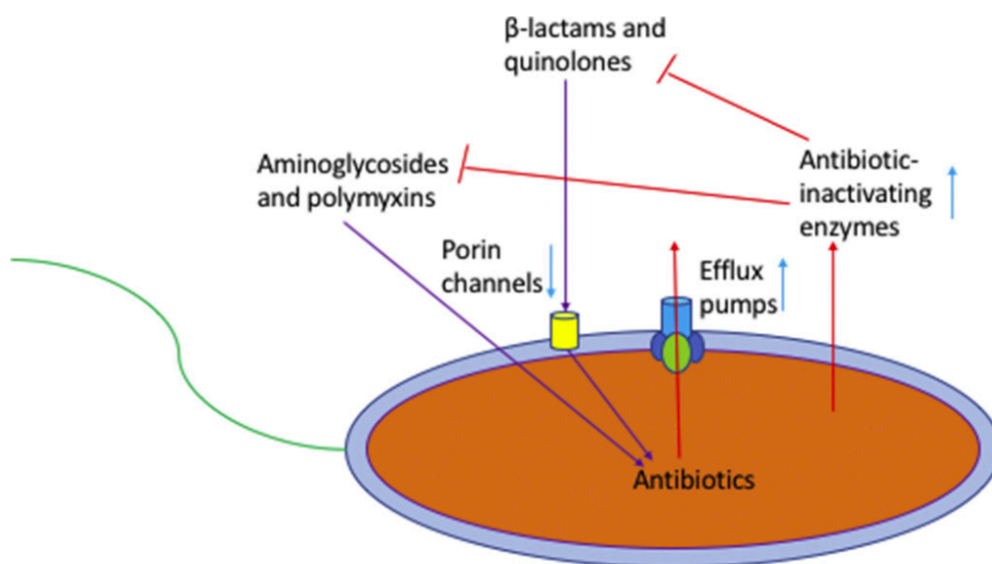
Από τις παραπάνω κατηγορίες αντιβιοτικών, η *P. aeruginosa* έχει βρεθεί να παρουσιάζει ανθεκτικότητα στις β-λακτάμες, τις αμινογλυκοσίδες και τις κινολόνες. Λίγα στοιχεία σχετικά με τις κατηγορίες αντιβιοτικών, οι β-λακτάμες εμποδίζουν τη δράση πενικιλινοδεσμευτικών πρωτεϊνών, οι οποίες εμπλέκονται στην βιοσύνθεση πεπτιδογλυκάνης που αποτελεί βασικό στοιχείο του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων. Με τον τρόπο αυτό εμποδίζουν τον σχηματισμό του βακτηριακού τοιχώματος, βλάπτοντας το βακτήριο. Οι αμινογλυκοσίδες, από την άλλη, εμποδίζουν την πρωτεϊνοσύνθεση του βακτηρίου καθώς δεσμεύουν στην 30S υπομονάδα του ριβοσώματος. Οι κινολόνες παρεμβαίνουν στη διαδικασία αντιγραφής του DNA, εμποδίζοντας την DNA γυράση και την τοποϊσομεράση IV. Τέλος, οι πολυμιξίνες είναι πολυπεπίδια, τα οποία προσδέονται στους λιποπολυσακχαρίτες (LPS) της εξωτερικής μεμβράνης των Gram-αρνητικών βακτηρίων και αυξάνουν την διαπερατότητα της μεμβράνης. Έτσι, αυξάνουν την πρόσληψη του αντιβιοτικού από το βακτήριο και στη συνέχεια το καταστρέφουν με την απελευθέρωση ριζών υδροξυλίου (Pang, 2019).

1.3.1 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά

Υπάρχουν πολλοί μηχανισμοί που παρέχουν ανθεκτικότητα στα διάφορα αντιβιοτικά και μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες:

i. Ενδογενείς μηχανισμοί

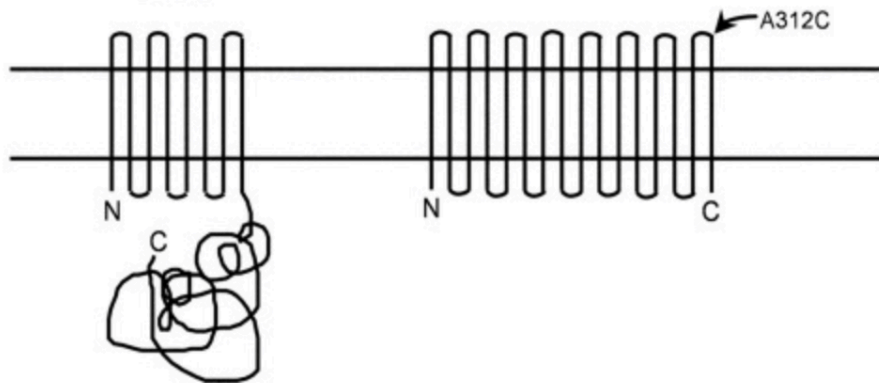
Πρόκειται για μηχανισμούς αντοχής στην δράση των αντιβιοτικών, οι οποίοι στηρίζονται συνήθως σε δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά του βακτηρίου. Κάποια παραδείγματα τέτοιων μηχανισμών που θα αναλυθούν παρακάτω είναι η διαπερατότητα της μεμβράνης, οι αντλίες εκροής και ένζυμα με την ικανότητα απενεργοποίησης αντιβιοτικών (Εικόνα 13).



Εικόνα 13: Μηχανισμοί ενδογενούς αντίστασης σε αντιβιοτικά της *P. Aeruginosa* (Pang, 2019)

Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, η εξωτερική μεμβράνη της *P. aeruginosa* αποτελείται από λιποπολυσακχαρίτες (LPS) και φωσφολιπίδια, τα οποία διακόπτονται από πρωτεΐνες που

ονομάζονται πορίνες (Εικόνα 5). Η πιο συνηθισμένη πορίνη στην *P. aeruginosa* είναι η OprF, η οποία είναι μια μη ειδική πορίνη που επιτρέπει σε μικρά υδρόφιλα μόρια να διαπερνούν αργά την μεμβράνη. Η OprF έχει τη δυνατότητα να υπάρχει σε 2 διαμορφώσεις, μια κλειστή και μια ανοιχτή. Στην κλειστή διαμόρφωση αποτελείται από έναν διαμεμβρανικό N-τελικό τομέα και από έναν C-τελικό τομέα εντός του περιπλάσματος ενώ στην ανοιχτή από έναν μόνο διαμεμβρανικό τομέα (Εικόνα 14). Στην περίπτωση της *P. aeruginosa*, η κλειστή διαμόρφωση της OprF καλύπτει περίπου το 95% της κυτταρικής μεμβράνης, γεγονός που μειώνει σημαντικά την διαπερατότητά της και άρα και την είσοδο αντιβιοτικών (Sugawara, 2006).



Εικόνα 14: Κλειστή (αριστερά) και ανοιχτή (δεξιά) διαμόρφωση της OprF στο βακτηριακό τοίχωμα της *P. aeruginosa* (Sugawara, 2006)

Οι αντλίες εκροής των βακτηρίων χρησιμεύουν στην απομάκρυνση τοξικών προϊόντων από το εσωτερικό των βακτηρίων και χωρίζονται σε πέντε οικογένειες, εκ των οποίων η μία είναι υπεύθυνη για την ανθεκτικότητα έναντι αντιβιοτικών (Resistance-Nodulation-Division (RND)). Οι αντλίες αυτής της οικογένειας απομακρύνουν το αντιβιοτικό από το κυτταρόπλασμα του βακτηρίου παρέχοντας του ανθεκτικότητα και προστασία. Αποτελούνται από μια πρωτεΐνη – μεταφορέα του κυτταροπλάσματος, μια πρωτεΐνη – συνδέτη του περιπλάσματος και μια μεμβρανική πορίνη (Opr). Τα τρία συστατικά αυτά δημιουργούν 12 διαφορετικά συστήματα εκροής, τα οποία είναι ειδικά για κάθε κατηγορία αντιβιοτικού (β-λακτάμες, αμινογλυκοσίδες και κινολόνες) (Ruggerone, 2015).

Η τελευταία κατηγορία μηχανισμών ενδογενούς ανοχής στα αντιβιοτικά είναι η παραγωγή ενζύμων που τροποποιούν τα αντιβιοτικά, καθιστώντας τα μη λειτουργικά. Συγκεκριμένα, η *P. aeruginosa* παράγει κάποια υδρολυτικά ένζυμα, β-λακταμάσες, τα οποία διασπούν τον δακτύλιο όλων των β-λακταμών και τις απενεργοποιούν. Όσον αφορά τις αμινογλυκοσίδες, το βακτήριο παράγει τριών ειδών τροποποιητικά ένζυμα ώστε να τις καταστείλει, τις φωσφοτρανσφεράσες (APH), τις ακετυλοτρανσφεράσες (AAC) και τις νουκλεοτιδοτρανσφεράσες (ANT). Τα ένζυμα αυτά είναι υπεύθυνα για την απενεργοποίηση σχεδόν όλων των αμινογλυκοσιδών (Ramirez, 2010).

ii. Επίκτητοι μηχανισμοί

Σε συνδυασμό με την φυσική ανοχή που έχουν τα βακτήρια *P. aeruginosa* στα αντιβιοτικά, η απόκτηση επιπλέον επίκτητων μηχανισμών ανθεκτικότητας είναι ένα μεγάλο πρόβλημα

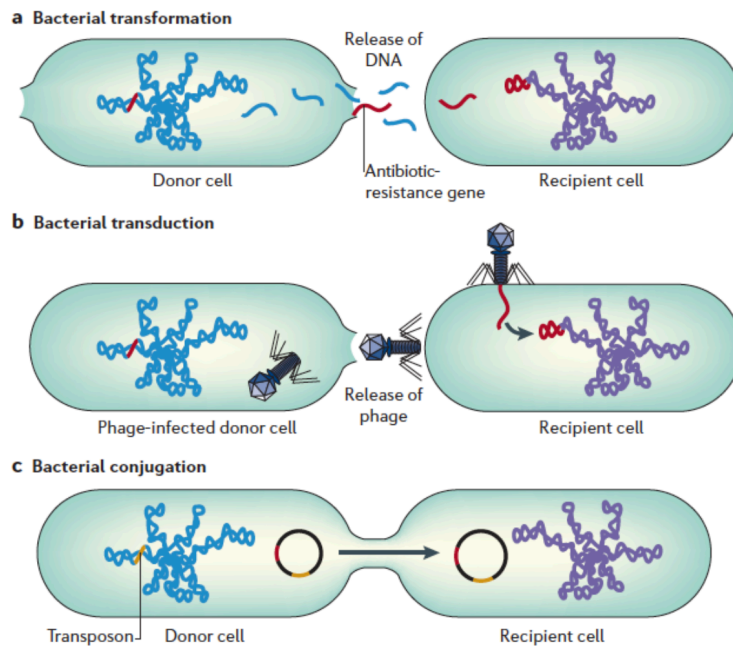
στην θεραπεία των ασθενών. Η επιπλέον αντοχή αποκτάται είτε μέσω μεταλλάξεων είτε μέσω γονιδίων ανθεκτικότητας από οριζόντια μεταφορά γονιδίων. Το αποτέλεσμα των μεταλλάξεων είναι η ενίσχυση των μηχανισμών της ήδη υπάρχουσας αντοχής, που αναφέρθηκαν νωρίτερα, ενώ στην περίπτωση της οριζόντιας μεταφοράς, το βακτήριο αποκτά νέα γονίδια που του προσδίδουν ανθεκτικότητα και σε νέες κατηγορίες αντιβιοτικών.

Η οριζόντια μεταφορά ορίζεται ως η άμεση μεταφορά γονιδίων από ένα είδος στα αναπαραγωγικά κύτταρα ενός άλλου είδους και επιτυγχάνεται με μετασχηματισμό, μεταγωγή ή σύζευξη. Τα γονίδια ανθεκτικότητας μεταφέρονται με την βοήθεια κινητών γενετικών στοιχείων (MGEs), όπως είναι τα τρανσποζόνια, τα ιντεγκρόνια, τα πλασμίδια και τα συζευκτικά μεταθετά στοιχεία. Σύμφωνα με μελέτες, στην *P. aeruginosa* έχει διαπιστωθεί η επίκτητη απόκτηση γονιδίων ανθεκτικότητας έναντι των β-λακταμών και των αμινογλυκοσιδών μέσω οριζόντιας μεταφοράς (Chen, 2009), (Khosravi, 2017), (Nikokar, 2013), (Odumosu, 2013).

Ο μετασχηματισμός (transformation) είναι η πρόσληψη γυμνού DNA από ένα βακτήριο. Το γυμνό DNA μπορεί να έχει προέλθει από ένα νεκρό ή αποδομημένο βακτήριο και αφού εισαχθεί στο βακτήριο – δέκτη είναι πιθανό είτε να αποδομηθεί είτε να ενσωματωθεί στο γονιδίωμα του (Εικόνα 15 (a)) (Pang, 2019).

Ο δεύτερος τρόπος μεταφοράς γονιδίων, η μεταγωγή (transduction), είναι η διαδικασία μεταφοράς γονιδίων μεταξύ δύο βακτηρίων, η οποία διαμεσολαβείται από βακτηριοφάγους. Οι βακτηριοφάγοι αφού προσβάλλουν ένα βακτήριο μπαίνουν είτε στον λυτικό είτε στον λυσιγονικό κύκλο. Στον λυτικό κύκλο έχουν ως στόχο τον πολλαπλασιασμό τους εντός των βακτηρίων, χρησιμοποιώντας τα μεταγραφικά και αντιγραφικά στοιχεία του, και στην συνέχεια την απελευθέρωση τους από το βακτήριο προκαλώντας λύση. Αντίθετα, στον λυσιγονικό κύκλο οι φάγοι ενσωματώνουν το γονιδίωμα τους στο γονιδίωμα του βακτηρίου (Εικόνα 15 (b)) (Pang, 2019).

Τέλος, κατά την σύζευξη (conjugation) είναι απαραίτητο να υπάρχει ένα βακτήριο δότης, το οποίο έχει το συζευκτικό πλασμίδιο, και ένα βακτήριο δέκτης, το οποίο δεν το έχει ενώ είναι εξίσου απαραίτητη η άμεση επαφή των δύο βακτηρίων. Τα συζευκτικά πλασμίδια κωδικοποιούν από μόνα τους τα απαραίτητα στοιχεία για την επίτευξη της σύζευξης, η οποία τα ωφελεί καθώς με αυτό τον τρόπο μεταφέρουν αντίγραφα τους σε επιπλέον βακτήρια – δέκτης (Εικόνα 15(c)) (Pang, 2019).

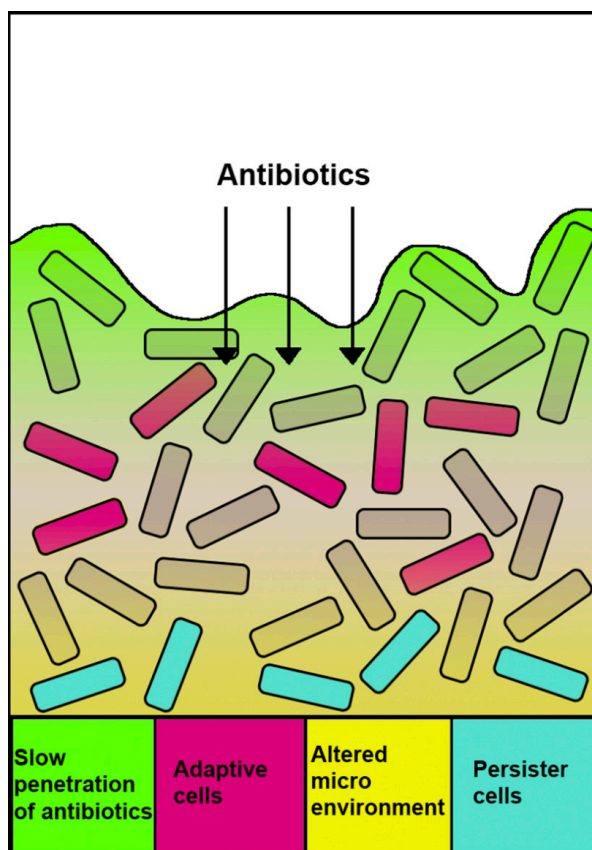


Εικόνα 15: Μηχανισμοί οριζόντιας μεταφοράς στα βακτήρια (Greenen, 2010)

iii. Προσαρμοστικοί μηχανισμοί

Οι μηχανισμοί αυτής της κατηγορίας βοηθούν το βακτήριο να επιβιώσει όταν βρίσκεται σε ένα εχθρικό περιβάλλον, όπως ένα περιβάλλον με αντιβιοτικά, αλλάζοντας την γονιδιακή έκφραση και την πρωτεϊνική σύνθεση. Οι αλλαγές αυτές είναι δυνατόν να αντιστραφούν με την άρση των εχθρικών συνθηκών. Οι πιο καλά χαρακτηρισμένοι προσαρμοστικοί μηχανισμοί είναι η παραγωγή βιοφίλμ και η παραγωγή «επίμονων» κυττάρων (persistent cells).

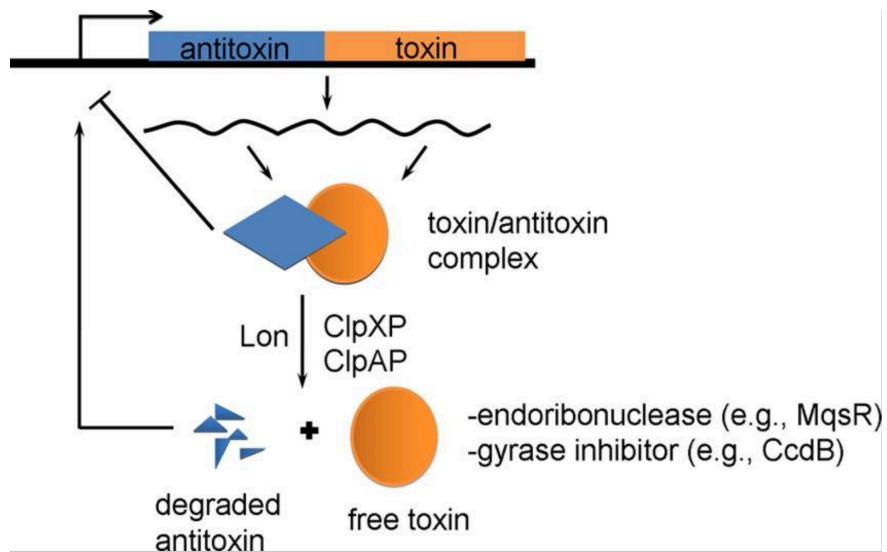
Η παραγωγή βιοφίλμ που συμβαίνει ύστερα από την αλληλεπίδραση των βακτηρίων μέσω 'Quorum Sensing' συστημάτων, έχει ως στόχο την προστασία των βακτηρίων από τις μη ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες, καθώς τα βακτήρια εντός του βιοφίλμ δεν έρχονται σε επαφή με τα αντιβιοτικά. Η μάζα του βιοφίλμ εμποδίζει το αντιβιοτικό να το διαπεράσει. Ταυτόχρονα, τα βακτήρια στο μικροπεριβάλλον του βιοφίλμ καθυστερούν την ανάπτυξή τους μειώνοντας την εισροή στοιχείων από το περιβάλλον μέσω των αντλιών και άρα και την πρόσληψη του αντιβιοτικού. Κάποια βακτήρια αποκρίνονται στο στρες και αποκτούν μηχανισμούς που τα καθιστούν ανθεκτικά ενώ κάποια άλλα αναπτύσσουν ανθεκτικότητα σε πολλά αντιβιοτικά και γίνονται «επίμονα» κύτταρα (persistent cells), τα οποία θα αναλυθούν παρακάτω (Εικόνα 16) (Pang, 2019). Σε μια σειρά πειραμάτων έχει δειχθεί ότι ενώ τα βακτήρια εντός των βιοφίλμ παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε ένα συγκεκριμένο αντιβιοτικό, μόλις αφαιρεθεί το βιοφίλμ, σταματούν να είναι ανθεκτικά (Walters, 2003). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει το ότι η ανθεκτικότητα που παρέχει το βιοφίλμ είναι ένας μηχανισμός προσαρμογής των βακτηρίων.



