



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

**“ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ
ΥΓΙΕΙΝΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ & ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΥΔΑΤΩΝ”**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία με τίτλο:

**Μελέτη του προφίλ αντιβιοαντοχής στελεχών *Escherichia coli* που απομονώθηκαν
σε περιβαλλοντικά δείγματα του Περιφερειακού Εργαστηρίου Δημόσιας Υγείας
(Π.Ε.Δ.Υ) Θεσσαλίας.**

της Τεχνολόγου Τροφίμων του Α.Τ.Ε.Ι ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Γεροβασιλείου Ευφροσύνης του Σωτηρίου

Επιβλέπων Καθηγητής: Χατζηχριστοδούλου Χρήστος

Λάρισα, 2019



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

**“ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ
ΥΓΙΕΙΝΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ & ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΥΔΑΤΩΝ”**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία με τίτλο:

**Μελέτη του προφίλ αντιβιοαντοχής στελεχών *Escherichia coli* που απομονώθηκαν
σε περιβαλλοντικά δείγματα του Περιφερειακού Εργαστηρίου Δημόσιας Υγείας
(Π.Ε.Δ.Υ) Θεσσαλίας.**

της Τεχνολόγου Τροφίμων του Α.Τ.Ε.Ι ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Γεροβασιλείου Ευφροσύνης του Σωτηρίου

Επιβλέπων Καθηγητής: Χατζηχριστοδούλου Χρήστος

Λάρισα, 2018

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Επιβλέπων Καθηγητής:

Χατζηχριστοδούλου Χρήστος, Καθηγητής Υγιεινής & Επιδημιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Μέλη Τριμελούς Επιτροπής:

Πουρνάρας Σπυρίδων, Καθηγητής Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Ραχιώτης Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Επιδημιολογίας & Επαγγελματικής Υγιεινής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΑΦΙΕΡΩΣΕΙΣ

Την παρούσα διπλωματική εργασία θα ήθελα να την αφιερώσω σε εκείνη που στήριξε όλα μου τα σχέδια και υπήρξε αρωγός κάθε προσπάθειάς μου, καθότι και της παρούσης εργασίας, που μου έμαθε να διεκδικώ τα όνειρα μου και να μην το βάζω ποτέ κάτω. Σε εκείνη που μου μαθαίνει κάθε μέρα πως είναι να βλέπεις και να ξεχωρίζεις την ομορφιά σε κάθε τι άσχημο. Σε εκείνη λοιπόν που είναι ο ήρωάς μου. Στη μητέρα μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια η αντιβιοαντοχή των μικροοργανισμών που έχει προκύψει λόγω της αλόγιστης χρήσης των αντιβιοτικών καθώς και της διασποράς της μέσω μη οργανωμένης διαχείρισης των αποβλήτων, βρίσκεται στο επίκεντρο της επιστημονικής έρευνας καθότι τα βακτήρια αναπτύσσουν ολοένα και περισσότερους μηχανισμούς ευαισθησίας έναντι των μικροβιακών παραγόντων. Η επικράτηση των ανθεκτικών στελεχών αποτελεί απειλή για τη δημόσια υγεία διότι μειώνει την αποτελεσματικότητα των θεραπευτικών σχημάτων έναντι των λοιμώξεων τόσο της κοινότητας όσο και των ενδονοσοκομειακών, αυξάνοντας έτσι τη θνητότητα. Ο κύριος παράγοντας που ενισχύει τη συνεχή ανάπτυξη μηχανισμών εκ μέρους των μικροοργανισμών είναι η μαζική χρήση αντιβιοτικών στον άνθρωπο, στην κτηνοτροφία καθώς και στα ύδατα αλλά και στη γεωργία.

Ο προσδιορισμός της αντιβιοαντοχής στο υδάτινο περιβάλλον είναι σημαντικός διότι όχι μόνο γίνεται διασπορά, μέσω αυτού, στον άνθρωπο και στον ζωικό πληθυσμό αλλά και διότι αποτελεί μέσο ένταξης των ανθεκτικών στελεχών στο υδάτινο περιβάλλον.

Η *E. Coli* είναι Gram-αρνητικό βακτήριο, που αποτελεί μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του παχέος εντέρου του ανθρώπου και των θερμόαιμων οργανισμών όπου ευκαιριακά και δυνητικά χαρακτηρίζεται από παθογονικότητα. Είναι κλινικής σημασίας βακτήριο καθώς έχει συσχετιστεί με την πρόκληση λοιμώξεων του γαστρεντερικού σωλήνα και του ουροποιητικού συστήματος, με την πρόκληση πνευμονίας, σήψης και νεογνικής μηνιγγίτιδας. Πιο συγκεκριμένα αποτελεί κύριο αίτιο των λοιμώξεων του ουροποιητικού τόσο στην κοινότητα όσο και μεταξύ των ενδονοσοκομειακών ασθενών. Χαρακτηρίζεται από μια πλειάδα μηχανισμών ευαισθησίας έναντι μικροβιακών παραγόντων με αποτέλεσμα να διαθέτει μεγάλο ποσοστό ανθεκτικών στελεχών που δυσκολεύουν την αντιμετώπιση των λοιμώξεων που προκαλεί.

Η ανίχνευσή του στο νερό αποτελεί δείκτη κοπρανώδους μόλυνσης και σχετίζεται άμεσα με την ποιότητα του ύδατος στο οποίο ανευρίσκεται.

Ο προσδιορισμός της αντιβιοαντοχής του είναι σημαντικός διότι το υδάτινο περιβάλλον αποτελεί μέσο διασποράς τους στο οικοσύστημα και στον ανθρώπινο πληθυσμό.

Στην παρούσα μελέτη απομονώθηκαν 176 συνολικά περιβαλλοντικά δείγματα που αφορούν νερό δικτύου ύδρευσης, κολυμβητικών δεξαμενών, θαλάσσης και αποβλήτων εργοστασίων. Στα 72 από αυτά έγινε προσδιορισμός της αντιβιοαντοχής τους μέσω του αυτοματοποιημένου συστήματος Vitek®2 και της μεθόδου διάχυσης με δίσκους σε αντιμικροβιακούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται ευρέως στην κλινική πράξη όπως είναι τα β-λακταμικά, οι κινολόνες, οι τετρακυκλίνες, οι αμινογλυκοσίδες, οι φουράνες και η κοτριμοξαζόλη.

Με τη μέθοδο vittek 2 η μεγαλύτερη αντοχή αναπτύχθηκε στην αμπικιλίνη με ποσοστό 98.61% και η χαμηλότερη στη γενταμυκίνη ενώ με μέθοδο της Kirby-Bauer η μεγαλύτερη αντοχή σημειώθηκε στην αμπικιλίνη με ποσοστό 22.22% και η μικρότερη στην ημιπενέμη,

σιπροφλοξασίνη και στην Τριμεθοπρίμη/Σουλφομεθοξαζόλη με ποσοστό 0%. Φαίνεται πως και με τις δύο μεθόδους βρέθηκαν στελέχη ανθεκτικά σε ευρέως φάσματος αντιβιοτικά όπως είναι η αμικιλίνη, γεγονός που αποτυπώνει τη διασπορά ανθεκτικών στελεχών στο περιβάλλον.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία με τίτλο “*Μελέτη του προφίλ αντιβιοαντοχής στελεχών Escherichia coli που απομονώθηκαν σε περιβαλλοντικά δείγματα του Περιφερειακού Εργαστηρίου Δημόσιας Υγείας (Π.Ε.Δ.Υ) Θεσσαλίας.*” πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Υγιεινής & Επιδημιολογίας του τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και αποτελεί μέρος πειραματικής μελέτης του εργαστηρίου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον εισηγητή και επιβλέποντα της διπλωματικής εργασίας, κ. Χατζηχριστοδούλου Χρήστο για τις υποδείξεις και τις οδηγίες καθ’ όλη τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο, το συνεχές ενδιαφέρον και την καθοριστική του συμβολή στη διεξαγωγή των πειραμάτων καθώς και τη διαμόρφωση του κειμένου.

Επιπλέον θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον Καθηγητή Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. Πουρνάρα Σπυρίδων καθώς και τον κ. Ραχιώτη Γεώργιο Επίκουρο Καθηγητή Επιδημιολογίας και Επαγγελματικής Υγιεινής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για το διδακτικό ρόλο τους και την καθοριστική τους συμβολή στη διεκπεραίωση αυτής της διπλωματικής εργασίας.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κ. Κυρίτση Μαρία, Ιατρό Μικροβιολόγο Βιοπαθολόγο, Τεχνική υπεύθυνη του μικροβιολογικού εργαστηρίου του Π.Ε.Δ.Υ Θεσσαλίας και υπεύθυνη του εργαστηρίου Μοριακής Μικροβιολογίας για την πολύτιμη βοήθειά της, την αμέριστη υπομονή της και το χρόνο που αφιέρωσε για την πραγματοποίηση αυτής της εργασίας.

Ακόμα, θα ήταν παράλειψη να μην αναφερθώ στους συνεργάτες του εργαστηρίου Επιδημιολογίας, καθώς και σε όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για την προθυμία και τη βοήθεια τους κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο, ιδιαίτερα στο χρόνο συλλογής και πρωτογενούς επεξεργασίας των περιβαλλοντικών δειγμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους με βοήθησαν και με στήριξαν για την εκπόνηση της εργασίας αυτής.

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Συχνότερα βακτηριακά παθογόνα αίτια των τροφιμογενών νοσημάτων και χαρακτηριστικά του νοσήματος

Πίνακας 2: Διαρροικά στελέχη της *E.coli*, παράγοντες που συμμετέχουν στην πρόκληση της νόσου και κλινικές εκδηλώσεις

Πίνακας 3: Βιοχημικές Ιδιότητες της *E.coli*

Πίνακας 4: Μικροβιολογικές Παράμετροι & Παραμετρικές τιμές για το νερό ανθρώπινης κατανάλωσης

Πίνακας 5: Μικροβιολογικοί Παράμετροι & Παραμετρικές τιμές για το νερό που πωλείται σε φιάλες ή δοχεία.

Πίνακας 6: Αξιολόγηση ποιότητας ανάλογα με τη συγκέντρωση της *E.coli*, σε εσωτερικά ύδατα

Πίνακας 7: Αξιολόγηση ποιότητας ανάλογα με τη συγκέντρωση της *E.coli*, σε παράκτια και μεταβατικά ύδατα

Πίνακας 8: Παράμετροι και κριτήρια ποιότητας νερού πισίνων & κολυμβητικών δεξαμενών

Πίνακας 9: Είδος και συνολικός αριθμός δειγμάτων που απομονώθηκαν κατά την περίοδο Ιούνιος 2016 – Νοέμβριος 2017.

Πίνακας 10: Στελέχη *E.coli* που απομονώθηκαν από τα περιβαλλοντικά δείγματα.

Πίνακας 11: Στελέχη *E.coli* από τα περιβαλλοντικά δείγματα, για τα οποία περιλήφθηκαν δεδομένα ως προς την ευαισθησία τους

Πίνακας 12: Σύνθεση του Chromocult Coliform agar.

Πίνακας 13: Κρίσιμα όρια κατά EUCAST.

Πίνακας 14: Συστατικά των καρτών AST – N215 μιας χρήσης του Vitek® 2.

Πίνακας 15: Αποτελέσματα φαινοτύπου των στελεχών στα β-λακταμικά.

Πίνακας 16: Αποτελέσματα φαινοτύπου των στελεχών στις κινολόνες.

Πίνακας 17: Αποτελέσματα φαινοτύπου των στελεχών στις αμινογλυκοσίδες.

Πίνακας 18: Αποτελέσματα φαινοτύπου των στελεχών στις φουράνες.

Πίνακας 19: Αποτελέσματα φαινοτύπου των στελεχών στην τριμεθοπρίμη/σουλφομεθοξαζόλη.

Πίνακας 20: Αποτελέσματα αντιβιοαντοχής όλων των προς εξέταση δειγμάτων.

Πίνακας 21: Συγκριτικός πίνακας αποτελεσμάτων Vitek 2 - Kirby Bauer.

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση της δομής του βακτηριακού κυττάρου της *E.coli*

Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση του λιποπολυσακχαρίτη (LPS).

Εικόνα 3 : Ανάδειξη της διαχωριστικής ικανότητας του καλλιεργητικού υλικού Mc Conkey.

Εικόνα 4: Χημική δομή του β-λακταμικού δακτυλίου.

Εικόνα 5: Απεικόνιση προσδιορισμού αντιβιοαντοχής με τη μέθοδο Kirby-Bauer.

Εικόνα 6: Απεικόνιση προσδιορισμού αντιβιοαντοχής με τη δοκιμή αραιώσεων ζωμού.

Εικόνα 7: Απεικόνιση Etest.

Εικόνα 8: Απεικόνιση του Vitek 2.

Εικόνα 9: Απεικόνιση των καρτών μιας χρήσης.

Εικόνα 10: Ανακαλλιέργεια των προς εξέταση στελεχών *E.coli* σε TSA.

Εικόνα 11: Προσθήκη 3ml Salin Solution στους δοκιμαστικούς σωλήνες.

Εικόνα 12: Ανάδευση του μικροοργανισμού στο δοκιμαστικό σωλήνα.

Εικόνα 13: Μέτρηση της πυκνότητας του εναιωρήματος με θολοσίμετρο.

Εικόνα 14: Παραγωγή εναιωρήματος.

Εικόνα 15: Μέτρηση θολερότητας.

Εικόνα 16: Ενοφθαλμισμός στο θρεπτικό υλικό.

Εικόνα 17: Τοποθέτηση αντιβιοτικών δισκίων.

Εικόνα 18: Απεικόνιση ζωνών αναστολής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1. <i>Escherichia Coli</i>	1
1.1 Μορφολογία & Αντιγονική Σύσταση.....	1
1.2 Επιδημιολογία.....	3
1.3 Παθογένεια-Λοιμογόνιοι Παράγοντες.....	5
1.4 Κλινικές Εκδηλώσεις	9
1.5 Εργαστηριακή Διάγνωση	14
1.6 Θεραπεία	16
2. Αντιβιοαντοχή	20
2.1 Αντιβιοαντοχή της <i>E.coli</i> και μηχανισμοί αντιβιοαντοχής.....	20
2.2 Μέθοδοι προσδιορισμού αντιβιοαντοχής	22
3.Περιβαλλοντικά δείγματα	25
3.1 Νομοθετικά όρια για <i>E.coli</i> στα περιβαλλοντικά δείγματα	26
3.2 Παρουσία αντιβιοτικών & ανθεκτικών στελεχών στο υδάτινο περιβάλλον ..	28
ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	30
1.Είδος & Συλλογή Δειγμάτων.....	30
2. Ανίχνευση και Καταμέτρηση της <i>E.Coli</i>	30
2. Ταυτοποίηση με MALDI – TOF.	32
3. Φύλαξη & συντήρηση σε βαθιά κατάψυξη	33
4. Προσδιορισμός Ευαισθησίας Αντιβιοαντοχής των στελεχών <i>E.coli</i> με τη χρήση του Vitek® 2.	34
5. Ανίχνευση καθαρότητας των δειγμάτων.....	38
6.Ανίχνευση αντιβιοαντοχής με τη μέθοδο διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών κατά Kirby Bauer	38
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	40
1. Προσδιορισμός Φαινοτύπου με Vitek 2	40
2. Προσδιορισμός ευαισθησίας των στελεχών έναντι αντιμικροβιακών παραγόντων με Vitek 2.....	42
3.Προσδιορισμός αντιβιοαντοχής με τη μέθοδο διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών κατά Kirby Bauer	44
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	45
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	48

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ESCHERICHIA COLI

Το μικρόβιο αυτό ανακαλύφθηκε και περιγράφηκε για πρώτη φορά από το Γερμανό Βακτηριολόγο Theodore von Escherich το 1885. Ο Theodore von Escherich αρχικά το είχε ονομάσει *Bacterium coli commune* και έπειτα μετονομάστηκε από τον Migula σε *Bacillus coli* το 1895 (Migula W., 1895). Στην πορεία οι Lehman και Neumann το μετονόμασαν πάλι σε *Bacterium coli* το 1896 (Lehman KB et.al., 1896) και η τελική του ονομασία δόθηκε το 1919 από τους Castellani και Charmers (Castellani A et.al., 1919). Επιπλέον ο Theodore von Escherich συνέδεσε την ύπαρξη κάποιων στελεχών της *E.coli* με την πρόκληση γαστρεντερίτιδας στα βρέφη. Η ανακάλυψή του αυτή ήταν πολύ σημαντική για τη δημόσια υγεία. Παρ' όλα αυτά μόλις το 1982 συνδέθηκε για πρώτη φορά με επιδημίες αιμορραγικής διάρροιας και αναγνωρίστηκε ως ανθρώπινο παθογόνο στο Όρεγκον των Η.Π.Α (Ji Youm Lim et.al., 2010). Από τότε έχει ενοχοποιηθεί για αρκετές επιδημίες ανά τον κόσμο. Σήμερα γνωρίζουμε ότι το μικρόβιο αυτό αποτελεί μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου του ανθρώπου καθώς και των θερμόαιμων ζώων (WHO, 2016). Τα περισσότερα στελέχη της δεν είναι παθογόνα για τον άνθρωπο (Mayo Clinic, 2014), κάποια όμως μπορούν να προκαλέσουν νόσο (CDC, 2015). Τα παθογόνα στελέχη της *E.coli* κατηγοριοποιούνται στους παρακάτω τύπους ανάλογα με το μηχανισμό πρόκλησης βλάβης στο επιθήλιο (Ji Youm Lim et.al., 2010).

Κατά το CDC, οι παρακάτω 6 τύποι σχετίζονται με την πρόκληση διάρροιας:

1. Shigatoxin-producing *E.coli* (STEC)
2. Enteropathogenic *E.coli* (EPEC)
3. Enteroaggregative *E.coli* (EAEC)
4. Enterotoxinogenic *E.coli* (ETEC)
5. Enteroinvasive *E.coli* (EIEC)
6. Diffusely adherent *E.coli* (DAEC)

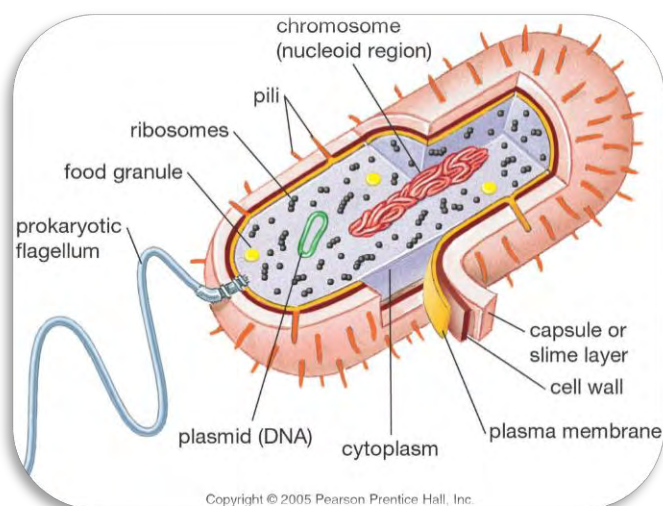
Κάθε τύπος χαρακτηρίζεται από διαφορετικό οροτυπικό προφίλ και ευθύνεται για διαφορετική συμπτωματολογία στον άνθρωπο (Todar, K., 2012). Περαιτέρω κατηγοριοποίηση των στελεχών μπορεί να προκύψει από την ανίχνευση και αλληλούχιση συγκεκριμένων γονιδίων παθογονικότητας.

1.1 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ & ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ

Η *E.Coli* είναι ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο ραβδόμορφου σχήματος με πάχος 0,5μm και μήκος 1-5μm που ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae* (Griffin, P. M., 1991). Είναι περιτρίχο κινητό μικρόβιο, ενώ υπάρχουν και ακίνητα στελέχη. Παράγει ένα πολύ μικρό έλυτρο και φέρει προσκολλητικά και συζευκτικά ινίδια (Brock Biology of Microorganisms), χαρακτηριστικά που του προσδίδουν παθογονικότητα. Το κύτταρο της αποτελείται από κυτταρόπλασμα, κυτταρική

μεμβράνη και κυτταρικό τοίχωμα. Μεταξύ κυτταροπλασματικής μεμβράνης και κυτταρικού τοιχώματος απαντά ο περιπλασμικός χώρος όπου εκεί βρίσκονται υδρολυτικά ένζυμα όπως είναι οι β-λακταμάσες που τους προσδίδουν αντοχή έναντι αντιβιοτικών όπως είναι τα β- λακταμικά που διαθέτουν τον λακταμικό δακτύλιο. Η αντοχή τους οφείλεται στην υδρόλυση που προκαλεί το υδρολυτικό ένζυμο στο αντιβιοτικό στο περιπλασμικό χώρο. Λόγω της δομής τους αυτής διαθέτουν πλεονέκτημα έναντι των Gram θετικών μικροοργανισμών. Γύρω από το κυτταρικό τοίχωμα απαντά ένα λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης που περιβάλλεται απο την εξωτερική μεμβράνη. Το κυτταρικό τοίχωμα της *E.coli* όπως και των υπόλοιπων Gram αρνητικών βακτηρίων εκτελεί τις κάτωθι λειτουργίες:

1. Προστατεύει το εσωτερικό του κελιού απο μηχανικές και οσμωτικές δυνάμεις.
 2. Συμμετέχει στην κυτταρική διαίρεση και στην ανάπτυξη του κυττάρου.
 3. Διαθέτει συστήματα μεταφοράς των θρεπτικών ουσιών ενώ παράλληλα έχει τη δυνατότητα να απελευθερώνει ένζυμα και τοξίνες από την κυψέλη.
 4. Επιπλέον διαθέτει θέσεις υποδοχέων για βακτηριοφάγους.
 5. Τέλος, παρουσιάζει μια σειρά χαρακτηριστικών αντιγόνων.
- (Bayer, M., 1965)



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση της δομής του βακτηριακού κυττάρου της *E.coli*

Τα αντιγόνα της *E.coli* είναι αυτά που καθορίζουν τον ορότυπό της και διακρίνονται στα σωματικά (O), τα μαστιγωτά (H) και τα καψικά πολυσακχαριδικά αντιγόνα (K). Η διάκριση αυτή χρησιμοποιείται κυρίως στην επιδημιολογία (Stenutz R., 2006).

