



ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ

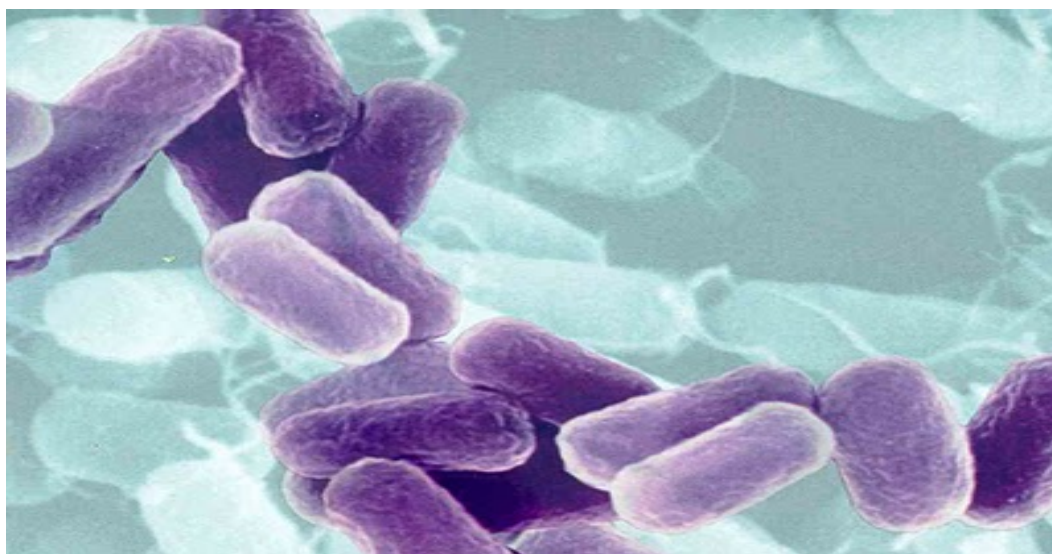


ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΖΩΪΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ GRAM (-) ΒΑΚΤΗΡΙΔΙΩΝ



ΦΟΙΤΗΤΗΣ: ΚΑΡΑΒΙΤΣΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΜΑΖΑΡΑΚΗ ΚΥΡΙΑΚΗ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2014

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	Σελ.
1.1 Από το χθες στο σήμερα ,μια ιστορική αναδρομή.....	6
1.2 Η χρησιμότητα της τεχνικής χρώσης κατά Gram.....	9
1.3 Ταξινόμηση κατά Gram.....	10
1.4 Τα Gram(-)αρνητικά μικρόβια.....	10
1.4.1 Κυτταρικό τοίχωμα των Gram αρνητικών μικροβίων.....	11
1.4.2 Το περίπλασμα ,ο περιπλασματικός χώρος και η πεπτιδογλυκάνη.....	11
1.4.3 Εξωτερική μεμβράνη.....	12
1.4.4 Οι λιποπρωτεΐνες.....	12

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1 *Escherichia coli*

2.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά.....	13
2.1.2 Μορφολογία κατά τη χρώση και μικροσκόπηση.....	14
2.1.3 Καλλιέργεια.....	14
2.1.4 Βιοχημικές ιδιότητες.....	15
2.1.5 Ορολογικές εξετάσεις για την διάγνωση της νόσου.....	16
2.1.6 Πρόληψη.....	18
2.1.7 Αντιγονική δομή.....	18
2.1.8 Γενετική.....	21
2.1.9 Συσχετιζόμενες τροφές.....	22
2.1.10 Ευαισθησία στα αντιβιοτικά	22
2.1.11 Διάγνωση και συμπτώματα ασθένειας στον άνθρωπο.....	22
2.1.12 Παθογένεια – Νόσοι από E.COLI	23

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1 *Klebsiella spp.*

3.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά.....	28
3.1.2 Μορφολογία.....	28
3.1.3 Καλλιέργεια.....	28
3.1.4 Βιοχημικές ιδιότητες.....	30
3.1.5 Αντιγονική δομή.....	30

3.1.6	Παθογόνος δράση.....	31
3.1.7	Νόσοι από Klebsiella.....	32
3.1.8	Αντιβιοτικά.....	32

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4.1 Salmonella

4.1.1	Γενικά χαρακτηριστικά.....	34
4.1.2	Μορφολογία.....	36
4.1.3	Καλλιέργεια.....	37
4.1.4	Βιοχημικές ιδιότητες.....	38
4.1.5	Ορολογικές εξετάσεις.....	39
4.1.6	Ορολογική ταυτοποίηση και οροτυπία σαλμονελλών	39
4.1.7	Παθογένεια.....	42
4.1.8	Πηγές μόλυνσης.....	43

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

5.1 Proteus

5.1.1	Γενικά χαρακτηριστικά.....	45
5.1.2	Μορφολογία.....	46
5.1.3	Καλλιέργεια.....	47
5.1.4	Βιοχημικές ιδιότητες.....	47
5.1.5	Αντιγονική δομή.....	48
5.1.6	Νόσοι από πρωτεΐς.....	48
5.1.7	Θεραπεία.....	48

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

6.1 Shigella

6.1.1	Γενικά χαρακτηριστικά.....	49
6.1.2	Μορφολογία.....	49
6.1.3	Καλλιέργεια.....	50
6.1.4	Βιοχημικές ιδιότητες.....	50
6.1.5	Θεραπεία – Αντοχή στα αντιβιοτικά.....	51
6.1.6	Αντιγονική δομή.....	52
6.1.7	Οροτυπία.....	52

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

7.1 Pseudomonas

7.1.1	Γενικά χαρακτηριστικά.....	54
7.1.2	Μορφολογία.....	55
7.1.3	Καλλιέργεια.....	55
7.1.4	Βιοχημικές ιδιότητες.....	56
7.1.5	Αντιγονική δομή.....	57
7.1.6	Παθογόνος δράση.....	58
7.1.7	Ταυτοποίηση της ψευδομονάδας	59
7.1.8	Ευαισθησία-Αντοχή στα αντιβιοτικά.....	60
7.1.9	Νόσοι από ψευδομονάδα	61
	Παράρτημα φωτογραφιών.....	63

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη βιβλιογραφία.....	65
Ελληνική βιβλιογραφία.....	70
Διαδίκτυο.....	71
Εικόνες.....	71

Ευχαριστίες

Θα ηθελα να ευχαριστήσω την κα. Μαζαράκη Κυριακή για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε έχοντας γνώση του αντικειμένου που ασχολήθηκα καθώς επίσης ευχαριστώ θερμά την κα. Πάλλα Ελισάβετ για την καθοδήγηση και την υπομονή που έκανε κατά την διάρκεια της υλοποίησης της πτυχιακής μου εργασίας.