Εικόνα 16: Μηχανισμοί με τους οποίους το βιοφίλμ προστατεύει τα βακτήρια από τα αντιβιοτικά (Pang, 2019)

Τελευταίος μηχανισμός που θα αναλυθεί είναι τα «επίμονα» κύτταρα (persistent cells). Πρόκειται για βακτήρια, τα οποία ενώ γενετικά δεν έχουν τα κατάλληλα γονίδια ανθεκτικότητας έναντι ενός αντιβιοτικού, παρουσιάζουν φαινοτυπικά αντοχή σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού αυτού. Τα βακτήρια αυτά καλύπτουν περίπου το 1% του βιοφίλμ και μπορούν να επιβιώσουν παρουσία αντιβιοτικών χάρη στο ότι έχουν καταστείλει κάθε μηχανισμό ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού. Έτσι, ακόμα και αν ένα αντιβιοτικό καταστρέψει όλα τα κύτταρα ενός βιοφίλμ, τα «επίμονα» κύτταρα θα ξεκινήσουν τον πολλαπλασιασμό τους με την απουσία του αντιβιοτικού και θα εποικήσουν ξανά το βιοφίλμ. Στο γεγονός αυτό οφείλονται κατά μεγάλο βαθμό και όλες οι χρόνιες και βαριές μολύνσεις από *P. aeruginosa*. Ένα ερώτημα που απασχολεί τους ερευνητές είναι το πώς τα βακτήρια καταφέρνουν να δημιουργούν τα «επίμονα» κύτταρα. Η απάντηση σε αυτό δόθηκε το 2011, ύστερα από την ανακάλυψη του ρόλου του συστήματος τοξίνης – αντιτοξίνης (TA System) στην παραγωγή βιοφίλμ και «επίμονων» κυττάρων (Wang, 2011) (Εικόνα 17). Το σύστημα αυτό αποτελείται από γονίδια εντός ενός οπερονίου. Από αυτά, το ένα κωδικοποιεί μια τοξίνη που διακόπτει μια κυτταρική λειτουργία και το άλλο κωδικοποιεί μια αντιτοξίνη (πρωτεΐνη ή RNA) που διακόπτει την λειτουργία της τοξίνης. Το μοντέλο αυτό, έχει βρεθεί ότι προκαλεί τον σχηματισμό «επίμονων» κυττάρων στο *E. coli* αλλά προς το παρόν όχι στην *P. aeruginosa* (Kaspy, 2013). Παρόλα αυτά, σε στελέχη που έχουν απομονωθεί από ασθενείς με κυστική ίνωση, ο αριθμός των «επίμονων» κυττάρων *P. aeruginosa* ήταν πολύ μεγαλύτερος από αυτόν στα στελέχη άγριου τύπου (Mulcahy, 2010). Παράλληλα, έχει βρεθεί ότι περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως η έλλειψη θρεπτικών, οδηγεί επίσης στην αύξηση του

αριθμού των «επίμονων» κυττάρων στην *P. aeruginosa* (Kolar, 2017). Γίνεται λοιπόν σαφές ότι υπάρχει άμεση συσχέτιση μεταξύ των συνθηκών καταπόνησης και της ανάπτυξης των «επίμονων» κυττάρων που οδηγούν στην αύξηση της ανθεκτικότητας έναντι αντιβιοτικών.



Εικόνα 17: Παράδειγμα συστήματος τοξίνης – αντιτοξίνης που αφορά την τοξίνη MqsR στο *E. Coli* (Wang, 2011)

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η διερεύνηση του ρόλου των 'Quorum Sensing' συστημάτων στην έκφραση παραγόντων παθογονικότητας σε στελέχη *P. aeruginosa*, τα οποία απομονώθηκαν από ασθενείς του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας το έτος 2020 και της πιθανής χρήσης των συστημάτων αυτών για την καταπολέμηση πολυανθεκτικών στελεχών *P. aeruginosa*. Η *P. aeruginosa* είναι ένας μικροοργανισμός, ο οποίος έχει απασχολήσει αρκετά τους επιστήμονες καθώς ευθύνεται για ένα πολύ μεγάλο ποσοστό ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς αλλά και καθώς εμφανίζει ανθεκτικότητα σε ένα ευρύ φάσμα αντιβιοτικών. Τα 'Quorum Sensing' συστήματα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο κατά τη διαδικασία πρόκλησης μόλυνσης ενώ ταυτόχρονα εμπλέκονται και στην ανθεκτικότητα του μικροβίου. Οι πληροφορίες που αντλούνται από μελέτη των 'Quorum Sensing' συστημάτων σε μεγαλύτερο βάθος θα οδηγήσουν στην εύρεση νέων στρατηγικών αντιμετώπισης της *P. aeruginosa*, οι οποίες θα στοχεύουν και θα εμποδίζουν τα συστήματα (QS Inhibitors). Τα φάρμακα αυτά αναμένεται να έχουν μεγαλύτερη επιτυχία από τις στρατηγικές που χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Λήψη δειγμάτων από ασθενείς

Τα κλινικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για το πειραματικό μέρος της παρούσας πτυχιακής εργασίας προήλθαν από ασθενείς διαφόρων κλινικών του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας κατά το έτη 2019 – 2020. Τα συγκεκριμένα δείγματα είχαν προηγουμένως χαρακτηριστεί σε επίπεδο είδους, κλωνικότητας, ευαισθησίας σε αντιβιοτικά και παρουσίας ορισμένων γονιδίων ανθεκτικότητας. Ο τύπος της αλληλουχίας (ST), στον οποίο ανήκει κάθε βακτηριακό στέλεχος προσδιορίστηκε μέσω MLST (Multilocus Sequence Typing). Η ταυτοποίηση του είδους και της ευαισθησίας σε διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες που περιέχουν τα αντιβιοτικά έγινε με τη χρήση του αυτοματοποιημένου συστήματος VITEK 2 (BioMerieux, Inc) ενώ τα MICs (Minimum Inhibitory Concentrations) βρέθηκαν σύμφωνα με τα κριτήρια της Έκδοσης 11 της Ευρωπαϊκής Επιτροπής για τη δοκιμή ευαισθησίας σε αντιμικροβιακά φάρμακα (EUCAST) (www.eucast.org). Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3) παρουσιάζονται τα δείγματα και η πηγή προέλευσης τους.

Αριθμός δειγμάτων	Πηγή προέλευσης
13/62 (21%)	Αίμα
6/62 (9,6%)	Βρογχικές εκκρίσεις
1/62 (1,6%)	Δείγμα από επιφάνεια
2/62 (3%)	Ιστός
1/62 (1,6%)	Οφθαλμικό έκκριμα
1/62 (1,6%)	Καθετήρας
3/62 (5%)	Ωτικό έκκριμα
10/62 (16%)	Ούρα
9/62 (14%)	Πτύελα
1/62 (1,6%)	Πλευριτικό υγρό
6/62 (9,6%)	Πύον
2/62 (3%)	Τραχειοσωλήνας
2/62 (3%)	Τραύμα
1/62 (1,6%)	Υγρό παροχέτευσης
3/62 (5%)	Άγνωστη

Πίνακας 3: Διασπορά των στελεχών *P. aeruginosa* ανά κλινικό δείγμα

3.2 Καλλιέργεια κλινικών δειγμάτων από τα οποία απομονώθηκαν τα στελέχη *P. aeruginosa*

Τα κλινικά δείγματα καλλιεργήθηκαν σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα και συγκεκριμένα MacConkey άγαρ, Mueller-Hinton (MH) άγαρ και Αιματούχο (Blood) άγαρ. Οι καλλιέργειές αυτές επώαστηκαν υπό αναερόβιες συνθήκες σε κλίβανο στους 37°C για 18-24h. Αφού παρατηρήθηκε ανάπτυξη αποικιών βακτηρίων, τα στελέχη τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό ζωμό (tryptic soy broth) και περιεκτικότητά 20% γλυκερόλη και συντηρήθηκαν στην κατάψυξη στους -80°C.

3.3 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA (DNA extraction)

Σε αυτό το στάδιο έγινε απομόνωση του γονιδιωματικού υλικού ενός βιολογικού δείγματος. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε λύση κυττάρων, απομάκρυνση πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων ώστε στο τέλος να απομονωθεί το DNA. Το όνομα του kit, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση ονομάζεται DNA-Sorb-A (Sacace-Biotechnologies) και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- a. Lysis Solution
- b. Washing Solution
- c. Sorbent
- d. DNA-eluent
- e. Transport medium

Τα βήματα τα οποία ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

1. Αρχικά, θερμάνθηκαν τα διαλύματα λύσης και πλύσης (lysis and washing solutions) στους 60-65°C προκειμένου να ζεσταθούν και να διαλυθούν τυχόν κρύσταλλοι πάγου.
2. Ετοιμάστηκαν 1,5ml αποστειρωμένα σωληνάρια πολυπροπυλενίου, τα οποία πρόκειται να χρησιμοποιηθούν.
3. Σε κάθε σωληνάριο προστέθηκε 1ml φυσιολογικού ορού (Φ.Ο.) και έγινε αναδιάλυση των βακτηρίων που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία. Η αναδιάλυση, στην αρχή, έγινε με τη χρήση vortex. Στη συνέχεια με φυγοκέντρηση στις 5.000-6.000 στροφές για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε προσεκτικά και πετάχτηκε με τη χρήση πιπέτας.
4. Ακολούθησε ανασύσταση του ιζήματος σε 100μl φυσιολογικού ορού ενώ προστέθηκαν και 300μl διάλυμα λύσης (lysis solution).
5. Έπειτα, έγινε ανάδευση των σωληναρίων με τη χρήση vortex και επώαση των δειγμάτων για 5 λεπτά στους 65°C.

Συνιστάται, τα δείγματα τα οποία δεν έχουν διαλυθεί πλήρως να φυγοκεντρηθούν για 5 λεπτά σε μέγιστο αριθμό στροφών (12.000-16.000 g) και το υπερκείμενο να μεταφερθεί σε νέα σωληνάρια για απομόνωση του DNA.

6. Το Sorbent αναδεύτηκε με vortex και προστέθηκαν 20μl σε κάθε δείγμα.
7. Τα δείγματα αναδεύτηκαν ξανά με τη χρήση vortex για 5-7 sec και όλα τα σωληνάρια επώαστηκαν για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Το προηγούμενο βήμα επαναλήφθηκε.

9. Όλα τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 30 sec στις 5.000 στροφές και με τη βοήθεια μικροπιπέτας, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο από κάθε σωληνάριο χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα.
10. Ακολούθησε προσθήκη 500μl διαλύματος πλύσης σε κάθε σωληνάριο, ελαφριά ανάδευση με vortex, φυγοκέντρηση για 30 sec στις 10.000 στροφές και αφαίρεση του υπερκειμένου.
11. Το προηγούμενο βήμα επαναλήφθηκε και ακολούθησε επώαση όλων των δειγμάτων για 5-10 λεπτά στους 65°C με το καπάκι ανοιχτό.
12. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100μl DNA-eluent και επώαστηκε για 5 λεπτά στους 65°C με περιοδική ανάδευση με τη χρήση vortex.
13. Ακολούθως, τα σωληνάρια φυγοκεντρήθηκαν για 1 λεπτό στις 12.000 στροφές.
14. Τέλος, με τη χρήση πιπέτας αφαιρέθηκε το υπερκείμενο, το οποίο περιείχε το απομονωμένο DNA, και μεταφέρθηκε σε νέα σωληνάρια, τα οποία αποθηκεύτηκαν στους -20°C για μελλοντική χρήση.

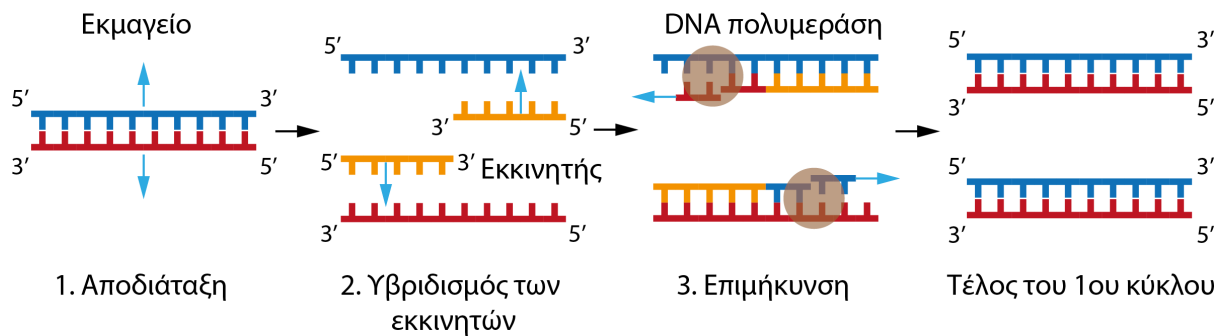
3.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

3.4.1 Ανάλυση της μεθόδου της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction) αποτελεί μια μέθοδο μοριακής βιολογίας που επιτρέπει την αντιγραφή επιλεγμένων αλληλουχιών του DNA από ένα μείγμα πολλών μορίων DNA, χωρίς με τη μεσολάβηση ζωντανού κυττάρου. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται ευρέως από το 1985 και έχει πολλές εφαρμογές, καθιστώντας δυνατή την ανάλυση DNA με πολύ μεγάλη ακρίβεια και ευαισθησία. Ο τελικός στόχος της PCR που είναι η ενίσχυση του DNA, επιτυγχάνεται με την επανάληψη τριών σταδίων. Κάθε επανάληψη των τριών σταδίων αντιπροσωπεύει ένα κύκλο PCR (*Papanikolaou, 2015*). Τα στάδια αυτά είναι τα εξής:

1. Αποδιάταξη του DNA (DNA denaturation): Κατά το στάδιο αυτό, οι δύο αλυσίδες αποχωρίζονται η μία την άλλη ώστε το δίκλωνο DNA να γίνει μονόκλωνο, κάτι που επιτυγχάνεται με θέρμανση του μίγματος περίπου στους 95°C για 30 sec – 1 min.
2. Υβριδισμός εκκινητών (primer annealing): Αφού έχει δημιουργηθεί το εκμαγείο με τα μονόκλιωνα πλέον μόρια DNA, η θερμοκρασία μειώνεται στους περίπου 40-70°C με σκοπό οι εκκινητές να προσδεθούν στα εκμαγεία. Οι εκκινητές υβριδίζονται με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες DNA.
3. Επιμήκυνση DNA (DNA extension): Σε αυτό το στάδιο, η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C, θερμοκρασία ιδανική για την δράση της πολυμεράσης (Taq πολυμεράση) που θα επιμηκύνει τους εκκινητές. Η επιμήκυνση αυτή γίνεται με την προσθήκη 5' τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs) στο ελεύθερο 3' άκρο των εκκινητών σύμφωνα με την συμπληρωματικότητα της μητρικής αλυσίδας DNA.

Τα τρία αυτά βήματα ολοκληρώνουν τον 1^ο κύκλο της PCR (Εικόνα 18) και έχουν ως αποτέλεσμα τον διπλασιασμό του DNA-στόχου. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για 30-40 κύκλους, ώστε να προκύψουν αρκετά αντίγραφα του DNA-στόχου.



Εικόνα 18: Στάδια ενός κύκλου PCR

(Paranikolaou, G. 2015)

Παραπάνω έγινε αναφορά στην φιλοσοφία της μεθόδου PCR. Όσον αφορά στο πρακτικό μέρος, η προετοιμασία των δειγμάτων για την αντίδραση πολυμεράσης περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Αρχικά, σε ένα σωληνάριο 1,5 ml τύπου Eppendorf γίνεται προσθήκη όλων των συστατικών του μίγματος αντίδρασης που θα αναφερθούν παρακάτω εκτός από το DNA. Το σωληνάριο αυτό αποτελεί το Master Mix. Τα συστατικά προστίθενται στο Master Mix σε ποσότητα πολλαπλασιασμένη με τον αριθμό των δειγμάτων (+ 1 για τον αρνητικό μάρτυρα, δηλαδή ένα δείγμα στο οποίο θα προστεθεί νερό αντί για DNA). Οι ποσότητες που αναγράφονται παρακάτω αφορούν ένα δείγμα, οπότε για παράδειγμα στην περίπτωση δέκα δειγμάτων θα τις πολλαπλασιάσουμε επί 11 (10 δείγματα + 1 αρνητικός μάρτυρας).
 - Απιονισμένο dH₂O → 19,8 μl
 - DreamTaq Buffer 10x → 2,5 μl
 - dNTPs 5 mmol → 0,5 μl
 - Primer Forward → 0,25 μl
 - Primer Reverse → 0,25 μl
 - DreamTaq DNA polymerase (5U/μL) → 0,2 μl

Η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η DreamTaq DNA polymerase με 5U/μL και ποσότητα 500U (Thermo Scientific™ DreamTaq™ DNA Polymerase). Οι εκκινήτες, ύστερα από ειδική παραγγελία, ήταν αρχικά σε μορφή σκόνης και πριν την χρήση αραιώθηκαν σε κατάλληλο διάλυμα σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Συνίσταται, η Taq πολυμεράση να βγαίνει από την κατάψυξη μόνο την στιγμή που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί και να μπαίνει ξανά στην κατάψυξη αμέσως μετά τη χρήση καθώς είναι ευαίσθητη σε θερμοκρασία δωματίου. Επιπλέον, είναι σύνηθες να υπολογίζεται ποσότητα Master Mix για n + 1 δείγματα ώστε να είναι βέβαιο ότι το Master Mix θα είναι επαρκές για όλα τα δείγματα, δεδομένου ότι υπάρχει πιθανότητα κάποια μl να «χαθούν» κατά το πιπετάρισμα.

2. Στη συνέχεια, γίνεται ανάδευση του Master Mix, αρχικά με τη χρήση vortex και ακολούθως με φυγόκεντρο ώστε να ομογενοποιηθεί το μίγμα και μοιράζονται 23,5 μl σε μικρότερα σωληνάκια (0,2ml).

3. Σε καθένα από αυτά τα σωληνάρια, προστίθεται 1,5μl δείγματος DNA ώστε ο τελικός όγκος να είναι 25μl. Είναι σημαντικό, να γνωρίζουμε σε ποιο σωληνάριο έχει προστεθεί κάθε δείγμα για την σωστή ανάλυση των αποτελεσμάτων.
4. Αφού ολοκληρωθεί η προετοιμασία των δειγμάτων και αυτά τοποθετηθούν στον θερμικό κυκλοποιητή, πρέπει να γίνει ρύθμιση του προγράμματος που θα χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση της επιθυμητής αλληλουχίας, δηλαδή επιλογή των κατάλληλων θερμοκρασιών, χρόνων και κύκλων. Για τον υπολογισμό της θερμοκρασία τήξης των εκκινητών, χρησιμοποιείται για κάθε έναν από τους δύο εκκινητές ο προσεγγιστικός τύπος:

$$T_m = (4 \times C-G) + (2 \times A-T)$$

Για τον υπολογισμό του χρόνου που απαιτεί η πολυμεράση για να αντιγράψει ένα συγκεκριμένο τμήμα DNA, γίνεται χρήση του προγράμματος Nucleotide Blast που θα δώσει μια ένδειξη για το μήκος του προϊόντος. Γνωρίζοντας ότι η ταχύτητα αντιγραφής της Taq πολυμεράσης είναι περίπου 1000bp ανά 1 λεπτό, γίνεται υπολογισμός του απαιτούμενου χρόνου. Οι κύκλοι PCR που απαιτούνται κυμαίνονται μεταξύ 30 και 40, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα.

5. Με το πέρας της διαδικασίας της PCR και την ολοκλήρωση του προγράμματος που ρυθμίστηκε, τα δείγματα είτε θα αναλυθούν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αραρόζης, μια διαδικασία που θα αναλυθεί παρακάτω, είτε θα αποθηκευτούν στην κατάψυξη στους -18°C για μεταγενέστερη μελέτη.

3.4.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ανίχνευση γονιδίων παθογονικότητας

Κατά την εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής εργασίας, έγινε έλεγχος με PCR για την παρουσία 9 γονιδίων που σχετίζονται με την παθογονικότητα των στελεχών *P. aeruginosa*, την κυτταροτοξικότητα, την ανοσολογική απόκριση, την λειτουργία των 'Quorum Sensing' συστημάτων Las και Rhl και την παραγωγή βιοφίλμ. Η τεχνική χρησιμοποιήθηκε για κάθε γονίδιο ξεχωριστά και για τα 62 δείγματα.

Το Master Mix που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση τμήματος όλων των γονιδίων που μελετήθηκαν στην PCR περιείχε τα εξής (Thermo Scientific™ DreamTaq™ DNA Polymerase):

Master Mix	Mix για x1 αντίδραση (μl)
10X DreamTaq Green Buffer (includes 20 mM MgCl ₂)	2,5
dNTPs 5 mmol	0,5
MgCl ₂	-
Primer F	0,25
Primer R	0,25
DreamTaq DNA Polymerase (500 U, 5 U/μL)	0,2
dH ₂ O	19,8
DNA	1,5
Συνολικός όγκος αντίδρασης	25

Πίνακας 4: Συστατικά του Master Mix για μια αντίδραση PCR

Το πρόγραμμα που ρυθμίστηκε στον θερμικό κυκλοποιητή PCR ήταν παρόμοιο για όλα τα γονίδια με διαφοροποιήσεις στις θερμοκρασίες τήξης ανάλογα με τους εκάστοτε εκκινητές. Σε όλες τις αντιδράσεις πολυμεράσης που διενεργήθηκαν, το πρόγραμμα ρυθμίστηκε για 35 κύκλους με χρόνο τελικής επιμήκυνσης 10min.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95°C	3 min
Αποδιάταξη του DNA (denaturation)	95°C	30 s
Προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (annealing)	65°C	30 s
Επιμήκυνση των εκκινητών (extension)	72°C	30 s
Τελική επιμήκυνση	72°C	10 min

Πίνακας 5: Πρόγραμμα που ρυθμίστηκε στον θερμικό κυκλοποιητή PCR

Στον πίνακα αναγράφονται οι εκκινητές, οι θερμοκρασίες τήξης των εκκινητών, το μέγεθος του προϊόντος και η βιβλιογραφία για κάθε PCR.