Το κυτταρικό τοίχωμα των Gram αρνητικών βακτηρίων διαθέτει τον πολυσακχαρίτη LPS, του οποίου το πολυσακχαριδικό τμήμα αποτελούν τα σωματικά (O) αντιγόνα. Είναι ανθεκτικά στη θερμότητα και ειδικά για κάθε είδος. Ωστόσο, υπάρχουν διασταυρούμενες αντιδράσεις μεταξύ της *E.coli* και άλλων εντεροβακτηριοειδών κυρίως της *Shigella* λόγω της ομοιότητας των σωματικών αντιγόνων τους. Επιπλέον,

τα σωματικά αντιγόνα είναι αυτά που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή αντισωμάτων και την άνοδο του τίτλου αυτών κατά την πορεία της νόσου. Για τον προσδιορισμό τους χρησιμοποιούνται συγκολλητινοαντιδράσεις με τη χρήση ειδικών αντι-Ο ορών (Nataro J et.al., 2011).

Σε αντίθεση με τα σωματικά (Ο) αντιγόνα, τα βλεφαριδικά αντιγόνα είναι μόρια πρωτεϊνικής φύσης από τη φλαγελλίνη των βλεφαρίδων και είναι θερμοευαίσθητα. Η αντιγονική ποικιλομορφία τους έγκειται στους διαφορετικούς τύπους αντιγόνων των βλεφαρίδων. Επιπρόσθετως, δεν εμφανίζουν διασταυρούμενες αντιδράσεις όπως συμβαίνει με τα σωματικά (Ο) (Wang, L., 2003).

Τα αντιγόνα του ελύτρου Κ είναι και αυτά θερμοευαίσθητα και μπορούν να είναι είτε πρωτεϊνικά μόρια ή πολυσαχαριδικά και αποτελούν μέρος του ελύτρου. Σε αντίθεση με τα σωματικά (Ο) που βρίσκονται σε βάθος, τα αντιγόνα του ελύτρου είναι επιφανειακά, γεγονός που τους επιτρέπει να εμποδίζουν τις συγκολλήσεις με ομόλογους αντι-Ο ορούς των αντιγόνων Ο. Κάποια από τα Κ αντιγόνα συνδέονται με συγκεκριμένες λοιμώξεις με χαρακτηριστικό παράδειγμα το K1 που συνδέεται με την πρόκληση νεογνικής μηνιγγίτιδας και πυελονεφρίτιδας. Τα Κ αντιγόνα δεν προκαλούν παραγωγή αντισωμάτων σε τίτλους με διαγνωστική αξία ενώ οι ορολογικές εξετάσεις έχουν διαγνωστική αξία μόνο στην περίπτωση της πυελονεφρίτιδας (Nataro J et.al., 2011).

1.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ενώ η *E.coli* αποτελεί μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου του ανθρώπου, είναι δυνητικά ή ευκαιριακά παθογόνο βακτήριο. Ορισμένα στελέχη έχουν ενοχοποιηθεί τόσο για εντερικές όσο για εξωεντερικές λοιμώξεις με σημαντικότερο στέλεχος της STEC την O157:H7, η οποία συνδέεται με την πρόκληση αιμορραγικής διάρροιας και την πρόκληση ουραιμικού αιμολυτικού συνδρόμου. Η μετάδοση της είναι γίνεται με την κοπρανοστοματική οδό μέσω τροφίμων όπως είναι το ατελώς μαγειρεμένο κρέας ή τα απαστερίωτα προϊόντα γάλακτος ακόμη και μέσω επιμολυσμένων ή μη επαρκώς πλυμένων λαχανικών και φρούτων ή μέσω μολυσμένου νερού (WHO,2018). Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αύξηση των κρουσμάτων υδατογενών λοιμώξεων κυρίως λόγω γήρανσης των συστημάτων ύδρευσης και αποχέτευσης. Επιπλέον ενοποιούνται παράγοντες όπως η αστυφιλία, η αύξηση των ανοσοκατεσταλμένων ατόμων, και η αλλαγή του κλίματος Η επιδημιολογική επιτήρηση των υδατογενών λοιμώξεων είναι πολύ σημαντική για τη διάσφαλιση της δημόσιας υγείας. Οι υδατογενείς λοιμώξεις μπορούν να μεταδοθούν με την άμεση επαφή με το νερό, με την κατανάλωση μολυσμένου νερού, με εισπνοή αερολύματος καθώς και εισρόφηση μολυσμένου νερού (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2011). Η συστηματική συλλογή, ανάλυση και ερμηνεία όλων των δεδομένων που αφορούν την εμφάνιση και εξάπλωση των τροφιμογενών παραγόντων είναι απαραίτητες διεργασίες για τον σχεδιασμό, την εφαρμογή και την αξιολόγηση των παρεμβάσεων της δημόσιας υγείας με τελικό σκοπό τον έλεγχο των τροφιμογενών λοιμώξεων και τη διάσφαλιση της δημόσιας υγείας.

Κατά την επιδημιολογική επιτήρηση, εφαρμόζονται διάφορες τεχνικές οι οποίες χωρίζονται σε κατηγορίες.(Παπαπαναγιώτου Ι, 2005)

A) στις **φαινοτυπικές μεθόδους** οι οποίες περιλαμβάνουν:

- i. τον έλεγχο αντοχής σε αντιβιοτικά: ο φαινότυπος αντοχής στα αντιβιοτικά αποτελεί τον πρώτο επιδημικό δείκτη και μπορεί να γίνει σε όλα τα εργαστήρια λόγω της εύκολης τεχνικής. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι η μέθοδος των δίσκων κατά Kirby – Bauer καθώς και ο προσδιορισμός τη ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας MIC με E-test (Χαρβάλου Α, 2007).
- ii. την βιοτυπία: η οποία στηρίζεται στον προσδιορισμό των βιοχημικών ιδιοτήτων του έκαστου στελέχους. Αποτελεί εύκολη και γρήγορη μέθοδο με εμπορικά συστήματα βιοχημικής ταυτοποίησης όπως είναι το API 20E και το αυτόματο σύστημα Vitek 2. Μειονέκτημα της μεθόδου αυτής η ελλιπής διακριτική ικανότητα που προκύπτει λόγω της ποικιλίας των μεταβολικών χαρακτηριστικών.
- iii. την οροτυπία: χρησιμοποιείται κυρίως για τον διαχωρισμό υποτύπων όπως το στέλεχος O157:H7 της *E.coli* και δεν είναι πολύ ειδικός δείκτης.
- iv. τη λυσιτυπία :υπάρχουν κάποια σχήματα λυσιτυπίας των *Escherichia* με τη χρήση βακτηριοφάγων.
- v. την κολισινοτυπία: η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ευαισθησία στελεχών της *E.coli* σε συγκεκριμένες κολισίνες και σε κολισινογονότυπους με βάση το είδος των κολισινών που παράγουν (Αρσένη Α, 1994).

B) στις **μοριακές μεθόδους**: Η γονοτύπηση που βασίζεται σε μοριακές μεθόδους καθιστά το διαχωρισμό των στελεχών της οικογένειας των εντεροβακτηριοειδών ευκολότερο με αποτέλεσμα την σύνδεση του κλινικού δείγματος με τα απομονωθέντα από περιβαλλοντικές πηγές/τρόφιμα. Οι μοριακές μέθοδοι περιλαμβάνουν τις εξής:

- α. Ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (*Pulsed field gel electrophoresis – PFGE*). Χρησιμοποιείται για τη γονοτυπική ανάλυση και τον διαχωρισμό μεγάλων τμημάτων DNA εφαρμόζοντας ηλεκτρικό παλλόμενο πεδίο σε υλικό αγαρόζης
- β. Τεχνική πολυτοπικής ανάλυσης της ομοιομορφίας διαδοχικών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών του γονιδιώματος (*Multi locus variable number of tandem repeat analysis – MLVA*). Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για τη γενετική ανάλυση παθογόνων βακτηρίων η οποία εκμεταλλεύεται τις δυνατότητες του πολυμορφισμού των παράλληλα επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών DNA (με τη βοήθεια της PCR).
- γ. Πολυτοπική Ανάλυση Νουκλεοτιδικής Αλληλουχίας (*Multi locus Sequence Typing- MLST*). Με την τεχνική αυτή παρακολουθείται η πορεία του μικροβιακού κλώνου μέσω της παρακολούθησης των μεταλλάξεων που συμβαίνουν στα διάφορα γονίδια των ενζύμων του βασικού μεταβολισμού. (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2011)

1.3 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ-ΛΟΙΜΟΓΟΝΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Η *E.coli* χαρακτηρίζεται από ποικίλλους λοιμογόνους παράγοντες με τους σημαντικότερους από αυτούς να είναι οι προσκολλητίνες, οι τοξίνες (ενδοτοξίνες & έξωτοξίνες) και τα συστήματα μεταφοράς σιδήρου.

1.3.1 ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΤΙΝΕΣ

Η ικανότητα των βακτηρίων να προσκολλώνται στο κυτταρικό τοίχωμα των ευκαρυωτικών κυττάρων αποτελεί θεμέλιο λίθο για τον αποικισμό του ξενιστή από αυτά. Για πολλούς παθογόνους μικροοργανισμούς η προσκόλληση είναι υψίστης σημασίας καθώς έχουν να ανταγωνιστούν τη φυσιολογική χλωρίδα του οργάνου, προκειμένου να καταφέρουν να αποικίσουν το επιθήλιο αυτού. Ειδικοί τύποι προσκολλητινών παίζουν σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση της *E. coli* στα διάφορα επιθήλια των ιστών (Gaastra W, 1982).

Τα προσκολλητικά ινίδια τύπου I (type I fimbriae) αποτελούν τον κύριο τύπο προσκολλητινών στα ουροπαθογόνα μαζί με τα ινίδια τύπου P. Τα τύπου I αποτελούν πρωτεϊνικές δομές που δεσμεύονται από γλυκοπρωτεΐνες που φέρουν στην επιφάνειά τους ένα σάκχαρο, τη μαννόζη και βρίσκονται κυρίως στην ουροδόχο κύστη. Για αυτό και τα ινίδια αυτά είναι κυρίως υπεύθυνα για την πρόκληση κυστίτιδας. Παίζουν σπουδαίο ρόλο στην προσκόλληση του βακτηρίου και συνεπώς στην πρόκληση της νόσου καθώς έχει δειχθεί πως στελέχη με μετάλλαξη στο υπεύθυνο για την έκφραση των ινιδίων αυτών γονίδιο, δεν κατάφεραν να προσκολληθούν επιτυχώς στο επιθήλιο της ουροδόχου κύστης. Τα επόμενα σημαντικά ινίδια τύπου P προσδένονται σε υποδοχείς που περιέχουν τον Gal – Gal δισακχαρίτη. Οι υποδοχείς αυτοί βρίσκονται κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα των νεφρικών σωληναρίων για αυτό και τα ινίδια τύπου P σχετίζονται κυρίως με οξεία πυελονεφρίτιδα. Τα ινίδια τύπου S προσδένονται σε υποδοχείς που βρίσκονται στα επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα των νεφρών και της κατώτερης ουροφόρου οδού (Ribic R, 2018).

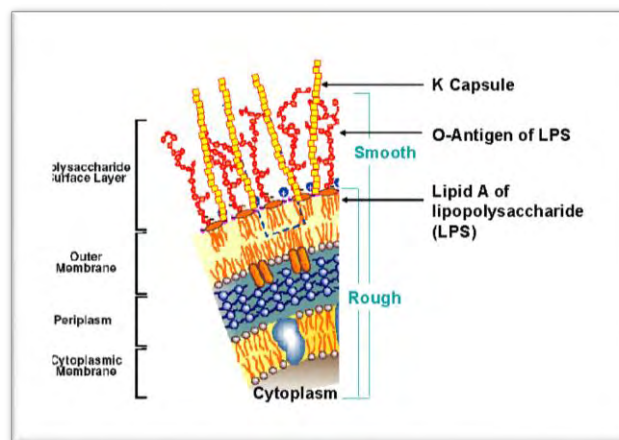
Τα εντεροτοξινογόνα και τα εντεροπροσκολλητικά στελέχη διαθέτουν αντιγονικούς παράγοντες αποικισμού (colonization factor antigens) CFAI και CFaII. Τα ινίδια αυτά είναι αντιγονικής φύσης και διαφέρουν μεταξύ των οροτύπων.

Τα εντεροαιμορραγικά και τα εντεροπαθογόνα παράγουν μια εξωτερική μεμβράνη την ιντιμπίνη, η οποία βοηθάει την προσκόλλησή τους στα επιθηλιακά κύτταρα του εντερικού βλεννογόνου (Ruan X, 2014).

1.3.2 ΤΟΞΙΝΕΣ

1. Ενδοτοξίνη LPS

Ο κυτταρικός φάκελος των Gram αρνητικών βακτηρίων αποτελείται από μια εσωτερική μεμβράνη η οποία επικαλύπτει το κυτταρόπλασμα και μια ασύμμετρη εξωτερική η οποία σχηματίζει έναν φραγμό από το εξωτερικό περιβάλλον του κυττάρου. Ενδιάμεσα των δύο αυτών δομών βρίσκεται ο περιπλαστικός χώρος. Η ασύμμετρη εξωτερική μεμβράνη αποτελείται από δύο φύλλα ένα εσωτερικό αποτελούμενο από φωσφολιπίδια και ένα εξωτερικό που αποτελείται από τον λιποπολυσακχαρίτη (LPS) (Piek S, 2012).



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση του λιποπολυσακχαρίτη (LPS)

Η απελευθέρωση του λιπολυσακχαρίτη από το κύτταρο μπορεί να οδηγήσει σε ποικιλία φλεγμονωδών αντιδράσεων και την πυροδότηση παθοφυσιολογικών μηχανισμών όπως είναι ο πυρετός, η διάχυτη ενδαγγειακή πήξη, η πολλαπλή οργανική ανεπάρκεια καθώς και το σηπτικό σοκ. Οι διεργασίες αυτές υποκινούνται λόγω της ενεργοποίησης του συμπληρώματος και κυτταροκινών όπως είναι η ιντερλευκίνη 6 (IL-6) και ο παράγων νεκρώσεως των όγκων (TNF). Ο λιπολυσακχαρίτης μέσω σύνδεσης με μια πρωτεΐνη του ορού μεταφέρεται στον κυτταρικό του υποδοχέα που βρίσκεται στα μονοκύτταρα CD14 και με αυτόν τον τρόπο πυροδοτούνται οι παθοφυσιολογικές διεργασίες που αναφέρθηκαν παραπάνω. (Kirikae T, 1998)

2. Εξωτοξίνες

Η *E. Coli* έχει την ικανότητα να παράγει μια ποικιλία εξωτοξινών περιλαμβάνοντας τις θερμοανθεκτικές STI και STII (ή STa και STb), τις θερμοευαίσθητες LTI και LTII, την θερμοανθεκτική EAST I και τις βέρο ή σίγκα τοξίνες (Sxt1 και Sxt2). Επιπλέον, παράγουν αιμολυσίνες, κολισίνες και κυτταροκτόνες διασταλτικές τοξίνες καθώς και κυτταροτοξικούς παράγοντες νέκρωσης TNF.

Τα εντεροτοξινογόνα στελέχη παράγουν τις θερμοανθεκτικές τοξίνες ST-I και ST-II, τις θερμοευαίσθητες LT-I και LT-II ή και τις δύο. Οι θερμοανθεκτικές ST-I και ST-II, είναι χαμηλού μοριακού βάρους πεπτίδια μήκους 17 αμινοξέων. Το γονίδιο που εκφράζει τις τοξίνες αυτές έχει εντοπισθεί σε πλασμίδια με την ονομασία *estA* (Candrian U, 1991). Ο μηχανισμός μέσω του οποίου προκαλούν υδαρή διάρροια είναι η αύξηση της αποβολής νερού και ηλεκτρολυτών από τον εντερικό βλεννογόνο. (Loos M, 2012). Οι θερμοευαίσθητες εντεροτοξίνες LT-I και LT-II, σε αντίθεση με τις ST-I και ST-II μεγάλα ολιγομερή με μια A υπομονάδα και πέντε B υπομονάδες. Εκκρίνονται μέσω της εξωτερικής μεμβράνης σε δύο φάσεις. Η παραγωγή τους ρυθμίζεται από τα πλασμίδια του μικροοργανισμού. Δρουν και ενεργοποιούνται μέσω της αδενυλικής κυκλάσης (Spangler B, 1992). Οι υπομονάδες B προσκολλώνται στον υποδοχέα των επιθηλιακών κυττάρων που προσκολλάται και η χολερική τοξίνη, επιτρέποντάς τους με αυτόν τον τρόπο την είσοδό τους στο κύτταρο. Η θερμοευαίσθητη LT-II δεν σχετίζεται με ανθρώπινη νόσο. Η LT-I ομοιάζει πολύ με την τοξίνη της χολέρας τόσο στη δομή όσο και στον μηχανισμό δράσης (Rocha L, 2013).

Τα κυτταροπροσκολλητικά *E.coli* (Enteraggative, EaggEC) παράγουν τη θερμοανθεκτική εντεροτοξίνη 1 (EAST1) η οποία είναι μικρού μοριακού βάρους πολυπεπτίδιο αποτελούμενη από 38 αμινοξέα και είναι όμοια στη δομή με την STa (Savarino S, 1996).

Η Shiga toxin πρωτοπεριγράφηκε το 1903 και παράγεται από την *Shigella dysenteriae*. Αποτελείται από μια A υπομονάδα η οποία είναι υπεύθυνη για την αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης του κυττάρου στόχου και από μια B υπομονάδα που παίζει ρόλο στην πρόσδεση της τοξίνης με τον υποδοχέα του κυττάρου του ξενιστή. Ενοχοποιείται για κυτταρικές λύσεις στο εντερικό επιθήλιο καθώς και για νευρολογικές διαταραχές μέσω της δράσης της στα αγγεία, τη σπονδυλική στήλη και τον εγκέφαλο (O'Brien A, 1987). Τα εντεροαιμορραγικά στελέχη *E.coli* παράγουν τις Shiga-like τοξίνες (Verocytotoxins VT1, VT2 η Shiga toxins Stx1, Stx2). Και οι δύο αποτελούνται από μια υπομονάδα A και πέντε υπομονάδες B. Οι εντεροτοξίνες αυτές απαιτούν εξειδικευμένους υποδοχείς. Η Shiga 1 (Stx1) δομικά διαφέρει με την Shiga τοξίνη της *Shigella* κατά ένα αμινοξύ. Η Shiga 2 (Stx2) μοιάζει με την Shiga 1 στη δομή, στο μηχανισμό δράσης και στα βιοχημικά χαρακτηριστικά τους. Είναι 400 φορές τοξικότερη από της Sxt1 και είναι υπεύθυνη για την πρόκληση του ουραιμικού αιμολυτικού συνδρόμου, καταστρέφοντας τα ενδοθηλιακά κύτταρα του σπειράματος. (Melton-Celsa A.R, 2014)

3. Αιμολυσίνες

Οι αιμολυσίνες είναι pore-forming toxins (PFTs).

Η αιμολυσίνη α (Hly α) της *E.coli* ανήκει στην β -PFT ομάδα. Ο ρόλος της στο γαστρεντερικό σύστημα είναι ακόμα αδιευκρίνιστος παρ' όλο που σε άλλα πεδία έχει γνωστοποιηθεί. Η παραγωγή της ρυθμίζεται από γονίδιο του χρωμοσώματος στα στελέχη που απομονώθηκαν από τον άνθρωπο. Παράγεται συχνά από στελέχη που απομονώνονται από περιπτώσεις εξωεντερικών λοιμώξεων (Bucker R, 2014)

Η αιμολυσίνη β (Hly β) είναι μια πρωτεΐνη που βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη του κυττάρου με δράση και αιμολυτική δραστηριότητα παρόμοια με αυτήν της α -αιμολυσίνης (Gentschev I, 1992).