Θα θελα επίσης να απευθύνω τις ευχαριστίες μου στους γονείς μου, οι οποίοι στήριξαν τις σπουδές μου με διάφορους τρόπους, φροντίζοντας για την καλύτερη δυνατή μόρφωση μου.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η εργασία αυτή έχει θέμα την ταυτοποίηση Gram (-) αρνητικών βακτηριδίων. Η ταξινόμηση και ονοματολογία τους αλλάζει και συμπληρώνεται διαρκώς γιατί καινούργια βακτηρίδια ανακαλύπτονται ολοένα που τελικά κατατάσσονται δηλαδή ταξινομούνται σε συγγενείς, οικογένειες και γένη.

Η παρούσα πτυχιακή θα αναφερθεί αναλυτικά σε έξι Gram (-)αρνητικά βακτηρίδια, τα εξής:

-Escherichia Coli

-Klebsiella

-Salmonella

-Proteus

-Shigella

-Pseudomonas

Για την ταυτοποίηση Gram(-)βακτηριδίων χρησιμοποιούνται εργαστηριακές μέθοδοι που στηρίζονται σε :

- **Μορφολογικά χαρακτηριστικά** (*Μορφολογία στη χρώση Gram*)

- **Καλλιεργητικά χαρακτηριστικά** (απαραίτητα θρεπτικά υλικά, συνθήκες επώασης, μορφολογία αποικιών)

- **Μεταβολικές ιδιότητες**(διάσπαση χημικών ουσιών, παραγωγή ενζύμων κ.α)

- **Βιοχημική ταυτοποίηση**

- Έλεγχο διαφόρων αντιγονικών παραγόντων, ειδικών για κάθε είδος. **Ορολογική ταυτοποίηση / τυποποίηση**

- Την ανίχνευση χαρακτηριστικών αλληλουχιών βάσεων στο γενετικό υλικό των μικροοργανισμών με τεχνικές DNA .**Μοριακή ταυτοποίηση / τυποποίηση**

Επίσης, θα αναφέρουμε την ευαισθησία που παρουσιάζει ξεχωριστά καθένα από τα έξι βακτήρια στα αντιβιοτικά καθώς και τις νόσους που εμφανίζονται στα ζώα από αυτά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1 Ιστορική Αναδρομή



Εικόνα 1: Ανάπτυξη βακτηρίων του στόματος σε τριβλίο

1875 Ferdinand J. Cohn

Ο Ferdinand J. Cohn συμβάλλει στην ίδρυση της επιστήμης της μικροβιολογίας. Αυτός δημοσιεύει μια πρόωρη ταξινόμηση των βακτηρίων χρησιμοποιώντας το γένος *Bacillus* για πρώτη φορά.

1876 Robert Koch

Σπούδασε Ιατρική στο Goettingen και εγκαταστάθηκε στη Σηλεσία (τώρα Πολωνία) όπου ως νομιάτρος άρχισε τις ερευνητικές εργασίες του στον τομέα της Μικροβιολογίας, με την καλλιέργεια αποικιών βακτηριδίων. Το 1876 ανακάλυψε το βάκιλλο της σπλήνας, με τον οποίο απέδειξε ότι το αίτιο για τις μολυσματικές ασθένειες είναι μικροοργανισμοί.

Από το 1880 μέχρι το 1904 ο Koch διετέλεσε διευθυντής του Υγειονομικού Ινστιτούτου του Πανεπιστημίου του Βερολίνου . Από το 1891 είχε γίνει διευθυντής του νέου Ινστιτούτου για μολυσματικές ασθένειες, το οποίο αργότερα ονομάστηκε «Ινστιτούτο Robert Koch».

Το 1882 ανακάλυψε το βάκιλλο της φυματίωσης που ονομάζεται ακόμα «βάκιλλος του Koch» και το 1883 το μικρόβιο της χολέρας. Ακόμα εξερεύνησε την ασθένεια του ύπνου και την ελονοσία και μελέτησε τρόπους αντιμετώπισης αυτών των επιδημιών. Με αυτές τις μελέτες και εργασίες του προσέφερε ο Koch ανεκτίμητη βοήθεια στην πρακτική Ιατρική και έγινε ο θεμελιωτής της βακτηριολογίας. Το 1905 τιμήθηκε για την προσφορά του με το βραβείο Νόμπελ της Ιατρικής.

1878 Joseph Lister

Joseph Lister δημοσιεύει την μελέτη του για τη γαλακτική ζύμωση του γάλακτος, γεγονός που αποδεικνύει τη συγκεκριμένη αιτία της οξίνισης του γάλακτος. Η έρευνα του διεξάγεται χρησιμοποιώντας την πρώτη μέθοδο που αναπτύχθηκε για την απομόνωση καθαρής καλλιέργειας ενός βακτηρίου, το οποίο ονομάζει βακτήριο lactis.