Γονίδιο	Εκκινητής F	Εκκινητής R	T τήξης εκκινητών (°C)	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Βιβλιογραφία
<i>pslA</i>	TCC CTA CCT CAG CAA GCT GGT	CGG ATG TCG TGG TTG CGT ACC AGG TAT	65	200	Oliveira V. 2021
<i>toxA</i>	GGA GCG CAA CTA TCC CAC T	TGG TAG CCG ACG AAC ACA TA	60	150	Sairengpuii H. 2019
<i>phzM</i>	GAA TGG AAG TCC CGT TGC	GCC CTC GAC ATC CCT CA	56	200	Sairengpuii H. 2019
<i>lasI</i>	TTG CTC GCC GCA CAT CTG	ATC ATC TTC TCC ACG CCT AC	58	170	Banerjee M. 2017
<i>lasR</i>	ACC GTT TCA TAG AGT CGG TC	ACC ACT GCA ACA CTT CCT TC	60	100	Banerjee M. 2017
<i>rhII</i>	TCT TCA TCG AGA AGC TGG GC	ACG ATG TAG CGG GTT TGC G	62	170	Banerjee M. 2017
<i>rhIR</i>	TGA TGT CCA ACC CGG TCT G	TCG AAC TTC TTC TGG ATG TTC	60	100	Banerjee M. 2017
<i>lasB</i>	AGA CCG AGA ATG ACA AAG TGG AA	GGT AGG AGA CGT TGT AGA CCA GTT G	65	80	Sairengpuii H. 2019
<i>algD</i>	GCG ACC TGG ACC TGG GCT	TCC TCG ATC AGC GGG ATC	60	140	Sairengpuii H. 2019

Πίνακας 6: Εκκινητές για κάθε PCR

3.5 Blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Το βιοπληροφορικό πρόγραμμα Blastn χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του μεγέθους των προϊόντων της PCR για κάθε ζεύγος εκκινητών. Ειδικότερα, παρέχει τη δυνατότητα προσδιορισμού του ποσοστού ταύτισης μιας γνωστής νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, στην συγκεκριμένη περίπτωση αυτής των εκκινητών, με ήδη χαρακτηρισμένες αλληλουχίες, οι οποίες έχουν κατατεθεί σε μία βάση δεδομένων (GenBank database).

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για τον προσδιορισμό του μεγέθους των προϊόντων σε κάθε PCR είναι τα εξής:

1. Στο link που δίνεται, τοποθετείται η αλληλουχία του ενός εκκινητή και επιλέγεται το «Somewhat similar sequences» καθώς και το «show results in a new window».
2. Το ίδιο ακριβώς γίνεται και για τον δεύτερο εκκινητή.
3. Αφού τα αποτελέσματα με τις σχετιζόμενες αλληλουχίες έχουν εμφανιστεί σε δύο διαφορετικά παράθυρα, αναζητείται ένα στέλεχος (Sequence ID) με μεγάλο ποσοστό κάλυψης, στο οποίο να εμφανίζονται οι αλληλουχίες και των δύο εκκινητών.
4. Αφού βρεθεί το κατάλληλο στέλεχος, γίνεται υπολογισμός του μεγέθους του προϊόντος με απλή αφαίρεση, όπως φαίνεται παρακάτω (Εικόνες 19 και 20).

Παράδειγμα υπολογισμού μεγέθους προϊόντος PCR για το γονίδιο *lasB*:

Sequence ID: [CP094851.1](#) Length: 6351172 Number of Matches: 1

Range 1: 1356807 to 1356829 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
46.1 bits(23)	0.022	23/23(100%)	0/23(0%)	Plus/Plus
Query 1	AGACCGAGAATGACAAAGTGGAA	23		
Sbjct 1356807	AGACCGAGAATGACAAAGTGGAA	1356829		

Εικόνα 19: Forward Εκκινητής *lasB*
<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Sequence ID: [CP094851.1](#) Length: 6351172 Number of Matches: 1

Range 1: 1356863 to 1356887 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
50.1 bits(25)	0.003	25/25(100%)	0/25(0%)	Plus/Minus
Query 1	GGTAGGAGACGTTGTAGACCAGTTG	25		
Sbjct 1356887	GGTAGGAGACGTTGTAGACCAGTTG	1356863		

Εικόνα 20: Reverse Εκκινητής *lasB*
<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Αφαίρεση της αλληλουχίας των 2 εκκινητών: 1356807bp – 1356887bp = 80bp (μέγεθος προϊόντος)

3.6 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Ύστερα από την διεκπεραίωση κάθε PCR, διενεργήθηκε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης ώστε να επιβεβαιωθούν τα θετικά δείγματα, για το εκάστοτε γονίδιο. Το πήκτωμα αγαρόζης αποτελείται από αγαρόζη και buffer TBE (Tris, EDTA, βορικό οξύ).

1. Για 30ml πήκτωματος, με επιθυμητή συγκέντρωση αγαρόζης 2%, ζυγίστηκαν και αναμίχθηκαν 0,6 g αγαρόζης σε σκόνη και 30ml TBE σε κωνική φιάλη.
2. Το μίγμα τοποθετήθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων για 2 λεπτά με σκοπό να διαλυθεί η σκόνη αγαρόζης εντός του ρυθμιστικού διαλύματος.

Συνίσταται, το μίγμα να ζυγίζεται πριν και μετά την τοποθέτηση στον φούρνο μικροκυμάτων και η διαφορά στο βάρος, που οφείλεται σε εξάτμιση εντός του φούρνου, να προστίθεται σε απιοντισμένο H₂O.

3. Ύστερα αφέθηκε να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και κατόπιν προστέθηκαν 2ml βρωμιούχου αιθιδίου.
4. Το μίγμα τοποθετήθηκε στο ειδικό εκμαγείο όπου θα πήξει και θα δημιουργήσει το gel και αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 30 λεπτά.
5. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε εντός του ηλεκτρικού πεδίου.
6. Σε κάθε «πηγαδάκι» του gel προστέθηκαν 6ml κάθε δείγματος PCR, τα οποία περιέχουν ήδη loading dye από το buffer της PCR (Dream Taq Green Buffer).
7. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν για 30 λεπτά σε 100V.
8. Τα αποτελέσματα είναι ορατά σε UV.

3.7 Σχηματισμός και ανίχνευση βιοφίλμ

Ο έλεγχος παραγωγής βιοφίλμ έγινε σε όλα τα δείγματα και ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

1. Τοποθετήθηκαν σε falcon (15 ml) 5 ml θρεπτικού μέσου LB και μια αποικία μικροβίων από το τρυβλίο και επωάστηκαν στους 37°C για 18-24h.
2. Την επόμενη ημέρα, γίνεται αραιώση 1:10 σε νέα falcon με τελικό όγκο 1 ml. Συγκεκριμένα, 900μl νέου LB αναμίχθηκαν με 100μl καλλιέργειας.
3. Από την αραιωμένη καλλιέργεια, 200μl τοποθετήθηκαν σε 3 θέσεις των 96-well plates για κάθε δείγμα ενώ σε 3 επιπλέον θέσεις τοποθετήθηκαν 200μl control, τα οποία περιείχαν μόνο LB.
4. Το plate επωάστηκε στους 37°C για 18-24h.
5. Την επόμενη ημέρα, το plate, αφού αφαιρέθηκε προσεκτικά το περιεχόμενο του με πιπέτα ώστε να μην διαταραχθεί το βιοφίλμ που σχηματίστηκε στον πάτο του, καθαρίστηκε με 200μl απιοντισμένο H₂O.
6. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν σε κάθε πηγαδάκι 200μl χρωστικής crystal violet 0,5% και το plate επωάστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Σκοπός του βήματος αυτού είναι η χρωστική να δημιουργήσει δεσμούς με το βιοφίλμ εντός των πηγαδιών ώστε να μπορεί να οπτικοποιηθεί το αποτέλεσμα.
7. Η χρωστική αφαιρέθηκε προσεκτικά με πιπέτα και το plate πλύθηκε ξανά με 200μl απιοντισμένο H₂O.
8. Ύστερα, σε κάθε πηγαδάκι προστέθηκαν 200μl αιθανόλης 95% και το plate επωάστηκε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, με στόχο την αποκόλληση του βιοφίλμ από τον πάτο του πηγαδιού ώστε να φωτομετρηθεί. Σημαντικό είναι, κατά

την προσθήκη της αιθανόλης να ανακατεύεται το περιεχόμενο κάθε πηγαδιού με την πιπέτα.

9. Τέλος, έγινε φωτομέτρηση στα 595nm και ανάλυση των αποτελεσμάτων. Η φωτομέτρηση μετράει το ποσοστό της χρωστικής και άρα το ποσοστό του βιοφίλμ σε κάθε πηγαδάκι.
10. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων οπτικής πυκνότητας (OD) θεωρείται ότι:
 - $OD < 0,12$: καθόλου παραγωγή βιοφίλμ
 - $OD > 0,12$: μικρή παραγωγή βιοφίλμ
 - $OD > 0,4$: πολύ καλή παραγωγή βιοφίλμ
 - $0,2 > OD > 0,4$: μέτρια παραγωγή βιοφίλμ

3.8 Έλεγχος σχηματισμού βιοφίλμ παρουσία ερυθρομυκίνης

Σκοπός αυτής της μεθοδολογίας ήταν να ελεγχθεί εάν η παρουσία αντιβιοτικού και συγκεκριμένα ερυθρομυκίνης εμποδίζει την παραγωγή βιοφίλμ σε επιλεγμένα στελέχη *P. aeruginosa*. Τα 12 στελέχη που επιλέχθηκαν ήταν εκείνα που είχαν την μεγαλύτερη παραγωγή βιοφίλμ και τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

1. Μια αποικία από κάθε ένα από τα 12 δείγματα τοποθετήθηκε σε 5ml θρεπτικού μέσου LB και επώαστηκε στους 37°C για 18-24h.
2. Την επόμενη ημέρα, έγινε αραιώση 1:10 σε νέα falcon με τελικό όγκο 1ml (900μl LB και 100μl καλλιέργειας). Τα falcon αυτά αποτελούν τα control. Για κάθε δείγμα δημιουργήθηκε και ένα falcon στο οποίο το θρεπτικό μέσο LB που προστέθηκε περιείχε ερυθρομυκίνη 25mg/ml, ώστε να γίνει ο έλεγχος εμποδισμού παραγωγής βιοφίλμ.
3. Από τις αραιωμένες καλλιέργειες χωρίς αντιβιοτικό προστέθηκαν 200μl σε 3 θέσεις του 96-well plate και από τις καλλιέργειες με αντιβιοτικό επίσης 200μl σε 3 άλλες θέσεις. Η διαδικασία αυτή έγινε για κάθε δείγμα.
4. Στη συνέχεια ακολουθήθηκαν τα βήματα 4-10 του πρωτοκόλλου για τον σχηματισμό και την ανίχνευση παραγωγής βιοφίλμ και μελετήθηκαν τα αποτελέσματα.

3.9 Έλεγχος παραγωγής πυοκυανίνης σε αντιβιοτικά

3.9.1 Αναστολή παραγωγής πυοκυανίνης

Ο έλεγχος αυτός πραγματοποιήθηκε για τα εξής αντιβιοτικά:

- Ερυθρομυκίνη
- Κεφτριαξόνη
- Τομπραμυκίνη
- Σιπροφλοξασίνη
- Ριφαμπικίνη
- Κολιστίνη
- Αζιθρομυκίνη
- Κλαριθρομυκίνη
- Λινεζολίδη

Ο 1^{ος} έλεγχος αφορούσε το αντιβιοτικό ερυθρομυκίνη και διενεργήθηκε σε όλα τα δείγματα. Σκοπός αυτής της πειραματικής μεθόδου ήταν να ελεγχθεί ποια από τα στελέχη παράγουν πυοκυανίνη, η οποία δίνει ένα χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα στα τρυβλία, και αν η παραγωγή αυτή αναστέλλεται με την χρήση του αντιβιοτικού.

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν:

1. Αναμίχθηκε σκόνη άγαρ με διάλυμα LB στις κατάλληλες συγκεντρώσεις ώστε να παραχθεί ο επιθυμητός αριθμός τρυβλίων, δεδομένου ότι σε ένα τρυβλίο χωράνε περίπου 10ml άγαρ και η ιδανική συγκέντρωση σκόνης είναι 37g/L.
2. Το μίγμα αποστειρώνεται με τη χρήση ειδικού μηχανήματος.
3. Με το πέρας της αποστείρωσης, το μίγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου ή τοποθετείται σε υδατόλουτρο ώστε να κρυώσει.
4. Αφού το μίγμα κρυώσει, προστίθεται η ερυθρομυκίνη (100μl) με συγκέντρωση 25mg/ml και γίνεται ανάδευση ώστε να κατανεμηθεί ομοιόμορφα σε όλο τον όγκο του μίγματος.
5. Κατόπιν, προστέθηκε σε κάθε τρυβλίο ποσότητα μίγματος ίση με 10ml και τα τρυβλία αφέθηκαν να κρυώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 30 min.
6. Για την προετοιμασία των δειγμάτων, μικρή ποσότητα μικροβίων από τα τρυβλία αναμίχθηκε με 2 ml φυσιολογικού ορού.
7. Με την χρήση θολοσίμετρου, υπολογίστηκε η κατάλληλη θολερότητα μικροβίων στον ορό, δηλαδή 0,5 Mc Farland, η οποία είναι η ιδανική θολερότητα για μελέτη ευαισθησίας σε αντιβιοτικό (περίπου 10^8 κύτταρα/ml)
8. Από το διάλυμα Mc Farland, με κατάλληλο βαμβακοφόρο στελεό απλώθηκε το διάλυμα μικροβίων στα τρυβλία που είχαν το αντιβιοτικό. Για κάθε τρυβλίο με αντιβιοτικό, υπήρχε και ένα τρυβλίο χωρίς αντιβιοτικό, το οποίο αποτέλεσε το control του δείγματος.
9. Τα τρυβλία επωάστηκαν στους 37°C για 18-24h.
10. Την επόμενη ημέρα, το τρυβλίο κάθε δείγματος συγκρίθηκε με το αντίστοιχο control και παρατηρήθηκε η αναστολή, ή όχι, της παραγωγής πυοκυανίνης.

Η ίδια μεθοδολογία ακολουθήθηκε και για τα υπόλοιπα αντιβιοτικά με διαφοροποίηση στην συγκέντρωση αντιβιοτικού που χρησιμοποιήθηκε. Ειδικότερα:

- Κεφτριαξόνη: 20mg/L
- Τομπραμυκίνη: 4mg/L
- Σιπροφλοξασίνη: 2mg/L
- Ριφαμπικίνη: 6mg/L
- Κολιστίνη: 1mg/L
- Αζιθρομυκίνη: 50mg/L
- Κλαριθρομυκίνη: 50mg/L
- Λινεζολίδη: 2mg/L

Από όλα τα αντιβιοτικά στο τρυβλίο προστέθηκαν 200μl.

3.9.2 Αναστολή ανάπτυξης σε υγρή καλλιέργεια παρουσία αντιβιοτικών

Εκτός από τον έλεγχο παραγωγής πυοκυανίνης που έγινε στα επιλεγμένα 21 δείγματα, ελέγχθηκε επίσης και η αναστολή στην ανάπτυξη τους παρουσία αντιβιοτικών. Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την μεθοδολογία είναι η ερυθρομυκίνη και η μεροπενέμη, με συγκεντρώσεις 25mg/L και 4mg/L αντίστοιχα. Συγκεκριμένα:

1. Για κάθε δείγμα δημιουργήθηκαν 4 falcon (15ml), στα οποία προστέθηκαν 5ml θρεπτικού μέσου LB και 100μl καλλιέργειας Mc Farland.
2. Από τα 4 falcon, 1 αποτελούσε το control, στο οποίο δεν προστέθηκε κανένα αντιβιοτικό, 1 περιείχε 50μl ερυθρομυκίνης, 1 περιείχε 25μl μεροπενέμης και 1 περιείχε 50μl ερυθρομυκίνης και 25μl μεροπενέμης.
3. Όλα τα falcon επώαστηκαν στους 37°C για 18-24h.
4. Την επόμενη ημέρα 200μl καλλιέργειας διαλύθηκαν σε 1ml φυσιολογικού ορού και μετρήθηκε η θολρότητα ώστε να γίνει εμφανής η ύπαρξη ή η απουσία ανάπτυξης στα διαλύματα με τα αντιβιοτικά σε σχέση με τα control.
5. Στη συνέχεια, από κάθε falcon έγινε λήψη 10μl καλλιέργειας και αραιώση σε 1000μl (1:100).
6. Το ίδιο βήμα επαναλήφθηκε και στο αραιωμένο διάλυμα και άρα προέκυψε τελική αραιώση 1:10⁴.
7. Τέλος, 100μl από το τελικό διάλυμα απλώθηκαν σε τρυβλία με σκοπό την καταμέτρηση των αποικιών και την λήψη ακριβέστερων αποτελεσμάτων.

3.10 Απομόνωση RNA (RNA extraction)

Η απομόνωση RNA πραγματοποιήθηκε σε 21 επιλεγμένα στελέχη από τα 62 δείγματα με σκοπό να διενεργηθεί Real Time PCR και να προσδιοριστεί η διαφορά στην έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων στα συγκεκριμένα στελέχη και η επίδραση της ερυθρομυκίνης στην έκφραση αυτών των γονιδίων, όπως θα αναφερθεί παρακάτω. Η απομόνωση RNA έγινε με την χρήση του RNeasy Protect Mini Kit (QIAGEN). Συγκεκριμένα, αφού έγινε ανακαλλιέργεια και επώαση στους 37°C για 18-24h στα κλινικά δείγματα, ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

1. Αρχικά, έγινε εμβολιασμός falcon (15 ml) με 2ml θρεπτικό μέσο LB και 30μl καλλιέργειας από McFarland. Για κάθε δείγμα δημιουργήθηκαν 2 falcon, το ένα εκ των οποίων περιείχε αντιβιοτικό (50μl ερυθρομυκίνη 25mg/L) ενώ το άλλο όχι. Τα falcon επώαστηκαν στους 37°C για 18-24h.
2. Την επόμενη ημέρα, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του kit, σε νέα Eppendorf (2 ml) τοποθετήθηκαν 1,2 ml RNA protect και 0,6 ml καλλιέργειας και έγινε άμεση ανάδευση με vortex για 5 sec.
3. Ακολούθησε επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 5.000 στροφές, το υπερκείμενο αδειάστηκε προσεκτικά και τα Eppendorf τοποθετήθηκαν ανάποδα σε διηθητικό χαρτί για 10 sec ώστε να στεγνώσουν.
5. Στη συνέχεια, σε κάθε Eppendorf προστέθηκαν 200μl TE buffer containing lysozyme (1mg/ml), έγινε ανάδευση με vortex για 10 sec και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min, με τακτική ανάδευση ανά 2 λεπτά.
6. Επόμενο βήμα ήταν η προσθήκη 700μl διαλύματος RLT, το οποίο περιείχε 10μl β-μερκαπτοαιθανόλης για κάθε 1 ml του διαλύματος. Σκοπός της β-μερκαπτοαιθανόλης είναι η προστασία του RNA.

7. Ύστερα, προστέθηκε 1 όγκος (δηλαδή 900μl) αιθανόλης 70% και έγινε ανάδευση του περιεχομένου του Eppendorf με την πιπέτα.
8. Στο σημείο αυτό, έγινε μεταφορά του περιεχομένου σε κολώνες. Η χωρητικότητα των κολώνων είναι 700μl, οπότε η διαδικασία που θα ακολουθήσει έγινε 2 φορές ώστε να αξιοποιηθεί όλο το διάλυμα. Ειδικότερα, 700μl τοποθετήθηκαν στις κολώνες και έγινε φυγοκέντρηση διάρκειας 15 sec στις 10.000 στροφές. Το υγρό διάλυμα που διαχύθηκε από την κολώνα (flow through) απορρίφθηκε και η διαδικασία επαναλήφθηκε για άλλα 700μl.
9. Ακολούθησε προσθήκη 700μl διαλύματος RW1 και φυγοκέντρηση για 15 sec στις 10.000 στροφές.
10. Η κολώνα μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο συλλογής, έγινε προσθήκη 500μl RPE και φυγοκέντρηση για 15 sec στις 10.000 στροφές.
11. Αφού απορρίφθηκε το flow through, προστέθηκαν άλλα 500μl RPE στην κολώνα και έγινε φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές για διάστημα 2 λεπτών.
12. Η κολώνα φυγοκεντρήθηκε για άλλη μία φορά στις 12.000 στροφές για 1 λεπτό με σκοπό να στεγνώσει.
13. Τέλος, αφού η κολώνα μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο συλλογής (1,5ml), προστέθηκαν 50μl RNase-free water και αυτή φυγοκεντρήθηκε για 1 λεπτό στις 10.000 στροφές.
14. Το υγρό που διαχύθηκε από την κολώνα (flow through) συλλέχτηκε και αποτελεί το RNA, το οποίο στη συνέχεια θα υποστεί επιπλέον καθαρισμό για την καταστροφή των μορίων DNA.