4. Άλλες τοξίνες

Τα στελέχη της *E.coli* έχουν τη δυνατότητα να παράγουν και άλλες τοξίνες όπως είναι οι κυτταροκτόνες διασταλτικές τοξίνες Cytolethal Distending toxins (CDTs), οι κυτταροτοξικοί παράγοντες νέκρωσης (Cytotoxic necrotizing factors, CNFs) και οι κολισίνες.

Οι CDTs αποτελούν ενδοκυττάρειες γενοτοξίνες οι οποίες παράγονται και από άλλα Gram αρνητικά βακτήρια. Πιστεύεται ότι διακόπτουν τον κυτταρικό κύκλο και την σύνθεση κυτοκίνης με αποτέλεσμα να μεταβάλλουν τη φυσιολογική λειτουργία φραγμού και ανοσίας των επιθηλιακών κυττάρων και των λεμφοκυττάρων (Gargi A, 2013)

Οι CNFs παράγονται κυρίως από τα στελέχη της *E.coli* που προκαλούν εξωεντερικές εκδηλώσεις όπως είναι τα στελέχη που συνδέονται με τη νεογνική μηνιγγίτιδα, τη βακτηριαμία και τις λοιμώξεις των ουροφόρων οδών. Παρ' όλο που ο ρόλος τους δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, παίζει ρόλο στον πολυμερισμό της ακτίνης του κυτταροσκελετού σε ίνες και τη διάρρηξη της μεμβράνης. Αυτό οφείλεται στην ενεργοποίηση μικρών G-πρωτεϊνών που ανήκουν στην οικογένεια Rho. Η ικανότητα των πρωτεϊνών αυτών να ελέγχει την οργάνωση του δικτύου ακτίνης σημαίνει να ρυθμίζει πολλές λειτουργίες του κυττάρου όπως είναι η μορφογένεση, η μετανάστευση και η φαγοκυττάρωση (Travaglione S, 2014).

Οι κολισίνες (colicins) αποτελούν μικροβιοκτόνα, έναντι άλλων στελεχών αυτού του είδους η συγγενικών του, πρωτεϊνικής φύσης των οποίων η παραγωγή ρυθμίζεται από πλασμίδιο (col factor) (Liu S, 2011).

1.3.3 ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΣΙΔΗΡΟΥ

Ο σίδηρος είναι απαραίτητος σε μικρομοριακές συγκεντρώσεις στα Εντεροβακτηριοειδή. Τα βακτήρια αυτά συμπεριλαμβανομένου της *E.coli* πρέπει να είναι σε θέση να προσλαμβάνουν σίδηρο από τον εξωκυττάριο χώρο όταν η ποσότητα του ελεύθερου σιδήρου στα κύτταρα του ξενιστή είναι ανεπαρκής. Αυτό συμβαίνει κυρίως κατά τη διάρκεια λοιμώξεων. Έτσι, η *E.coli* έχει αναπτύξει συστήματα πρόσληψης εξωκυττάριου σιδήρου για να καλύψει το έλλειμμα. Αυτό το πετυχαίνει με την παραγωγή σιδηροφόρων, μικρού μοριακού βάρους σιδηροδεσμευτικές ενώσεις υψηλής συγγένειας. Ένα τέτοιο σιδηροφόρο είναι η αερομπακτίνη η οποία συντίθεται

κυρίως από εντεροπαθογόνα βακτήρια. Η αερομπακτίνη ενώ έχει χαμηλότερη συγγένεια για τον σίδηρο από ότι η εντερομπακτίνη, προσδίδει ένα πλεονέκτημα στους παθογόνους μικροοργανισμούς που αποικίζουν τον ξενιστή. Επιτρέπει στα παθογόνα που την παράγουν να καθαρίζουν τα επίπεδα σιδήρου αποτελεσματικά χωρίς τις πρωτεΐνες του ξενιστή, με αποτέλεσμα να αραιώνουν τα επίπεδα σιδηροφόρου που παράγουν. Επιπλέον η αερομπακτίνη δεν δεσμεύεται από τη λευκωματίνη του ορού (Carpenter C, 2014).

1.4 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ

Η *E.coli* που είναι ένα ευκαιριακά παθογόνο βακτήριο προκαλεί και εντερικές και εξωεντερικές εκδηλώσεις (CDC, 2018). Οι πιο σημαντικές είναι οι λοιμώξεις των ουροφόρων οδών, η νεογνική μηνιγγίτιδα, η πνευμονία, η σήψη και η γαστρεντερίτιδα. Επιπλέον, έχουν καταγραφεί και άλλες λοιμώξεις όπως είναι η σηπτική αρθρίτιδα, λοιμώξεις του δέρματος, ενδοκοιλιακά αποστήματα, περιτονίτιδα, χολαγγειίτιδα, οστεομυελίτιδα και χολοκυστίτιδα. Η *E.coli* λόγω των μηχανισμών ανοχής έναντι των αντιμικροβιακών φαρμάκων που έχει αναπτύξει αποτελεί ένα από τα συχνότερα αίτια νοσοκομειακών λοιμώξεων. Τα γενικά συμπτώματα της λοίμωξης από *E.coli* περιλαμβάνουν κοιλιακές κράμπες και διάρροια ενίοτε αιμορραγική. Πυρετός και έμετοι μπορεί να συνυπάρχουν. Οι περισσότεροι ασθενείς αναρρώνουν σε διάστημα 10 ημερών, ωστόσο, για κάποιες περιπτώσεις η λοίμωξη μπορεί να αποδειχθεί απειλητική για τη ζωή (WHO, 2018).

1.4.1 ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΟΥΡΟΦΟΡΩΝ ΟΔΩΝ

Το 90% των λοιμώξεων του ουροποιητικού προκαλείται από τα ουροπαθογόνα στελέχη (UPEC). Η παθογονικότητα τους έγκειται στην παραγωγή φορέων σιδήρου και αιμολυσίνης, στην παρουσία του K1 αντιγόνου καθώς και στην ικανότητα τους να διαφεύγουν της βακτηριοκτόνου δράσης του ορού (Todar K, 2012). Οι πιο συχνές λοιμώξεις είναι του ουροποιητικού συστήματος και χωρίζονται σε επιπλεγμένες και μη επιπλεγμένες. Με τον όρο επιπλεγμένες χαρακτηρίζονται εκείνες που οδηγούν σε πυελονεφρίτιδα ή σηψαιμία. Τα παθογόνα που αποτελούν αίτιο των λοιμώξεων αυτών αλλάζουν συνεχώς χαρακτηριστικά εξαιτίας της ανοχής έναντι των αντιμικροβιακών φαρμάκων που αναπτύσσουν. Ωστόσο στην αιτιολογία της πρόκλησης της λοίμωξης εμπλέκονται και χαρακτηριστικά του ξενιστή όπως είναι η ηλικία, το φύλο, η παρουσία διαβήτη, ο τραυματισμός της σπονδυλικής στήλης καθώς και ο καθετηριασμός. Κυρίαρχο παθογόνο των λοιμώξεων αυτών είναι η *E.coli* (80%) και ακολουθεί ο *Staphylococcus saprophyticus* (10-15%) (Ronald A, 2002). Οι συμπτωματικές λοιμώξεις του ουροποιητικού προσβάλλουν κυρίως νεαρές γυναίκες, ιδιαίτερα εκείνες που ήρθαν σε σεξουαλική επαφή το προηγούμενο διάστημα. Αυτό συμβαίνει λόγω της μικρότερης ουρήθρας των γυναικών γεγονός που καθιστά την ώθηση των μικροοργανισμών στην κύστη από την περιουρηθρική περιοχή πιο εύκολη κατά τη διάρκεια της σεξουαλικής επαφής. (Hooton, T.M, 1996)

Για την πρόκληση των λοιμώξεων των ουροφόρων είναι υπαίτια κυρίως τα ουροπαθογόνα στελέχη (Uropathogenic *E.coli*-UPEC), καθώς έχουν τη δυνατότητα να εισβάλλουν και να πολλαπλασιάζονται στα ουροεπιθηλιακά κύτταρα (Ribic R, 2018). Η λοιμογόνος δύναμή τους έγκειται στην ικανότητα να καθίστανται ανθεκτικά στη βακτηριοκτόνο δράση του ορού του αίματος, στην δυνατότητα παραγωγής βακτηριοσινών, στην παραγωγή προσκολλητινών καθώς και στην παραγωγή αερομπακτίνης. Τα στελέχη αυτά διαθέτουν συγκεκριμένα σωματικά αντιγόνα με τα συνηθέστερα (O1, O2, O4, O6, O7, O15, O18, O25, O75, O83), καψιδικά αντιγόνα (K1 & K2). (Abe C.M, 2008)

1.4.2 ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ

Η νεογνική βακτηριακή μηνιγγίτιδα είναι ασυνήθης αλλά σχετίζεται με αυξημένη θνησιμότητα και θνητότητα. Επηρεάζει 1/2.000 – 4.000 νεογνά με το 80% των στελεχών να είναι τα K1. (Todar K , 2012)

Σύμφωνα με το ΚΕΕΛΠΝΟ, η *E.coli* αποτελεί τη δεύτερη αιτία νεογνικής μηνιγγίτιδας ακολουθώντας τον στρεπτόκοκκο της ομάδας B, αλλά αποτελεί το πρώτο αίτιο βακτηριακής μηνιγγίτιδας σε νεογνά με χαμηλό βάρος κατά τη γέννησή τους. (Ku L.C, 2015). Οι κυριότεροι παράγοντες που συμβάλλουν στην πρόκληση της λοίμωξης είναι τα ινίδια τύπου S και το αντιγόνο K1 του ελύτρου το οποίο και ανευρίσκεται στον ορό και στο Εγκεφαλονωτιαίο Υγρό (ENY) όπου και η ποσότητα του είναι συνυφασμένη με τη θνητότητα του νεογνού. (McCracken JR G, 1974) . Η μηνιγγίτιδα στα νεογνά συνήθως συνοδεύεται από μικροβιαμία ενώ το 50% αυτών που επιβιώνουν εκδηλώνουν νευρολογικές διαταραχές.

Η διάγνωση τίθεται με καλλιέργεια του ENY. (Korczak B, 2005)

1.4.3 ΣΗΨΑΙΜΙΑ

Η *E.coli* αποτελεί την πιο κοινή αιτία νεογνικής σηψαιμίας ενώ σπάνια επηρεάζει παιδιά μεγαλύτερη ηλικίας. Παρ' όλο που αρκετοί ορότυποι της είναι ικανοί να προκαλέσουν μηνιγγίτιδα, μόνο οι ορότυποι που διαθέτουν το καψιδικό αντιγόνο K1 έχουν τη δυνατότητα να εισέλθουν στο ENY και στο αίμα προκειμένου να εκδηλωθεί σηψαιμία. (Korhonen T.K, 1985). Στο γενικό πληθυσμό, βακτηριαμία πιο συχνά βρίσκεται σε υπόβαθρο κωλύματος των ούρων, ενώ η θνητότητα εξαρτάται από την υποκείμενη νόσο και την πηγή της λοίμωξης. Αυξημένη θνητότητα παρατηρείται στους ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς και σε ασθενείς με ενδοκοιλιακές λοιμώξεις.

1.4.4 ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Η *E.coli* αποτελεί το κύριο παθογόνο αίτιο από την οικογένεια των Εντεροβακτηριοειδών για την πρόκληση πνευμονίας στους ασθενείς που

νοσηλεύονται στις μονάδες εντατικής θεραπείας. Αυτό συμβαίνει διότι διευκολύνεται ο αποικισμός του βακτηρίου στο πνευμονικό παρέγχυμα από εισρόφιση βρογχικών εκκρίσεων για αυτό και συναντάται κυρίως στους διασωληνωμένους ασθενείς των μονάδων εντατικής θεραπείας. (Messika J, 2012). Στην κοινότητα αποτελεί πιο σπάνια αιτία και εμφανίζεται κυρίως σε ασθενείς με υποκείμενη νόσο όπως είναι ο διαβήτης, καρδιαγγειακά νοσήματα ή η Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια. Η μεταδόση μπορεί να γίνει είτε με αιματογενή διασπορά από προυπάρχουσα μόλυνση είτε μέσω διατροφική μόλυνσης. Η προηγούμενη χορήγηση αντιμικροβιακών φαρμάκων δεν αποτελεί παράγοντα κινδύνου. (Okimoto N, 2010).

1.4.5 ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Τα στελέχη της *E.coli* που έχουν την ικανότητα να προκαλούν γαστροεντερικές λοιμώξεις υποδιαιρούνται σε 5 ομάδες (Todar K, 2012):

1. Εντεροτοξινογόνα (*Enterotoxigenic E. Coli*, ETEC)
2. Εντεροδιδεισδυτικά (*Enteroinvasive E. Coli*, EIEC)
3. Εντεροπαθογόνα (*Enteropathogenic E. Coli*, EPEC)
4. Εντεροαιμορραγικά (*Enterohaemorrhagic E. Coli*, EHEC) ή Vero-κυτταροτοξικά (*verotoxin producing E. Coli*, VTEC) ή Shiga-toxin producing *E.coli*, STEC.
5. Εντεροπροσκολλητικά τα οποία είναι είτε συναθροιζόμενης προσκόλλησης (*Enteraggagative E.coli*, EAggEC) είτε εντεροπροσκολλητικά διαχεόμενης προσκόλλησης (*Diffusely Adherent E. Coli*, DAEC)

1. *Εντεροτοξινογόνα E.coli*, ETEC

Τα στελέχη που ανήκουν σε αυτήν την υποομάδα είναι υπεύθυνα κυρίως για τη διάρροια των ταξιδιωτών καθώς και την πρόκληση διάρροιας σε νεογνά. Έχει αυξημένο επιπολασμό στις αναπτυσσόμενες χώρες με κακές συνθήκες υγιεινής όπως και στους ανοσοκατεσταλμένους. Έχουν συνδεθεί με αρκετές επιδημίες, κυρίως υδατογενείς, αλλά και λόγω κακής χρήσης ωμών λαχανικών καθώς υπάρχει και σύνδεση με βρώση μαλακού τυριού. Έχουν τη δυνατότητα παραγωγής δύο τοξινών. Την ασταθή στη θερμότητα (*heat-labile toxin*, LT), η οποία μοιάζει με την τοξίνη της χολέρας και την σταθερή στη θερμότητα τοξίνη (*heat-stable toxin*, ST), η οποία είναι ανθεκτική στο βρασμό για τριάντα λεπτά. Οι κλινικές εκδηλώσεις της νόσου περιλαμβάνουν διάρροια (όχι αιμορραγική καθώς δεν είναι διεισδυτικά στελέχη) χωρίς πυρετό. (Ruan X, 2014).

2. Εντεροδυσεντερικά *E. Coli*, EIEC

Τα στελέχη της κατηγορίας αυτή ομοιάζουν με αυτά της *Shigella* τόσο όσον αφορά τον παθοφυσιολογικό μηχανισμό με τον οποίο προκαλούν τη νόσο όσο και στην κλινική εικόνα της νόσου. Έχουν τη δυνατότητα να διεισδύουν και να πολλαπλασιάζονται μέσα στο εντερικό επιθήλιο προκαλώντας εκτεταμένη κυτταρική βλάβη. Δεν έχουν τη δυνατότητα παραγωγής των LT και ST τοξινών. Το κλινικό σύνδρομο που προκαλούν είναι παρόμοιο με αυτό της δυσεντερίας της *Shigella* με πυρετό.

3. Εντεροπαθογόνα *E. Coli*, EPEC

Τα στελέχη της κατηγορίας αυτής προκαλούν εκδήλωση υδαρούς διάρροιας, ενίοτε αιμορραγικής. Η μετάδοση γίνεται κυρίως μέσω επιμολυσμένου ύδατος και προϊόντων κρέατος. Εδώ σε αντίθεση με την περίπτωση της νόσου που προκαλείται από τα εντεροτοξινογόνα ή τα εντεροπροσκολλητικά, απαντάει φλεγμονώδης αντίδραση. Τα συμπτώματα οφείλονται στη διεισδυτικότητα του βακτηρίου παρά στην παραγωγή των τοξινών του. Κάποιοι τύποι αυτών των στελεχών είναι γνωστοί και ως εντεροπροσκολλητικά διαχεόμενης προσκόλλησης (Diffusely Adherent *E. Coli*, DAEC) ανάλογα με τον τύπο προσκόλλησης.

4. Εντεροαιμορραγικά *E. Coli*, EHEC

Τα εντεροαιμορραγικά στελέχη με κυρίαρχο το O157:H7 αποτελούν την κύρια αιτία αιμορραγικής κολίτιδας που εκδηλώνεται με αιμορραγική διάρροια της οποίας συχνή επιπλοκή είναι το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από αυξημένη θνητότητα. Τα στελέχη αυτά είναι ικανά να παράγουν βεροτοξίνες ή σιγκατοξίνες (με πιο γνωστές τις Stx1 & Stx2). Η παραγωγή της τοξίνης ενισχύεται από την έλλειψη σιδήρου.

5. Εντεροπροσκολλητικά *E. Coli*, EAaggEC

Τα στελέχη αυτά ενοχοποιούνται για την πρόκληση εμμένουσας διάρροιας στα μικρά παιδιά. Το βακτήριο εισέρχεται στον εντερικό βλεννογόνο και προκαλούν μη αιμορραγική διάρροια χωρίς τη δημιουργία φλεγμονώδους αντίδρασης. Τα στελέχη αυτά έχουν τη δυνατότητα παραγωγής μιας τοξίνης γνωστή ως Enteroaggregative ST (EAST) καθώς και αιμολυσίνης των οποίων ο ρόλος δεν είναι γνωστός στην παθοφυσιολογία της νόσου.

Στελέχη	ETEC	EIEC	EPEC	EAEC	EHEC
Καθοριστικοί Παράγοντες	<ul style="list-style-type: none"> • Κροσσοί • Μη διεισδυτικό • LT & ST τοξίνες 	<ul style="list-style-type: none"> • Μεμβρανική πρωτεΐνη • Διεισδυτικό (εισέρχεται και πολλαπλασιάζεται στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου) 	<ul style="list-style-type: none"> • Παράγοντας προσκόλλησης (EAF) • Μέτρια διεισδυτικό 	<ul style="list-style-type: none"> • Παραγωγή τοξίνης EAST • Παραγωγή αιμολυσίνης 	<ul style="list-style-type: none"> • Μέτρια διεισδυτικό • Παραγωγή Shiga τοξίνης
Κλινικές Εκδηλώσεις	<ul style="list-style-type: none"> • Υδαρής διάρροια σε νεογνά και ταξιδιώτες • Απουσία φλεγμονής • Απουσία πυρετού 	<ul style="list-style-type: none"> • Διάρροια ομοιάζουσα με τη δυσεντερία (με παρουσία βλέννης και αίματος) • Φλεγμονή • Πυρετός 	<ul style="list-style-type: none"> • Υδαρής διάρροια • Μικρή φλεγμονώδης απάντηση 	<ul style="list-style-type: none"> • Εμμένουσα διάρροια στα παιδιά, χωρίς φλεγμονή ή πυρετό 	<ul style="list-style-type: none"> • Αιμορραγική διάρροια • Έντονη φλεγμονώδης απάντηση • Επιπλοκή με αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο

Πίνακας 2: Διαρροικά στελέχη της *E.coli*, παράγοντες που συμμετέχουν στην πρόκληση της νόσου και κλινικές εκδηλώσεις

(Todar K, 2012)

1.5 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η εργαστηριακή διάγνωση του μικροοργανισμού αφορά την απομόνωση του από το εκάστοτε δείγμα, την καλλιέργεια του στα κατάλληλα θρεπτικά υλικά και τέλος, την ταυτοποίηση του είτε μέσω βιοχημικών δοκιμών είτε μέσω αυτοματοποιημένων μεθόδων.

1.5.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ – ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Η *E.coli* μπορεί να απομονωθεί εύκολα από κλινικά δείγματα, τρόφιμα και περιβαλλοντικά δείγματα όπως είναι το νερό ανθρώπινης κατανάλωσης, τα νερά κολύμβησης και τα απόβλητα εργοστασίων και βιομηχανιών. Η *E.coli* όπως και όλα τα εντεροβακτηριοειδή απομονώνονται και αναπτύσσονται εύκολα. Η *E.coli* μπορεί να αναπτυχθεί και σε κοινά καλλιεργητικά υλικά όπως είναι το θρεπτικό άγαρ σε πιο απαιτητικά, για παράδειγμα το αιματούχο άγαρ, αλλά και σε εκλεκτικά όπως είναι το Mc Conkey (Παπαπαναγιώτου, 2005). Το Mc Conkey είναι εκλεκτικό και διαχωριστικό θρεπτικό υλικό, κατάλληλο για την ανάπτυξη των Gram αρνητικών μικροβίων. Εκλεκτικό διότι λόγω της παρουσίας χολικών αλάτων και κρυσταλλικού ιώδους επιτρέπει μόνο την ανάπτυξη των Gram αρνητικών μικροβίων και διαχωριστικό διότι έχει τη δυνατότητα να διαχωρίζει στελέχη ανάλογα με τη βιοχημική του ιδιότητα να ζυμώνουν ή όχι τη λακτόζη (<http://iws2.collin.edu/dcain/CCCCD%20Micro/macconkeyagar.htm>).