1880 Louis Pasteur

Ο Λουί Ζαν Παστέρ (Louis Jean Pasteur), απαντώμενος στην παλαιότερη ελληνική βιβλιογραφία και με την εξελληνισμένη μορφή Λουδοβίκος Παστέρ (27 Δεκεμβρίου 1822 – 28 Σεπτεμβρίου 1895), ήταν Γάλλος χημικός που έγινε διάσημος για τις ανακαλύψεις του στη Μικροβιολογία, τόσο ώστε να αποκαλείται «Πατέρας της Μικροβιολογίας» και της Ανοσολογίας. Τα πειράματά του επιβεβαίωσαν τη θεωρία ότι πολλές ασθένειες προκαλούνται από μικρόβια, ενώ ο ίδιος δημιούργησε το πρώτο εμβόλιο για τη λύσσα (αντιλυσσικός ορός). Είναι επίσης γνωστός από τον τρόπο που εφηύρε για να αποτρέπεται το ξίνισμα του γάλακτος και του κρασιού, καθώς αυτή η διαδικασία πήρε το όνομά του και ονομάζεται παστερίωση. Αρκετές είναι και οι ανακαλύψεις του στο πεδίο της Χημείας, με σημαντικότερη την ανακάλυψη της ασυμμετρίας των κρυστάλλων. Ο Παστέρ απέδειξε ότι η διαδικασία που ονομάζεται ζύμωση προκαλείται από την ανάπτυξη μικροοργανισμών και ότι η ανάπτυξή τους σε διαλύματα θρεπτικών ουσιών δεν οφείλεται σε αυτόματη γένεση από άζωη ύλη. Οι έρευνες του Παστέρ απέδειξαν επίσης ότι κάποιοι μικροοργανισμοί μόλυναν τα υγρά κατά τη ζύμωση. Τότε επηρόησε μία διαδικασία δηλ. θέρμαινε τα υγρά όπως το γάλα ώστε να σκοτώσει όλους σχεδόν τους μικροοργανισμούς που βρίσκονταν ήδη μέσα τους. Μαζί με τον Κλωντ Μπερνάρ ολοκλήρωσε την πρώτη δοκιμή στις 20 Απριλίου 1862. Αυτή η διαδικασία ονομάσθηκε παστερίωση.

Η μόλυνση των ζωικών υγρών οδήγησε τον Παστέρ να συμπεράνει ότι μικροοργανισμοί (τα μικρόβια) μόλυναν τα ζώα και τους ανθρώπους επίσης. Πρότεινε την παρεμπόδιση της εισόδου μικροοργανισμών μέσα στο ανθρώπινο σώμα, οδηγώντας έτσι τον Ιωσήφ Λίστερ στο να αναπτύξει αντισηπτικές μεθόδους στη Χειρουργική. Ο Παστέρ επίσης ανακάλυψε τους αναερόβιους οργανισμούς, που μπορούν να ζουν χωρίς οξυγόνο, και η σχετική ιδιότητα, η «αναεροβίωση», καλείται και «φαινόμενο Παστέρ».

1889 Martinus Beijerinck

Ο Martinus Beijerinck χρησιμοποίησε καλλιέργεια εμπλουτισμού, χωρίς αζωτούχες ενώσεις, με σκοπό να αποκτήσει μια καθαρή καλλιέργεια του βακτηρίου Rhizobium, αποδεικνύοντας ότι η καλλιέργεια εμπλουτισμού δημιουργεί τις προϋποθέσεις για τη βέλτιστη ανάπτυξη του επιθυμητού βακτηριδίου.[1]



Εικόνα 2: Carl Friedländer

Κατά το 19^ο αιώνα ο Γερμανός παθολόγος **Καρλ Φριντλέντερ** (Carl Friedländer), ο οποίος εργαζόταν στο νεκροτομείο του νοσοκομείου του Βερολίνου προσπαθούσε

να εντοπίσει τα αίτια της πνευμονίας. Το 1882 και το 1883 εξέδωσε δύο μελέτες, στις οποίες περιέγραφε την ιστολογική εικόνα των μικροοργανισμών όπως παρατηρούνταν στα ινώδη εκκρίματα μολυσμένων πνευμόνων ασθενών που είχαν αποβιώσει από λοβώδη πνευμονία και απομόνωσε τους μικροοργανισμούς που αποκάλεσε τότε «μικρόκοκκους». Η βακτηριολογική έρευνα στην πραγματικότητα έγινε από ένα μαθητή του Ρόμπερτ Κοχ ονόματι Φρομπένιους (Frobenius). Στις μελέτες αυτές ο Φριντλέντερ έδωσε ιδιαίτερη έμφαση στην παρουσία μιας κάψας, η οποία περιέκλειε τους παρατηρούμενους μικροοργανισμούς. Σήμερα δεν υπάρχει αμφιβολία ότι ο Φριντλέντερ στις μελέτες του περιέγραψε τον πνευμονιόκοκκο (*Streptococcus pneumoniae*). Τα άρθρα του Φριντλέντερ και ιδιαίτερα η έμφασή τους στην παρουσία κάψας προκάλεσαν το έντονο ενδιαφέρον του Άλμπερτ Φρένκελ (Albert Fraenkel, 1864–1938) καθηγητή στο Πανεπιστήμιο της Χαϊδελβέργης, ο οποίος είχε επίσης απομονώσει μικροοργανισμό από ασθενείς με λοβοπνευμονία, αλλά ήταν τελείως διαφορετικός από αυτόν που περιέγραφε ο Φριντλέντερ. Στη σχετική μελέτη που δημοσίευσε είναι σήμερα φανερό ότι περιέγραψε την Κλεμπσιέλλα [2]

Ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα που αντιμετώπισαν και οι δύο ερευνητές ήταν η δυνατότητα να παρατηρήσουν τους μικροοργανισμούς σε πύελα με πύον που αποβάλλονταν από τους μολυσμένους πνεύμονες και σε τομές ιστών. Αιτία ήταν η παρουσία ινιδίνης (fibrin) αλλά οι ίδιοι οι πυρήνες των μικροοργανισμών, που αντιδρούσαν με τις χρωστικές που χρησιμοποιούνταν εκείνη την εποχή για τη χρώση ιστολογικών παρασκευασμάτων. Έτσι ήταν σχεδόν αδύνατη η παρατήρηση βακτηρίων που βρίσκονταν ανάμεσα στα κύτταρα των ιστών. Στο σημείο αυτό παρενέβη ο Γκραμ, συνεργάτης τότε του Φριντλέντερ, ο οποίος είχε αναπτύξει μια μέθοδο χρώσης των βακτηρίων. Τη μέθοδο αυτή ανέφερε ο Φριντλέντερ στις μελέτες του, αλλά το 1884 ο Γκραμ εξέδωσε ο ίδιος μια μελέτη, στην οποία περιέγραφε με λεπτομέρειες τη μέθοδο χρώσης και τα αποτελέσματά της.[2]