3.11 Καθαρισμός RNA και καταστροφή DNA

Για το πρωτόκολλο αυτό χρησιμοποιήθηκε το Turbo DNA – free kit (QIAGEN) και έγιναν τα παρακάτω βήματα:

1. Αναμίχθηκαν 45μl του απομονωμένου RNA κάθε δείγματος από το προηγούμενο βήμα, 5μl 10x Turbo DNA buffer και 0,5μl Turbo DNAase, σε αποστειρωμένα σωληνάρια πολυπροπυλενίου (1,5ml).
2. Τα σωληνάρια επωάστηκαν στους 37°C για 30 λεπτά.
3. Ακολούθως, προστέθηκαν επιπλέον 0,5μl Turbo DNAase και ξαναέγινε επώαση στους 37°C για 30 λεπτά.
4. Προστέθηκαν 5μl DNAase inactivation reagent και τα δείγματα επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά, κατά τα οποία έγιναν 2-3 αναδεύσεις με vortex.
5. Στη συνέχεια, έγινε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 11.000 στροφές για 2 λεπτά και το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει το RNA, συλλέχθηκε και μεταφέρθηκε σε νέα σωληνάρια των 1,5 ml. Η συλλογή έγινε με την χρήση πιπέτας και προσεκτικά με σκοπό να μην διαταραχθεί το ίζημα.
6. Τα σωληνάρια που περιέχουν το RNA αποθηκευτήκαν στην κατάψυξη στους -20°C για μελλοντική χρήση.

3.12 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Αντίστροφης Μεταγραφής σε πραγματικό χρόνο (Real Time RT – PCR)

Για την μελέτη της διαφοράς στην έκφραση των γονιδίων σε συγκεκριμένα δείγματα παρουσία αντιβιοτικού, διενεργήθηκε RT – PCR. Για κάθε ένα από τα 21 δείγματα που

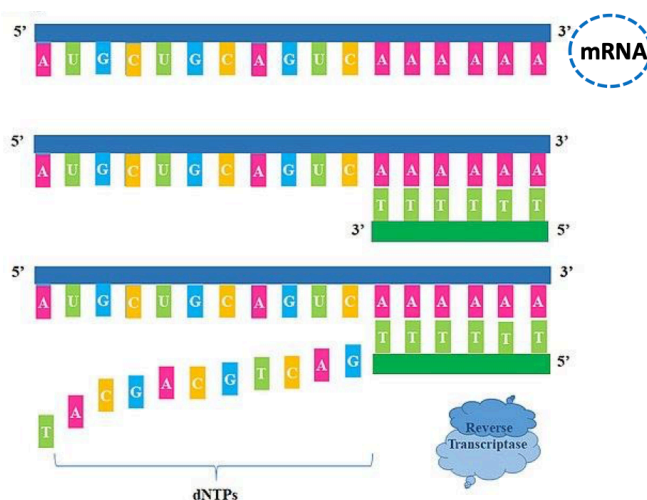
επιλέχθηκαν, έγινε απομόνωση RNA, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, παρουσία και απουσία αντιβιοτικού και RT – PCR για τον έλεγχο της διαφορικής έκφρασης. Όπως γίνεται σαφές και από το όνομα της τεχνικής, η RT – PCR είναι μια εργαστηριακή μέθοδος που συνδυάζει την αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε DNA και την ενίσχυση συγκεκριμένων μορίων – στόχων μέσω της PCR με σκοπό την μέτρηση της ποσότητας ενός συγκεκριμένου RNA στα δείγματα. Σε αντίθεση με την κλασική PCR, έχει το πλεονέκτημα της παρακολούθησης της διαδικασίας ενίσχυσης του προϊόντος κατά τη διάρκεια της PCR και του υπολογισμού της ποσότητας προϊόντος σε κάθε κύκλο αντίδρασης. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω φθορίζουσών ουσιών, όπως για παράδειγμα το SYBR Green, οι οποίες παρεμβάλλονται στα δίκλιωνα μόρια που δημιουργούνται κατά την ενίσχυση. Η μέτρηση του φθορίζοντος σήματος κατά τη διάρκεια της PCR παρέχει μια ένδειξη για την ποσότητα του επιθυμητού μορίου στο δείγμα.

Ένας κύκλος RT – PCR περιλαμβάνει 5 στάδια:

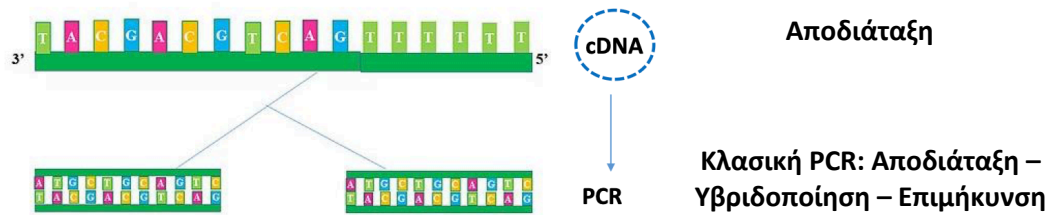
1. Αντίστροφη Μεταγραφή (reverse transcription): Κατά το στάδιο αυτό γίνεται η μετατροπή του RNA σε DNA με τη δράση του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης και ενός ειδικού εκκινητή.
2. Αποδιάταξη δίκλωνων μορίων (denaturation): Η αποδιάταξη γίνεται με θέρμανση (95°C) και διαρκεί περίπου 2 min, ώστε τα δίκλιωνα μόρια που δημιουργήθηκαν από την αντίστροφη μεταγραφή να αποχωριστούν.

Τα 2 πρώτα βήματα γίνονται μία φορά ενώ τα υπόλοιπα 3 γίνονται σε κάθε κύκλο αντίδρασης.

3. Αποδιάταξη δίκλωνων μορίων (denaturation): Σε αυτή την περίπτωση, η αποδιάταξη διαρκεί λιγότερο (περίπου 10 sec) και γίνεται σε κάθε κύκλο PCR στους 95°C.
4. Υβριδισμός εκκινητών (primer annealing): Η θερμοκρασία μειώνεται ώστε οι εκκινητές να συνδεθούν στα μόνοκλιωνα πλέον μόρια, ακριβώς όπως και στην κλασική PCR.
5. Επιμήκυνση (extension): Η θερμοκρασία ρυθμίζεται στην ιδανική θερμοκρασία δράσης της πολυμεράσης ώστε να παράξει πολλά αντίγραφα του επιθυμητού τμήματος (Εικόνα 21).



**Αντίστροφη
Μεταγραφή**



Εικόνα 21: Στάδια Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης Αντίστροφης Μεταγραφής (RT – PCR)
(By Lokesthihmana – Own Work)

Όσον αφορά την παρούσα πτυχιακή εργασία, χρησιμοποιήθηκε το QuantiNova SYBR Green RT – PCR kit (QIAGEN) με σκοπό να υπολογιστεί η διαφορά στην έκφραση 9 γονιδίων παρουσία και απουσία αντιβιοτικού στα 21 δείγματα. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την ολοκλήρωση της RT – PCR, σύμφωνα με τον κατασκευαστή του kit, είναι τα εξής:

1. Δημιουργήθηκε ένα Master Mix, το οποίο περιείχε όλα τα αντιδραστήρια στις κατάλληλες συγκεντρώσεις, εκτός από το RNA, πολλαπλασιασμένες με τον αριθμό των δειγμάτων που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν. Συγκεκριμένα, οι ποσότητες για 1 δείγμα είναι:

Master Mix	Mix για x1 αντίδραση
2x SYBR Green RT – PCR Master Mix	10μl
QN SYBR Green RT – Mix	0,2 μl
20x Forward primer mix αραιωμένος 1:10	1μl
20x Reverse primer mix αραιωμένος 1:10	1μl
RNase – free water	6,8 μl

Πίνακας 7: Συστατικά του Master Mix για μια αντίδραση RT-PCR

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ίδιοι με αυτούς που αναφέρθηκαν παραπάνω (για την PCR ανίχνευση γονιδίων παθογονικότητας) και αραιώθηκαν 1:10 ώστε να έχουν την επιθυμητή συγκέντρωση που προτείνει ο κατασκευαστής του kit.

2. Αφού το Master Mix αναδευθεί με vortex και στη συνέχεια με φυγόκεντρο για 8 sec ώστε να ομογενοποιηθεί, τοποθετούνται σε κάθε πηγαδάκι του «πιάτου» PCR 19 μl Master Mix.
3. Έπειτα προστίθεται 1μl RNA των δειγμάτων και το πιάτο καλύπτεται με ειδική ταινία και αναδύεται για λίγα δευτερόλεπτα στην φυγόκεντρο.
4. Το πιάτο τοποθετήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή RT – PCR και ρυθμίστηκε το ακόλουθο πρόγραμμα, το οποίο είναι κοινό για όλα τα υπό μελέτη γονίδια. Το πρόγραμμα ρυθμίστηκε για 40 κύκλους αντίδρασης.
5. Όταν ολοκληρωθεί το πρόγραμμα, γίνεται αποθήκευση των δεδομένων από την καμπύλη τήξης σε excel και εξαγωγή τους για περαιτέρω ανάλυση.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αντίστροφη Μεταγραφή	50°C	10 min
Αποδιάταξη του dsRNA (denaturation)	95°C	2 min
Αποδιάταξη δίκλωνων μορίων (denaturation)	95°C	10 s
Προσαρμογή των εκκινητών και επιμήκυνση	60°C	30 s

Πίνακας 8: Πρόγραμμα που ρυθμίστηκε στον θερμικό κυκλοποιητή RT-PCR

Σε κάθε RT – PCR χρησιμοποιήθηκε και το γονίδιο *gusA*, το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που συμμετέχει στον μεταβολισμό των πουρινών (GMP συνθάση). Η έκφραση του *gusA* δεν μεταβάλλεται παρουσία και απουσία αντιβιοτικού, οπότε οι τιμές που προκύπτουν από την RT – PCR, θα χρησιμοποιηθούν στην συνέχεια για την κανονικοποίηση των τιμών που προκύπτουν από τα υπό μελέτη γονίδια.

3.13 Κανονικοποίηση δεδομένων της RT – PCR

Οι τιμές CT που προκύπτουν από την RT – PCR για κάθε ένα από τα υπό μελέτη γονίδια πρέπει να υποστούν κανονικοποίηση, δηλαδή να συγκριθούν με τις τιμές που προέκυψαν από ένα γονίδιο του οποίου η έκφραση δεν αλλάζει παρουσία και απουσία αντιβιοτικού, ώστε να προκύψουν όσο το δυνατόν πιο ακριβή αποτελέσματα. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν κάποιοι στατιστικοί αλγόριθμοι όπως φαίνεται στο παράδειγμα παρακάτω (Xiaoyu Rao. 2013):

1. Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, τα αποτελέσματα, δηλαδή τα CT, για κάθε γονίδιο κάθε δείγματος αποθηκεύτηκαν σε excel. Αρχικά υπολογίστηκε το ΔCT (Threshold Cycles), όπου το CT αντιπροσωπεύει τον κύκλο στον οποίο ο φθορισμός, δηλαδή η ποσότητα RNA, φτάνει ένα συγκεκριμένο επίπεδο. Η διαφορά στους κύκλους ανάμεσα στο γονίδιο αναφοράς και στο γονίδιο ενδιαφέροντος υπολογίζεται με αφαίρεση:

$$\Delta CT = CT (\text{target gene}) - CT (\text{reference gene}).$$

2. Για να μεταφραστεί η διαφορά στους κύκλους σε διαφορά στην έκφραση, χρησιμοποιείται ο τύπος:

$$2^{-\Delta CT}$$

3. Αφού έχει γίνει η κανονικοποίηση των δεδομένων, ακολουθεί ένα ακόμα βήμα ώστε να υπολογιστεί η διαφορά στην έκφραση % για ένα δείγμα παρουσία και απουσία αντιβιοτικού. Για τον σκοπό αυτό, γίνεται χρήση του τύπου:

$$(\text{expression with antibiotic}) / (\text{expression without antibiotic})$$

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Έλεγχος με PCR για την παρουσία γονιδίων παθογονικότητας στα δείγματα

Στο πειραματικό μέρος της παρούσας πτυχιακής εργασίας έγινε έλεγχος των 62 δειγμάτων για την παρουσία 9 γονιδίων παθογονικότητας. Τα γονίδια αυτά εμπλέκονται στην παραγωγή πυοκυανίνης, στην παραγωγή βιοφίλμ, στην έκφραση παραγόντων παθογονικότητας και στην λειτουργία των 'Quorum Sensing' συστημάτων της *P. aeruginosa*. Στο σημείο αυτό θα γίνει μια στατιστική αναφορά στο ποσοστό των δειγμάτων που εμφανίζουν το καθένα από τα υπό μελέτη γονίδια, παράλληλα με μια συσχέτιση των στελεχών με τους κλώνους στους οποίους ανήκουν (Πίνακας 9).

Γονίδια	Αριθμός θετικών δειγμάτων
<i>pslA</i>	54 (87%)
<i>toxA</i>	52 (83%)
<i>phzM</i>	48 (77%)
<i>lasI</i>	54 (87%)
<i>lasR</i>	52 (83%)
<i>rhlI</i>	42 (67%)
<i>rhlR</i>	62 (100%)
<i>lasB</i>	60 (96%)
<i>algD</i>	41 (66%)

Πίνακας 9: Γονίδια και αριθμός θετικών δειγμάτων

Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ήδη χαρακτηρισμένα σχετικά με την κλωνικότητα τους. Ανήκαν σε διαφορετικούς κλώνους, με κάποιους κλώνους να έχουν περισσότερα από ένα στελέχη ενώ άλλους να έχουν μόνο ένα. Ο Πίνακας 10 συνοψίζει τα αποτελέσματα της PCR για κάθε έναν από τους κλώνους στους οποίους ανήκαν τα 62 δείγματα.

ST	Αριθμός στελεχών	<i>pslA</i> -θετικά	<i>toxA</i> -θετικά	<i>phzM</i> -θετικά	<i>lasI</i> -θετικά	<i>lasR</i> -θετικά	<i>rhlI</i> -θετικά	<i>rhlR</i> -θετικά	<i>lasB</i> -θετικά	<i>algD</i> -θετικά
16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
17	2	2	1	1	1	2	1	2	2	2
110	1	-	-	-	1	-	1	1	1	-
111	6	5	4	5	4	4	3	6	6	5
112	3	3	2	2	2	3	2	3	3	2
155	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
235	7	6	6	6	6	5	3	7	7	6
242	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1
244	4	3	4	3	4	3	3	4	3	1
253	2	1	1	1	1	2	-	2	2	1
274	5	4	5	4	5	5	4	5	5	4
277	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2
304	5	5	5	3	5	5	5	5	5	3

309	4	4	4	4	4	4	2	4	4	4
317	1	1	1	1	1	1	-	1	1	1
323	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
395	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-
554	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
932	2	1	-	-	1	-	1	2	1	-
1621	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2293	1	-	1	-	1	-	-	1	1	-
3160	1	-	-	-	-	-	-	1	1	-
3191	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
262	1	1	1	1	1	1	-	1	1	-

Πίνακας 10: Αποτελέσματα PCR γονιδίων παθογονικότητας στα στελέχη για κάθε κλώνο

Ειδικότερα για το κάθε γονίδιο:

1. *pslA*

Το γονίδιο *pslA* ανήκει σε μια ομάδα γονιδίων (*psl*), τα οποία εμπλέκονται στην παραγωγή βιοφίλμ και εκφράζεται στην κυτταρική μεμβράνη. Σύμφωνα με μελέτες, η έκφραση μόνο του *pslA* προκαλεί την παραγωγή βιοφίλμ σε στελέχη τα οποία δεν παρήγαγαν βιοφίλμ εξ αρχής (Overhage, 2005). Από τα 54 στελέχη, τα οποία ήταν θετικά για το γονίδιο *pslA*, τα 30 παρήγαγαν βιοφίλμ και αρκετά βρέθηκαν να ανήκουν σε ίδιους κλώνους (ST 111, 235, 244, 274, 277, 304 και 309).

2. *toxA*

Πρόκειται για ένα χρωμοσωμικό γονίδιο που κωδικοποιεί την εξωτοξίνη Α, έναν εξωκυττάριο παράγοντα παθογονικότητας που υπάρχει στα περισσότερα στελέχη *P. aeruginosa*. Εκφράζεται στον κυτταρόπλασμα και στην κυτταρική μεμβράνη. Από τα 62 στελέχη που μελετήθηκαν, τα 52 είχαν το γονίδιο *toxA*. Όπως και στην προηγούμενη περίπτωση, κάποιοι κλώνοι εμφάνισαν αρκετά θετικά στελέχη. Επιπλέον, 2 από τα αρνητικά δείγματα ανήκαν στον ίδιο κλώνο (ST 932).

3. *phzM*

Το χρωμοσωμικό γονίδιο *phzM* εκφράζεται στο κυτταρόπλασμα και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην βιοσύνθεση της φαιναζίνης. Η φαιναζίνη αποτελεί μέρος του μονοπατιού παραγωγής της πυοκυανίνης, πρόκειται για μία τοξίνη που προσδίδει χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα στα στελέχη που την παράγουν και παρέχει μεγάλη ανθεκτικότητα στα στελέχη *P. aeruginosa* έναντι πολλών αντιβιοτικών. Τα 48 από τα 62 δείγματα βρέθηκαν θετικά για το γονίδιο *phzM*. Ταυτόχρονα, από τα 48 δείγματα που έχουν το γονίδιο *phzM*, τα 18 παράγουν πυοκυανίνη.

4. *lasI*

Το γονίδιο *lasI* είναι υπεύθυνο για την σύνθεση του σηματοδοτικού μορίου, C12HSL, του 'Quorum Sensing' συστήματος Las. Το γονίδιο βρέθηκε σε 54 από τα 62 δείγματα

5. *lasR*

Το γονίδιο *lasR* κωδικοποιεί τον υποδοχέα στον οποίο συνδέεται το C12HSL και λειτουργεί σαν μεταγραφικός ενεργοποιητής στο 'Quorum Sensing' σύστημα Las. Αναμένεται, λοιπόν, τα στελέχη που έχουν το ένα γονίδιο να έχουν και το άλλο, κάτι που αποδεικνύεται ως επί το πλείστον από τα δεδομένα. Ειδικότερα, το *lasR* εμφανίζεται στα 52 από τα 62 στελέχη και από αυτά τα 52 στελέχη, τα 49 έχουν και το γονίδιο *lasI*.

6. *rhlI*

Το γονίδιο *rhlI* κωδικοποιεί το σηματοδοτικό μόριο, C4HSL, του 'Quorum Sensing' συστήματος Rhl και βρέθηκε σε 42 από τα 62 δείγματα.

7. *rhlR*

Το γονίδιο *rhlR*, όπως και το γονίδιο *rhlI*, εμπλέκεται στο 'Quorum Sensing' σύστημα Rhl κωδικοποιώντας τον υποδοχέα του χημικού σήματος. Το *rhlR* υπήρχε και στα 62 δείγματα που ελέγχθηκαν. Επομένως, 42 από τα 62 δείγματα είχαν και τα δύο γονίδια του συστήματος Rhl.

8. *lasB*

Το γονίδιο *lasB* κωδικοποιεί την ελασάση Β, πρόκειται για ένα μέταλλο-ένζυμο που αποτελεί παράγοντα παθογονικότητας και παράγεται κατά κανόνα από τα Gram-αρνητικά στελέχη *P. aeruginosa*. Το ένζυμο αυτό εμπλέκεται σε διαδικασίες που αφορούν στην μόλυνση του ασθενή από το βακτήριο και συγκεκριμένα στην υδρόλυση πρωτεϊνών όπως η ελαστίνη, το κολλαγόνο και άλλες. Το συγκεκριμένο γονίδιο βρέθηκε στην πλειονότητα των δειγμάτων (60/62 δείγματα). Τα 2 δείγματα που δεν είχαν το γονίδιο ανήκαν σε διαφορετικούς κλώνους (ST 932 και 244).