Εικόνα 3 : Ανάδειξη της διαχωριστικής ικανότητας του καλλιεργητικού υλικού Mc Conkey.

Στο θρεπτικό άγαρ οι αποικίες είναι λείες, ελαφρώς επηρμένες, διαμέτρου περίπου 2mm και ομαλές. Στο αιματούχο άγαρ, εμφανίζονται με γκρίζα χροιά ενώ κάποια στελέχη διαθέτουν και ζώνη αιμολύσεως. Στο Mc Conkey, ύστερα από επώαση στους 37 °C για 24 ώρες, οι αποικίες εμφανίζονται κυκλικές, μεγάλες και ερυθρές. Η *E.coli*, σε αντίθεση με άλλα εντεροπαθογόνα όπως η *Salmonella* και η *Shigella* έχει τη

δυνατότητα να ζυμώνει τη λακτόζη που περιέχει το θρεπτικό υλικό. Η ζύμωση προκαλεί πτώση του pH με αποτέλεσμα να προσδίδεται ερυθρή χροιά στις αποικίες της. Οι μικροοργανισμοί που δε ζυμώνουν τη λακτόζη θα εμφανίζονται με άχρες αποικίες. Ο διαχωρισμός αυτός είναι σημαντικός για την γρήγορη κλινική διάγνωση (Παπαπαναγιώτου, 2005).

1.5.2 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ

A. Βιοχημικές Μέθοδοι

Με τη δοκιμασία της λακτόζης είναι εύκολο να διαχωριστούν τα παθογόνα που τη διασπών όπως είναι η *E.coli* και αυτά που δεν την διασπών όπως είναι η *Salmonella* και η *Shigella*. Η διάκριση και ταυτοποίηση της *E.coli* από τα υπόλοιπα Gram αρνητικά βακτήρια στηρίζεται σε βιοχημικές διαδικασίες. Οι τέσσερις βασικές είναι: η δοκιμασία παραγωγής ινδόλης (Indol), η διάσπαση της ακετυλομεθυλοκαρβινόλης ή Voges-Proskauer (VP), η δοκιμασία Ερυθρού του μεθυλίου (Methyl red) και η κιτριτάση (Citrata). Ένα τυπικό στέλεχος της *E.coli*, παράγει ινδόλη, είναι αρνητικό στην VP, θετικό στο Ερυθρό του μεθυλίου και αρνητικό στο κιτρικό (Παπαπαναγιώτου, 2005).

Επιπλέον, το μικρόβιο δε διασπά την ουρία, δεν παράγει την οξειδάση, ανάγει τα νιτρικά σε νιτρώδη, δε ζυμώνει τον ινοσίτη και την αδενοσίλη, καθώς και διασπά διάφορα σάκχαρα όπως είναι η γλυκόζη, η μαλτόζη, και η μαννιτόλη. Επιπρόσθετα, δίνει αρνητική την παραγωγή υδρόθειου (Αρσένη, 1994).

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται συνοπτικά οι βιοχημικές ιδιότητες της *E.coli*.

Παράμετρος	Ινδόλη	Voges-Proscauer	Κινητικότητα	Κίτρινη χρωστική	Λυσίνη	Ορνιθίνη	KCN	Acerate utilization	Mucate utilization	D-γλυκόζη	Αδοσινόλη	L-αραβινόζη	D-αραβοτινόζη	Κιτρικά	Σελοβιόζη	Δουλοσιτόζη
<i>E.coli</i>	+	-	+	-	+	+/-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+/-

Παράμετρος	Λακτόζη	Σουκρόζη	D-μαννιτόλη	Ραφινόζη	L-ραμνόςζη	D-σορβιτόλη	D-ξυλόζη
<i>E.coli</i>	+	+/-	+	+/-	+	+	+

Πίνακας 3: Βιοχημικές Ιδιότητες της *E.coli* (Nataro et., 2007).

B. Αυτοματοποιημένες Μέθοδοι

Τα περισσότερα εργαστήρια στηρίζονται σε αυτοματοποιημένες ή ημιαυτοματοποιημένες φαινοτυπικές μεθόδους.

Vitek 2

Ένα εξελιγμένο αυτοματοποιημένο σύστημα ταυτοποίησης μικροοργανισμών είναι το Vitek 2 που έχει τη δυνατότητα ταυτοποίησης των στελεχών σε λιγότερο από δέκα ώρες. Πιο συγκεκριμένα, για τα Gram αρνητικά βακτήρια χρησιμοποιείται μια κάρτα μιας χρήσης πάνω στην οποία εξετάζονται 47 διαφορετικές βιοχημικές δοκιμασίες. Σε περίπτωση που δεν υπάρξει μια μοναδική ταυτοποίηση, δίνεται μια λίστα πιθανών μικροοργανισμών ή διαφορετικά το στέλεχος κρίνεται εκτός του πεδίου της βάσης δεδομένων. Ένα από τα πλεονεκτήματά του είναι ότι διαθέτει κάρτες μιας χρήσης για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της ευαισθησίας των υπό εξέταση στελεχών σε μια πλειάδα αντιβιοτικών. Οι περιορισμοί του αφορούν τη χρήση του σε απομονωμένα στελέχη και όχι άμεσα σε κλινικά δείγματα, ενώ επίσης η καλλιέργεια δεν θα πρέπει να είναι μικτής φύσης (Ling T.K, 2001).

Maldi-Tof

Τα τελευταία χρόνια, η φασματοσκοπία μάζας κερδίζει έδαφος και έχει αναδειχθεί ως ένα κύριο εργαλείο για τη μικροβιακή ταυτοποίηση και διάγνωση. Κατά τη φασματοσκοπία οι μικροοργανισμοί αναγνωρίζονται είτε ως ακέραια κύτταρα είτε ως εκχυλίσματα κυττάρων. Η μέθοδος αυτή είναι ταχεία, με υψηλή ευαισθησία και οικονομική τόσο από πλευρά χρόνου αλλά και από οικονομική άποψη. Η τεχνική αυτή είναι χρήσιμη για την ταυτοποίηση και την τυποποίηση στελεχών, για τη διενέργεια επιδημιολογικών μελετών καθώς και για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών που μεταδίδονται μέσω νερού και τροφής.

Η αρχή της μεθόδου αφορά τη μετατροπή των μορίων ενός δείγματος, κυρίως των πρωτεϊνών του, μετατρέποντάς τα σε ταχύτατα κινούμενα ιόντα και στη συνέχεια στο διαχωρισμό τους σε σχέση με το λόγο της μάζας προς το φορτίο του (m/z). Η ταυτοποίηση του υπο εξέταση δείγματος στηρίζεται στη σύγκριση του φάσματός του με πρότυπο φάσμα (βιβλιοθήκες)

Ο περιορισμός της μεθόδου αυτής είναι ότι απαιτεί βάση δεδομένων για το φάσμα και το αποτύπωμα του φάσματος του πεπτιδίου του προς εξέταση στελέχους. (Singhal, 2015).

1.6 ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η αντιμικροβιακή θεραπεία στηρίζεται στη διαφορά που υπάρχει μεταξύ των βιοχημικών χαρακτηριστικών των μικροοργανισμών και των ανθρώπων. Τα αντιμικροβιακά φάρμακα καταπολεμούν τις λοιμώξεις χάρη στην εκλεκτική τους τοξικότητα. Στην ικανότητά τους δηλαδή να προσβάλλουν τον μικροοργανισμό που

αποικίζει τον ξενιστή και όχι τόσο τον ίδιο τον ξενιστή. Τις περισσότερες φορές, η εκλεκτικότητα αυτή είναι σχετική και όχι απόλυτη. Επομένως, ρυθμίζεται η συγκέντρωση του φαρμάκου προκειμένου το αποτέλεσμα να είναι το επιθυμητό. Δηλαδή, να προσβάλλεται ο μικροοργανισμός-στόχος και να είναι καλά ανεκτό το φάρμακο από τον ξενιστή (Harvey, 2015).

Οι λοιμώξεις που προκαλούνται από τα στελέχη της *E.coli* αντιμετωπίζονται με τα κοινά αντιβιοτικά και χημειοθεραπευτικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται έναντι των Gram αρνητικών βακτηρίων. Τα στελέχη που προσβάλλουν το γενικό πληθυσμό είναι συνήθως ευαίσθητα σε μια πλειάδα αντιβιοτικών, σε αντίθεση με τα νοσοκομειακά στελέχη που παρουσιάζουν αυξημένη αντοχή.

Στα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται έναντι της *E.coli* περιλαμβάνονται τα β-λακταμικά (πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες, μονοβακτάμες), οι τετρακυκλίνες, οι αμινογλυκοσίδες, η τριμεθοπρίμη-σουλφομεθοξαζόλη και οι κινολόνες. Η επιλογή του αντιμικροβιακού παράγοντα εξαρτάται από την εστία της λοίμωξης, τη βαρύτητά της, την ευαισθησία του μικροοργανισμού καθώς και του ξενιστή στον συγκεκριμένο παράγοντα, την ασφάλεια του παράγοντα και τέλος, από το κόστος της θεραπείας (Harvey, 2015).

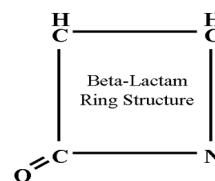
1.6.1 ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ E.COLI

β-λακταμικά αντιβιοτικά

Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά αποτελούν την πιο ευρέως διαδεδομένη τάξη αντιβιοτικών και χαρακτηρίζονται από τον β-λακταμικό δακτύλιο τους.

Πρωτοανακαλύφθηκαν, το 1920 από τον Alexander Fleming όταν τυχαία παρατήρησε ότι η φυσική πενικιλίνη που παράγεται από τον έναν μύκητα του είδους *Penicillium* στο εργαστήριο του έδρασε εναντίον του Σταφυλόκοκκου σε μια προσπάθεια του να τον καταπολεμήσει ψάχνοντας για κάποιον αντισταφυλοκοκκικό βακτηριοφάγο. Η οικογένεια των β-λακταμών απαρτίζεται από τις πενικιλίνες, τις κεφαλοσπορίνες, τις καρβαπενέμες και τη μονοβακτάμη. Ο μηχανισμός δράσης του στηρίζεται στην αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος του προκαρυωτικού κυττάρου. Το κυτταρικό τοίχωμα του βακτηρίου, διαθέτει κάποιες πρωτεΐνες που ονομάζονται πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες (penicillin-binding proteins, PBPs), των οποίων ο ρόλος είναι να διεκπεραιώνουν τον επιχιασμό προκειμένου να είναι το τοίχωμα σταθερό και να αντέχει σε οσμωτικά φαινόμενα. Προϋπόθεση λοιπόν για να δράσουν τα β-λακταμικά είναι να προσδεθούν στις πρωτεΐνες αυτές και να τις εμποδίσουν να εκτελέσουν τη λειτουργία τους (Bush K, 2016). Αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα το κυτταρικό τοίχωμα να παραμείνει ασταθές με αποτέλεσμα είτε να λυθεί λόγω οσμωτικών φαινομένων είτε να ενεργοποιηθούν οι αυτολυσίνες του κυττάρου και να καταστραφεί. Άρα τα β-λακταμικά χαρακτηρίζονται βακτηριοκτόνα, χρονο-εξαρτώμενα φάρμακα (Harvey, 2015).

Οι πενικιλίνες με βελτιωμένη δράση στα Gram αρνητικά βακτήρια που χορηγούνται per os είναι οι η αμπικιλίνη και η αμοξυκιλίνη. Και οι δύο ανακαλύφθηκαν το 1970. Χρησιμοποιούνται κυρίως για την καταπολέμηση των εντεροβακτηριοειδών όπως για παράδειγμα στις ουρολοιμώξεις από *E.coli*. Η αμοξυκιλίνη αποτελεί



Εικόνα 4: χημική δομή του β-λακταμικού δακτυλίου

επίσης φάρμακο εκλογής για τις μη επιλεγμένες ουρηθρίτιδες, τις κυστίτιδες και τις λοιμώξεις των εγκύων (Sahm D, 2001). Η μεσιλλινάμη είναι στενού φάσματος αντιβιοτικό, αφού προσδένεται μόνο με την PBP2 σε εντερικά βακτήρια. Εξαιτίας αυτής της εκλεκτικότητάς της συνεργάζεται και με άλλα β- λακταμικά έναντι Gram αρνητικών όπως είναι η *E.coli*. Οι πενικιλίνες σε συνδυασμό με κλαβουλανικό χορηγούνται στα ESBLs στελέχη της *E.coli* (Bush K,2016).

Οι κεφαλοσπορίνες μοιάζουν με τις πενικιλίνες δομικά και λειτουργικά. Διαθέτουν τον ίδιο μηχανισμό δράσης με τη διαφορά ότι είναι περισσότερο ανθεκτικές από τις πενικιλίνες σε κάποιες β-λακταμάσες (Harvey, 2015). Υπάρχουν οι κεφαλοσπορίνες πρώτης, δεύτερης, τρίτης, και τέταρτης γενιάς. Οι τρίτης και τέταρτης γενιάς γενικά έχουν ενισχυμένη δράση κατά των Gram αρνητικών βάκιλλων, με την κεφτριαξόνη να αποτελεί το φάρμακο εκλογής σε μικροβιακή μηνιγγίτιδα από *E.coli* (Bush K,2016).

Οι καρβαπενέμες, δεσμεύονται με τις PBP1, PBP2 και είναι και αυτές περισσότερο ανθεκτικές στις β-λακταμάσες αλλά όχι στις μεταλλο-β-λακταμάσες. Παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμπειρική θεραπεία των λοιμώξεων από Gram αρνητικά βακτήρια (Harvey, 2015), με τη μεροπενέμη να αποτελεί τη μοναδική της κατηγορίας που εγκρίθηκε για τη θεραπεία της βακτηριακής μηνιγγίτιδας λόγω της εξαιρετικής διείσδυσής της στις μήνιγγες (Bush K,2016).

Οι μοναβακτάμες διαφέρουν δομικά από τα υπόλοιπα β- λακταμικά. Η αζτρεονάμη είναι η μοναδική εμπορικά διαθέσιμη μονοβακτάμη και είναι δραστική έναντι των Gram αρνητικών βακτηρίων χωρίς να έχει καμία δράση έναντι των Gram θετικών. Είναι ανθεκτική στις β-λακταμάσες αλλά όχι στις ESBL (Harvey, 2015). Χορηγείται ενδοφλεβίως ή ενδομυϊκά και χρησιμοποιείται σπάνια στις ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις από *E.coli*.

Αμινογλυκοσίδες

Οι αμινογλυκοσίδες αποτελούνται από δύο αμινοσάκχαρα ενωμένα με γλυκοσιτιδικό δεσμό και χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία των σοβαρών λοιμώξεων που προκαλούνται από Gram αρνητικούς βάκιλλους. Ωστόσο η κλινική χρήση τους είναι περιορισμένη λόγω της τοξικότητάς τους. Η μηχανισμός δράσης του έγκειται στην αναστολή της πρωτεϊνσύνθεσης. Οι αμινογλυκοσίδες διέρχονται μέσω πορινών στην εξωτερική μεμβράνη και μεταφέρονται μέσω του συστήματος οζυγόνου του κυττάρου κατά μήκος της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Στο εσωτερικό του κυττάρου προσδένονται με την ριβοσωμική υπομονάδα 30S. Με αυτόν τον τρόπο, αναγκάζουν την υπομονάδα να διαβάσει εσφαλμένα τον γενετικό κώδικα. Οι αμινογλυκοσίδες είναι τα μοναδικά αντιβιοτικά με μηχανισμό δράσης την αναστολή της πρωτεϊνσύνθεσης που είναι βακτηριοκτόνα και όχι βακτηριοστατικά (Harvey, 2015). Χορηγούνται για την καταπολέμηση ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων από *E.coli* όπως είναι η σηψαιμία και η πυελονεφρίτιδα κυρίως σε ανοσοκατεσταλμένους.

Τετρακυκλίνες

Αποτελούνται από τέσσερις συγχωνευμένους δακτυλίους με ένα σύστημα συζυγών διπλών δεσμών. Εισέρχονται στο κύτταρο με παθητική διάχυση και αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση με αντιστρεπτή πρόσδεσή τους στην υπομονάδα 30S του ριβοσώματος. Με αυτόν τον τρόπο είναι βακτηριοστατικά αντιμικροβιακά φάρμακα (Harvey, 2015). Σπάνια η χορήγησή τους σε λοιμώξεις από *E.coli*. Συνήθως χορηγούνται σε διάρροια ταξιδιωτών με βαρεία συμπτωματολογία.

Κοτριμοξαζόλη

Η κοτριμοξαζόλη αποτελεί τον συνδυασμό τριμεθοπρίμης- σουλφαμεθοξαζόλη (SXT). Και οι δύο αυτές ουσίες αναστέλλουν δυο διαδοχικά στάδια στη σύνθεση του φυλλικού οξέος. Σύμφωνα με την Αμερικάνικη επιτροπή Λοιμώξεων η κοτριμοξαζόλη αποτελεί το φάρμακο εκλογής για την εμπειρική θεραπεία της μη επιπλεγμένης κυστίτιδας από *E.coli* (Hsueh P.R., 2011)

Κινολόνες

Το 1962 ανακαλύφθηκε το ναλιδικό οξύ το οποίο αποτελεί παράγωγο κινολόνης και θεωρείται γονέας της ομάδας των κινολονών. Η κλινική του χρήση περιορίστηκε στη θεραπεία λοιμώξεων του ουροποιητικού λόγω της πτωχής φαρμακοκινητικής του και της ταχέως αναπτυσσόμενης αντιβιοαντοχής. Στις επόμενες δεκαετίες συντέθηκαν νέα παράγωγα κινολονών, έχοντας την ίδια μοίρα με αυτή του ναλιδικού οξέος. Τη δεκαετία του '80 ανακαλύπτονται τα φθοριομένα παράγωγα με καλύτερες φαρμακοκινητικές ιδιότητες, ευρύ φάσμα δράσης και με λιγότερες παρενέργειες που τα εδραίωναν στην κλινική χρήση έναντι κυρίως των Gram αρνητικών βακτηρίων. Στα φθοριομένα παράγωγα έχει προστεθεί ένα άτομο φθορίου στη θέση 6 του βασικού μορίου της κινολόνης. Στις επόμενες δεκαετίες συντέθηκαν και άλλες κινολόνες πλέον με ισχυρή δράση έναντι και των Gram θετικών βακτηρίων. Ο μηχανισμός δράσης τους στηρίζεται στην αναστολή της τοποϊσομεράσης II ενός ενζύμου σημαντικού για την αναδίπλωση του DNA. Αναστέλλοντας λοιπόν αυτό το ένζυμο, οδηγούν το βακτηριακό κύτταρο σε κυτταρικό θάνατο (Ball P, 2000). Αρκετές διεθνείς οδηγίες συνιστούν τις φθοροκινολόνες ως φάρμακο εκλογής για τη θεραπεία των λοιμώξεων του ουροποιητικού καθώς και των λοιμώξεων του ουροποιητικού που συνδέονται με καθετήρα. Η λεβοφλοξασίνη και η σιπροφλοξασίνη χορηγούνται σε ασθενείς με οξεία πυελονεφρίτιδα συμπεριλαμβανομένου των ασθενών με συνυπάρχουσα βακτηριαίμια (Hsueh P.R., 2011).

2. ANTIBIOANTOXH

Η αντιβιοαντοχή μπορεί να αποτελέσει ένα παράδειγμα εξέλιξης το **οποίο** μελετάται σε αληθινό χρόνο. Η σύνθεση των αντιβιοτικών και η ανεξέλεγκτη χρήση αυτών τα προηγούμενα 50 περίπου χρόνια έχει οδηγήσει στην απάντηση των βακτηρίων με ανθεκτικά στελέχη (Bell B.G, 2014). Η αυξανόμενη αντιβιοαντοχή μπορεί να επηρεάσει την υγεία του ανθρώπου με 2 τρόπους. Αφενός μπορεί να επηρεάσει την πορεία της νόσου και αφετέρου μπορεί να επηρεάσει ιατρικές πράξεις και θεραπείες όπως είναι η μεταμόσχευση, ο καθετηριασμός και η χημειοθεραπείες όπου είναι απαραίτητη η προφυλακτική χορήγηση αντιμικροβιακών παραγόντων προκειμένου να αποφευχθούν συνδεδεμένες με αυτές τις καταστάσεις λοιμώξεις (Martinez J.L, 2014). Τα βακτήρια διαθέτουν δύο είδη αντοχής. Την ενδογενή αντοχή που την έχουν λόγω δομής ή λειτουργίας από τη φύση τους χωρίς να χρειάζεται κάποια τροποποίηση το γενετικό υλικό τους όπου σε αυτήν την περίπτωση είναι ανθεκτικά όλα τα στελέχη ενός συγκεκριμένου είδους ή γένους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η δύσκολη διάχυση των πενικιλινών G&M, της βανκομυκίνης και της ριφαμπικίνης μέσω της εξωτερικής μεμβράνης της *E.coli*. Και την επίκτητη την οποία και αποκτούν σε μια προσπάθεια επιβίωσης και εξέλιξης μέσω τροποποίησης του γενετικού τους υλικού. Η επίκτητη στηρίζεται σε δύο μηχανισμούς
Α. Γενετικούς μηχανισμούς και Β. Βιοχημικούς μηχανισμούς.