1.2 Χρησιμότητα της χρώσης Gram

Η τεχνική της χρώσης κατά Gram χρησιμοποιείται κύρια για το διαχωρισμό των επιμέρους ειδών των βακτηρίων σε δύο κατηγορίες (θετικά και αρνητικά). Η μέθοδος δεν έχει χρησιμότητα στα αρχαιοβακτήρια καθώς η τεχνική δίνει ποικίλα αποτελέσματα, ανάλογα με τις φυλογενετικές τους ομάδες.[62]

Η μέθοδος δεν είναι αλάνθαστη για τη διάγνωση και την ταυτοποίηση μικροοργανισμών, για τις οποίες έχουν αναπτυχθεί νεότερες τεχνικές, βασιζόμενες κυρίως στη μοριακή Βιολογία, οι οποίες είναι πολύ πιο αποτελεσματικές. Η ταξινόμηση των βακτηρίων που έχει γίνει με βάση τη χρώση κατά Gram παραμένει σε χρήση, παρά το γεγονός ότι υπάρχουν τα κατά Gram μεταβλητά βακτήρια αλλά

και ορισμένα, όπως τα βακτήρια του γένους *Mycobacterium*, στο οποίο περιλαμβάνονται τα *Mycobacterium tuberculosis* (προκαλεί τη φυματίωση) και το *Mycobacterium leprae* (προκαλεί τη νόσο του Χάνσεν (λέπρα). Το κυτταρικό τοίχωμα αυτών των βακτηρίων εμφανίζει σημαντικές διαφοροποιήσεις (αν και περιέχει μεγάλες ποσότητες πεπτιδογλυκάνης), εμπεριέχοντας ένα κηρώδες υλικό, το οποίο εμποδίζει τη χρώση τους κι έτσι τα βακτήρια παραμένουν αόρατα.[2,62]

1.3 Ταξινόμηση κατά Gram:

Κατά Gram θετικά

Κύρια ομάδα κατά Gram θετικών βακτηρίων είναι τα βακτήρια του γένους *Firmicutes*, που περιλαμβάνει γένη όπως *Bacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* και *Clostridium*.

Κατά Gram αρνητικά

Η μεγαλύτερη ομάδα των κατά Gram αρνητικών βακτηρίων περιλαμβάνει τα πρωτεοβακτήρια. Αρνητικά εμφανίζονται επίσης τα κυανοβακτήρια, οι σπειροχαίτες και τα πρασινοβακτήρια. Υπάρχουν ακόμη αρκετοί κόκκοι και βάκιλλοι που σχετίζονται κυρίως με ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις, που εμφανίζονται κατά Gram αρνητικοί.[3]

1.4 GRAM(-)ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΜΙΚΡΟΒΙΑ

Τα Gram(-)αρνητικά μικρόβια είναι μία ετερογενής ομάδα που περιλαμβάνει πολλές οικογένειες, γένη και είδη πολλά από τα οποία προκαλούν σοβαρές λοιμώξεις και ενδοτοξικό σοκ.

Η ταχεία και ακριβής ταυτοποίηση των Gram (-) βακτηριδίων και Gram (-) διπλοκόκκων παρέχει έγκαιρη και σωστή έναρξη της αντιμικροβιακής αγωγής. Παθογόνα Gram (-) βακτήρια είναι τα εξής:

- *Salmonella* spp.,
- *Shigella* spp.,
- *Escherichia coli*,
- *Campylobacter jejuni*,
- *Vibrio parahemolyticus*

Βρίσκονται: στο έντερο, κόπρανα, έδαφος, γάλα, κρέας (πουλερικά), θαλασσινά.
[4,5,6]

1.4.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΤΟΙΧΩΜΑ ΤΩΝ GRAM ΑΡΝΗΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ

Το κυτταρικό τοίχωμα των Gram αρνητικών μικροβίων διαφέρει χημικά και δομικά από αυτό των Gram θετικών. Το μόνο κοινό στοιχείο είναι η παρουσία της μουρεΐνης, δηλ. της πεπτιδογλυκάνης, αλλά και αυτή διαφορετική ποσοστικά και στη σύσταση της. Τα δομικά και χημικά στοιχεία της εξωτερικής μεμβράνης των Gram αρνητικών είναι τα εξής :

1. Το περίπλασμα ή ο περιπλασματικός χώρος και η πεπτιδογλυκάνη
2. Η εξωτερική μεμβράνη
3. Οι λιποπρωτεΐνες