9. *algD*

Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μια κινάση που εμπλέκεται στο μονοπάτι βιοσύνθεσης αλγινικού οξέος. Το αλγινικό οξύ είναι ένας έξω-πολυσακχαρίτης, ο οποίος συμμετέχει στην παραγωγή βιοφίλμ στα στελέχη *P. aeruginosa*. Το γονίδιο *algD* υπήρχε στα 41 από τα 62 δείγματα. Αξίζει να παρατηρηθεί, πως από τα 41 θετικά στελέχη για το γονίδιο *algD*, τα 21 έχουν την δυνατότητα παραγωγής βιοφίλμ, με 4 από αυτά να είναι πολύ κάλοι παραγωγού βιοφίλμ.

Συμπερασματικά, σε όλα τα δείγματα υπάρχουν παραπάνω από ένα γονίδια παθογονικότητας με την πλειονότητα των δειγμάτων να έχει περισσότερα. Υπάρχουν συγκεκριμένοι κλώνοι, οι οποίοι φαίνεται να είναι πιο παθογόνοι καθώς αποτελούνται από στελέχη με πολλά γονίδια παθογονικότητας. Οι κλώνοι αυτοί είναι οι ST 235, 242, 244, 274, 277, 304, 309 και 323. Αντίστοιχα, παρατηρήθηκαν 2 κλώνοι που ήταν λιγότερο παθογόνοι

σε σχέση με άλλους, οι ST 932 και 3160. Στους υπόλοιπους κλώνους ανήκουν αρνητικά και θετικά δείγματα.

4.2 Έλεγχος παραγωγής πυοκυανίνης παρουσία και απουσία αντιβιοτικών

4.2.1 Παραγωγή πυοκυανίνης απουσία αντιβιοτικών

Διενεργήθηκε έλεγχος παραγωγής πυοκυανίνης για όλα τα δείγματα. Από τα 62 δείγματα:

- 27 παρήγαγαν πυοκυανίνη (43%), 18 εκ των οποίων έχουν το γονίδιο *rhzM*
- 4 παρήγαγαν πυοβερδίνη
- 3 παρήγαγαν πυορουμπίνη (Εικόνα 22)

Τα στελέχη που παρήγαγαν πυοβερδίνη και πυορουμπίνη είχαν όλα το γονίδιο *rhzM* ενώ τα υπόλοιπα 28 δείγματα δεν βρέθηκε να παράγουν κάποια χρωστική.



Εικόνα 22: Αριστερά: Στέλεχος που παράγει πυοβερδίνη, Κέντρο: Στέλεχος που παράγει πυοκυανίνη και Δεξιά: Στέλεχος που παράγει πυορουμπίνη

Αναλυτικότερα για τα 27 στελέχη που παράγουν πυοκυανίνη, κάποια βρέθηκαν να ανήκουν σε ίδιους κλώνους, όπως φαίνεται παρακάτω:

Στέλεχος που παράγει πυοκυανίνη	ST	Αριθμός στελεχών	Αριθμός στελεχών που παράγουν πυοκυανίνη	<i>rhzM</i>
2433	16	1	1	+
2432	17	2	2	+
2364				-
2326	111	6	3	+
2380				+
2441				+
2608	112	3	2	-
2276				+
2623	155	1	1	+
2732	242	2	1	+

2431B	244	4	1	+
3164	274	5	4	-
2486				+
2699				+
3164/09/2020				-
2544	277	3	2	+
2655				+
2748	304	5	2	-
2166				-
2231	309	4	1	+
2657	395	1	1	+
401/11/2020	932	2	2	-
4190/09/2020				-
4917/09/2020	3160	1	1	-
400/11/2020	774 or 262	1	1	+
2912	111	1	1	+
2917	111	1	1	+

Πίνακας 11: Σύνοψη των κλώνων με στελέχη που παράγουν πυοκυανίνη και της ύπαρξης του γονιδίου *phzM*

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα 28 στελέχη, τα οποία δεν παρήγαγαν κάποια χρωστική:

Στέλεχος που δεν παράγει πυοκυανίνη	ST	<i>phzM</i>
681/11/2020	110	-
2266	111	-
2298		+
2402		+
2809	112	+
2183	235	+
2203		+
2209		-
2297		+
2414		+
2520		+
2632		+
2620	242	+
4116/09/2020	244	-
2510		+
6114/10/2020	253	-
2154	274	+
2519		+
2153	304	+
2336		+

2647		+
6560/10/2020	309	+
2487		+
2500	317	+
2698	323	+
6003/10/2020	1621	+
177/11/2020	2293	-
2488	3191	+

Πίνακας 12: Σύνοψη κλώνων με στελέχη που δεν παράγουν πυοκυανίνη και της ύπαρξης του γονιδίου *phzM*

Όσον αφορά τα στελέχη που παρήγαγαν πυοβερδίνη:

Στέλεχος	ST	<i>phzM</i>
2325	277	+
2565	253	+
2550	323	+
2542	3191	+

Πίνακας 13: Σύνοψη στελεχών που παράγουν πυοβερδίνη

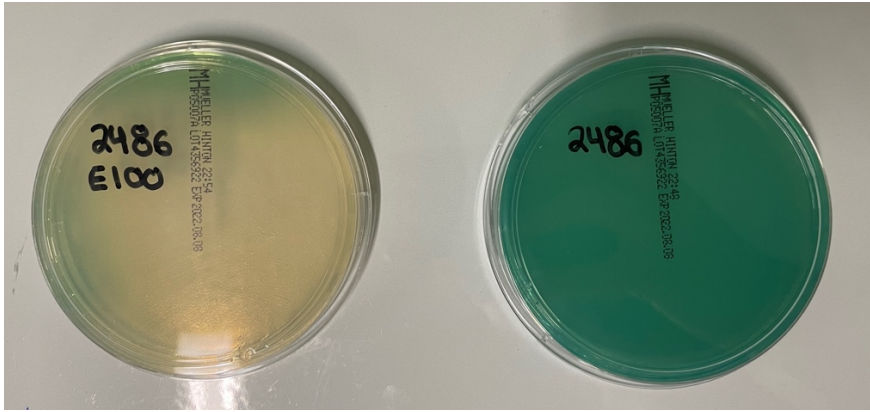
Τέλος, για τα στελέχη που παρήγαγαν πυορουμπίνη ισχύουν τα εξής:

Στέλεχος	ST	<i>phzM</i>
2564	244	+
2493	309	+
4014/09/2020	554	+

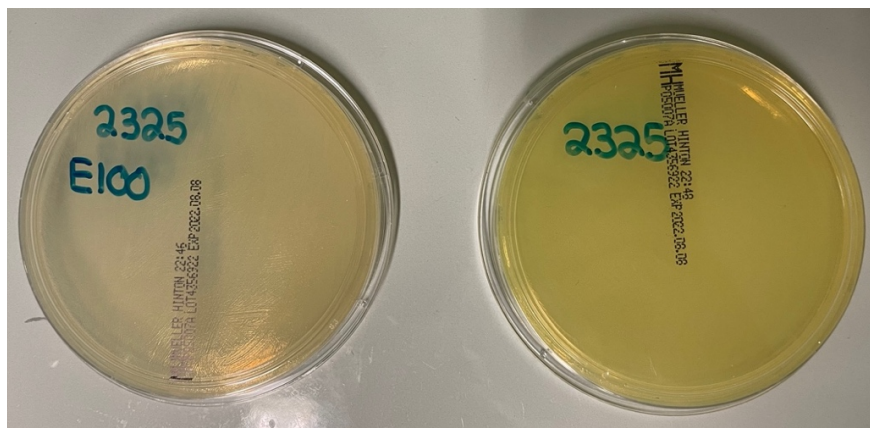
Πίνακας 14: Σύνοψη στελεχών που παράγουν πυορουμπίνη

4.2.2 Παραγωγή πυοκυανίνης παρουσία ερυθρομυκίνης

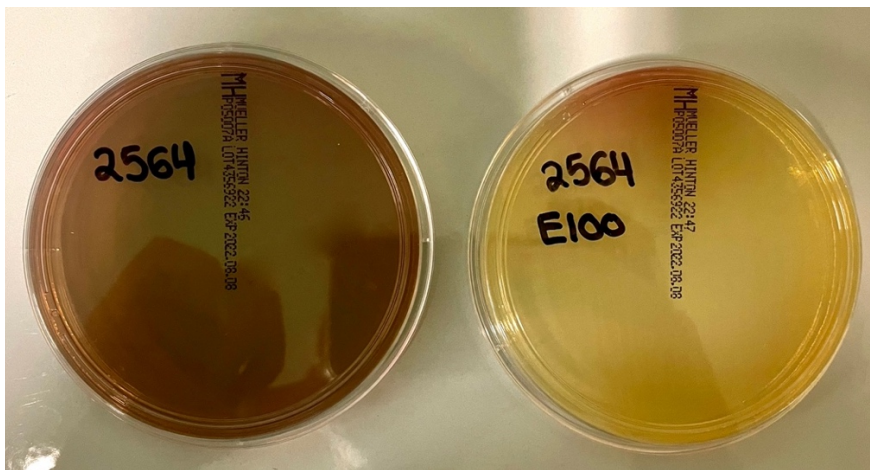
Σύμφωνα με την μεθοδολογία που αναφέρθηκε στα Υλικά και τις Μεθόδους, έγινε έλεγχος της παραγωγής πυοκυανίνης παρουσία ερυθρομυκίνης σε όλα τα δείγματα. Από τον έλεγχο αυτό προέκυψε ότι στα 12 από τα 27 δείγματα, τα οποία παράγουν πυοκυανίνη, υπήρξε αναστολή παραγωγής ύστερα από την χρήση ερυθρομυκίνης (Εικόνα 23). Στα υπόλοιπα 15 δείγματα παρατηρήθηκε αναστολή ανάπτυξης παρουσία του αντιβιοτικού. Όσον αφορά τα στελέχη που παρήγαγαν πυοβερδίνη ή πυορουμπίνη, από τα 4 που παρήγαγαν πυοβερδίνη μόνο στο 1 έγινε αναστολή παραγωγής χρωστικής (Εικόνα 24). Από την άλλη, και τα 3 στελέχη που παρήγαγαν πυορουμπίνη ανέστειλαν την παραγωγή χρωστικής παρουσία ερυθρομυκίνης (Εικόνα 25). Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι κάποια στελέχη παρουσίασαν αναστολή ανάπτυξης παρουσία ερυθρομυκίνης παρότι είναι γνωστό ότι τα βακτήρια έχουν ενδογενείς μηχανισμούς αντοχής στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό.



Εικόνα 23: Αναστολή παραγωγής πυοκυανίνης παρουσία ερυθρομυκίνης



Εικόνα 24: Αναστολή ανάπτυξης σε στέλεχος που παράγει πυοβερδίνη παρουσία ερυθρομυκίνης



Εικόνα 25: Αναστολή παραγωγής πυορουμπίνης παρουσία ερυθρομυκίνης

4.2.3 Παραγωγή πυοκυανίνης παρουσία άλλων αντιβιοτικών

Από τα 62 στελέχη, επιλέχθηκαν τα 21 στα οποία έγινε έλεγχος της επίδρασης άλλων αντιβιοτικών στην παραγωγή πυοκυανίνης. Τα αντιβιοτικά ήταν: κλαριθρομυκίνη, αζιθρομυκίνη, ριφαμπικίνη, λινεζολίδη, κολιστίνη, κεφτριαξόνη, σιπροφλοξασίνη και

τομπραμυκίνη. Τα στελέχη που επιλέχθηκαν ανήκαν σε 3 διαφορετικές κατηγορίες. Στις περισσότερες περιπτώσεις η χρωστική που παραγόταν ήταν η πυοκυανίνη ενώ χρησιμοποιήθηκαν και κάποια στελέχη που παρήγαγαν πυοβερδίνη ή πυορουμπίνη. Οι κατηγορίες των στελεχών φαίνονται παρακάτω:

1. Δεν παρήγαγαν καμία χρωστική (n=4)
2. Παρήγαγαν κάποια χρωστική και δεν αναστελλόταν από την ερυθρομυκίνη (n=5)
3. Παρήγαγαν κάποια χρωστική και αναστελλόταν από την ερυθρομυκίνη (n=12)

Όσον αφορά στα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν, αυτά ανήκαν στις παρακάτω κατηγορίες:

- Μακρολίδες (Ερυθρομυκίνη, Κλαριθρομυκίνη, Αζιθρομυκίνη)
- Ριφαμπικίνη
- Κολιστίνη
- Οξαζολιδόνες (Λινεζολίδη)
- Αμινογλυκοσίδες (Τομπραμυκίνη)
- Κεφαλοσπορίνες (Κεφτριαξόνη)
- Κινολόνες (Σιπροφλοξασίνη)

Συνοπτικά, τα αποτελέσματα της χρήσης των αντιβιοτικών φαίνονται στον Πίνακα 15 όπου τα στελέχη παρουσιάζουν τους εξής φαινότυπους:

- Αναστολή παραγωγής πυοκυανίνης
- Όχι αναστολή παραγωγής πυοκυανίνης
- Ανάπτυξη (για στελέχη που δεν παράγουν πυοκυανίνη)
- Βακτηριακό θάνατο (-)

ST	Στέλεχος	Κλαριθρομυκίνη	Αζιθρομυκίνη	Ριφαμπικίνη	Λινεζολίδη	Κολιστίνη	Κεφτριαξόνη	Σιπροφλοξασίνη	Τομπραμυκίνη
		C: 50mg/L	C: 50mg/L	C: 6mg/L	C: 2mg/L	C:1mg/L	C: 20mg/L	C:2mg/L	C:4mg/L
262	400/11/2020	Αναστολή	-	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή
554	4014/09/2020	Αναστολή	-	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή
3160	4917/09/2020	Αναστολή	-	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή
304	2166	Αναστολή	-	Όχι αναστολή	Αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	-	Όχι αναστολή
304	2748	Αναστολή	-	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή
253	6114/10/2020	Ανάπτυξη	Ανάπτυξη	Όχι αναστολή	Ανάπτυξη	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή
110	681/11/2020	Ανάπτυξη	Ανάπτυξη	Όχι αναστολή	Ανάπτυξη	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή
323	2698	Ανάπτυξη	Ανάπτυξη	Όχι αναστολή	Ανάπτυξη	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή
242	2732	Ανάπτυξη	-	Όχι αναστολή	Ανάπτυξη	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή
112	2276	Αναστολή	Αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή
17	2432	Αναστολή	Αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή
16	2433	Αναστολή	Αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή
111	2441	Αναστολή	-	Όχι αναστολή	Αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή
274	2486	Αναστολή	Αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή
309	2493	Όχι αναστολή	-	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή
3191	2542	Αναστολή	-	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή
277	2544	Αναστολή	Αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή
323	2550	-	-	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή
253	2565	Αναστολή	Αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή
112	2608	Αναστολή	-	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή
17	2364	Αναστολή	-	Όχι αναστολή	Αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή	Όχι αναστολή

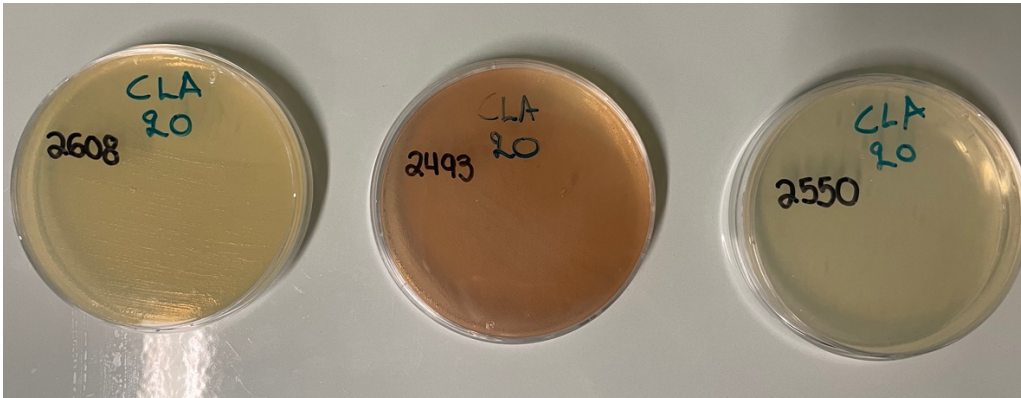
Πίνακας 15: Αποτελέσματα αντιβιοτικών για τα 21 στελέχη

1. Κλαριθρομυκίνη: Μακρολίδες

Η κλαριθρομυκίνη, όπως και οι άλλες μακρολίδες, ασκεί την αντιμικροβιακή της δράση εμποδίζοντας την πρωτεϊνοσύνθεση των βακτηρίων, συνδεδεμένη στην 50S υπομονάδα του ριβοσώματος. Σε συγκέντρωση 50mg/L, προκάλεσε αναστολή παραγωγής πυοκυανίνης στο 62% των δειγμάτων. Ειδικότερα:

- Και τα 4 στελέχη που δεν παράγουν κάποια χρωστική αναπτύχθηκαν φυσιολογικά.

- Σε όλα τα δείγματα που παράγουν κάποια χρωστική αλλά δεν αναστέλλονται από την ερυθρομυκίνη, παρατηρήθηκε αναστολή παραγωγής της χρωστικής.
- Σε 10 από τα 12 δείγματα που αναστέλλονται από την ερυθρομυκίνη, παρατηρήθηκε αναστολή παραγωγής χρωστικής. Σε ένα δείγμα, το οποίο παρήγαγε πυορουμπίνη (2493) δεν συνέβη αναστολή παραγωγής χρωστικής και σε ένα δείγμα που παρήγαγε πυοβερδίνη συνέβη αναστολή ανάπτυξης (2550) (Εικόνα 26).



Εικόνα 26: Αριστερά: Αναστολή παραγωγής πυοκυανίνης, Κέντρο: Μη αναστολή παραγωγής πυορουμπίνης και Δεξιά: Αναστολή ανάπτυξης στελέχους που παράγει πυοβερδίνη

2. Αζιθρομυκίνη: Μακρολίδες

Η αζιθρομυκίνη δρα έναντι των μικροβίων αναστέλλοντας τον σχηματισμό της 50S υπομονάδας του ριβοσώματος. Η χρήση της σε συγκέντρωση 50mg/L είχε ως αποτέλεσμα αναστολή παραγωγής πυοκυανίνης στο 52% των δειγμάτων. Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα είναι τα εξής:

- Από τα δείγματα που δεν παρήγαγαν καμία χρωστική, μόνο 1 ανέστειλε την ανάπτυξη του.
- Σε όλα τα δείγματα που παράγουν κάποια χρωστική και δεν αναστέλλονται από την ερυθρομυκίνη, παρατηρήθηκε αναστολή ανάπτυξης.
- Από τα υπόλοιπα 12 δείγματα, στα 6 παρατηρήθηκε αναστολή παραγωγής της χρωστικής.

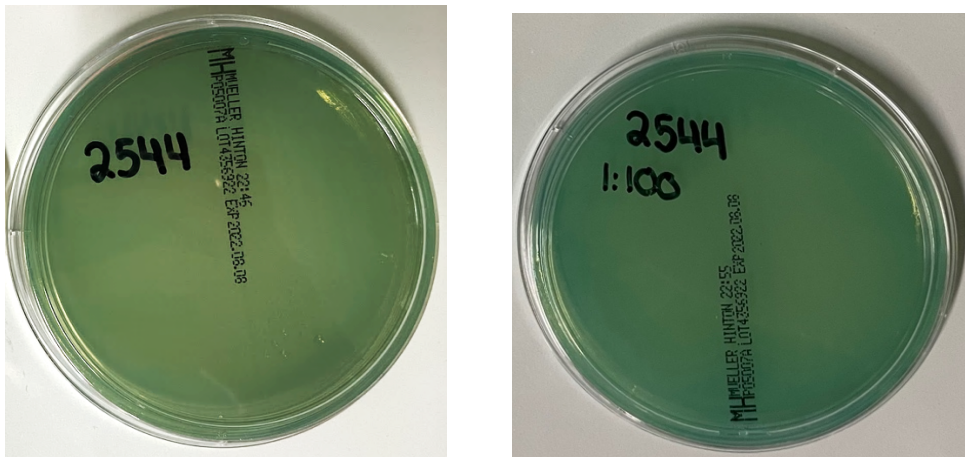
Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της χορήγησης 3 διαφορετικών μακρολίδων (ερυθρομυκίνη, κλαριθρομυκίνη και αζιθρομυκίνη) μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η κλαριθρομυκίνη είναι πιο αποτελεσματική στην αναστολή παραγωγής πυοκυανίνης σε στελέχη στα οποία τα άλλα 2 αντιβιοτικά της κατηγορίας δεν έχουν επίδραση.

3. Ριφαμπικίνη: Βακτηριοκτόνος δράση

Η ριφαμπικίνη είναι ένα αντιβιοτικό με *in vivo* βακτηριοκτόνο δράση, το οποίο δρα αναστέλλοντας την βακτηριακή DNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση χωρίς όμως να επηρεάζει την ανθρώπινη πολυμεράση. Μελετήθηκε σε συγκέντρωση 6mg/L, όπου δεν προκάλεσε αναστολή παραγωγής πυοκυανίνης.