A. Γενετικοί μηχανισμοί:

Οι μηχανισμοί αυτοί έχουν συμβάλει στη δημιουργία της αντιβιοαντοχής με δύο τρόπους. Πρώτον, με τις σημειακές μεταλλάξεις του DNA και δεύτερον με την οριζόντια μεταφορά δηλαδή με την απόκτηση εξωγενούς γενετικού υλικού (HGT).

B. Βιοχημικοί Μηχανισμοί:

Στους βιοχημικούς μηχανισμούς ανήκουν:

- α) η τροποποίηση ή αδρανοποίηση του αντιβιοτικού μέσω ενζύμων,
- β) η τροποποίηση του στόχου δράσης και
- γ) η μείωση της συγκέντρωσης του αντιβιοτικού το οποίο επιτυγχάνεται είτε με αποτροπή του μικροοργανισμού να εισέλθει στο κύτταρο, είτε με την αποβολή του αντιβιοτικού από το κύτταρο μέσω ειδικών αντλιών γνωστές ως efflux pumps (Blair J.M, 2015).

2.1 ANTIBIOANTOXH THΣ E.COLI ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ANTIBIOANTOXΗΣ

Γενικά, τα Gram αρνητικά βακτήρια χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά από ότι τα Gram θετικά λόγω της περιπλοκότερης δομής τους. Πιο συγκεκριμένα, μια έρευνα που δημοσιεύτηκε πρόσφατα έδειξε ότι πάνω από το 90% των αντιβιοτικών που χορηγήκαν σε Gram θετικά βακτήρια και ήταν αποτελεσματικά, στην *E.coli* δεν είχαν κάποια δράση.

1. Παραγωγή β- λακταμασών

Ο μηχανισμός αυτός είναι παράδειγμα τροποποίησης-αδρανοποίησης του αντιβιοτικού μέσω ενζύμων.

Ο πιο κοινός μηχανισμός ανθεκτικότητας της *E.coli* καθώς και άλλων εντεροβακτηριοειδών είναι η παραγωγή β-λακταμασών (το όνομά τους το παίρνουν από το ένζυμο που υδρολύει τελικά το αντίστοιχο αντιβιοτικό), μέσω των οποίων αδρανοποιούν τα αντίστοιχα β-λακταμικά αντιβιοτικά και έτσι καθίστανται ανθεκτικά σε αυτά. Με αυτόν τρόπο γίνεται ανθεκτική έναντι των αμινοπενικιλινών όπως είναι η αμοξικιλίνη και η αμπικιλίνη (Tenover F.C, 2006). Κάποια στελέχη παράγουν β-λακταμάσες γνωστές ως Extended Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs). Οι ESBLs, είναι μια ομάδα ενζύμων που χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια. Τα ένζυμα αυτά κωδικοποιούνται από πλασμιδιακά γονίδια του μικροοργανισμού. Υπάρχουν περίπου 532 διαφορετικά ένζυμα τα προσδίδουν στην *E.coli* ανθεκτικότητα σε όλη την κατηγορία των β-λακταμικών, δηλαδή, στις πενικιλίνες, στις κεφαλοσπορίνες, τις μονοβακτάμες, αλλά και στους αναστολείς των β-λακταμασών όπως είναι το κλαβουλανικό οξύ που χορηγείται μόνο σε συνδυασμό με κάποια πενικιλίνη, συνήθως με την αμοξικιλίνη (Slama T.G, 2008).

2. Μείωση συγκέντρωσης του αντιβιοτικού μέσω αντλιών εκροής (efflux pumps)

Ο μηχανισμός αυτός αποτελεί παράδειγμα μείωσης της συγκέντρωσης του αντιβιοτικού μέσω συστημάτων ή αντλιών ενεργητικής αποβολής.

Ενώ λοιπόν, η παραγωγή β-λακταμασών σε συνδυασμό με την εξωτερική μεμβράνη των Gram αρνητικών δημιουργούν τον πιο συνηθισμένο φραγμό έναντι των αντιβιοτικών, ο δεύτερος πιο συχνός τρόπος ανθεκτικότητας είναι η δυνατότητα τους να μειώνουν τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού μέσω αντλιών εκροής προωθώντας το έξω από το κύτταρο. Αναμέσα σε κάποια Gram αρνητικά βακτήρια που διαθέτουν τον μηχανισμό αυτό, τον διαθέτει και η *E.coli*. Η έκφραση των efflux pumps βρίσκεται σε πλασμιδιακά γονίδια της *E.coli* και της προσδίδουν το πλεονέκτημα να είναι ανθεκτική έναντι στις τετρακυκλίνες, στην ερυθρομυκίνη και στην σουλφαδιαζίνη (Nikaido H, 1998).

3.Μεθυλίωση του ριβοσωμικού RNA.

Ανακαλύφθηκε πολύ πρόσφατα σαν μηχανισμός και πρόκειται για την μεθυλίωση της 16S υπομονάδας του ριβοσωμικού RNA (rRNA). Πρωτοαναγνωρίστηκε το 2002 στην Πολωνία στον *Citrobacter freundii* και έκτοτε έχει παρατηρηθεί και σε διάφορα εντεροβακτηριοειδή μεταξύ των και στην *E.coli*. Ο μηχανισμός αυτός αποτελεί παράδειγμα αλλαγής του στόχου δράσης και της προσδίδει ανθεκτικότητα έναντι των αμινογλυκοσιδών (Canteón R, 2009).

4. Μεταλλάξεις στην τοποϊσομεράση

Άλλον ένα παράδειγμα αλλαγής στόχου δράσης που αφορά κυρίως την αντιβιοαντιχή έναντι των κινολονών στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια οι μεταλλάξεις αφορούν την γυράση A (*gyrA*). Η μετάλλαξη αυτή είναι χρωμοσωμιακή. Τα τελευταία χρόνια παρατηρήθηκε ένας καινούργιος μηχανισμός αντιβιοαντοχής έναντι των κινολονών μέσω πλασμιδιακής έκφρασης που περιλαμβάνει τα εξής: α) Qnr πρωτεΐνες προστατευτικές της τοποϊσομεράσης (Qnr- topoisomerase protective proteins, β) ένζυμο τροποποίησης κινολονών και γ) αντλίες εκροής. Είτε πλασμιδιακό το γονίδιο είτε χρωμοσωμικό, προσδίδει ανθεκτικότητα στην *E.coli* έναντι των κινολονών (Canteón R, 2009).

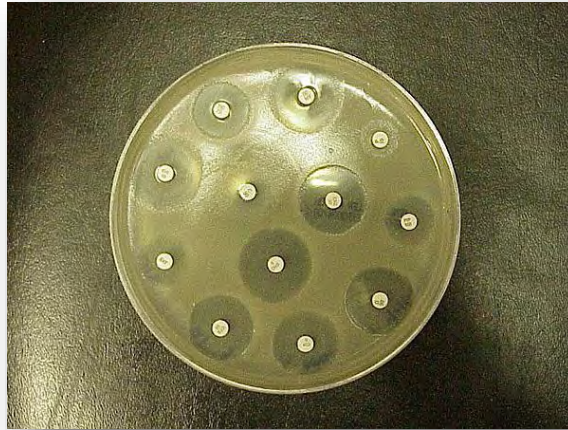
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΝΤΙΒΙΟΑΝΤΟΧΗΣ

Οι μέθοδοι προσδιορισμού αντιβιοαντοχής περιλαμβάνουν τη μέθοδο Kirby-Bauer ή Αντιβιόγραμμα, τον Προσδιορισμό Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης (MIC) και τον Προσδιορισμό Ελάχιστης Μικροβιοκτόνου Συγκέντρωσης αντιβιοτικού (MBC), καθώς και έτοιμα συστήματα ελέγχου που περιλαμβάνουν ημιαυματοποιημένες μεθόδους ή αυτοματοποιημένες μεθόδους όπως είναι το Vitek 2.

1. Μέθοδος Kirby-Bauer ή Αντιβιόγραμμα

Το 1966 ο Bauer κ.α δημοσίευσαν την προτυποποιημένη μέθοδο του ενός δίσκου για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας των βακτηρίων στα αντιβιοτικά. Η διαδικασία αυτή αποτελεί τη μέθοδο εκλογής για τη δοκιμασία ευαισθησίας των αερόβιων μη απαιτητικών και ταχείας ανάπτυξης βακτηρίων (Barry A.L, 1979).

Αρχή της μεθόδου: η μέθοδος αφορά τη διάχυση του αντιβιοτικού σε στερεό υλικό από δισκία διηθητικού χαρτιού εμποτισμένα με αντιβιοτικά. Το μέγεθος της διαμέτρου αναστολής ανάπτυξης του βακτηρίου που σχηματίζεται γύρω από το δισκίο βρίσκεται σε αναλογία με την MIC του αντιβιοτικού. Αρχικά γίνεται η παρασκευή του ενοφθαλμίσματος, ύστερα η σπορά, ακολουθεί η τοποθέτηση των δισκίων και τέλος η επώαση. Κατά την ανάγνωση των αποτελεσμάτων μετρούνται οι ζώνες ανάπτυξης γύρω από το κάθε δισκίο με όσο το δυνατόν περισσότερη ακρίβεια (Liberman D.F, 1975). Το 1975, Εθνική Επιτροπή Κλινικών και Εργαστηριακών Στάνταρ (NCCLS) πρότεινε ότι οι ζώνες γύρω από το δίσκο πρέπει να μετρώνται σε mm χρησιμοποιώντας χάρακα στην πλάτη του δισκίου ενώ θα φωτίζεται από ανακλώμενο φως (Barry A.L, 1979).



Εικόνα 5: Απεικόνιση προσδιορισμού αντιβιοαντοχής με τη μέθοδο Kirby-Bauer.

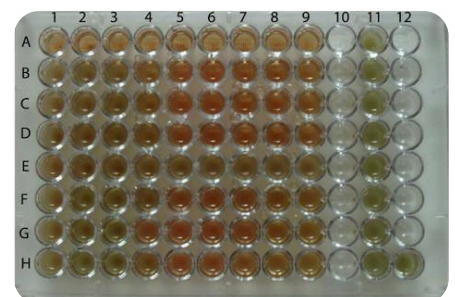
Αποτελέσματα:

- Ευαίσθητα: έτσι χαρακτηρίζονται τα βακτήρια που καταστρέφονται στις συνήθεις δόσεις του αντιβιοτικού
- Μέτρια ευαίσθητα: λέγονται τα βακτήρια τα οποία δύναται να καταστραφούν από τη συνηθισμένη δόση του αντιβιοτικού αλλά μπορεί και όχι, οπότε είναι προτιμότερο να χορηγηθεί άλλο αντιβιοτικό
- Ενδιάμεσα ευαίσθητα: χαρακτηρίζονται τα μέτρια ευαίσθητα βακτήρια στα οποία έχει επιδράσει αντιβιοτικό στενού φάσματος.
- Ανθεκτικά: είναι εκείνα στα οποία το αντιβιοτικό δεν έχει καμία επίδραση και έτσι χορηγείται κάποιο άλλο (Boyle V.J, 1973).

2. Δοκιμές Αραιώσης Ζωμού

Χρησιμοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις του αντιβιοτικού και έπειτα προστίθεται οημένου (δηλαδή γνωστής περιεκτικότητας σε cfu/ml εναιώρημα του μικροοργανισμού που επρόκειτο να εξετασθεί. Η τελευταία αραιώση του αντιβιοτικού όπου παρατηρείται αναστολή της ανάπτυξης του μικροοργανισμού αντιπροσωπεύει την MIC. Η μέθοδος εκτελείται είτε σε πλάκες μικροτιτλοποίησης (μικρομέθοδος) είτε σε δοκιμαστικούς σωλήνες (μακρομέθοδος). Τα

πλεονεκτήματα της μικρομεθόδου είναι η δημιουργία MIC, η αναπαραγωγικότητα, η ύπαρξη προκατασκευασμένων καθώς το μικρό κόστος των υλικών. Επιπλέον υπάρχει η δυνατότητα για τη δημιουργία ηλεκτρονικών αναφορών



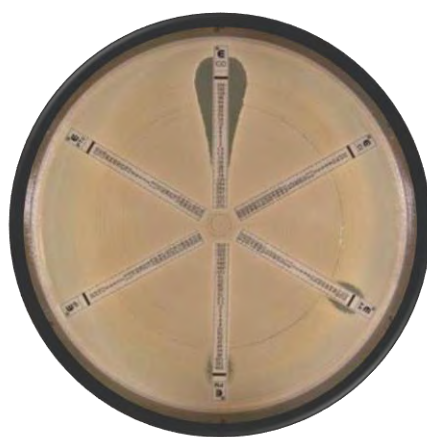
Εικόνα 6: Απεικόνιση προσδιορισμού αντιβιοαντοχής με τη δοκιμή αραιώσεων ζωμού.

εάν χρησιμοποιείται ένας αυτοματοποιημένος αναγνώστης πάνελ. Το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι κάποια φάρμακα είναι δυσεύρετα στα πρότυπα εμπορικά πάνελ (Reller L.B, 2009).

3.Έτοιμα Συστήματα Ελέγχου Ευαισθησίας

Διακρίνονται σε συστήματα δια χειρός όπως είναι το Etest, σε ημιαυτοματοποιημένα και σε αυτοματοποιημένα όπως είναι το Vitek 1 και Vitek 2.

Etest



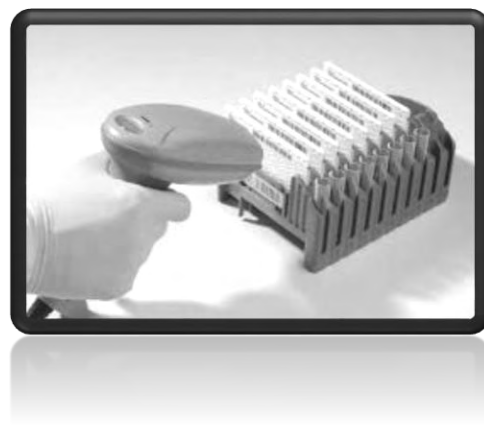
Εικόνα 7: Απεικόνιση Etest.

Είναι μέθοδος κλιμακωτής διάχυσης. Χρησιμοποιούνται λεπτές πλαστικές λωρίδες δοκιμής οι οποίες εμποτίζονται στο ανώτερο σημείο με διαβάθμιση συγκέντρωσης αντιβιοτικού. 5 έως 6 λωρίδες μπορούν να τοποθετηθούν στην επιφάνεια πλάκας από άγαρ που έχει εμβολιαστεί με προτυποποιημένο αιώρημα μικροοργανισμού όπως αυτό που χρησιμοποιείται και στο αντιβιογράμμα κατά Kirby-Bauer. Ύστερα επώζονται όλο το βράδυ. Μετά την επώαση δημιουργείται ζώνη αναστολής σε σχήμα έλλειψης. Το σημείο εκείνο της ταινίας που συναντά την έλλειψη αντιπροσωπεύει την MIC του προς εξέταση αντιβιοτικού. Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες του καταναλωτή και ο προσδιορισμός της MIC σύμφωνα με τα κριτήρια του NCCLS (Reller L.B, 2009).

Vitek 2



Εικόνα 8: Απεικόνιση του Vitek 2.



Εικόνα 9: Απεικόνιση των καρτών μιας χρήσης.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό ευαισθησίας κοινών, ταχέως αναπτυσσόμενων Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων. Το Vitek 2 είναι αυτοματοποιημένο και χρησιμοποιεί συμπαγείς πλαστικές κάρτες οι οποίες περιέχουν ποσότητες μικρολίτρων γνωστών αντιβιοτικών σε μορφή 64 κυψελίδων. Το μηχάνημα αυτό χρησιμοποιεί στροβιδομετρική παρακολούθηση της ανάπτυξης των βακτηρίων σε διάρκεια επώασης από τέσσερις έως και δέκα ώρες. Το όργανο μπορεί να δεχθεί έως και 240 δείγματα ταυτόχρονα (Reller L.B, 2009).

3. ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Ο ρόλος περιβαλλοντικά δείγματα αναφέρεται στα νερά κολύμβησης δηλαδή θάλασσες και πισίνες, στα υγρά απόβλητα των εργοστασίων καθώς και στο νερό ανθρώπινης κατανάλωσης. Σύμφωνα με την **Κ.Υ.Α Υ2/2600/2001**, ως νερό ανθρώπινης κατανάλωσης νοούνται τα εξής:

α) το νερό είτε στη φυσική του κατάσταση είτε μετά από επεξεργασία, που προορίζεται για πόση, μαγείρεμα, προπαρασκευή τροφής ή άλλες οικιακές χρήσεις, ανεξάρτητα από την προέλευσή του και από το εάν παρέχεται από δίκτυο διανομής, από βυτίο ή σε φιάλες ή σε δοχεία.

β) το νερό που χρησιμοποιείται στις επιχειρήσεις παραγωγής τροφίμων για την παρασκευή, επεξεργασία, συντήρηση ή εμπορία προϊόντων ή ουσιών που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση.

3.1 ΝΟΜΟΘΕΤΙΚΑ ΟΡΙΑ ΓΙΑ E.COLI ΣΤΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Η παρουσία της *E.coli* σε οποιοδήποτε από τα παραπάνω περιβαλλοντικά δείγματα αποτελεί **δείκτη ποιότητας του νερού**. Τα κολλοβακτηριοειδή συμπεριλαμβανομένου της *E.coli* βρίσκονται συνήθως στα κόπρανα των θηλαστικών καθώς αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου των θερμόαιμων μικροοργανισμών. Φυσικά φαινόμενα όπως οι θύελλες και οι καταιγίδες συνεισφέρουν στη μόλυνση των ποταμιών, των λιμνών, της θάλασσας και κατ'έκταση του δικτύου ύδρευσης. Η μεταφορά των μολυσματικών ουσιών μπορεί να γίνει από διάφορες πηγές όπως είναι οι μονάδες επεξεργασίας αστικών λυμάτων, οι κτηνοτροφικές μονάδες ακόμη και τα κατοικίδια ζώα. Η επιφανειακή μόλυνση των υδάτων μπορεί να υποβαθμίσει την ποιότητα και να επηρεάσει τη δημόσια υγεία καθώς η ανίχνευση *E.coli* στα ύδατα αναψυχής έχει κατά καιρούς συνδεθεί με την εκδήλωση επιδημιών από το στέλεχος O157:H7 (Sidhu J.P, 2013).

Νερό ανθρώπινης Κατανάλωσης

Σύμφωνα με το άρθρο 5 και το Παράρτημα I της **Κ.Υ.Α Υ2/2600/2001**, Οι μικροβιολογικές παράμετροι για την *E.coli* παρατίθενται στους παρακάτω πίνακες.

Παράμετρος	Παραμετρική τιμή (αριθμός/100ml)
<i>E.coli</i>	0

Πίνακας 4: Μικροβιολογικές Παράμετροι & Παραμετρικές τιμές για το νερό ανθρώπινης κατανάλωσης.

Παράμετρος	Παραμετρική τιμή (αριθμός/100ml)
<i>E.coli</i>	0/250ml

Πίνακας 5: Μικροβιολογικοί Παράμετροι & Παραμετρικές τιμές για το νερό που πωλείται σε φιάλες ή δοχεία.

Νερά κολύμβησης

Σύμφωνα με την Οδηγία 2006/7/ΕΚ ισχύουν τα κάτωθι όρια:

Παράμετρος	Εξαιρετική Ποιότητα	Καλή Ποιότητα	Επαρκής Ποιότητα	Μέθοδοι Ανάλυσης Αναφοράς
Κολοβακτηρίδια (cfu/ml)	500(*)	1000(*)	900(**)	ISO7899-1 ή ISO 7899-2
(*) Βάσει αξιολόγησης σύμφωνα με το 95 ^ο εκατοστημόριο. Βλέπε παράρτημα ΙΙ. (**) Βάσει αξιολόγησης σύμφωνα με το 90 ^ο εκατοστημόριο. Βλέπε παράρτημα ΙΙ.				