1.4.2 ΤΟ ΠΕΡΙΠΛΑΣΜΑ Η Ο ΠΕΡΙΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΣ ΧΩΡΟΣ ΚΑΙ Η ΠΕΠΤΙΔΟΓΛΥΚΑΝΗ

Το περίπλασμα καταλαμβάνει το χώρο μεταξύ της κυτταρικής μεμβράνης και της εξωτερικής μεμβράνης. Είναι γεμάτος από μια ζελατινώδη ουσία που είναι γέλη της πεπτιδογλυκάνης, μέσα στην οποία πλέει ένα λεπτό αλλά στερεό στρώμα πεπτιδογλυκάνης που σαν σακί περιβάλλει όλο το μικροβιακό κύτταρο. Αυτό προσφέρει στο μικρόβιο τη σταθερότητα στο σχήμα και στη μορφή του. Όταν αυτό το στερεό σώμα χαθεί για διάφορους λόγους το μικρόβιο χάνει τη μορφή του, γίνεται σφαιρικό και λέγεται σφαιροπλάστης. Η πεπτιδογλυκάνη αυτή έχει την ίδια χημική δομή με αυτή που έχει στα Gram θετικά με την διαφορά ότι μερικά από τα Gram αρνητικά μικρόβια έχουν στο μόριο του N-ακετυλ-μουραμικού τους οξέος αντί της L-λυσίνης το διαμινοπιμελικό οξύ που είναι μια ουσία πρόδρομος της λυσίνης, που δεν βρίσκεται πουθενά αλλού στη φύση. Μια άλλη διαφορά είναι ότι για την αύξηση του μεγέθους του μορίου της πεπτιδογλυκάνης δεν χρειάζεται ενεργοποίηση ενζύμων για να καθορισθεί «θέση» όπου θα σπάσει η συνέχεια του μορίου για την προσθήκη της νέας ύλης που παράγεται, αλλά το μόριο αυξάνει σε όλη την έκταση του. Η πεπτιδογλυκάνη στα Gram αρνητικά αποτελεί μόνο το 5% της όλης ύλης του κυτταρικού τοιχώματος και το πάχος του στρώματος είναι 2 nm. Μέσα στο περίπλασμα βρίσκονται εν διαλύσει διάφορες ουσίες, πρωτεΐνες και ολιγοσακχαρίδια. Οι πρωτεΐνες είναι κυρίως ένζυμα όπως αυτά που αδρανοποιούν τα αντιβιοτικά, πρωτεΐνες συνδεδεμένες, ένζυμα υδρολυτικά όπως η αλκαλική φωσφατάση. Τα ολιγοσακχαρίδια εκκρίνονται κατά τις ανάγκες διατηρήσεως σταθερής της οσμωτικής πίεσης στο χώρο σε περίπτωση διαταραχής της από επίδραση εξωτερικών συνθηκών. [4,5,6]

1.4.3 ΕΞΩΤΕΡΙΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ

Η εξωτερική μεμβράνη των Gram αρνητικών μικροβίων έχει πολλαπλές δομικές και βιολογικές λειτουργίες σαν παράγων της παθογόνου δράσεως των μικροβίων και σαν πηγή αντιγόνων για τη δημιουργία αντισωμάτων ποικίλων χρήσιμων στη διαγνωστική και ταυτοποίηση των μικροβίων και ιδίως για την παρασκευή εμβολίων. Αποτελείται, όπως όλες οι βιολογικές μεμβράνες, από δύο στρώματα φωσφολιπιδίων- πρωτεϊνών αντικρυστών, με τη διαφορά προς τις άλλες βιολογικές μεμβράνες ότι το εξωτερικό της στρώμα δεν αποτελείται από φωσφολιπίδια αλλά από λιποπολυσακχαρίδιο το γνωστό LPS (Lipopolysaccharide). Καθ' όλη την έκταση της μεμβράνης και κατά τόπους υπάρχουν πρωτεϊνικές ομάδες ειδικές οι πορίνες. Το LPS αποτελείται από τρεις μοριακές δομές. Στο ένα άκρο υπάρχει ένα φωσφολίπιο που περιέχει γλυκοσαμίνη αντί για γλυκερόλη και είναι το Α-λίπιο του μορίου του, δηλαδή μια ουσία τοξική που είναι η ενδοτοξίνη των Gram αρνητικών μικροβίων. Είναι τόσο τοξική ώστε ακόμη και η μικρή ποσότητα αυτού που απελευθερώνεται από τα μικρόβια που καταστρέφονται από την δράση των αντιβιοτικών κατά τη χημειοθεραπεία, αρκεί για να προκαλέσει ενδοτοξικό σοκ. Στο μέσο βρίσκεται ο πολυσακχαριδικός πυρήνας και στο άλλο άκρο το Ο-αντιγόνο του που είναι μια πλευρική σακχαριδική αλυσίδα. Το στοιχείο αυτό παρουσιάζει χημικές διαφορές στα μικρόβια του αυτού γένους και του αυτού είδους. Βάσει των αντιγονικών αυτών διαφορών τα μικρόβια διαχωρίζονται σε ορολογικές ομάδες ή σε ορολογικούς τύπους. Διαφορά στη χημική σύσταση του LPS υπάρχει και μεταξύ αερόβιων μικροβίων. Η παρουσία του LPS στην εξωτερική επιφάνεια του μικροβίου το προφυλάσσει από την είσοδο οποιασδήποτε οργανικής ουσίας, γιατί με το λιπιδικό της μέρος μπλοκάρονται οι υδρόφιλες ουσίες και με το Ο-πολυσακχαριδικό του μέρος οι υδρόφοβες. Η είσοδος των θρεπτικών ουσιών γίνεται με ενεργητική μεταφορά και μέσω των πόρων των πορινών. Οι πορίνες ή στρωματικές πρωτεΐνες έχουν πόρους που επιτρέπουν τη διέλευση μέσω αυτών υδρόφιλων εν διαλύσει ουσιών μοριακού βάρους κάτω των 800 και μεγέθους μέχρι 600 Daltons (1 DA=1 g/mol). [5,6,7,9]

1.4.4 ΟΙ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Οι λιποπρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος των Gram αρνητικών βακτηριδίων αποτελούν την πλουσιότερη σε πρωτεΐνες περιοχή του μικροβιακού κυττάρου. Με το καρβοξυλικό τους άκρο ενώνονται με τα αμινοξέα της πεπτιδογλυκάνης ενώ με το αμινικό τους άκρο ενώνονται με τα λιπίδια της εξωτερικής μεμβράνης.