4. Κολιστίνη: Βακτηριοκτόνος δράση

Η κολιστίνη είναι μια βακτηριοκτόνος ουσία, η οποία απομονώθηκε από το βακτήριο *Bacillus polymyxa* και έχει τη δυνατότητα να διαταράσσει την βακτηριακή κυτταροπλασματική μεμβράνη, αλλάζοντας την διαπερατότητά της. Η κολιστίνη χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 1mg/L με αποτέλεσμα μη αναστολή παραγωγής χρωστικών (Εικόνα 27).



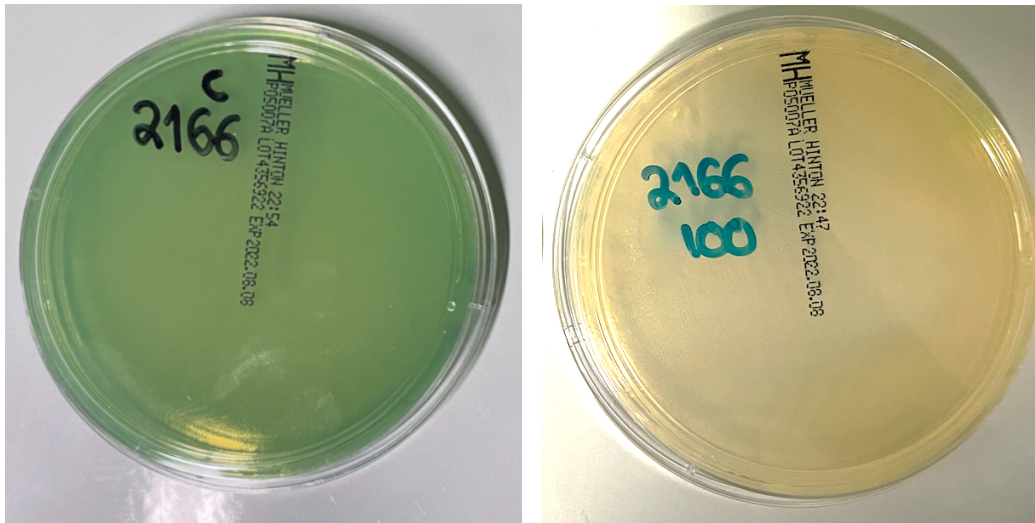
Εικόνα 27: Μη αναστολή παραγωγής πυοκυανίνης παρουσία κολιστίνης σε στέλεχος που η πυοκυανίνη αναστέλλεται από την ερυθρομυκίνη

Συμπερασματικά, τα 2 αντιβιοτικά με βακτηριοκτόνο δράση που δοκιμάστηκαν δεν προκάλεσαν αναστολή της παραγωγής πυοκυανίνης ή και των άλλων χρωστικών αλλά θάνατο των βακτηρίων.

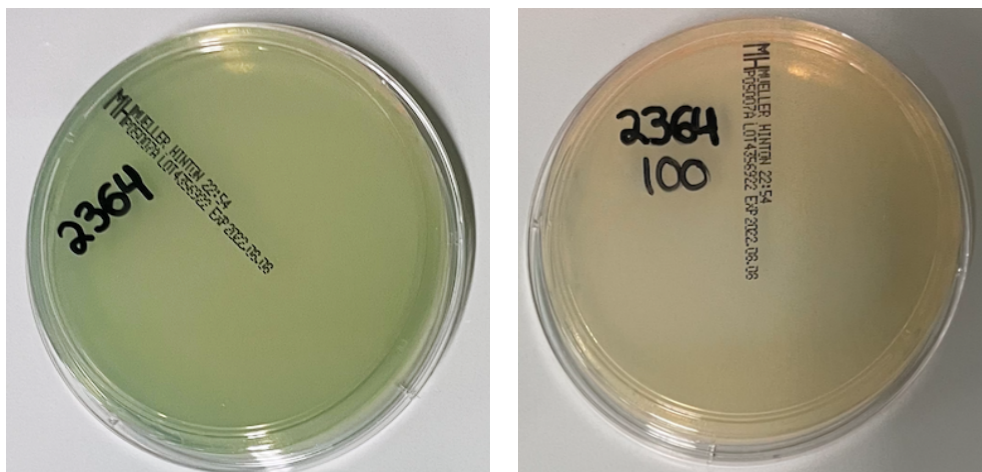
5. Λινεζολίδη: Οξαζολιδινόνες

Πρόκειται για έναν συνθετικό αντιμικροβιακό παράγοντα, ο οποίος είναι αρκετά αποτελεσματικός έναντι των αερόβιων Gram-θετικών βακτηρίων και των αναερόβιων μικροοργανισμών. Όπως και τα προηγούμενα αντιβιοτικά, δρα αναστέλλοντας την πρωτεϊνοσύνθεση. Τα αποτελέσματα χρήσης λινεζολίδης (2mg/L) είναι τα εξής:

- Μόνο σε ένα στέλεχος από αυτά που παράγουν πυοκυανίνη και δεν αναστέλλονται από την ερυθρομυκίνη παρατηρήθηκε αναστολή παραγωγής πυοκυανίνης (Εικόνα 28).
- Από τα στελέχη που παράγουν κάποια χρωστική και αναστέλλονται από την ερυθρομυκίνη, τα 10/12 δεν παρουσίασαν αναστολή παραγωγής χρωστικής ενώ στα υπόλοιπα 2 παρατηρήθηκε αναστολή (Εικόνα 29).
- Τα στελέχη που δεν παρήγαγαν κάποια χρωστική αναπτύχθηκαν φυσιολογικά.



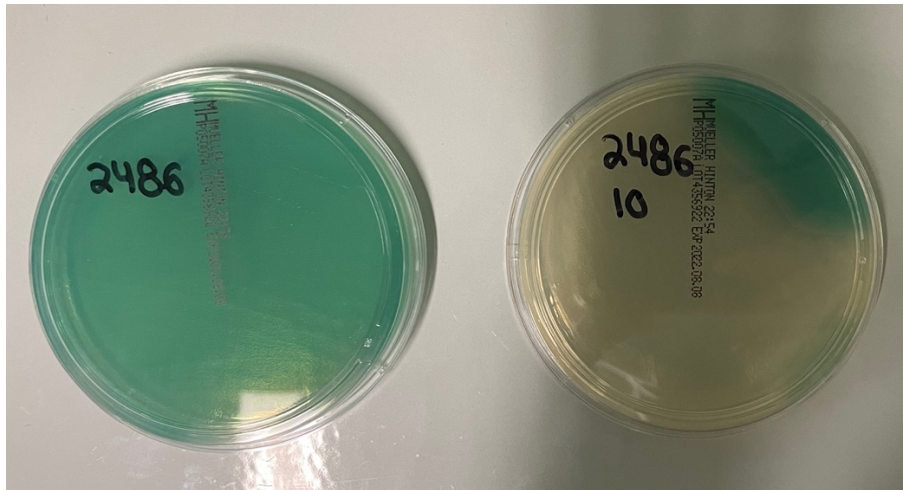
Εικόνα 28: Αναστολή παραγωγής πυοκυανίνης παρουσία λινεζολίδης σε στέλεχος που η πυοκυανίνη δεν αναστέλλεται από την ερυθρομυκίνη



Εικόνα 29: Αναστολή παραγωγής πυοκυανίνης παρουσία λινεζολίδης σε στέλεχος που η πυοκυανίνη αναστέλλεται από την ερυθρομυκίνη

6. Τομπραμυκίνη: Αμινογλυκοσίδες

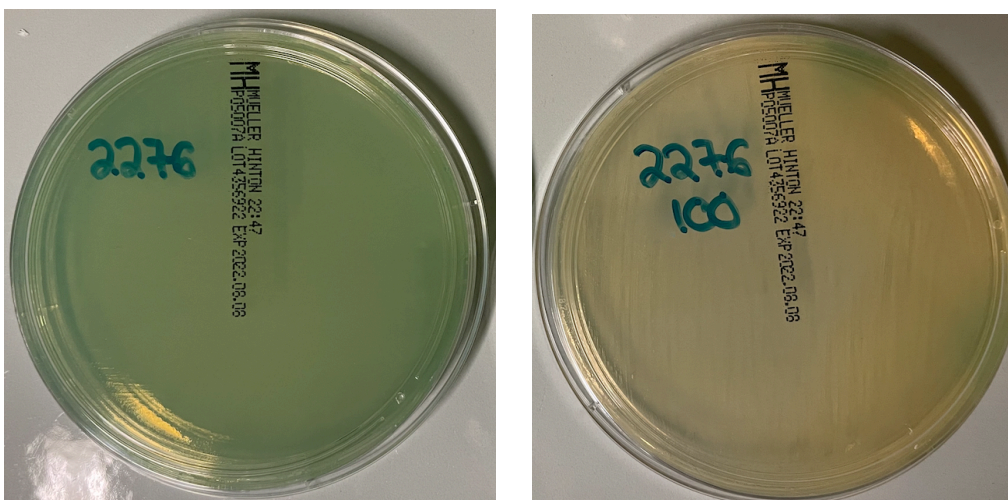
Η τομπραμυκίνη είναι ένα αμινογλυσιδικό αντιβιοτικό που παράγεται από το *Streptomyces tenebrarius* και δρα διαταράσσοντας την σύνθεση των πρωτεϊνών, οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο. Η *P. aeruginosa* είναι κατά κανόνα ανθεκτική στις αμινογλυκίδες καθώς παράγει ένζυμα που τροποποιούν και απενεργοποιούν το αντιβιοτικό. Στα δείγματα χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση 4mg/L. Η συγκέντρωση αυτή δεν σκοτώνει τα περισσότερα από τα βακτήρια αλλά ούτε και προκαλεί αναστολή παραγωγής χρωστικής. Κάποια από τα στελέχη που δοκιμάστηκαν ήταν ήδη γνωστό ότι είναι ευαίσθητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό (Εικόνα 30).



Εικόνα 30: Αναστολή ανάπτυξης σε στέλεχος που παράγει πυοκυανίνη παρουσία τομπραμυκίνης

7. Κεφτριαζόνη: Κεφαλοσπορίνες

Η κεφτριαζόνη είναι ένα αντιβιοτικό ευρέως φάσματος που ανήκει στις β-λακτάμες (κεφαλοσπορίνες γ' γενιάς). Είναι αποτελεσματικό εναντίον Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων και προκαλεί αναστολή σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος, οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο. Η συγκέντρωση 20mg/L προκάλεσε αναστολή ανάπτυξης σε κάποια στελέχη και αναστολή πυοκυανίνης σε ένα μόνο στέλεχος (Εικόνα 31).



Εικόνα 31: Αναστολή παραγωγής πυοκυανίνης παρουσία κεφτριαζόνης σε στέλεχος που η παραγωγή πυοκυανίνης αναστέλλεται από την ερυθρομυκίνη

8. Σiproφλοξασίνη: Κινολόνες

Η σiproφλοξασίνη ανήκει σε μια κατηγορία αντιβιοτικών ευρέως φάσματος και λειτουργεί αναστέλλοντας την DNA γυράση, η οποία συμμετέχει στην αντιγραφή και κατ' επέκταση σταματώντας τον μεταβολισμό και την αναπαραγωγή των βακτηρίων. Χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 2mg/L, στην οποία δεν παρατηρήθηκε αναστολή παραγωγής χρωστικής ενώ σε 1 στέλεχος προκάλεσε βακτηριακό θάνατο.

Γενικά παρατηρήθηκε ότι τα αντιβιοτικά εκτός των μακρολιδών δεν είχαν κάποια επίδραση στην παραγωγή πυοκυανίνης εκτός ελαχίστων εξαιρέσεων.

4.3 Αναστολή ανάπτυξης σε υγρή καλλιέργεια παρουσία αντιβιοτικών

Στα 21 παραπάνω στελέχη ελέγχθηκε η ανάπτυξη παρουσία ερυθρομυκίνης, μεροπενέμης και σε συνδυασμό και των 2 αντιβιοτικών. Σκοπός αυτής της πειραματικής μεθόδου ήταν να διαπιστωθεί αν ο συνδυασμός των 2 αντιβιοτικών είχε μεγαλύτερο αντίκτυπο στην αναστολή της ανάπτυξης των στελεχών από ότι κάθε αντιβιοτικό ξεχωριστά. Τα αποτελέσματα για τον ρυθμό ανάπτυξης λήφθηκαν μέσω μέτρησης θολερότητας 200μl των καλλιεργειών ενώ στη συνέχεια τμήμα της καλλιέργειας αραιώθηκε και απλώθηκε σε τρυβλία για την μέτρηση των αποικιών (Εικόνες 32 και 33). Η ερυθρομυκίνη χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 25mg/L και η μεροπενέμη σε συγκέντρωση 4mg/L και προστέθηκαν 50μl ερυθρομυκίνης και 25 μl μεροπενέμης. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται για κάθε δείγμα οι τιμές θολερότητας (Θ) της καλλιέργειας και ο αριθμός των αποικιών (N) που μετρήθηκαν στα τρυβλία:

Στέλεχος	ST	<i>blaVIM</i>	<i>phzM</i>	MICs μεροπενέμης	Control	Ερυθρομυκίνη (25mg/L)	Μεροπενέμη (4mg/L)	Ερυθρομυκίνη (25mg/L) + Μεροπενέμη (4mg/L)
2166	304	-	-	8	Θ: 0,72	0,29	0,49	0
					N: >10 ³	79	147	0
2276	112	+	+	≥16	Θ: 1,16	0,51	0,29	0,02
					N: >10 ⁶	>10 ⁶	>10 ⁴	>10 ³
2364	17	+	-	≥16	Θ: 0,72	0,12	0,74	0,07
					N: >200	26	>200	0
2432	17	-	+	8	Θ: 0,74	0,31	0	0
					N: >10 ⁶	>10 ⁵	8	20
2433	16	-	+	64	Θ: 0,78	0,14	0,02	0,01
					N: 8	0	0	0
2441	111	+	+	4	Θ: 0,86	0,25	0,37	0,08
					N: >10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ³
2486	274	-	+	8	Θ: 0,72	0,48	0	0
					N: >10 ³	568	0	0
2493	309	-	+	≥8	Θ: 0,52	0,03	0,49	0,02
					N: 50	29	50	0
2542	3191	-	+	≥16	Θ: 1,02	0,75	0,02	0,06
					N: >10 ³	212	42	1
2544	277	-	+	≥16	Θ: 0,84	0,60	0	0
					N: >10 ³	>10 ³	8	7
2550	323	+	+	≥16	Θ: 0,58	0,06	0,63	0,12
					N: >200	127	>200	163
2565	253	+	+	≥16	Θ: 1,05	0,64	1,01	0,48
					N: >10 ³	>10 ³	>10 ³	>10 ³
2608	112	+	-	8	Θ: 0,85	0,43	0,78	0,13
					N: 389	421	468	113
2698	323	+	+	≥128	Θ: 0,90	0,76	0,61	0,89
					N: >400	332	350	370
2732	242	-	+	≥16	Θ: 0,96	0,28	0,41	0,06
					N: >10 ⁶	>10 ³	>10 ³	0
2748	304	+	-	8	Θ: 1,48	1,07	0,06	0,02
					N: >10 ⁴	>200	0	2
400	262	-	+	1	Θ: 0,73	0,15	0,02	0,04
					N: >10 ⁴	>10 ³	0	256
4014	554	-	+	≥0,25	Θ: 0,29	0,11	0,30	0,08

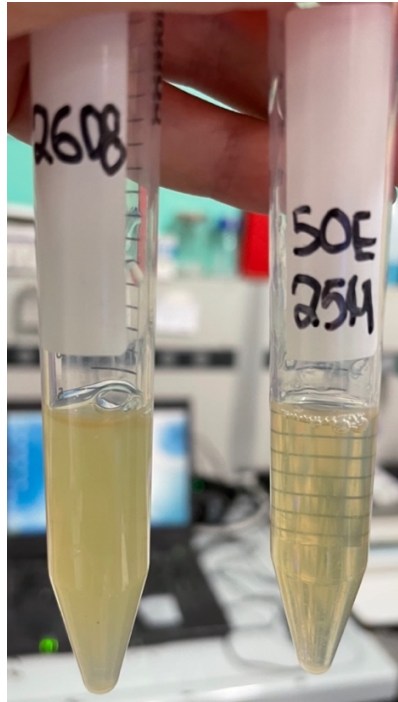
					N: 500	70	0	0
4917	3160	-	-	1	Θ: 1,01	0,14	0,05	0,03
					N: >10 ⁴	41	32	1
6114	253	-	-	>=0,25	Θ: 0,71	0,40	0,18	0,12
					N: >10 ³	>10 ³	9	12
681	110	-	-	0,25	Θ: 0,73	0,36	0,46	0,03
					N: >10 ⁴	110	>10 ³	13

Πίνακας 16: Αποτελέσματα θολερότητας και αποικιών των καλλιιεργειών των 21 δειγμάτων

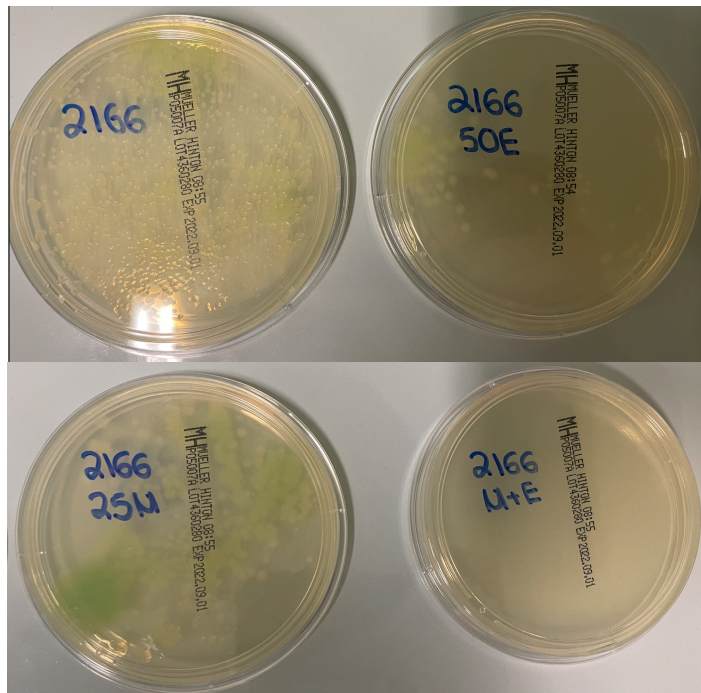
Μεμονωμένα η χρήση μόνο ερυθρομυκίνης προκάλεσε αναστολή ανάπτυξης 17 δειγμάτων, και η χρήση μεροπενέμης αναστολή ανάπτυξης 14 δειγμάτων, με κάποια δείγματα να είναι κοινά. Τα δείγματα αυτά ήταν 2166, 2432, 2433, 2441, 2486, 2698, 2732, 400, 4917, 6114 και 681. Αντίστοιχα, η ταυτόχρονη χρήση και των 2 αντιβιοτικών προκάλεσε αναστολή ανάπτυξης 20 δειγμάτων, εκ των οποίων στα 6 (2166, 2276, 2441, 2608, 2732 και 681) η μείωση στην ανάπτυξη ήταν μεγαλύτερη από τη μείωση που παρατηρήθηκε παρουσία ενός μόνο αντιβιοτικού. Όπως φαίνεται, κάποια δείγματα, τα οποία ήταν ευαίσθητα και στα 2 αντιβιοτικά μεμονωμένα, παρουσίασαν ακόμα μεγαλύτερη ευαισθησία στην ταυτόχρονη χρήση των αντιβιοτικών (2166, 2441, 2732 και 681). Στην περίπτωση της μεροπενέμης, είναι γνωστές οι MICs των στελεχών καθώς και η ύπαρξη του γονιδίου *blaVIM* που σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στην μεροπενέμη, από προηγούμενα πειράματα, όπως φαίνεται στον Πίνακα 16. Γενικά, το γονίδιο *blaVIM* υπάρχει σε 8 από τα 21 δείγματα. Τα δείγματα που έχουν το *blaVIM* παρουσιάζουν, ως επί το πλείστο, μεγαλύτερες MICs και άρα μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην μεροπενέμη. Συγκεκριμένα, 4 από τα 8 θετικά δείγματα για το *blaVIM* ήταν ανθεκτικά στην μεροπενέμη (2364, 2550, 2565 και 2608). Στα δείγματα που οι MICs ήταν <=4, παρατηρήθηκε όντως αναστολή από την μεροπενέμη, εκτός από 1 δείγμα (4014). Αναστολή ανάπτυξης παρατηρήθηκε, επίσης, και σε 10 δείγματα, τα οποία είχαν MICs >4. Τα αποτελέσματα της συνδυαστικής χρήσης των αντιβιοτικών είναι ιδιαίτερα σημαντικά δεδομένου ότι η *P. aeruginosa* παρουσιάζει το πρόβλημα της ανθεκτικότητας σε ένα ευρύ φάσμα αντιβιοτικών λόγω των γονιδίων ανθεκτικότητας που διαθέτει. Επομένως, η ταυτόχρονη χρήση 2 αντιβιοτικών είναι πιθανό να συμβάλλει στην επίλυση της πολυανθεκτικότητας, διευκολύνοντας την θεραπεία των ασθενών.