Πίνακας 6: Αξιολόγηση ποιότητας ανάλογα με τη συγκέντρωση της *E.coli*, σε εσωτερικά ύδατα.

Παράμετρος	Εξαιρετική Ποιότητα	Καλή Ποιότητα	Επαρκής Ποιότητα	Μέθοδοι Ανάλυσης Αναφοράς
Κολοβακτηρίδια (cfu/ml)	250(*)	500(*)	500(**)	ISO9308-3 ή ISO 9308-1
(*) Βάσει αξιολόγησης σύμφωνα με το 95 ^ο εκατοστημόριο. Βλέπε παράρτημα ΙΙ. (**) Βάσει αξιολόγησης σύμφωνα με το 90 ^ο εκατοστημόριο. Βλέπε παράρτημα ΙΙ.				

Πίνακας 7: Αξιολόγηση ποιότητας ανάλογα με τη συγκέντρωση της *E.coli*, σε παράκτια και μεταβατικά ύδατα.

Πισίνες & Κολυμβητικές Δεξαμενές

Παράμετρος	Μονάδες	Αποδεκτή	Ιδανική
E.coli	cfu/100ml	Απουσία	

Πίνακας 8: Παράμετροι και κριτήρια ποιότητας νερού πισίνων & κολυμβητικών δεξαμενών

3.2 ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ & ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΤΟ ΥΔΑΤΙΝΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Το πρόβλημα των αντιβιοτικών συνεπώς και των ανθεκτικών στελεχών των μικροοργανισμών έναντι σε αυτά παίρνει μεγαλύτερες διαστάσεις καθώς απειλεί όλο και περισσότερο τη δημόσια υγεία, γεγονός που απασχολεί και προβληματίζει την επιστημονική κοινότητα.

Η ευρεία χρήση των αντιβιοτικών στην ιατρική και στην γεωργία έχει οδηγήσει στην συστηματική ανίχνευση αντιβιοτικών, ανθεκτικών στελεχών μικροοργανισμών καθώς και αντιβιοανθεκτικών γονιδίων στο περιβάλλον (Zhanng X, 2014). Τα περισσότερα αντιβιοτικά καταλήγουν στο περιβάλλον είτε αυτούσια είτε με τη μορφή μεταβολιτών τους μέσω των απεκκριμάτων των ζώων αλλά και από μη αποτελεσματικά συστήματα διαχείρισης αποβλήτων ή και από απουσία αυτών σε κάποιες περιπτώσεις (Yao L, 2015).

Παρ' όλο που η αποτελεσματικότητα των αντιμικροβιακών παραγόντων έγκειται στο ότι εκμεταλλεύονται τις διαφορετικές βιοχημικές ιδιότητες ξενιστή και μικροβίου έτσι ώστε η τοξικότητα του φαρμάκου να αφορά μόνο τον στόχο, στην πραγματικότητα τα περισσότερα αντιβιοτικά προσδίδουν κάποια τοξικότητα και πέρα από τον μικροοργανισμό στόχο. Κάποια αντιβιοτικά όπως οι πενικιλίνες όταν βρεθούν στο περιβάλλον, αποδομούνται ενώ κάποια άλλα όπως είναι οι φθοροκινολόνες και οι τετρακυκλίνες είναι πιο ανθεκτικές και δεν αποδομούνται άμεσα. Επομένως, η παραμονή των αντιβιοτικών στο περιβάλλον μπορεί να επηρεάσει τη χλωρίδα και την πανίδα της περιοχής με συνέπειες που δεν μπορούν να υπολογιστούν με ακρίβεια ενώ επίσης μπορεί να αποτελέσει κίνδυνο για τη δημόσια υγεία (Larsson D.J, 2014).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

1.ΕΙΔΟΣ & ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν στελέχη της *E.coli* που απομονώθηκαν από περιβαλλοντικά δείγματα του Περιφερειακού Εργαστηρίου Δημόσιας Υγείας (Π.Ε.Δ.Υ) Θεσσαλίας τα οποία στάλθηκαν στο εργαστήριο κατά τη διάρκεια τακτικών προληπτικών ελέγχων από τις εκάστοτε Περιφερειακές Ενότητες. Τα δείγματα συλλέχθηκαν και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο σύμφωνα με την πρότυπη μέθοδο **ISO 5667-5** την περίοδο Ιούνιος 2016 – Νοέμβριος 2017. Συνολικά συλλέχθηκαν 1405 δείγματα εκ των οποίων τα 380 αφορούσαν θαλασσινό νερό τα 22 ιαματικά ύδατα για λουτροθεραπεία, τα 75 ύδατα κολυμβητικών δεξαμενών, τα 927 νερό ανθρώπινης κατανάλωσης και 1 απόβλητο.

Είδος δείγματος	Αριθμός δειγμάτων
Ιαματικά ύδατα για λουτροθεραπεία & Κολυμβητικές Δεξαμενές	97
Θαλασσινό νερό	380
Νερό ανθρώπινης κατανάλωσης	927
Απόβλητο	1

Πίνακας 9: Είδος και συνολικός αριθμός δειγμάτων που απομονώθηκαν κατά την περίοδο Ιούνιος 2016 – Νοέμβριος 2017.

2. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ E.COLI

Για την απομόνωση των στελεχών από τα περιβαλλοντικά δείγματα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος διήθησης δια μεμβράνης (MF membrane filters) κατά **ΕΛΟΤ EN ISO 9308 -1:2014** κατά τη χρονική περίοδο Ιούλιος 2016 – Νοέμβριος 2017. Συνολικά απομονώθηκαν 176 στελέχη εκ των οποίων 115 αφορούσαν θαλασσινό νερό, τα 8 κολυμβητικές δεξαμενές τα 52 νερό ανθρώπινης κατανάλωσης και 1 απόβλητο όπως φαίνεται και στον Πίνακα 10. Η τεχνική αυτή είναι παγκοσμίως αποδεκτή ως αποτελεσματική για τη μικροβιακή ή μοριακή μόλυνση διαλυμάτων ύδατος. Το πρακτορείο Περιβαλλοντικής Προστασίας των Ηνωμένων Πολιτειών (U.S. EPA) έχει εγκρίνει την τεχνική ως κατάλληλη για την απομόνωση της *E.coli* από δείγματα

νερού ανθρώπινης κατανάλωσης (Brenner, K.P, 1996). Πλεονέκτημα της έναντι άλλων μεθόδων είναι η απαίτηση λιγότερου χρόνου προετοιμασίας από άλλες μεθόδους αλλά και το ότι μπορεί να παρέχει πληροφορίες παρουσίας η απουσίας του μικροοργανισμού σε λιγότερο από εικοσιτέσσερις ώρες (Geldreich, E.E, 1965).

Είδος δείγματος	Αριθμός δειγμάτων
Θαλασσινό νερό	115
Κολυμβητικές Δεξαμενές	8
Νερό ανθρώπινης κατανάλωσης	52
Απόβλητα	1

Πίνακας 10: Στελέχη *E.coli* που απομονώθηκαν από τα περιβαλλοντικά δείγματα.

Υλικά-Εξοπλισμός:

- Αποστειρωμένες φιάλες
- Ισόθερμα δοχεία
- Προκαταψυγμένες παγοκύστες
- Συσκευές διήθησης
- Θρεπτικό υλικό Chromocult Coliform Agar με σύνθεση,

Φόρμουλα	g/L
Peptone	3.0
Sodium chloride	5.0
Sodium dihydrogen phosphate	2.2
di – sodium hydrogen phosphate	2.7
Sodium pyruvate	1.0
Chloro – 3- indoxyl – beta – D - galactopyranoside	0.2
5 – bromo – 4 – Chloro – 3 – indoxyl – beta – D – glucuronic acid	0.1
Isopropyl – beta – D – thiogalactopyranoside	0.1

Πίνακας 11: Σύνθεση του Chromocult Coliform agar.

Με τη μέθοδο αυτή οι μπλέ αποικίες είναι επιβεβαιωμένες αποικίες της *E.coli* καθώς είναι οι μοναδικές από τα υπόλοιπα κολοβακτηριοειδή που εμφανίζονται με μπλέ χρώμα.

Μέθοδος:

Κατα την εφαρμογή της μεθόδου, ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

1. Πολύ καλή ανάδευση του δείγματος.
2. Λήψη ποσότητας 250 ml από δείγματα εμφιαλωμένου νερού, 100 ml από νερό δικτύου και 10ml από δείγματα θαλασσινού νερού, σε αποστειρωμένες φιάλες. Εάν το νερό είναι χλωριωμένο χρησιμοποιούνται φιάλες στις οποίες έχει προστεθείθειοθειικό νάτριο. Σε περίπτωση που το δείγμα είναι πυκνό διενεργούνται αραιώσεις.
3. Διήθηση δια μέσου μεμβράνης πόρων από εστέρες κυτταρίνης 0,45μm προκειμένου να συγκρατηθούν στην επιφάνεια τα κύτταρα της *E.coli*.
4. Τοποθέτηση της μεμβράνης σε τρυβλίο petri πάνω από το θρεπτικό υλικό που στην προκειμένη περίπτωση είναι το Chromocult Coliform agar.
5. Επώαση στους (36+/-2°) C, για (21+/-3) h.
6. Τέλος, λάμβανε χώρα η εξέταση των μεμβρανών. Οι αποικίες της *E.coli* είναι μπλέ - μωβ.

2. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ MALDI – TOF.

Έπειτα, έγινε η ταυτοποίηση των αποικιών με φασματοσκοπία μάζας (MALDI TOF). Οι μπλε-μωβ αποικίες ανακαλλιεργήθηκαν στο θρεπτικό υλικό Tryptic Soya Agar (TSA) όπου επώαστηκαν στους 37°C για 24 ώρες. Στη συνέχεια διενεργήθηκε η δοκιμή οξειδάσης και τα οξειδάση-αρνητικά στελέχη ταυτοποιήθηκαν με MALDI-TOF MS. Συγκεκριμένα σε ένα βοθρίο της ανοξειδωτής ατσάλινης πλάκας επιστρώθηκε με αποστειρωμένο κρίκο η καθαρή αποικία προς ταυτοποίηση. Αφού αφέθηκε για λίγα λεπτά στον αέρα προστέθηκε 1μl α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) 10% (Sigma-Aldrich) αφέθηκε να συν-κρυσταλλωθεί με το δείγμα στον αέρα. Κατόπιν, η πλάκα εισήχθη στον φασματογράφο μάζας. Η ανάλυση των στελεχών έγινε με το MALDI Microflex LT (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Το πρωτεϊνικό αποτύπωμα αποκτήθηκε μετά από ανάλυση γραμμικής θετικής κατεύθυνσης (linear positive mode) με συχνότητα laser ρυθμισμένη στα 30 Hz. Το εύρος μαζών της μεθόδου ορίστηκε στα 2,000 ως 12,000 Da. Για την απόκτηση κάθε φάσματος χρειάστηκαν 240 laser shots (60 laser shotsx40 φορές) σε διαφορετικά σημεία πάνω στο spot (random walk movement), τα οποία αποκτήθηκαν αυτομάτως με το AutoXecute control software (Flex control 3.4; Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Η μέθοδος βαθμονομήθηκε εξωγενώς με τη χρήση του Bacterial Test Standard (BTS) (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) το οποίο είναι εκχύλισμα της *Escherichia coli* DH5alpha. Κατόπιν, τα πρωτογενή φάσματα επεξεργάστηκαν με το

MALDI BIOTYPER Software, version 4.0, με τις προκαθορισμένες παραμέτρους και στη συνέχεια συγκρίθηκαν με πρότυπα φάσματα που υπάρχουν στη βιβλιοθήκη αναφοράς (6.093 είδη), χρησιμοποιώντας τους ενσωματωμένους αλγόριθμους του συστήματος BIOTYPER, version 4.0. Τα αποτελέσματα ταξινομήθηκαν με score values που προτείνει ο κατασκευαστής: $\text{score} \geq 2.000$ υποδεικνύει ταυτοποίηση ασφαλή σε επίπεδο είδους, $\text{score} 1.700-1.999$ υποδεικνύει ασφαλή ταυτοποίηση σε επίπεδο γένους και $\text{score} \leq 1.700$ υποδεικνύει μη ασφαλή ταυτοποίηση.

3. ΦΥΛΑΞΗ & ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΣΕ ΒΑΘΙΑ ΚΑΤΑΨΥΞΗ

Οι επιβεβαιωμένες αποικίες και των 176 δειγμάτων φυλάχθηκαν σε γλυκερόλη σε βαθιά κατάψυξη στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ έως ότου ανακαλλιεργήθηκαν για τον προσδιορισμό της αντιβιοαντοχής τους.

Υλικά – Εξοπλισμός

- Δοκιμαστικοί σωλήνες τύπου Eppendorf
- Vortex
- Κρίκοι

Μέθοδος:

Οι δοκιμαστικοί σωλήνες αριθμήθηκαν και έφεραν πάνω τον αριθμό του δείγματος καθώς και την ημερομηνία λήψης.

Εφόσον αριθμήθηκαν οι αποικίες της *E.coli*, λήφθηκε από κάθε τρυβλίο μια κρικιά από την αποικία με την καλύτερη μορφολογία, και βυθίστηκε στον δοκιμαστικό σωλήνα τύπου Eppendorf που περιείχε 1ml διαλύματος γλυκερόλης 30% v/v και 2 ml θρεπτικού υλικού nutrient broth. Στην πορεία ο δοκιμαστικός σωλήνας τοποθετήθηκε στο vortex για ανάδευση για κάποια δευτερόλεπτα. Τέλος, τοποθετούνταν σε ειδικούς περιέκτες σε βαθιά κατάψυξη στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε και για τα 176 δείγματα.

4.ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΑΝΤΙΒΙΟΑΝΤΟΧΗΣ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ E.COLI ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ VITEK® 2.

Εφόσον συγκεντρώθηκαν όλα τα δείγματα, επιλέχθηκαν 76 από αυτά με προτεραιότητα στα δείγματα που αφορούσαν όλες τις κατηγορίες του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης τα δείγματα των κολυμβητικών δεξαμενών, των αποβλήτων και τέλος τα θαλασσινού νερού, προκειμένου να προσδιοριστεί η ευαισθησία τους σε αντιβιοτικά. Η μέθοδος αυτή εκτελέστηκε την περίοδο Ιούνιος – Ιούλιος 2018, ακολουθώντας τα βήματα όπως αναγράφονται στο εγχειρίδιο χρήσης του μηχανήματος.

Είδος δείγματος	Αριθμός δειγμάτων
Θαλασσινό νερό	19
Κολυμβητικές Δεξαμενές	8
Νερό ανθρώπινης κατανάλωσης	48
Απόβλητο	1

Πίνακας 11: Στελέχη E.coli από τα περιβαλλοντικά δείγματα, για τα οποία περιλήφθηκαν δεδομένα ως προς την ευαισθησία τους.

Υλικά – Εξοπλισμός:

- Αποστειρωμένες πιπέτες
- Vortex
- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Κρίκοι
- Salin Solution
- Θολοσίμετρο densiCNEK plus
- Κάρτες AST – N215 μιας χρήσης

Μέθοδος:

1. Προετοιμασία του δείγματος: τα δείγματα μεταφέρθηκαν εκτός κατάψυξης και παρέμειναν σε θερμοκρασία εργαστηρίου για μια ώρα πριν την ανάλυση.
2. Ανακαλλιέργηθηκαν σε TSA στους (36+/-2°) C, για (21+/-3) h, όπως φαίνεται στην Εικόνα 9.
3. Κατά τη δημιουργία εναιωρήματος, αριθμήθηκαν οι δοκιμαστικοί

σωλήνες στους οποίους προστέθηκαν 3ml Salin Solution με αποστειρωμένη πιπέτα όπως φαίνεται στην Εικόνα 10.

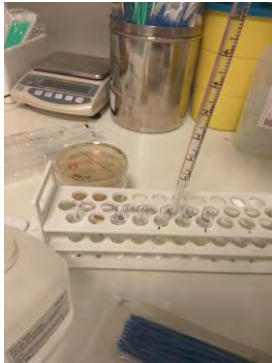
4. Έπειτα για τον κάθε δοκιμαστικό λήφθηκε μια κρική από την αποικία του κάθε δείγματος του προς εξέταση στελέχους και αναδεύτηκε με τη βοήθεια του vortex μέσα στο περιεχόμενο του δοκιμαστικού, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 11.
5. Η πυκνότητα του μικροοργανισμού πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 0,5 – 0,6 Mc Farland. Η πυκνότητα μετρήθηκε με θολοσίμετρο. Σε περίπτωση που



Εικόνα 10:
Ανακαλλιέργεια των προς εξέταση στελεχών E.coli σε TSA

είχε προστεθεί μεγαλύτερη πυκνότητα μικροοργανισμού το ελαιώρημα αραιωνόταν με Salin Solution μέχρι την επιθυμητή πυκνότητα όπως φαίνεται στην Εικόνα 12.

6. Στην πορεία έγινε εισαγωγή των καρτών με τα αντιβιοτικά που φαίνονται στον Πίνακα 11, με τις υποδοχές τους στους δοκιμαστικούς σωλήνες και τοποθετήθηκαν στο Vitek® 2.
7. Για την διεξαγωγή των αποτελεσμάτων της κάθε παρτίδας χρειάστηκαν 4 με 10 ώρες.



Εικόνα 11:
Προσθήκη 3ml
Salin Solution
στους
δοκιμαστικούς.



Εικόνα 12:
Ανάδευση του
μικροοργανισμού
στο δοκιμαστικό
σωλήνα.



Εικόνα 13:
Μέτρηση της
πυκνότητας
του
εναιωρήματος
με
θολοσίμετρο.

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα συστατικά των καρτών AST – N215 μιας χρήσης για το Vitek® 2.

Αντιμικροβιακό	Κωδικός	Συγκέντρωση	Ζώνη Αναστολής		Συνιστώμενη χρήση από τον FDA
			<=	>=	
Αμοξικιλίνη/ Κλαβουλανικό οξύ	AMC	4/2, 16/8, 32/6	2/1	32/16	Κλινικά σημαντικά αερόβια Gram – βακτήρια
Αμπικιλίνη	AM	4,8,32	2	32	Κλινικά σημαντικά αερόβια Gram – βακτήρια
Κεφαλοτίνη	CF	2,8,32	2	64	Κλινικά σημαντικά αερόβια Gram – βακτήρια
Κεφοταξίμη	CTX	1,4,16,32	1	64	Κλινικά σημαντικά αερόβια Gram – βακτήρια
Κεφοξιτίνη	FOX	8,16,32	4	64	Κλινικά σημαντικά αερόβια Gram – βακτήρια
Κεφοδοξίμη	CPD	0.5,1,4	0.25	8	Κλινικά σημαντικά αερόβια Gram – βακτήρια
Κεφταζιδίμη	CAZ	1,2,8,32	1	64	Κλινικά σημαντικά αερόβια Gram – βακτήρια
Κεφουροξίμη	CXM	2,8,32	1	64	Κλινικά σημαντικά αερόβια Gram – βακτήρια
Σιπροφλοξασίνη	CIP	0.5,2,4	0.25	4	Κλινικά σημαντικά αερόβια Gram – βακτήρια
Γενταμυκίνη	GM	4,16,32	1	16	Κλινικά σημαντικά αερόβια Gram – βακτήρια
Ιμιπενέμη	IPM	1,2,6,12	0.25	16	<i>Acinetobacter</i> spp., <i>Citrobacter</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>E.coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp., <i>M.morganii</i> , <i>P.vulgaris</i> , <i>Pv.rettgeri</i> , <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> , <i>S.</i> <i>marcescens</i> , <i>Pv.</i> <i>stuartii</i> .
Μεροπενέμη	MEM	0.5,2,6,12	0.25	16	<i>E.coli</i> , <i>K.pneumoniae</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>P.mirabilis</i> , <i>Acinetobacter</i> spp.,

					<i>C.freundii</i> , <i>E.cloacae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>M.morganii</i> , <i>P.vulgaris</i> , <i>S.marcescens</i> , <i>A.hydrophila</i> , <i>C.diversus</i> , <i>H.alvei</i> , <i>P.multocida</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>Shigella spp.</i>
Νιτροφουραδοΐνη	FT	16,32,64	16	512	Κλινικά σημαντικά αερόβια Gram – βακτήρια
Νοροφλοξασίνη	NOR	1,8,32	0.5	16	Κλινικά σημαντικά αερόβια Gram – βακτήρια
Πιπερακιλλίνη /Ταζομπακτάμη	TZP	2/4,8/4,24/4, 32/4,32/8, 48/8	4/4	128/4	<i>A. baumannii</i> , <i>E.coli</i> , <i>K.pneumoniae</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>C.koseri</i> , <i>M.morganii</i> , <i>P.mirabillis</i> , <i>P.vulgaris</i> , <i>Pv.rettgeri</i> , <i>Pv. stuartii</i> , <i>S.enterica</i> .
Τετρακυκλίνη	TE	2,4,8	1	16	Κλινικά σημαντικά αερόβια Gram – βακτήρια
Τομπραμυκίνη	TM	8,16,64	1	16	Κλινικά σημαντικά αερόβια Gram – βακτήρια
Τριμεθοπρίμη/ Σουλφομεθοξαζόλη	SXT	1/19,4/76, 16/304	20 (1/19)	320 (16/304)	<i>Klebsiella spp.</i> , <i>Enterobacter spp.</i> , <i>M.morganii</i> , <i>P.vulgaris</i> , <i>P.mirabillis</i> , <i>S. sonnei</i> , <i>S.flexneri</i> , Eco(+ETEC), <i>C.sakazakii</i> .