Χάρη στη χημική δομή της εξωτερικής τους επιφάνειας τα Gram αρνητικά μικρόβια διατηρούνται φορτισμένα αρνητικά, παράγων που παρεμβαίνει και καταπολεμά τις δυνατότητες φαγοκυτταρώσεως ή της βλαπτικής δράσης του συμπληρώματος, των πεπτικών ενζύμων των χολικών αλάτων της λυσοζύμης και πολλών αντιβιοτικών. [4,5,6,7,8,9]

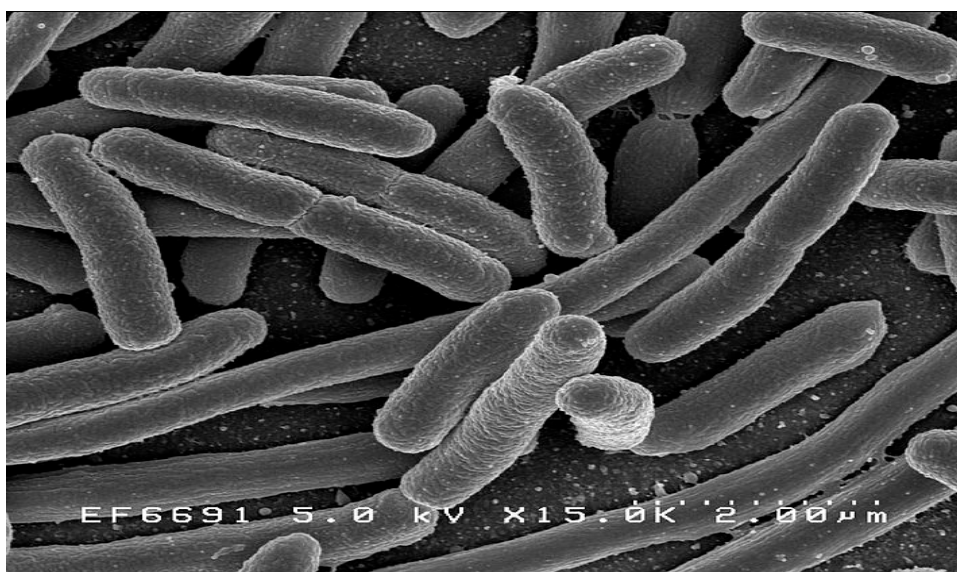
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1 Escherichia coli

2.1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Στο γένος αυτό ανήκουν δύο είδη η *Escherichia coli* και η *E. blattae*, καθώς και ένα αβέβαιας θέσεως η *E. adecarboxylata* κατά την ταξινόμηση του Bergey's Manual ενώ κατά την ταξινόμηση του Ewing ανήκουν 5 είδη.[11] Τα τρία επιπλέον είδη είναι οι *E. hermannii*, *E. vulneris* και *E. fergusonii*. Η *E. coli* είναι το τυπικό είδος του γένους αυτού κατά γενική παραδοχή. Κοινή ονομασία του είδους που επικράτησε στα ελληνικά είναι η λέξη κολοβακτηρίδιο. Έχει όλους τους γενικούς χαρακτήρες της οικογένειας των Εντεροβακτηριακών της οποίας αποτελεί το πιο αντιπροσωπευτικό είδος. Αποτελεί το τυπικό μοντέλο για μελέτες μοριακής βιολογίας και γενετικής, φαινομένων αντοχής στα αντιβιοτικά, πλασμιδολογίας και ενζυμολογίας.[10,13,14]

Η *E. coli* είναι Gram (-) αρνητικά, ραβδόμορφα βακτηρίδια που ανήκουν στην οικογένεια Enterobacteriaceae. Η *E. coli* υπάρχει στο έντερο όλων των ζώων, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Όταν οι αερόβιες μέθοδοι καλλιέργειας χρησιμοποιούνται, η *E. coli* είναι το κυρίως είδος που βρίσκεται στα περιττώματα. Κανονικά η *E. coli* εξυπηρετεί μια χρήσιμη λειτουργία στο σώμα με την καταστολή της αύξησης των επιβλαβών βακτηριακών ειδών και με τη σύνθεση αξιόλογων ποσών βιταμινών. Ο ορότυπος O157:H7 της *E. coli* είναι μια σπάνια ποικιλία της *E. coli* που παράγει μεγάλες ποσότητες μιας ή περισσότερων σχετικών, ισχυρών τοξινών που προκαλούν σοβαρές παρενέργειες στο εσωτερικό του εντέρου. Αυτές οι τοξίνες [verotoxin (VT), shiga -όμοια τοξίνη] είναι πολύ συγγενικές ή όμοιες με την τοξίνη που παράγεται από το *Shigella dysenteriae*. [15]



Εικόνα 3: *Escherichia coli* σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

2.1.2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΚΑΤΑ ΧΡΩΣΗ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΗΣΗ

Gram αρνητικό αερόβιο ασπορογόνο βακτήριο, μήκους 1-1,5-3 μm. Είναι περίτριχο, κινητό, αλλά υπάρχουν και ακίνητα στελέχη, Παράγει ένα πολύ λεπτό έλυτρο που στα μη κινητά στελέχη είναι παχύτερο σαν μια πραγματική κάψα. Τόσο τα κινητά όσο και τα ακίνητα παράγουν ινίδια προσκολλητικά και πολλά στελέχη παράγουν και ινίδια συζευκτικά.[10]

2.1.3 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Αναπτύσσεται σε όλα τα κοινά θρεπτικά υλικά και σε πολλά εκλεκτικά. Στο θρεπτικό άγαρ οι αποικίες του είναι λείες, χαμηλές, λίγο καμπυλωτές, διαμέτρου μέχρι 2mm, περιγεγραμμένες, γυαλιστερές όταν βρίσκονται στη S(smooth) φάση και ξηρές όταν βρίσκονται στη R(Rough) φάση. Στο αιματούχο άγαρ είναι γκριζωπές και σε πολλά στελέχη περιβάλλονται από λεπτή ζώνη αιμόλυσεως. Στο MacConkey άγαρ οι αποικίες είναι ροδοκόκκινες γιατί ζυμώνει τη λακτόζη και προκαλεί αλλαγή του χρώματος του ουδέτερου ερυθρού που περιέχεται στο θρεπτικό αυτό υλικό. Είναι μικρότερες από ό,τι στο θρεπτικό άγαρ. Στο άγαρ με δεσοξυχολικό και λακτόζη(DCA) οι αποικίες είναι ακόμη μικρότερες, συμπαγέστερες και κόκκινες.