Στην Εικόνα 32 φαίνεται ένα παράδειγμα αναστολής ανάπτυξης με ταυτόχρονη χρήση ερυθρομυκίνης και μεροπενέμης. Στα αριστερά το δείγμα control έχει τιμή θολερότητας 0,85 ενώ το δείγμα παρουσία και των 2 αντιβιοτικών, στα δεξιά, έχει τιμή 0,13. Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 16, το δείγμα 2608 παρουσιάζει ανθεκτικότητα στη μεροπενέμη (Θ:0,78) και έχει το γονίδιο *blaVIM*. Παρουσία μόνο ερυθρομυκίνης, η τιμή θολερότητας ήταν 0,43. Συνεπώς, η ταυτόχρονη χρήση και των 2 αντιβιοτικών έχει ως αποτέλεσμα μικρότερη θολερότητα στο δείγμα (Θ:0,13) και άρα μεγαλύτερη αναστολή ανάπτυξης σε σχέση με τη χρήση ενός μόνο αντιβιοτικού.

Στην Εικόνα 33 φαίνονται τα αποτελέσματα από την μέτρηση των αποικιών ενός δείγματος (2166). Το δείγμα παρουσιάζει μείωση στην ανάπτυξη παρουσία ερυθρομυκίνης (Θ:0,29, N:65) και παρουσία μεροπενέμης (Θ:0,49, N:147) ξεχωριστά και μεγαλύτερη μείωση όταν τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα (Θ:0, N:0). Ο αριθμός των αποικιών που μετρήθηκαν συμφωνεί με τα αποτελέσματα της μέτρησης θολερότητας, όπως και στα περισσότερα δείγματα.



Εικόνα 32: Αριστερά: Δείγμα χωρίς αντιβιοτικό και Δεξιά: Καλλιέργεια με ερυθρομικίνη και μεροπενέμη



Εικόνα 33: Αριθμός αποικιών δείγματος 2166 στις 4 πειραματικές συνθήκες: control: $>10^3$, ερυθρομικίνη (25mg/L): 65, μεροπενέμη (4mg/L): 147 και ερυθρομικίνη (25mg/L) + μεροπενέμη (4mg/L): 0

4.4 Παραγωγή βιοφίλμ

4.4.1 Έλεγχος παραγωγής βιοφίλμ απουσία αντιβιοτικού

Σε όλα τα δείγματα διενεργήθηκε έλεγχος παραγωγής βιοφίλμ σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρθηκε στα Υλικά και Μεθόδους. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε 3 φορές για κάθε δείγμα ώστε να προκύψουν όσο το δυνατόν πιο ακριβή αποτελέσματα και η κατηγοριοποίηση των στελεχών σε καθόλου, χαμηλή, μέτρια και υψηλή παραγωγή βιοφίλμ έγινε σύμφωνα με τις παρακάτω συνθήκες:

- $OD < 0,12 \rightarrow$ καθόλου βιοφίλμ
- $OD > 0,12 \rightarrow$ χαμηλή παραγωγή
- $OD > 0,4 \rightarrow$ υψηλή παραγωγή
- $0,2 > OD > 0,4 \rightarrow$ μέτρια παραγωγή

Προέκυψε ότι 45 από τα 62 δείγματα έχουν την ικανότητα παραγωγής βιοφίλμ με 36 από τα 45 να είναι μέτριοι παραγωγοί βιοφίλμ και 9 από τα 45 να είναι πολύ καλοί παραγωγοί. Ελέγχθηκε, επίσης, η ύπαρξη των γονιδίων *pslA* ($n=39$) και *algD* ($n=27$) στα δείγματα καθώς τα γονίδια εμπλέκονται στον σχηματισμό βιοφίλμ. Συγκεκριμένα, από τα 45 στελέχη που παράγουν βιοφίλμ τα 39 έχουν το γονίδιο *pslA* και μάλιστα 9 είναι πολύ καλοί παραγωγοί βιοφίλμ. Αντίστοιχα, από τα 45 δείγματα, τα 27 έχουν το γονίδιο *algD* με 4 από αυτά να είναι πολύ κάλοι παραγωγοί. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 17. Παράλληλα, 3 από τα 9 στελέχη που είναι πολύ καλοί παραγωγοί βιοφίλμ, ανήκαν στον ίδιο κλώνο (ST 235) ενώ ξεχώρισαν άλλοι 2 κλώνοι, των οποίων τα στελέχη είχαν μέτρια ή υψηλή παραγωγή βιοφίλμ (ST 277 ($OD > 0,36$) και ST 112 ($OD > 0,31$)).

4.4.2 Έλεγχος παραγωγής βιοφίλμ παρουσία ερυθρομυκίνης

Κατά τον έλεγχο αυτό, επιλέχθηκαν 12 στελέχη με μέτρια έως υψηλή παραγωγή βιοφίλμ και δοκιμάστηκε η ικανότητα παραγωγής βιοφίλμ παρουσία ερυθρομυκίνης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παρουσία αντιβιοτικού δεν είχε κάποια επίδραση στην παραγωγή βιοφίλμ των μικροβίων. (Πίνακας 17)

Όνομα στελέχους	ST	OD χωρίς ερυθρομυκίνη	OD με ερυθρομυκίνη	<i>pslA</i>	<i>algD</i>
4190/09/2020	932	0,28	0,298	-	-
2183	235	0,342	0,347	+	+
2209	235	0,318	0,316	+	+
2266	111	0,314	0,333	+	+
2608	112	0,349	0,323	+	-
2632	235	0,443	0,410	+	+
2655	277	0,461	0,482	+	+
2809	112	0,512	0,434	+	+
2325	277	0,554	0,402	+	+
2414	235	0,345	0,486	-	-
2431B	244	0,557	0,670	+	-

2500	317	0,769	0,875	+	+
------	-----	-------	-------	---	---

Πίνακας 17: Παραγωγή βιοφίλμ με και χωρίς ερυθρομυκίνη

Όσον αφορά στα γονίδια *psIA* και *algD*, το 47% των στελεχών που παρήγαγαν βιοφίλμ είχαν και τα 2 γονίδια. Υπήρχαν στελέχη που δεν είχαν κανένα από τα 2 γονίδια, τα οποία είχαν μέτρια ή χαμηλή παραγωγή βιοφίλμ. Παρόλα αυτά, όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 17, υπήρχαν 2 στελέχη, τα οποία δεν είχαν κανένα από τα 2 γονίδια όμως παρήγαγαν βιοφίλμ. Συνεπώς, η απουσία των γονιδίων δεν σημαίνει απουσία παραγωγής βιοφίλμ αλλά ενδεχομένως να σημαίνει χαμηλότερη παραγωγή. Αυτό αιτιολογείται και από το γεγονός ότι υπάρχουν και άλλα γονίδια που εμπλέκονται στην παραγωγή βιοφίλμ.

4.5 Έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης παρουσία ερυθρομυκίνης με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR)

Σε 21/62 δείγματα έγινε έλεγχος της διαφορικής έκφρασης των 9 γονιδίων (*psIA*, *toxA*, *phzM*, *lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR*, *lasB* και *algD*) παρουσία ερυθρομυκίνης. Τα 21 δείγματα είναι αυτά που απεικονίζονται στον Πίνακα 16. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από την RT-PCR κανονικοποιήθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρθηκε στα Υλικά και Μεθόδους, βάσει του γονιδίου *guaA* που κωδικοποιεί μια GMP συνθάση. Το *guaA* παρουσιάζει ένα πρότυπο έκφρασης, το οποίο δεν μεταβάλλεται από την παρουσία αντιβιοτικού και συνεπώς τα αποτελέσματα της RT-PCR είναι σταθερά και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν control για την εξήγηση των αποτελεσμάτων των υπό μελέτη γονιδίων. Γενικά, παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης των γονιδίων σε μεγάλο αριθμό των δειγμάτων, όπως δείχνουν τα αποτελέσματα στις Εικόνες 33 και 34. Σημαντικό να αναφερθεί σε αυτό το σημείο είναι ότι για να υπολογιστεί το ποσοστό των δειγμάτων στα οποία παρατηρήθηκε μείωση έκφρασης, λήφθηκαν υπόψιν τα δείγματα, τα οποία έχουν το γονίδιο. Επιπλέον, το ποσοστό μείωσης έκφρασης υπολογίστηκε βάσει των δειγμάτων στα οποία παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης για κάθε γονίδιο και όχι βάσει του συνόλου των θετικών δειγμάτων.

Αρχικά, θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα της διαφορικής έκφρασης των γονιδίων των 2 'Quorum Sensing' συστημάτων Las και Rhl, καθώς τα συστήματα αυτά ελέγχουν και την έκφραση των άλλων γονιδίων παθογονικότητας.

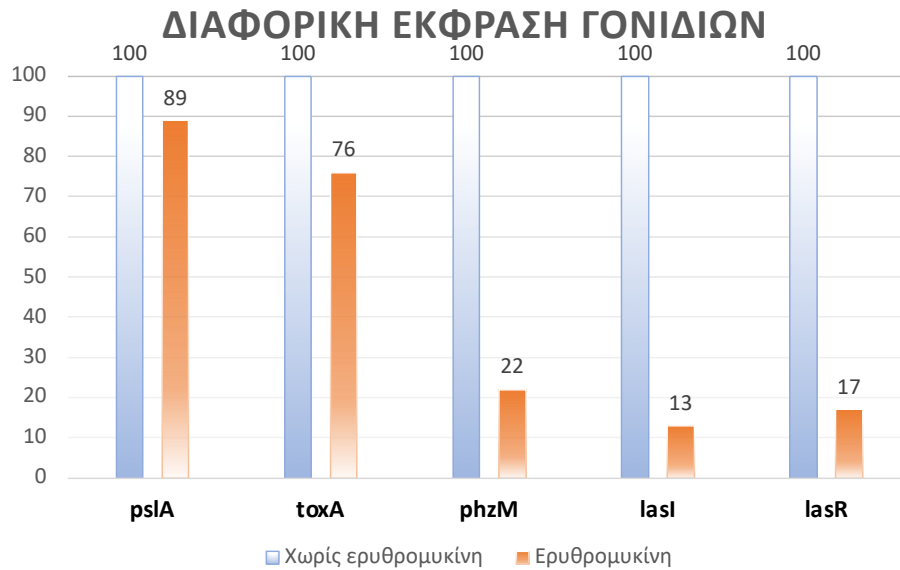
- Το σύστημα Las ελέγχει την έκφραση των γονιδίων *toxA* και *lasB*. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μείωση στο 52% των δειγμάτων που είχαν το *lasI*. Στα δείγματα αυτά η έκφραση μειώθηκε κατά 87%. Η έκφραση του γονιδίου *lasR* μειώθηκε, επίσης, στο 52% των δειγμάτων κατά 83%. Βρέθηκαν 8 δείγματα που μείωσαν την έκφραση τους και στις 2 περιπτώσεις (Εικόνα 33).
- Παράλληλα, το σύστημα Rhl ρυθμίζει την παραγωγή πυοκυανίνης και βιοφίλμ αλλά και ελέγχει την έκφραση του γονιδίου *lasB*. Το γονίδιο *rhlI* μείωσε την έκφραση του στο 57% των δειγμάτων με την μείωση αυτή να είναι της τάξης του 94%. Το γονίδιο *rhlR* υπήρχε και στα 21 δείγματα, μείωση έκφρασης παρατηρήθηκε στο 47% των δειγμάτων και το ποσοστό μείωσης ήταν 84%. Σε αυτή την περίπτωση, παρατηρήθηκε ότι 6 δείγματα μείωσαν την έκφραση τους και για τα 2 γονίδια (Εικόνα 34).

Στη συνέχεια, φαίνονται αναλυτικά τα αποτελέσματα για το γονίδιο *rhzM*, το οποίο συμμετέχει στην παραγωγή πυοκυανίνης καθώς και για 2 γονίδια που εμπλέκονται στην παραγωγή βιοφίλμ (*pslA* και *algD*). Τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να συσχετιστούν με τους φαινότυπους που προέκυψαν από τα προηγούμενα πειράματα.

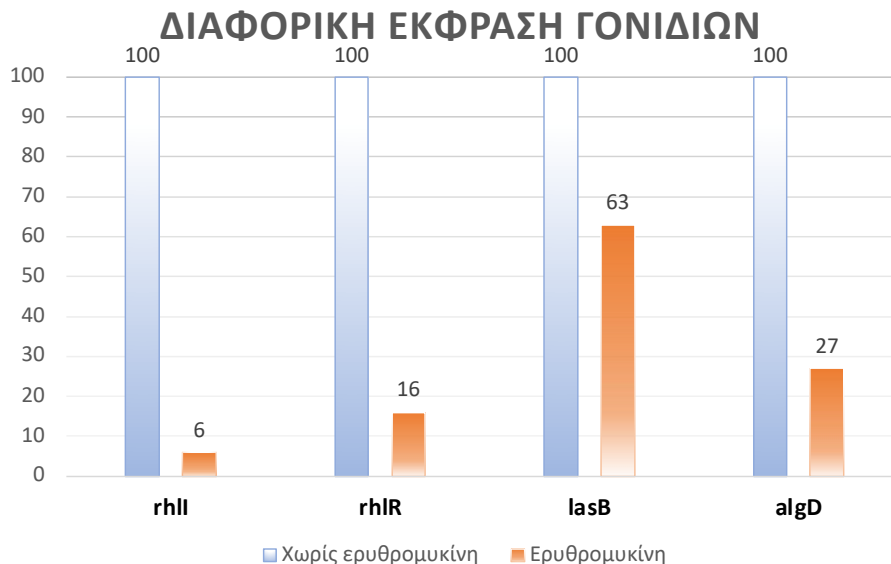
- Από τα 21 δείγματα που ελέγχθηκαν, τα 12 είχαν το γονίδιο *rhzM*. Το γονίδιο αυτό είναι υπεύθυνο για την παραγωγή πυοκυανίνης και μείωσε την έκφραση του σε 6 από τα 12 δείγματα (50%), με την μείωση αυτή να είναι περίπου 78%. Το γεγονός αυτό συμφωνεί με την αναστολή παραγωγής πυοκυανίνης που παρατηρήθηκε στα προηγούμενα πειράματα (Εικόνα 33).
- Αναφορικά με τα γονίδια που εμπλέκονται στην παραγωγή βιοφίλμ, το γονίδιο *pslA* μείωσε την έκφραση του στο 72% των δειγμάτων, με την μείωση αυτή να είναι περίπου 11% (Εικόνα 33). Αντίστοιχα, στον έλεγχο που διενεργήθηκε για την παραγωγή βιοφίλμ παρουσία ερυθρομυκίνης προέκυψε ότι η ερυθρομυκίνη δεν επηρεάζει την παραγωγή βιοφίλμ, κάτι που συμφωνεί με αυτά τα αποτελέσματα. Από την άλλη, είναι απαραίτητο να αναφερθεί ότι το γονίδιο *algD* που διαδραματίζει και αυτό ρόλο στην παραγωγή βιοφίλμ, μείωσε την έκφραση του στο 50% των δειγμάτων με το ποσοστό μείωσης να είναι 73% (Εικόνα 34).

Τέλος, όσον αφορά στα γονίδια *toxA* και *lasB* που παράγουν την εξωτοξίνη A και την ελαστάση B αντίστοιχα:

- Το γονίδιο *toxA* υπήρχε στα 16 από τα 21 δείγματα και μείωσε την έκφραση του στο 62% αυτών των δειγμάτων. Η μείωση της έκφρασης του γονιδίου ήταν της τάξης του 24%. Αξίζει να σημειωθεί ότι η παραγωγή της εξωτοξίνης A ελέγχεται από το 'Quorum Sensing' σύστημα Las, το οποίο παρουσίασε σημαντική μείωση έκφρασης. Παρόλα αυτά, η μείωση της έκφρασης του γονιδίου *toxA* ήταν συγκριτικά μικρότερη (Εικόνα 33).
- Το γονίδιο *lasB* βρέθηκε και στα 21 δείγματα ενώ η έκφραση του μειώθηκε στο 33% των δειγμάτων με το ποσοστό μείωσης έκφρασης να είναι 37%. Όπως και στην περίπτωση του *toxA*, το *lasB* παρουσίασε μικρή μείωση στην έκφραση παρότι ελέγχεται από τα 'Quorum Sensing' συστήματα Las και Rhl, τα οποία παρουσίασαν σημαντική μείωση (Εικόνα 34).



Εικόνα 33: Ραβδόγραμμα που απεικονίζει το ποσοστό έκφρασης των γονιδίων με και χωρίς ερυθρομυκίνη



Εικόνα 34: Ραβδόγραμμα που απεικονίζει το ποσοστό έκφρασης των γονιδίων με και χωρίς ερυθρομυκίνη

Από τα παραπάνω δεδομένα μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η χρήση ερυθρομυκίνης επηρέασε την έκφραση των γονιδίων των 'Quorum Sensing' συστημάτων και κατ' επέκταση και των γονιδίων παθογονικότητας που αυτά ελέγχουν. Τα γονίδια *phzM* (78%) και *algD* (73%) φαίνεται να μείωσαν περισσότερο την έκφραση τους και άρα είναι πιθανό να επηρεάζονται περισσότερο από τα 'Quorum Sensing' συστήματα, τα οποία μείωσαν επίσης την έκφρασή τους. Το γονίδιο *pslA* είχε την μικρότερη μείωση έκφρασης (11%), ενώ τα γονίδια *toxA* (24%) και *lasB* (33%) παρουσίασαν μέτρια μείωση. Τέλος συγκρίνοντας τα 2 'Quorum Sensing' συστήματα, προκύπτει ότι περισσότερο μειώθηκε η έκφραση του συστήματος Rhl, με ποσοστό μείωσης 94% και 84% για τα γονίδια *rhII* και *rhIR* αντίστοιχα, ενώ για το σύστημα Las, η μείωση ήταν 87% και 83% για τα *lasI* και *lasR* αντίστοιχα.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αποσαφήνιση των τρόπων πρόκλησης λοίμωξης από την *P. aeruginosa* θα φανεί πολύ χρήσιμη στον σχεδιασμό αποτελεσματικών φαρμάκων/ στρατηγικών για την αντιμετώπιση του μικροβίου. Το μεγάλο ποσοστό των λοιμώξεων που προκαλούνται από το συγκεκριμένο βακτήριο, είναι αποτέλεσμα του πλήθους γονιδίων παθογονικότητας και ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, της παραγωγής βιοφίλμ και της επικοινωνίας μεταξύ των βακτηρίων μέσω 'Quorum Sensing' συστημάτων. Κατά την εκπόνηση αυτής της διπλωματικής εργασίας, χρησιμοποιήθηκαν 62 κλινικά δείγματα από ασθενείς που έχουν μολυνθεί από την *P. aeruginosa*. Τα δείγματα ελέγχθηκαν για την ύπαρξη γονιδίων παθογονικότητας, την ικανότητα ανθεκτικότητας αλλά και ανάπτυξης παρουσία αντιβιοτικών, την παραγωγή βιοφίλμ καθώς και την διαφορική έκφραση των γονιδίων παθογονικότητας παρουσία ερυθρομυκίνης.

Σε όλα τα δείγματα υπήρχαν παραπάνω από ένα γονίδιο παθογονικότητας, με αρκετά από τα στελέχη να έχουν και τα εννέα γονίδια. Βακτήρια που ανήκαν στον ίδιο κλώνο είχαν σε κάποιες περιπτώσεις κοινά γονίδια. Παρατηρήθηκαν, επίσης, κλώνοι οι οποίοι αποτελούνταν από στελέχη με πολλά γονίδια παθογονικότητας και άρα ήταν πιο παθογόνοι από άλλους.

Η πυοκυανίνη είναι ένας παράγοντας παθογονικότητας, ο οποίος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην μόλυνση από την *P. aeruginosa*. Συνεπώς, η εύρεση μεθόδων που θα αναστείλουν την παραγωγή πυοκυανίνης κρίνεται απαραίτητη. Από τα δείγματα που μελετήθηκαν, 27/62 παρήγαγαν πυοκυανίνη (43%) ενώ υπήρχαν και δείγματα, τα οποία παρήγαγαν πυοβερδίνη (n=4) ή πυορουμπίνη (n=3). Η χρήση ερυθρομυκίνης είχε ως αποτέλεσμα αναστολή παραγωγής πυοκυανίνης σε 12/27 δείγματα που παρήγαγαν πυοκυανίνη και την αναστολή ανάπτυξης στα υπόλοιπα 15. Το αποτέλεσμα αυτό παρουσιάζει ενδιαφέρον καθώς, σύμφωνα με προηγούμενες αναφορές, η ερυθρομυκίνη δεν αναμενόταν να επηρεάζει την ανάπτυξη των στελεχών, δεδομένου ότι οι *Pseudomonas* παρουσιάζουν ενδογενή αντοχή στις μακρολίδες. Χρησιμοποιήθηκαν άλλες δύο μακρολίδες (κλαριθρομυκίνη και αζιθρομυκίνη) και αποδείχθηκε πως η κλαριθρομυκίνη είναι πιο αποτελεσματική στην αναστολή παραγωγής πυοκυανίνης. Ειδικότερα, η χρήση κλαριθρομυκίνης προκάλεσε αναστολή παραγωγής χρωστικής στο 88% των δειγμάτων ενώ η χρήση αζιθρομυκίνης είχε ως αποτέλεσμα αναστολή παραγωγής χρωστικής στο 35% των δειγμάτων που παρήγαγαν κάποια χρωστική. Όσον αφορά στα υπόλοιπα αντιβιοτικά, τα βακτήρια επιβίωσαν αλλά δεν ανέστειλαν την παραγωγή χρωστικής, εκτός ελαχίστων εξαιρέσεων. Επομένως, μόνο οι μακρολίδες έχουν την δυνατότητα αναστολής παραγωγής πυοκυανίνης.