Πίνακας 12: Συστατικά των καρτών AST – N215 μιας χρήσης του Vitek® 2.

5. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Ύστερα από κάθε παρτίδα δειγμάτων λαμβανόταν μια κρική από τους δοκιμαστικούς σωλήνες, και στρωνόταν σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό TSA ή Nutrient Agar με επώαση στους (36+/-2°) C, για (21+/-3) h προκειμένου να ελεγχθούν οι καθαρότητες των δειγμάτων. Σύμφωνα με αυτή τη διαδικασία 4 στα 76 δείγματα, κρίθηκαν μικτά στελέχη με άλλο μικροοργανισμό και απορρίφθηκαν.

6. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΤΙΒΙΟΑΝΤΟΧΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΔΙΑΧΥΣΗΣ ΔΙΣΚΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΤΑ KIRBY BAUER

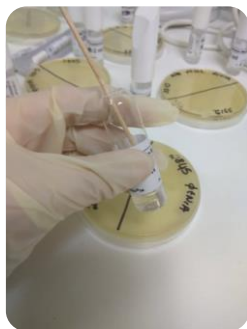
Για τον προσδιορισμό της αντιβιοαντοχής των 76 δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε επιπλέον η μέθοδος διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών κατά Kirby-Bauer. Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η αμπικιλίνη, η αμοξικιλίνη-κλαβουλανικό, η κεφοταξίμη, η κεφοξιτίνη, η κεφταζιδίμη, η σιπροφλοξασίνη, η ημιπενέμη και η τριμεθοπρίμη σουλφομεθοξαζόλη. Η διαδικασία αυτή έλαβε χώρα το διάστημα Δεκέμβριος 2018-Ιανουάριος 2019.

Υλικά –Εξοπλισμός:

- Αμπούλες Suspension Medium 2ml
- Τρυβλία άγαρ Mueller – Hinton
- Θολοσίμετρο
- Αποστειρωμένοι βαμβακοφόροι στυλεοί
- Φρέσκια καλλιέργεια δειγμάτων (24h)
- Δίσκοι αντιβιοτικών
- Αποστειρωμένη λαβίδα
- Λίχνος

Μέθοδος:

1. Ανακαλλιέργεια δειγμάτων σε TSA και επώαση για στους 37 °C για 24h.
2. Παρασκευή μικροβιακού εναιωρήματος θολερότητας 0,5 McFarland

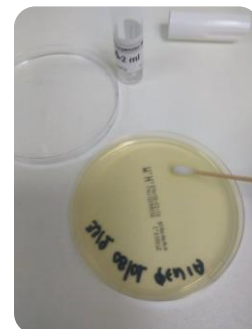


Εικόνα 14: Παρασκευή εναιωρήματος.



Εικόνα 15: Μέτρηση θολερότητας.

3. Ενοφθαλισμός στο θρεπτικό υλικό
4. Τοποθέτηση των αντιβιοτικών δισκίων
5. Επώαση στους 35 – 37 °C για 24h.
6. Ανάγνωση αποτελεσμάτων σύμφωνα με τα κρίσιμα όρια για τον χαρακτηρισμό των δειγμάτων κατά EUCAST.



Εικόνα 16:
Ενοφθαλισμός στο θρεπτικό υλικό.



Εικόνα 17:
Τοποθέτηση αντιβιοτικών δισκίων.



Εικόνα 18:
Απεικόνιση ζωνών αναστολής.

ΚΡΙΣΙΜΑ ΟΡΙΑ ΣΤΕΛΕΧΩΝ <i>E. COLI</i> ΚΑΤΑ EUCAST		
Αντιβιοτικό	Ευαίσθητο S \geq	Ανθεκτικό R $<$
Αμπικιλίνη	14	14
Αμοξικιλίνη-Κλαβουλανικό	50	50
Κεφοταξίμη	20	17
Κεφοξιτίνη	19	19
Κεφταζιδίμη	22	19
Σιπροφλοξασίνη	26	24
Ιμιπενέμη	22	16
Τριμεθοπρίμη-Σουλφομεθοξαζόλη	14	11

Πίνακας 13: Κρίσιμα όρια στελεχών *E. Coli* κατά EUCAST.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα 72 στελέχη που επιλέχθηκαν, ελέγχθηκαν για την αντοχή τους σε αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη για λοιμώξεις που προκαλεί η E.coli. Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η αμπικιλίνη, η αμοξυκιλλίνη, η πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη, η κεφαλοτίνη, η κεφουροξίμη, η κεφουροξίμη αζετίλη, η κεφοτιζιμίμη η κεφποδοξίμη, η κεφταζιδίμη, η ιμιπενέμη, η μεροπενέμη, η γενταμικίνη, η τομπραμυκίνη, η σιπροφλοξασίνη, η νορφλοξασίνη, η τετρακυκλίνη η νιτροφουραντοΐνη και η τριμεθοπρίμη/σουλφομεθοξαζόλη.

1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΜΕ VITEK 2

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Vitek 2, οι φαινότυποι για τα β- λακταμικά καταναμεήθηκαν ως εξής: το 40.28% αφορούσε ESBL στελέχη, το 26.39% στελέχη που παράγουν καρβαπενεμάσες και το 29.17% στελέχη που παράγουν Impermeability carba(+ESBL or +HL AmpC), Carbapenemase (+ or - ESBL). Σχετικά με τις κινολόνες, το 63.289% αποτελούσε στελέχη μερικώς ανθεκτικά, το 34.72%, Wild στελέχη και μόνο το 1.39% στελέχη ανθεκτικά. Για τις τετρακυκλίνες ο καταμερισμός προέκυψε ως εξής: το 87.5% αποτελούσε στελέχη Wild και το 12.5% ανθεκτικά στελέχη. Όσον αφορά τις φουράνες, το 81.94% των δειγμάτων ήταν στελέχη Wild, ενώ το 18.05% ανθεκτικά στελέχη. Και τέλος για την τριμεθοπρίμη/σουλφομεθοξαζόλη το 93.05% ήταν στελέχη Wild ανθεκτικά στην τριμεθοπρίμη μόνο και το 6.94% στελέχη ανθεκτικά. Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω οι μικροοργανισμοί χαρακτηρίζονται από φυσική και επίκτητη αντοχή. Με την φυσική αντοχή, έχουν μηχανισμούς ανθεκτικότητας έναντι των μικροβιακών παραγόντων από τη φύση του χωρίς να γίνει κάποια τροποποίηση του γενετικού τους υλικού. Ο όρος “Wild”, αναφέρεται στα στελέχη εκείνα που διαθέτουν μηχανισμούς ανθεκτικότητας έναντι του συγκεκριμένου βακτηρίου από τη φύση τους.

Φαινοτυπικός πίνακας στελεχών για τα β - λακταμικά					
	Αριθμός δειγμάτων (n=72)				
Β-λακταμικά - Φαινότυπος	Θαλασσινού Νερού (n=19)	Πόσιμο νερό δικτύου (n=44)	Κολυμβητικών Δεξαμενών (n=8)	Απόβλητου (n=1)	ΣΥΝΟΛΟ
ESBL	12	14	3	0	29 (40.28%)
Καρβαπενεμάσες	3	12	3	1	19 (26.39%)
Impermeability carba(+ESBL or +HL AmpC), Carbapenemase (+ or - ESBL)	4	15	2	0	21 (29.17%)
Wild	0	1	0	0	1 (1.39%)
Acquired Penicillinase	0	2	0	0	2 (2.78%)

Πίνακας 13: Αποτελέσματα φαινοτύπου των στελεχών στα β-λακταμικά.

Φαινοτυπικός πίνακας στελεχών για τις κινολόνες					
Κινολόνες	Θαλασσινού Νερού (n=19)	Πόσιμο νερό δικτύου (n=44)	Κολυμβητικών Δεξαμενών (n=8)	Απόβλητου (n=1)	ΣΥΝΟΛΟ
Partially Resistant	12	27	6	1	46 (63.89%)
Wild	7	16	2	0	25 (34.72%)
Resistant	0	1	0	0	1 (1.39%)

Πίνακας 14: Αποτελέσματα φαινοτύπου των στελεχών στις κινολόνες.

Φαινοτυπικός πίνακας στελεχών για τις αμινογλυκοσίδες					
Αμινογλυκοσίδες	Θαλασσινού Νερού (n=19)	Πόσιμο νερό δικτύου (n=44)	Κολυμβητικών Δεξαμενών (n=8)	Απόβλητου (n=1)	ΣΥΝΟΛΟ
Resistant	16	29	6	1	52 (72.22%)
Wild	3	15	2	0	20 (27.78%)

Πίνακας 15: Αποτελέσματα φαινοτύπου των στελεχών στις αμινογλυκοσίδες

Φαινοτυπικός πίνακας στελεχών για τις τετρακυκλίνες					
Τετρακυκλίνες	Θαλασσινού Νερού (n=19)	Πόσιμο νερό δικτύου (n=44)	Κολυμβητικών Δεξαμενών (n=8)	Απόβλητου (n=1)	ΣΥΝΟΛΟ
Wild	17	39	6	1	63 (87.5%)
Resistant	2	5	2	0	9 (12.5%)

Πίνακας 15: Αποτελέσματα φαινοτύπου των στελεχών στις τετρακυκλίνες.

Φαινοτυπικός πίνακας στελεχών για τις φουράνες					
Φουράνες	Θαλασσινού Νερού (n=19)	Πόσιμο νερό δικτύου (n=44)	Κολυμβητικών Δεξαμενών (n=8)	Απόβλητου (n=1)	ΣΥΝΟΛΟ
Resistant, Wild	17	37	5	0	59 (81.94%)
Resistant	2	7	3	1	13 (18.05%)

Πίνακας 16: Αποτελέσματα φαινοτύπου των στελεχών στις φουράνες.

Φαινοτυπικός πίνακας στελεχών για την τριμεθοπρίμη/ σουλφομεθοξαζόλη					
Τριμεθοπρίμη /Σουλφομεθοξαζόλη	Θαλασσινού Νερού (n=19)	Πόσιμο νερό δικτύου (n=44)	Κολυμβητικών Δεξαμενών (n=8)	Απόβλητου (n=1)	ΣΥΝΟΛΟ
Trimethoprim Resistant, Wild	17	40	8	1	67 (93.05%)
Resistant	2	4	0	0	5 (6.94%)

Πίνακας 17: Αποτελέσματα φαινοτύπου των στελεχών στην τριμεθοπρίμη/σουλφομεθοξαζόλη.

2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΜΕ VITEK 2

Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της αντιβιοαντοχής των προς εξέταση δειγμάτων έδειξαν πως το συνολικό ποσοστό αντοχής για την αμπικιλίνη ήταν το 98.61%, για την αμοξικιλίνη/κλαβουλανικό οξύ το 59.72%, για την πιπερακιλλίνη /ταζομπακτάμη το 58.33%, για την κεφαλοντίνη το 95.83%, την κεφουροξίμη το 99.22%, την κεφουροξίμη αξετίλλη το 97.22% την κεφοτιξιτίνη το 55.56%, την κεφοδοξίμη την κεφοταξίμη και την κεφταζιδίμη το 95.83%, για τις πενέμες ιμιπενέμη και μεροπενέμη 55.56%, για την τομπραμυκίνη και τη σιπροφλοξασίνη μόνο το 1.39%, για την τετρακυκλίνη το 9.72 %, τη νιτροφουραντοΐνη το 18.06% και για την τριμεθοπρίμη / σουλφομεθοξαζόλη το 6.94%, ενώ για τη γενταμυκίνη και νορφλοξασίνη δεν ανιχνεύθηκε κανένα ανθεκτικό στέλεχος.

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται αναλυτικά η αντιβιοαντοχή όλων των δειγμάτων που εξετάστηκαν στα αντιβιοτικά που περιέχει η κάρτα μιας χρήσης AST – N215 του Vitek® 2.

	MIC	R				I				S				ΣΥΝΟΛΟ		
Αντιμικροβιακό		Θάλασσινο νερό (n=10)	Κολυμβητικών Δεξαμενών (n=8)	Πόσιμο νερό δικτύου (n=44)	Αποβλήτου (n=1)	Θάλασσινο νερό (n=10)	Κολυμβητικών Δεξαμενών (n=8)	Πόσιμο νερό δικτύου (n=44)	Αποβλήτου (n=1)	Θάλασσινο νερό (n=10)	Κολυμβητικών Δεξαμενών (n=8)	Πόσιμο νερό δικτύου (n=44)	Αποβλήτου (n=1)	R (n=72)	I (n=72)	S (n=72)
Αμπικιλίνη		19	8	43	1	0	0	0	0	0	0	1	0	71 (98.61%)	0 (0%)	1(1.39%)
Αμοξικιλίνη/ Κλαβουλανικό οξύ		7	5	30	1	11	2	9	0	1	1	5	0	43 (59.72%)	22 (30.56%)	7 (9.72%)
Πιπερακιλλίνη / Ταζομπακτάμη		7	5	29	1	11	3	8	0	1	0	7	0	42 (58.33%)	22 (30.56%)	8 (11.11%)
Κεφαλοτίνη		19	8	41	1	0	0	0	0	0	0	3	0	69 (95.83%)	0 (0%)	3 (4.17%)
Κεφουροξίμη		19	8	42	1	0	0	0	0	0	0	2	0	70 (97.22%)	0 (0%)	2 (2.78%)
Κεφουροξίμη Αξετίλη		19	8	42	1	0	0	1	0	0	0	1	0	70 (97.22%)	1 (1.39%)	1 (1.39%)
Κεφοξιτίνη		7	5	27	1	0	0	0	0	32	3	17	0	40 (55.56%)	0 (0%)	32 (44.44%)
Κεφποδοξίμη		19	8	41	1	0	0	0	0	0	0	3	0	69 (95.83%)	0 (0%)	3 (4.17%)
Κεφοταξίμη		19	8	41	1	0	0	0	0	0	0	3	0	69 (95.83%)	0 (0%)	3 (4.17%)
Κεφαταξιδίμη		19	8	41	1	0	0	0	0	0	0	3	0	69 (95.83%)	0 (0%)	3 (4.17%)
Ιμιπενέμη		7	5	27	1	0	0	0	0	12	3	17	0	40 (55.56%)	0 (0%)	32 (44.44%)
Μεροπενέμη		7	5	27	1	0	0	0	0	12	3	17	0	40 (55.56%)	0 (0%)	32 (44.44%)
Γενταμικίνη		0	0	0	0	4	3	12	0	15	5	32	0	0 (0%)	20 (27.78%)	52 (72.22%)
Τομπραμυκίνη		0	0	1	0	2	1	1	0	17	7	42	0	1 (1.39%)	5 (6.94%)	66 (91.67%)
Σιπροφλοξασίνη		0	0	1	0	0	0	0	0	19	8	43	1	1 (1.39%)	0 (0%)	71 (98.61%)
Νορφλοξασίνη		0	0	0	0	0	0	0	0	19	8	44	1	0 (0%)	0 (0%)	72 (100%)
Τετρακυκλίνη		2	2	3	0	0	0	0	0	17	6	41	1	7 (9.72%)	0 (0%)	65 (90.28%)
Νιτροφουραντοΐνη		2	3	7	1	17	4	34	0	0	1	3	0	13 (18.06%)	55 (76.39%)	4 (5.56%)
Τριμεθοπρίμη / Σουλφομεθοξαζόλη		1	0	4	0	0	0	0	0	18	8	40	1	5 (6.94%)	0 (0%)	67 (93.05%)

Πίνακας 18: Αποτελέσματα αντιβιοαντοχής όλων των προς εξέταση δειγμάτων με Vitek 2.

3.ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΒΙΟΑΝΤΟΧΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΔΙΑΧΥΣΗΣ ΔΙΣΚΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΤΑ KIRBY BAUER

Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού από τη μέθοδο διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών κατά Kirby Bauer έδειξαν ότι το συνολικό ποσοστό αντοχής στην αμπικιλίνη ήταν 22.22%, στην Αμοξικιλίνη/Κλαβουλανικό οξύ 9.72%, στις κεφαλοσπορίνες (κεφοταξίμη, κεφοξιτίνη και κεφταζιδίμη) 19.44%, και στα υπόλοιπα (σιπροφλοξασίνη, ημιπενέμη και τριμεθοπρίμη / σουλφομεθοξαζόλη) 0% δηλαδή δεν ανιχνεύτηκε κανένα ανθεκτικό στέλεχος.

Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται αναλυτικά η ανταπόκριση των στελεχών στα αντιβιοτικά που αναφέρθηκαν παραπάνω.

Αντιμικροβιακό	R				S				ΣΥΝΟΛΟ	
	Θαλασσινό νερό (n=19)	Κολυμβητικών Δεξαμενών (n=8)	Πόσιμο νερό δικτύου (n=44)	Απόβλητο (n=1)	Θαλασσινό νερό (n=19)	Κολυμβητικών Δεξαμενών (n=8)	Πόσιμο νερό δικτύου (n=44)	Απόβλητο (n=1)	R (n=72)	S (n=72)
Αμπικιλίνη	1	1	14	0	18	7	30	1	16 (22.22%)	56 (77.78%)
Αμοξικιλίνη/ Κλαβουλανικό οξύ	2	0	5	0	17	8	42	1	7 (9.72%)	65 (90.3%)
Κεφοταξίμη	1	1	12	0	18	7	32	1	14 (19.44%)	58 (80.56%)
Κεφοξιτίνη	1	1	12	0	18	7	32	1	14 (19.44%)	58 (80.56%)
Κεφταζιδίμη	1	1	12	0	18	7	32	1	14 (19.44%)	58 (80.56%)
Σιπροφλοξασίνη	0	0	0	0	19	8	44	1	0 (0%)	100 (100%)
Ημιπενέμη	0	0	0	0	19	8	42	1	0 (0%)	100 (100%)
Τριμεθοπρίμη/ Σουλφομεθοξαζόλη	0	0	0	0	19	8	42	1	0 (0%)	100 (100%)

Πίνακας 19: Αποτελέσματα αντιβιοαντοχής όλων των προς εξέταση δειγμάτων με τη μέθοδο Kirby Bauer.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία συλλέχθηκαν και απομονώθηκαν 176 περιβαλλοντικά δείγματα του Π.Ε.Δ.Υ Θεσσαλίας, εκ των οποίων τα 115 αφορούν νερό θαλάσσης τα 52 πόσιμο νερό τα 8 κολυμβητικής δεξαμενής και 1 απόβλητο, κατά την περίοδο Ιούλιος 2016 – Νοέμβριος 2017. Μέσα στο ίδιο χρονικό διάστημα, φαίνεται πως συλλέχθηκαν σχεδόν διπλάσια στελέχη από δείγματα θάλασσας σε σύγκριση με τα στελέχη που απομονώθηκαν από δείγματα πόσιμου νερού. Αυτό θα μπορούσε να συσχετίζεται με μικρότερη επιμόλυνση της *E.coli* σε πόσιμο νερό από ότι σε περιβαλλοντικά δείγματα που αφορούν νερό επιφάνειας. Έπειτα, από τα 76 στελέχη που επιλέχθηκαν ανάμεσα στα 176 τα 4 απορρίφθηκαν λόγω επιμόλυνσης.

VI TEK 2

Στα 72 λοιπόν εναπομείναντα, προσδιορίστηκε η ευαισθησία τους έναντι κλινικών σημαντικών αντιμικροβιακών παραγόντων όπως είναι η αμικικιλίνη, κεφαλοσπορίνες 2^{ης} και 3^{ης} γενιάς και η νορφλοξασίνη. Επιπλέον προσδιορίστηκε και ο φαινότυπος τους σχετικά με τα β-λακταμικά και τις κινολόνες. Η πλειοψηφία των φαινοτύπων των στελεχών αφορά στελέχη μερικώς ανθεκτικά στις κινολόνες με ποσοστό 63.89% γεγονός που δεν έρχεται σε απόλυτη συμφωνία με αντίστοιχες μελέτες οι οποίες αναδεικνύουν υψηλά ποσοστά ανθεκτικών στελεχών έναντι στις κινολόνες. Ο 2^{ος} επικρατέστερος φαινότυπος είναι τα στελέχη ESBL, γεγονός που συμφωνεί και με άλλες μελέτες οι οποίες υποστηρίζουν ότι τα στελέχη ESBL απαντούν κατά πλειοψηφία σε περιβαλλοντικά δείγματα ιδίως σε απόβλητα. Τα ESBL στελέχη προκύπτουν από μεταλλάξεις των μη ESBL στελεχών και δείχνουν μια τάση συνεχούς αύξησης. Οι extended spectrum λακταμάσες είναι β – λακταμάσες με εκτεταμένη δραστηριότητα και μεταφέρονται από στέλεχος σε στέλεχος μέσω πλασμιδίου (Reinthal F.F, 2010). Αποτελούν στελέχη μεγάλης σημασίας καθώς, περιορίζουν τις αντιμικροβιακές θεραπείες των λοιμώξεων που προκαλούν τα στελέχη αυτά.