Στο ζυμό προκαλεί διάχυτη θολερότητα και παχύ ίζημα όταν βρίσκεται στην S φάση, κροκυδώδη ανάπτυξη όταν βρίσκεται στη R φάση.[63]



Εικόνα 4: Escherichia coli σε MacConkey agar

2.1.4 ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Οι βιοχημικές, δηλαδή οι σακχαροδιασπαστικές και άλλες ενζυμικές- βιολογικές, ιδιότητες της E.coli καθώς και όλων των άλλων εντεροβακτηριακών αποτελούν σταθερή παράμετρο που επιτρέπει την ταυτοποίηση τους.Οι τυπικές βασικές βιοχημικές ιδιότητες της E.coli είναι οι εξής :

- 1.Ινδόλη (+)**
- 2.Methyl Red (M.R) (+)** (παράρτημα, εικ. 1)
- 3. Voges-Proskauer (V.P.) (-)**
- 4.Κιτρικά (-)**
- 5.Απομίνωση της Φαινυλανίνης(PPA) (-)**
- 6.Λακτόζη (-)**
- 7.(ONPG) (+) (Ο-νιτροφαινύλ-B-D-γαλακτοσίδη)**
- 8.Λυσίνη (+)**
- 9.KCN (-)**
- 10. NO₃ (+)**
- 11.H₂S (-)**
- 12.Ουρία (-)**
- 13.Ορνιθίνη (+/-)**
- 14.Αργινίνη (-/+)**
- 15.Οξειδάση (-)**

Εκτός από τις παραπάνω βασικές βιοχημικές ιδιότητες η E.coli ζυμώνει διάφορα σάκχαρα εκτός της γλυκόζης και της λακτόζης όπως τη μαλτόζη, τη μαννιτόλη, και αρκετά στελέχη τη σουκρόζη, τη σαλικίνη και τη δουλιτιόλη και τα περισσότερα και τη σορβιτόλη.Δεν ζυμώνει τον ινοσίτη και την αδετινόλη.Οι διαφορές που παρατηρούνται στις σακχαροζυμωτικές ιδιότητες επιτρέπουν το διαχωρισμό της E.coli σε διάφορους βióτυπους.

Μερικές από τις σακχαρολυτικές και λοιπές ιδιότητες συμβαδίζουν με ορισμένους αντιγονικούς(ορολογικούς) χαρακτήρες.Έτσι η E.coli ορότυπου O111 :K58 : H2 είναι πάντοτε ενός ορισμένου βιότυπου σε όλες τις χώρες.Αυτό σημαίνει ότι μπορεί να ταυτοποιηθεί χωρίς ορολογικές δοκιμές.

Μερικές από τις ιδιότητες αυτές, όπως η παραγωγή ινδόλης και η παραγωγή οξέος και αερίου από τη λακτόζη, εκδηλώνονται και κατά την επώαση στους 44^o C .Επίσης υπάρχουν ανώμαλοι τύποι όπως π.χ. στελέχη που διασπούν την ουρία ή που δεν διασπούν τη λακτόζη.

Ο αριθμός των βιοχημικών δοκιμών που έχουν διαμορφωθεί για την ταυτοποίηση της E.coli είναι μεγάλος.Όσο περισσότερες δοκιμές εφαρμόζονται τόσο περισσότερα στελέχη ταυτοποιούνται.Στο εμπόριο κυκλοφορούν διάφορα έτοιμα συστήματα και kits με συνδιασμούς διαφόρων βιοχημικών δοκιμών.Στο API E20 σύστημα με 20 βιοχημικές δοκιμές ταυτοποιούνται το 94% των εντεροβακτηριακών και φυσικά η E.coli.[63]



Εικόνα 5: API 20E

2.1.5 ΟΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ

Αντισώματα προς τα αντιγόνα της E.coli βρίσκονται στο αίμα των πασχόντων κυρίως από τις εξωεντερικές εσεριχώσεις.Τα αντιγόνα που προκαλούν παραγωγή αντισωμάτων και άνοδο του τίτλου των κατά την πορεία της νόσου είναι τα Ο-σωματικά αντιγόνα και εν μέρει οι εντεροτοξίνες.Τα K-αντιγόνα δεν προκαλούν παραγωγή αντισωμάτων σε τίτλους με διαγνωστική αξία.Τα αντισώματα προς τις εντεροτοξίνες υπάρχουν και στο αίμα των υγιών προφανώς λόγω των συχνών μολύνσεων από εντεροτοξιγόνα στελέχη.

Οι ορολογικές εξετάσεις έχουν διαγνωστική αξία προς το παρών μόνο στην πυελονεφρίτιδα .Στη νόσο αυτή εμφανίζονται αντισώματα προς το Ο-αντιγόνο της E.coli σε τίτλους ανερχόμενους κατά την πορεία της νόσου.Τα αντισώματα αυτά είναι IgM στην οξεία πυελονεφρίτιδα αλλά εμφανίζονται και IgG στις χρονίζουσες ή στις υποτροπιάζουσες πυελονεφρίτιδες.

Αντισώματα δεν εμφανίζονται στο αίμα στην κυστίτιδα,στην ασυμπτωματική μικροβιοουρία και στο ουριθρικό σύνδρομο.Ετσι ο προσδιορισμός του τίτλου των Ο-αντισωμάτων στον ορό του ασθενούς χρησιμεύει σαν μέθοδος διαχωρισμού της πυελονεφρίτιδας από την κυστίτιδα ή γενικά από την χαμηλή ουρολοίμωξη.

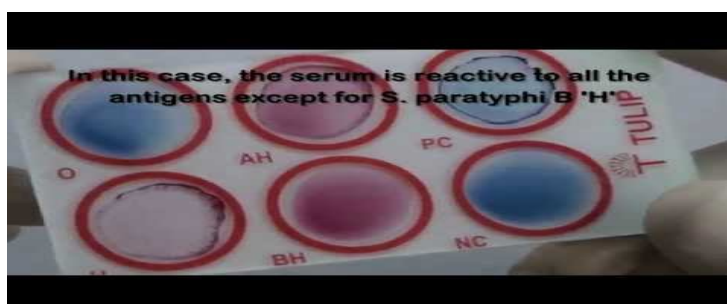
Τα αντι-Ο αντισώματα ανιχνεύονται με διάφορους τρόπους από τους οποίους οι πιο δοκιμασμένοι είναι οι εξής:

- 1.Μέθοδος συγκολλήσεως τύπου WIDAL
- 2.Μέθοδος ανοσοενζυμική ELISA
- 3.Μέθοδος εμμέσου αιμοσυγκολλήσεως

1.Συγκολλητιναντίδραση τύπου Widal

Το αντιγόνο στη μέθοδο αυτή είναι εναιώρημα στελέχους ή στελεχών της E.coli που απομονώθηκαν.Παρασκευάζεται όπως το Ο-αντιγόνο της Widal δηλ.με βρασμό για μια ώρα ή με οινόπνευμα για την καταστροφή των βλεφαριδικών αντιγόνων και αραιώση.