Κατά την ανάπτυξη σε υγρή καλλιέργεια παρουσία ερυθρομυκίνης και μεροπενέμης, 20/21 δείγματα ανέστειλαν την ανάπτυξή τους, με 6/20 να παρουσιάζουν αναστολή μεγαλύτερη από αυτή που προκάλεσε κάθε αντιβιοτικό μεμονωμένα, κάτι που υποδεικνύει ότι η ταυτόχρονη χρήση των δύο αντιβιοτικών είναι πιο αποτελεσματική για την θεραπεία της λοίμωξης από το συγκεκριμένο στέλεχος. Το αποτέλεσμα αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό δεδομένου ότι η *Pseudomonas* κατέχει πολλά γονίδια που της προσδίδουν αντοχή σχεδόν σε όλα τα συνήθη αντιβιοτικά οπότε ενδεχομένως η συνδυαστική δράση δύο αντιβιοτικών να λύσει το πρόβλημα πολυανθεκτικότητας και να διευκολύνει τη θεραπεία.

Η παραγωγή βιοφίλμ από το βακτήριο αποτελεί μεγάλο πρόβλημα στις νοσοκομειακές εγκαταστάσεις. Μέσω του βιοφίλμ η *P. aeruginosa* δημιουργεί αποικίες, οι οποίες είναι ιδιαίτερα ανθεκτικές, σε ιατρικά εργαλεία και επιφάνειες αυξάνοντας την πιθανότητα μετάδοσης. Στο πείραμα που διενεργήθηκε, το 72% των δειγμάτων είχε την δυνατότητα παραγωγής βιοφίλμ. Τα δείγματα αυτά, ως επί το πλείστο, είχαν τα γονίδια *pslA* και *algD* που συμμετέχουν στην παραγωγή βιοφίλμ. Η ανάπτυξη των βακτηρίων παρουσία ερυθρομυκίνης δεν φάνηκε να επηρεάζει την παραγωγή βιοφίλμ στα 12 στελέχη που ελέγχθηκαν, γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε πειραματικές παραμέτρους οι οποίες θα πρέπει να βελτιστοποιηθούν.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής σε πραγματικό χρόνο (RT-PCR) απέδειξε ότι η έκφραση των γονιδίων παθογονικότητας, στην πλειονότητα των στελεχών, μειώνεται όταν η καλλιέργεια αναπτύσσεται παρουσία ερυθρομυκίνης. Η ερυθρομυκίνη προκαλεί μεγαλύτερη μείωση στην έκφραση των γονιδίων του 'Quorum Sensing' συστήματος Rhl με ποσοστό μείωσης 94% για το *rhlI* και 84% για το *rhlR*, ενώ για το σύστημα Las, η μείωση ήταν 87% και 83% για τα *lasI* και *lasR* αντίστοιχα. Ως αποτέλεσμα αυτού, η έκφραση του γονιδίου *phzM*, μειώθηκε στο 50% των δειγμάτων με ποσοστό μείωσης 78% και η έκφραση του γονιδίου *algD* μειώθηκε στο 50% των δειγμάτων κατά 73%. Τα δύο αυτά γονίδια φαίνεται να επηρεάζονται περισσότερο από τα 'Quorum Sensing' συστήματα.

Ο ΠΟΥ (Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας) έχει θέσει ως νούμερο ένα προτεραιότητα την εύρεση νέων μεθόδων αντιμετώπισης των ανθεκτικών σε καρβαπενέμες *P. aeruginosa* καθώς είναι η αιτία μιας μεγάλης κρίσης του συστήματος υγείας (Kunz Coyne, 2022). Κάποια επιπλέον στατιστικά στοιχεία που επιβεβαιώνουν τη σοβαρότητα του προβλήματος είναι ότι την τελευταία δεκαετία στις ΗΠΑ έχουν βρεθεί 32.600 περιπτώσεις μολύνσεις από το βακτήριο, εκ των οποίων 2.700 κατέληξαν σε θάνατο με κόστος για τις δομές υγείας 767 εκατομμύρια δολάρια ετησίως. Επιπλέον, οι ασθενείς που μολύνονται από πολυανθεκτικά στελέχη *P. aeruginosa* εμφανίζουν πολύ αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας και αυξημένη κατά 7 μέρες νοσηλεία με κόστος 20.000 δολάρια ανά ασθενή σε σχέση με τους ασθενείς που μολύνονται από μη ανθεκτικά στελέχη του βακτηρίου (CDC, 2019) (Tabak, 2019). Η καθυστέρηση στην χορήγηση των κατάλληλων αντιβιοτικών, η οποία είναι αποτέλεσμα της ανθεκτικότητας των στελεχών, προκαλεί αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας, ιδίως σε μολύνσεις από *P. aeruginosa* που έχουν περάσει στην κυκλοφορία του αίματος. Σε προηγούμενη μελέτη αποδείχθηκε ότι η συνδυαστική δράση μεροπενέμης και κολιστίνης προκάλεσε αναστολή ανάπτυξης σε στελέχη *P. aeruginosa* που ήταν ανθεκτικά στη μεροπενέμη (Mohamed, 2016). Αντίστοιχα από τη συγκεκριμένη μελέτη προκύπτει ότι η χρήση ερυθρομυκίνης και μεροπενέμης, διευρύνει το φάσμα δράσης των φαρμάκων πλήττοντας την ανθεκτικότητα του μικροβίου. Συνεπώς, η συνδυαστική δράση αντιβιοτικών κρίνεται απαραίτητη για την αντιμετώπιση της πολυανθεκτικότητας της *P. aeruginosa*.

Όπως έχει καταστεί σαφές, τα 'Quorum Sensing' συστήματα ελέγχουν σε μεγάλο βαθμό τη συλλογική έκφραση γονιδίων παθογονικότητας σε αποικίες *P. aeruginosa*. Τα γονίδια αυτά σχετίζονται με την παραγωγή βιοφίλμ, τοξινών, ενζύμων και αντλιών εκροής. Όλα τα παραπάνω εμπλέκονται τόσο στην κυτταροτοξικότητα όσο στην ανθεκτικότητα του βακτηρίου και άρα είναι άμεσα συνδεδεμένα και με την επικινδυνότητα της λοίμωξης. Επομένως, η εύρεση μεθόδων καταστολής των 'Quorum Sensing' συστημάτων θα συμβάλει

στην μείωση του αριθμού των θανατηφόρων μολύνσεων από το βακτήριο. Μια αρκετά ελπιδοφόρα τακτική που χρησιμοποιείται τις τελευταίες δεκαετίες είναι η χρήση μορίων αναστολέων των 'Quorum Sensing' συστημάτων (QS Inhibitors). Υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι 'Quorum Sensing inhibitors' μπορεί να απομονωθούν από προκαρυώτες, οι οποίοι παράγουν ένζυμα που αποδομούν τα σηματοδοτικά μόρια όπως AHL-λακτονάσες αλλά και από ευκαρυωτικούς οργανισμούς, όπως φυτά με φαρμακευτική δράση. Τα μόρια αυτά έχουν ως στόχο την αναστολή παραγωγής και έκκρισης των σηματοδοτικών μορίων των συστημάτων, την αποδόμηση των σηματοδοτικών μορίων ή των υποδοχέων τους και τον εμπόδιο των μονοπατιών που ενεργοποιούν τα σηματοδοτικά μόρια. Από τις προαναφερθείσες μεθόδους, μεγαλύτερη επιτυχία έχει η αποδόμηση των σηματοδοτικών μορίων με τη χρήση ενζύμων (*Kalia, 2011*). Το πλεονέκτημα της χρήσης αναστολέων είναι η θεραπεία των λοιμώξεων χωρίς τη χρήση υψηλών συγκεντρώσεων αντιβιοτικών που πιθανόν να είναι επιβλαβείς για τον ασθενή αλλά και να προκαλούν την δημιουργία πολυανθεκτικών στελεχών (*Vipin, 2013*). Έχει βρεθεί, μάλιστα, ότι σε κάποια στελέχη *P. aeruginosa* η συνδυαστική χρήση πενικιλικού οξέος που αποτελεί αναστολέα των 'Quorum Sensing' συστημάτων και τομπραμυκίνης, αύξησε την ευαισθησία του μικροβίου στην τομπραμυκίνη, σε στελέχη που προηγουμένως παρουσίαζαν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό (*Hentzer, 2003*). Αντίστοιχα σε άλλο πείραμα, η στρεπτομυκίνη σε χαμηλή συγκέντρωση προκάλεσε αναστολή του 'Quorum Sensing' στο *Acinetobacter baumannii* (*Saroj, 2013*). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτής της πειραματικής μελέτης, οι μακρολίδες, όπως είναι η ερυθρομυκίνη, μπορούν να θεωρηθούν 'Quorum Sensing inhibitors' και να χρησιμοποιηθούν συνδυαστικά με άλλα αντιβιοτικά τελευταίας γραμμής, όπως οι καρβαπενέμες, για την αναστολή των συστημάτων και κατ' επέκταση και την αναστολή της έκφρασης των γονιδίων παθογονικότητας που ελέγχονται από αυτά. Ωστόσο, παραπάνω πειραματικές μελέτες απαιτούνται για την πλήρη κατανόηση του μηχανισμού δράσης των 'Quorum Sensing' συστημάτων και την εύρεση των πιο αποτελεσματικών λύσεων, με σκοπό την καταπολέμηση των πολυανθεκτικών στελεχών των μικροβίων και την διασφάλιση της δημόσιας υγείας.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Αρσένη Α., (1994), Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή διάγνωση των λοιμώξεων, Ψευδομονάδες, 4η έκδοση, Ιατρικές Εκδόσεις «Ζήτα».
2. Δημητρακόπουλος, Γ. Οδ. (1954). «Κεφάλαιο 11: Ψευδομονάδα». Μικροβιολογία II. Αθήνα: Ευγενίδιου Ιδρύματος
3. Παπαπαναγιώτου Ι, Κυριαζοπούλου – Δαλαΐνα Β., (2001), Ιατρική Μικροβιολογία και ιολογία. 1η έκδοση University Studio Press. Θεσσαλονίκη.
4. Banerjee M., Moullick S., Bhattacharya K., Parai D., Chattopadhyay S., Mukherjee S., (2017) Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing, virulence and biofilm formation by extracts of *Andrographis paniculate*, *Microbial Pathogenesis*.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.10.023>
5. Baysse C, Cullinane M, Déneraud V, Burrowes E, Dow JM, Morrissey JP, Tam L, Trevors JT, O’Gara F (2005) Modulation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* through alteration of membrane properties. *Microbiology* 151:2529–2542.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.28185-0>
6. Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos MG, and Samore HM. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999, 43:379-82.
<https://doi.org/10.1128/AAC.43.6.1379>
7. Castric, Influence of oxygen on the *Pseudomonas aeruginosa* hydrogen cyanide synthase. *Curr Microbiol*, 1994. <https://doi.org/10.1139/m83-209>
8. CDC . Antibiotic resistance threats in the United States. Atlanta: CDC; 2019
9. Chen J., Su Z., Liu Y., Wang S., Dai X., et al., 2009. Identification and characterization of class 1 integrons among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in Zhenjiang, China. *Int J Infect Dis* 13, 717–721. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2008.11.014>
10. Costerton J. W., Geesey G. G., and Cheng K. J. (1978). How bacteria stick. *Sci. Am.* 238, 86–95. doi: 10.1038/scientificamerican0178-86. DOI: 10.1038/scientificamerican0178-86
11. Cunz Koyne AJ, El Ghali Amer, Holger Dana, Rebold Nicholas, Rybak Michael J, 2022, Therapeutic Strategies for Emerging Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*, doi: 10.1007/s40121-022-00591-2
12. Dekimpe V., Deziel E., (2009) Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhIR regulates LasR-specific factors. *Microbiology* 155:712–723. <https://doi.org/10.1099/mic.0.022764-0>
13. Dreier J., Ruggerone P., 2015. Interaction of antibacterial compounds with RND efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* 6, 660.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00660>
14. Henry R. (August 2012). "Etymologia: *Pseudomonas*". *Emerging Infectious Diseases*. 18 (8): 1241. doi:10.3201/eid1808.ET1808. Retrieved 27 February 2021.

15. Hentzer M, Wu H, Andersen JB, Riedel K, Rasmussen TB, Bagge N, et al. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J* 2003;22: 3803–15 <https://doi.org/emboj/cdg366>.
16. Jack AA, Khan S., Powell LC, Pritchard MF, Beck K., Sadh H., Sutton L., Cavaliere A., Florance H., Rye PD, Thomas DW, Hill KE. 2018. Alginate oligosaccharide-induced modification of the lasI-lasR and rhII-rhIR quorum-sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 62: e02318-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.02318-17>.
17. Jurado-Martín I., Sainz-Mejías M., McClean S., *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 3128. <https://doi.org/10.3390/ijms22063128>
18. Kalia VC, Rani A, Lal S, Cheema S, Raut CP. Combing databases reveals potential antibiotic producers. *Expert Opin Drug Discov* 2007; 2:211–24. <https://doi.org/10.1517/17460441.2.2.211>
19. Kaspy I., Rotem E., Weiss N., Ronin I., Balaban N.Q., Glaser G., 2013. HipA-mediated antibiotic persistence via phosphorylation of the glutamyl-tRNA-synthetase. *Nat Commun* 4, 3001. <https://doi.org/10.1038/ncomms4001>
20. Khosravi A.D., Motahar M., Abbasi, Montazeri E., 2017. The frequency of class1 and 2 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in a burn center of Ahvaz, Iran. *PLoS One* 12, e0183061. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183061>
21. Lee J., Wu J., Deng Y., Wang J., Wang C., Chang C, Dong Y., Williams P., Zhang L-H. 2013. A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nat Chem Biol* 9:339–343. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1225>.
22. Lee J., Lianhui Z., The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*, *Protein and Cell*, 2015. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x>
23. Mlynarcik P., Kolar M., 2017. Starvation- and antibiotics-induced formation of persister cells in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 161, 58–67. DOI: 10.5507/bp.2016.057
24. Moore N. and Flaws M., Introduction: *Pseudomonas aeruginosa*, American Society for Clinical Laboratory Science, 2011. <https://doi.org/10.29074/ascls.24.1.41>
25. Mulcahy L.R., Burns J.L., Lory S., Lewis K., 2010. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis. *J Bacteriol* 192, 6191–6199. <https://doi.org/10.1128/JB.01651-09>
26. Nikokar I., Tishayar A., Flakiyan Z., Alijani K., Rehana-Banisaeed S., et al., 2013. Antibiotic resistance and frequency of class 1 integrons among *Pseudomonas aeruginosa*, isolated from burn patients in Guilan, Iran. *Iran J Microbiol* 5, 36–41. PMID: 23466812
27. Odumosu B.T., Adeniyi B.A., Chandra R., 2013. Analysis of integrons and associated gene cassettes in clinical isolates of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Southwest Nigeria. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 12, 29. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-12-29>

28. Olivares E., Badel-Berchoux S., Provot C., Prévost G., Bernardi T. and Jehl F., Clinical Impact of Antibiotics for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections, *Frontiers in Microbiology*, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02894>
29. Oliveira V., Steixner S., Nascimento C., Oliveira Pagnano V., Silva-Lovato C.H., Oliveira Paranhos H., Wilflingseder D., Coraça-Huber D., Watanabe E., 2021. Expression of virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* biofilm after bacteriophage infection, *Microbial Pathogenesis* 154 (2021) 104834. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104834>
30. Overhage J., Schemionek M., Webb J. S., Rehm B., Expression of the *psl* operon in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilms: *PslA* performs an essential function in biofilm formation, 2005, *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4407-4413.2005>
31. Papanikolaou G., & Palaiologou D. (2015). Τα στάδια της αντίδρασης PCR. [Image]. In Papanikolaou, G., Palaiologou, D., Katsareli, E., Katsila, T., Tsarouha, H., Tzetis, M., Lilakos, K., & Doukissas, L. 2015. *Laboratory Exercises in Human Genetics [Laboratory Guide]*. Kallipos, Open Academic Editions. chapter 6. <http://hdl.handle.net/11419/594>
32. Pollack M. *Pseudomonas aeruginosa*. In *principles and Practice of infectious Diseases*, 4th edn, (Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R., Eds), pp. 1980- 2003. Churchill Livingstone, London, UK. 1995.
33. Rajkumaria R., Borkotokyb S., Muralib A., Suchiangc K., Mohantyc S. K., Busia S., Attenuation of quorum sensing controlled virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* by pentacyclic triterpenes, betulin and betulinic acid, *Microbial Pathogenesis*, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.012>
34. Ramirez, M.S., Tolmasky, M.E., 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat* 13, 151–171. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2010.08.003>
35. Rao X., Huang X., Zhou Z., and Lin X., An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis, *Biostat Bioinforma Biomath*. 2013. PMID: 25558171
36. Reimer L. C., Vetcinina A., Carbasse J. S., Söhngen C., Gleim D., Ebeling C., Overmann J., (2019), Bacterial phenotypic data for High-throughput biodiversity analysis, *Nucleic Acids Research*, Volume 47, Issue D1, 08 January 2019, Pages D631–D636, <https://doi.org/10.1093/nar/gky879>
37. Sairengpuii H., Paramanatham P., SampathkumarR., Dinakara R.A., Dhanasekhar R., Ranjith N.K., Kitlangki S., Saswat M., Siddhardha B. (2019) Mosloflavone attenuates the quorum sensing controlled virulence T phenotypes and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: In vitro, in vivo and in silico approach. *Microbial Pathogenesis*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2019.04.005>
38. Saroj, S. D., and Rather, P. N. (2013). Streptomycin inhibits quorum sensing in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 1926–1929. doi: 10.1128/AAC.02161-12

39. Schuster M, Lostroh CP, Ogi T, Greenberg EP. 2003. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J Bacteriol* 185:2066–2079. <https://doi.org/10.1128/JB.185.7.2066-2079.2003>.
40. Schuster M, Greenberg EP (2006) A network of networks: quorum- sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Med Microbiol* 296:73–81. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.01.036>
41. Sugawara E, Nestorovich E, Sergey M. Bezrukov, Nikaido H., *Pseudomonas aeruginosa* Porin OprF Exists in Two Different Conformations, *Journal of Biological Chemistry*, 2006, <https://doi.org/10.1074/jbc.M600680200>
42. Tabak YP, Merchant S, Ye G, et al. Incremental clinical and economic burden of suspected respiratory infections due to multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the United States. *J Hosp Infect.* 2019 <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2019.06.005>
43. van Delden C, Comte R, Bally AM (2001) Stringent response activates quorum sensing and modulates cell density-dependent gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 183:5376–5384. <https://doi.org/10.1128/JB.183.18.5376-5384.2001>
44. Vipin Chandra Kalia, Quorum Sensing inhibitors: An overview, 2013, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.10.004>
45. Walters 3rd, M.C., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M.J., Stewart, P.S., 2003. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 317–323. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.1.317-323.2003>
46. Wang J., Wang C., Dela Ahator S., Wu S., Zhang L.H., Bacterial quorum-sensing signal IQS induces host cell apoptosis by targeting POT1-p53 signalling pathway. *Cell Microbiol.* 2019, 21, e13076. <https://doi.org/10.1111/cmi.13076>
47. Wang X. and Wood T. K., Toxin-Antitoxin Systems Influence Biofilm and Persister Cell Formation and the General Stress Response, *Applied and Environmental Microbiology*, 2011. <https://doi.org/10.1128/AEM.05068-11>
48. Yajie Zhu, Shuming Pan, *Pseudomonas aeruginosa* induced acute emphysema through bacterial secretion in mice, Cold Spring Harbor Laboratory, 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.09.08.287003>
49. Zheng Pang, Renee Raudonis, Bernard R. Glick, Tong-Jun Lin, Zhenyu Cheng, Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies, *Biotechnology Advances*, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>

Σύνδεσμοι (links):

1. <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=76313637>
2. <https://www.cdc.gov/hai/organisms/pseudomonas.html>