Τα μεγαλύτερα ποσοστά αντιβιοαντοχής παρατηρήθηκαν στην αμικικιλίνη με ποσοστό 98.61%, έπειτα στις κεφαλοσπορίνες 2^{ης} γενιάς κεφοξίμη και κεφοξίμη αξετίλλη με ποσοστό 97.22% και ύστερα με μια μικρή διαφορά στις κεφαλοσπορίνες 3^{ης} γενιάς κεφοταξίμη και κεφταζιδίμη με ποσοστό 95.83%. και άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι η ανθεκτικότητα των στελεχών αφορά κυρίως την αμικικιλίνη (Amaya E, 2012)

Αξίζει να σημειωθεί ότι στη νορφλοξασίνη και στην γενταμυκίνη δεν βρέθηκε κανένα ανθεκτικό στέλεχος. Και άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι το ποσοστό ανθεκτικότητας που εντοπίστηκε γενικότερα έναντι των κινολονών και ειδικότερα έναντι των νεότερων όπως είναι η νορφλοξασίνη ήταν τόσο μικρό που δεν συμπεριλήφθηκε στη στατιστική ανάλυση (Reinthal F.F, 2003).

KIRBY BAUER

Όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα τα αποτελέσματα για τον προσδιορισμό της αντιβιοαντοχής με τις δύο μεθόδους έρχονται σε αντιδιαστολή στα περισσότερα αντιβιοτικά ενώ τείνουν να συμφωνούν σε χαμηλά ποσοστά μικροβιακής αντοχής στη σιπροφλοξασίνη και στην τριμεθοπρίμη/σουλφομεθοξαζόλη.

Αντιμικροβιακό	VITEK 2		KIRBY - BAUER	
	R	S	R	S
Αμπικιλίνη	98.61%	1.39%	22.22%	77.78%
Αμοξικιλίνη/ Κλαβουλανικό οξύ	59.72%	9.72%	9.72%	90.3%
Κεφοταξίμη	95.83%	4.17%	19.44%	80.56%
Κεφοξιτίνη	55.56%	44.44%	19.44%	80.56%
Κεφταζιδίμη	95.83%	4.17%	19.44%	80.56%
Ιμιπενέμη	55.56%	44.44%	0%	100%
Σιπροφλοξασίνη	1.39%	98.61%	0%	100%
Τριμεθοπρίμη / Σουλφομεθοξαζόλη	6.94%	93.05%	0%	100%

Πίνακας 20: Συγκριτικός πίνακας αποτελεσμάτων Vitek 2 και Kirby – Bauer.

Η διαφωνία αυτή πιθανόν να προέκυψε από τεχνικά σφάλματα κατά την διενέργεια της μεθόδου προσδιορισμού αντιβιοαντοχής με τη χρήση του αυτοματοποιημένου συστήματος Vitek 2. Τείνουμε να αποδεχτούμε τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον προσδιορισμό αντιβιοαντοχής με τη μέθοδο διάχυσης σε δίσκων αντιβιοτικών κατά Kirby – Bauer. Από τα αποτελέσματα της μεθόδου αυτής προκύπτει ότι το ποσοστό που ανταποκρίνεται σε χαμηλά ποσοστά αντιβιοαντοχής έναντι των πιο ευρέως διαδεδομένων αντιβιοτικών τόσο στην ιατρική όσο και στην κτηνιατρική πράξη είναι χαμηλό αλλά όχι αμελητέο. Αυτό φαίνεται και από το ότι το μεγαλύτερο ποσοστό ανάπτυξης αντοχής είναι έναντι της αμπικιλίνης η οποία αποτελεί ευρέως χρησιμοποιούμενο αντιβιοτικό στην καθημέρα κλινική πράξη. Το δεδομένο αυτό θέτει υποψίες και επιβεβαιώνει τις ανησυχίες για την επιροή της αλόγιστης και όχι πάντα απαραίτητης χορήγησης αντιβιοτικών στον άνθρωπο αλλά και στην κτηνοτροφία. Από τα αποτελέσματα φαίνεται να έχει επηρεαστεί και το περιβάλλον της θάλασσας καθώς και το νερό δικτύου και φαίνεται να έρχεται σε συμφωνία με μελέτες που υποστηρίζουν ότι η χρήση αντιβιοτικών ιδιαίτερα σε γεωργικές διεργασίες αλλά και στην κτηνοτροφία μπορεί να επηρεάσει το περιβάλλον μέσω υδάτων κατακρήμνησης, τόσο το θάλασσιο οικοσύστημα όσο και το δίκτυο ύδρευσης, επιτρέποντας στη γλωρίδα που τα αποικίζει να αναπτύξει νέους μηχανισμούς αντιβιοαντοχής (Skariyachan S., 2015).

Συμπεραίνεται, πως η ύπαρξη ανθεκτικών στελεχών στα περιβαλλοντικά δείγματα τείνει να ακμάζει δημιουργώντας μείζον πρόβλημα για τη δημόσια υγεία. Το νερό,

μπορεί όχι απλά να λειτουργήσει σαν ρεζερβουάρ ανθεκτικών στελεχών αλλά και να συνεισφέρει στην περαιτέρω διασπορά τους στο περιβάλλον και στον άνθρωπο. Επομένως, η περαιτέρω μελέτη και κατανόηση των αιτιών της αύξησης των ανθεκτικών στελεχών στα περιβαλλοντικά δείγματα καθώς και του μηχανισμού επιμόλυνσης του υδάτινου περιβάλλοντος θα συνδράμει στην καλύτερη διαχείριση αυτού και στον περιορισμό του προβλήματος.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενόγλωσση:

1. **Abe, C. M., Salvador, F. A., Falsetti, I. N., Vieira, M. A., Blanco, J., Blanco, J. E., ... & Gomes, T. A.** (2008). Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *52*(3), 397-406.
2. **Amaya, E., Reyes, D., Paniagua, M., Calderón, S., Rashid, M. U., Colque, P., ... & Nord, C. E.** (2012). Antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* isolates from different aquatic environmental sources in León, Nicaragua. *Clinical Microbiology and Infection*, *18*(9), E347-E354.
3. **Barry, A. L., Coyle, M. B., Thornsberry, C., Gerlach, E. H., & Hawkinson, R. W.** (1979). Methods of measuring zones of inhibition with the Bauer-Kirby disk susceptibility test. *Journal of clinical Microbiology*, *10*(6), 885-889.
4. **Bayer, M. E., & Anderson, T. F.** (1965). The surface structure of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *54*(6), 1592-1599.
5. **Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J.** (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(1), 42.
6. **Boyle, V. J., Fancher, M. E., & Ross, R. W.** (1973). Rapid, modified Kirby-Bauer susceptibility test with single, high-concentration antimicrobial disks. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *3*(3), 418-424.
7. **Brenner, K. P., Rankin, C. C., Sivaganesan, M., & Scarpino, P. V.** (1996). Comparison of the recoveries of *Escherichia coli* and total coliforms from drinking water by the MI agar method and the US Environmental Protection Agency-approved membrane filter method. *Applied and environmental microbiology*, *62*(1), 203-208.
8. **Bücker, R., Schulz, E., Günzel, D., Bojarski, C., Lee, I. F. M., John, L. J., ... & Beutin, L.** (2014). α -Haemolysin of *Escherichia coli* in IBD: a potentiator of inflammatory activity in the colon. *Gut*, gutjnl-2013.
9. **Bush, K., & Bradford, P. A.** (2016). β -Lactams and β -lactamase inhibitors: an overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, a025247.
10. **Candrian, U., Furrer, B., Höfelein, C., & Lüthy, J.** (1991). Use of inosine-containing oligonucleotide primers for enzymatic amplification of different alleles of the gene coding for heat-stable toxin type I of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, *57*(4), 955-961.
11. **Canteón, R.** (2009). Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. *Clinical microbiology and infection*, *15*, 20-25.
12. **Carpenter, C., & Payne, S. M.** (2014). Regulation of iron transport systems in Enterobacteriaceae in response to oxygen and iron availability. *Journal of inorganic biochemistry*, *133*, 110-117.
13. **Castellani A, Chalmers A.J.** Manual of Tropical Medicine, 3rd Ed, 1919, Williams Wood and Co., New York.

14. **Gaastra, W. I. M., & De Graaf, F. K.** (1982). Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Microbiological reviews*, 46(2), 129.
15. **Gargi, A., Tamilselvam, B., Powers, B., Prouty, M. G., Lincecum, T., Eshraghi, A., ... & Blanke, S. R.** (2013). Cellular interactions of the cytolethal distending toxins from *Escherichia coli* and *Haemophilus ducreyi*. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M112.
16. **Geldreich, E. E., Clark, H. F., Huh, C. B., & Best, L. C.** (1965). Fecal-coliform- organism medium for the membrane filter technique. *Journal-American Water Works Association*, 57(2), 208-214.
17. **Gentschev, I., & Goebel, W.** (1992). Topological and functional studies on HlyB of *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics MGG*, 232(1), 40-48.
18. **Griffin, P. M., & Tauxe, R. V.** (1991). The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157: H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiologic reviews*, 13(1), 60-98.
19. **Hooton, T. M., Scholes, D., Hughes, J. P., Winter, C., Roberts, P. L., Stapleton, A. E., ... & Stamm, W. E.** (1996). A prospective study of risk factors for symptomatic urinary tract infection in young women. *New England journal of medicine*, 335(7), 468-474.
20. **Hsueh, P.R., Lau Y.J., Ko W. C., Liu, C.Y, Huang, C. T., Yen, M.Y., ... & Chen, C. M.** (2011). Consensus statement on the role of fluoroquinolones in the management of urinary tract infections. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 44(2), 79-82.
21. **Kirikae, T., Kirikae, F., Saito, S., Tominaga, K., Tamura, H., Uemura, Y., ... & Nakano, M.** (1998). Biological Characterization of Endotoxins Released from Antibiotic-Treated *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 42(5), 1015-1021.
22. **Korczak, B., Frey, J., Schrenzel, J., Pluschke, G., Pfister, R., Ehricht, R., & Kuhnert, P.** (2005). Use of diagnostic microarrays for determination of virulence gene patterns of *Escherichia coli* K1, a major cause of neonatal meningitis. *Journal of clinical microbiology*, 43(3), 1024-1031.
23. **Korhonen, T. K., Valtonen, M. V., Parkkinen, J., Väisänen-Rhen, V., Finne, J., Orskov, F., ... & Mäkelä, P. H.** (1985). Serotypes, hemolysin production, and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis. *Infection and immunity*, 48(2), 486-491.
24. **Ku, L.C., Boggess, K.A., & Cohen-Wolkowicz, M.** (2015). Bacterial meningitis in infants. *Clinics in perinatology*, 42(1), 29-45.
25. **Larsson, D. J.** (2014). Antibiotics in the environment. *Upsala journal of medical sciences*, 119(2), 108-112.
26. **Lehman KB, Neumann R.** Atlas and Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik, 1st Ed., 1896, J.F. Lehmann, Munchen.
27. **Liberman, D. F., & Robertson, R. G.** (1975). Evaluation of a rapid Bauer-Kirby antibiotic susceptibility determination. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 7(3), 250-255.
28. **Lim, J. Y., Yoon, J. W., & Hovde, C. J.** (2010). A brief overview of *Escherichia coli* O157: H7 and its plasmid O157. *Journal of microbiology and biotechnology*, 20(1),

29. **Ling, T. K., Tam, P. C., Liu, Z. K., & Cheng, A. F.** (2001). Evaluation of VITEK 2 rapid identification and susceptibility testing system against gram-negative clinical isolates. *Journal of clinical microbiology*, 39(8), 2964-2966.
30. **Liu, S. M., Miller, D. M., & Roberts, R. F.** (2011). Cloning of genes encoding colicin E2 in *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and evaluation of the colicin-producing transformants as inhibitors of *Escherichia coli* O157: H7 during milk fermentation. *Journal of dairy science*, 94(3), 1146-1154.
31. **Loos, M., Geens, M., Schauvliege, S., Gasthuys, F., van der Meulen, J., Dubreuil, J. D., ... & Cox, E.** (2012). Role of heat-stable enterotoxins in the induction of early immune responses in piglets after infection with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *PLoS One*, 7(7), e41041.
32. **Martinez, J. L.** (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today: Technologies*, 11, 33-39.
33. **Mccracken JR, G., Glode, M., Sarff, L., Mize, S., Schiffer, M., Robbins, J., ... & Cooperative Neonatal Meningitis Study Group.** (1974). Relation between *Escherichia coli* K1 capsular polysaccharide antigen and clinical outcome in neonatal meningitis. *The Lancet*, 304(7875), 246-250.
34. **Melton-Celsa, A. R.** (2014). Shiga toxin (Stx) classification, structure, and function. *Microbiology spectrum*, 2(2).
35. **Messika, J., Magdoud, F., Clermont, O., Margetis, D., Gaudry, S., Roux, D., ... & Ricard, J. D.** (2012). Pathophysiology of *Escherichia coli* ventilator-associated pneumonia: implication of highly virulent extraintestinal pathogenic strains. *Intensive care medicine*, 38(12), 2007-2016.
36. **Migula W.** Bacteriaceae (Stabchenbacterien). In: Engler A. and Prantl K (eds), *Die Natürlichen Pflanzenfamilien, Teil I*, 1895, W.Engelmann Press, Leipzig, Abteilung Ia. pp. 20-30.
37. **Nataro, J. P., Bopp, C. A., Fields, P. I., Kaper, J. B., & Strockbine, N. A.** (2011). *Escherichia*, *shigella*, and *salmonella*. In *Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition* (pp. 603-626). American Society of Microbiology.
38. **O'Brien, A. D., & Holmes, R. K.** (1987). Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiological reviews*, 51(2), 206.
39. **Okimoto, N., Hayashi, T., Ishiga, M., Nanba, F., Kishimoto, M., Yagi, S., ... & Tamada, S.** (2010). Clinical features of *Escherichia coli* pneumonia. *Journal of infection and chemotherapy*, 16(3), 216-218.
40. **Reinthaler, F. F., Feierl, G., Galler, H., Haas, D., Leitner, E., Mascher, F., ... & Marth, E.** (2010). ESBL-producing *E. coli* in Austrian sewage sludge. *Water research*, 44(6), 1981-1985.
41. **Reinthaler, F. F., Posch, J., Feierl, G., Wüst, G., Haas, D., Ruckebauer, G., ... & Marth, E.** (2003). Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water research*, 37(8), 1685-1690.
42. **Ribić, R., Meštrović, T., Neuberg, M., & Kozina, G.** (2018). Effective anti-adhesives of uropathogenic *Escherichia coli*. *Acta Pharmaceutica*, 68(1), 1-18.
43. **Rocha, L. B., Ozaki, C. Y., Horton, D. S., Menezes, C. A., Silva, A., Fernandes, I., ... & Piazza, R. M.** (2013). Different assay conditions for detecting the production and release of heat-labile and heat-stable toxins in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates. *Toxins*, 5(12), 2384-2402.
44. **Ronald, A.** (2002). The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *The American journal of medicine*, 113(1), 14-19.
45. **Ruan, X., Knudsen, D. E., Wollenberg, K. M., Sack, D. A., & Zhang, W.** (2014). Multiepitope fusion antigen induces broadly protective antibodies that

- prevent adherence of Escherichia coli strains expressing colonization factor antigen I (CFA/I), CFA/II, and CFA/IV. *Clinical and Vaccine Immunology*, 21(2), 243-249.
46. **Savarino, S. J., McVeigh, A., Watson, J., Cravioto, A., Molina, J., Echeverria, P., ... & Fasano, A.** (1996). Enteroaggregative Escherichia coli heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative E. coli. *Journal of Infectious Diseases*, 173(4), 1019-1022.
 47. **Savarino, S. J., McVeigh, A., Watson, J., Cravioto, A., Molina, J., Echeverria, P., ... & Fasano, A.** (1996). Enteroaggregative Escherichia coli heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative E. coli. *Journal of Infectious Diseases*, 173(4), 1019-1022.
 48. **Sidhu, J. P., Ahmed, W., Hodgers, L., & Toze, S.** (2013). Occurrence of virulence genes associated with diarrhoeagenic pathotypes in Escherichia coli isolates from surface water. *Applied and environmental microbiology*, 79(1), 328-335.
 49. **Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., & Viridi, J. S.** (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in microbiology* 6 (2015): 791.
 50. **Skariyachan, S., Mahajanakatti, A. B., Grandhi, N. J., Prasanna, A., Sen, B., Sharma, N., ... & Narayanappa, R.** (2015). Environmental monitoring of bacterial contamination and antibiotic resistance patterns of the fecal coliforms isolated from Cauvery River, a major drinking water source in Karnataka, India. *Environmental monitoring and assessment*, 187(5), 279.
 51. **Slama, T. G.** (2008). Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. *Critical Care*, 12(4), S4.
 52. **Spangler, B. D.** (1992). Structure and function of cholera toxin and the related Escherichia coli heat-labile enterotoxin. *Microbiological reviews*, 56(4), 622-647.
 53. **Stenutz, R., Weintraub, A., & Widmalm, G.** (2006). The structures of Escherichia coli O-polysaccharide antigens. *FEMS microbiology reviews*, 30(3), 382-403.
 54. **Tenover, F. C.** (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American journal of infection control*, 34(5), S3-S10.
 55. **Todar, K.** (2015). Textbook of bacteriology.

56. **Travaglione, S., Loizzo, S., Ballan, G., Fiorentini, C., & Fabbri, A.** (2014). The E. coli CNF1 as a pioneering therapy for the central nervous system diseases. *Toxins*, 6(1), 270-282.
57. **Wang, L., Rothmund, D., Curd, H., & Reeves, P. R.** (2003). Species-wide variation in the Escherichia coli flagellin (H-antigen) gene. *Journal of bacteriology*, 185(9), 2936-2943.
58. **Yao, L., Wang, Y., Tong, L., Li, Y., Deng, Y., Guo, W., & Gan, Y.** (2015). Seasonal variation of antibiotics concentration in the aquatic environment: a case study at Jiangnan Plain, central China. *Science of the total environment*, 527, 56-64.

Ελληνική:

1. **Αρσένη Α.** Εντεροβακτηριακά Ι: In: Κλινική Μικροβιολογία και εργαστηριακή διάγνωση λοιμώξεων. Τόμος Α. 4^η έκδοση. Ζήτα Ιατρικές εκδόσεις, Αθήνα, 1994, σ.234-263.
2. **Παπαπαναγιώτου Ι, Κυριαζοπούλου Δαλαίνα Β.** Γενετική των μικροβίων. In: Εισαγωγή στην Ιατρική Μικροβιολογία Ιολογία και Ανοσολογία. 1^η έκδοση University Studio Press. Θεσσαλονίκη, 2005; Γ' 63-88
3. **Χαρβάλου Α.** Παράρτημα. In: Πρωτόκολλα κλινικής Μικροβιολογίας. 1^η έκδοση. Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης, Αθήνα, 2007, σ.273-284.

Πηγές από το διαδίκτυο:

1. CDC, 2015. E.coli (*Escherichia coli*) available at <https://www.cdc.gov/ecoli/general/>
2. Mayo Clinic (2014). Diseases and Conditions *E.coli* available at <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/e-coli/basics/definition/con-20032105>
3. WHO, 2016. *E.coli* available at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/>
4. <http://dev.nsta.org/evwebs/2217/history.htm>

5. Todar, K., 2012 available at
http://textbookofbacteriology.net/e.coli_4.html
6. ΚΕΕΑΠΝΟ, 2011
<http://www.keelpno.gr/Portals/0/%CE%91%CF%81%CF%87%CE%B5%CE%AF%CE%B1/%CE%A4%CF%81%CE%BF%CF%86%CE%B9%CE%BC%CE%BF%CE%B3%CE%B5%CE%BD%CE%AE/EHEC/EHEC%20-%20%CE%A0%CE%B5%CF%81%CE%B9%CE%B3%CF%81%CE%B1%CF%86%CE%AE%20%CE%BD%CE%BF%CF%83%CE%AE%CE%BC%CE%B1%CF%84%CE%BF%CF%82.pdf>

Νομοθεσία:

http://www.waterlabs.gr/yliko/pools_waterspecif.pdf

http://www.waterlabs.gr/yliko/nea_odigia_nera_kolimvisis.pdf

http://www.waterlabs.gr/yliko/fek_tropopoiisi_kya_2600_posimo_nero.pdf