Θετική θα θεωρηθεί η δοκιμή αν ο τίτλος συγκολλήσεως είναι άνω του 1:40 και κυρίως αν παρατηρηθεί ορομεταστροφή ,δηλαδή άνοδος του τίτλου κατά την πορεία της νόσου.



Εικόνα 6: Widal test

2.Ανοσο-ενζυμο-συνδετική ELISA

Το αντιγόνο της E.coli συνδέεται με ένζυμο π.χ. αλκαλική φωσφατάση.Αν στον ορό υπάρχουν αντισώματα προς το αντιγόνο αυτό θα συνδεθούν με το σύμπλεγμα αντιγόνο+ένζυμο και το ποσό του ελεύθερου συμπλέγματος θα μειωθεί .Μετρώντας την ενζυμική δραστικότητα του παραμείναντος συμπλέγματος πάνω στο υπόστρωμα του ενζύμου φωτομετρικά, υπολογίζουμε το ποσό των αντισωμάτων που συνδέθηκε.Η μέθοδος είναι πολύ καλή και δίνει υψηλούς τίτλους μια και τα αντισώματα π.χ στην οξεία πυελονεφρίτιδα είναι IgM.

3.Έμμεσος αιμοσυγκόλληση

Το αντιγόνο, στη μέθοδο αυτή, είναι ερυθρά αιμοσφαίρια ευαισθητοποιημένα με διαλυτό αντιγόνο E.coli.Τέτοιο αντιγόνο υπάρχει στο εμπόριο.Ο ορός του αίματος του ασθενούς προκαλεί συγκόλληση των ευαισθητοποιημένων ερυθρών αιμοσφαιρίων εφόσον υπάρχουν αντισώματα προς το αντιγόνο της E.coli.Η μέθοδος είναι πολύ ευαίσθητη αλλά όχι πολύ ειδική.[63]

2.1.6 ΠΡΟΛΗΨΗ

Τα εντεροβακτήρια (συμπεριλαμβανομένης της E. coli) είναι θερμοευαίσθητα και θανατώνονται με παρατεταμένη θέρμανση (πάνω από 70 ° C). Ακατέργαστα ή μη μαγειρεμένα τρόφιμα και διασταυρούμενη μόλυνση, όταν δηλ. το μαγειρεμένο υλικό έρχεται σε επαφή με τα ακατέργαστα ή τα μολυσμένα υλικά (σανίδες κοπής), αποτελούν τις κύριες αιτίες μόλυνσης. Το κατάλληλο μαγείρεμα και ο υγιεινός χειρισμός τροφίμων μπορούν να προλάβουν τις εντεροβακτηριακές μολύνσεις σε μεγάλο βαθμό.

2.1.7 ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΔΟΜΗ

Αντιγονικές ιδιότητες έχουν πολλές από τις ουσίες του κυτταρικού τοιχώματος, της κάψας και των βλεφαρίδων και λιγότερο ουσίες από την κυτταροπλασματική μεμβράνη.Αντιγόνα είναι επίσης μερικές από τις τοξίνες που παράγει το βακτήριο αυτό.

Οι κυριότερες ομάδες αντιγόνων που χρησιμεύουν για το διαχωρισμό της σε οροτύπους είναι οι εξής :

- Αντιγόνα σωματικά ή αντιγόνα –O(160 είδη)
- Αντιγόνα βλεφαρίδων ή αντιγόνα –H(60 είδη)
- Αντιγόνα ελύτρου ή αντιγόνα –K(100 είδη)

Το σωματικό O αντιγόνο είναι το σακχαριδικό μεταβαλλόμενο μέρος του τριμερούς λιπο-πολύ-σακχαριδικού(LPS) αντιγόνου που βρίσκεται στο κυτταρικό τοίχωμα της E.coli και των άλλων Gram αρνητικών εντεροβακτηριακών.Βάσει αυτού η E.coli διαχωρίζεται σε 160 O-οροτύπους.Το υπόλοιπο τμήμα του μορίου του LPS αντιγόνου είναι το λιπιδικό ή A-λιπίδιο το οποίο είναι η ενδοτοξίνη.Όλο αυτό το σύμπλεγμα είναι βιολογικά ενεργό όπως αποδεικνύεται πειραματικά.Μικρή ποσότητα της ουσίας αυτής προκαλεί στα πειραματόζωα,όταν δοθεί ενδοφλεβίως,συμπτώματα όμοια με αυτά που παρατηρούνται στο σηπτικό σοκ από

Gram αρνητικά στον άνθρωπο. Πυρετός, ενδαγγειακή αιμορραγία, και πήξη, λευκοπενία, υπόταση και σοκ. Όλες οι φαρμακολογικές δραστηριότητες της ενδοτοξίνης αποδίδονται στο Α-λιπίδιο.

Το Ο-αντιγόνο των εσεριχίων είναι ουσία θερμοανθεκτική. Δεν καταστρέφεται με βρασμό για μια ώρα. Προκαλεί την παραγωγή αντισωμάτων που προκαλούν συγκόλληση του εναιωρήματος της *E. coli*.

Ορισμένοι Ο-ορότυποι απαντούν σε συγκεκριμένες εντερολοιμώξεις, όπως η διάρροια ταξιδιωτών, άλλοι στη γαστρεντερίτιδα των βρεφών, στις ουρολοιμώξεις, στην αιμορραγική κολίτιδα.

Τα Ο-αντιγόνα των άλλων εντεροβακτηριακών έχουν μερικές ομοιότητες αντιγονικές με τα Ο-αντιγόνα της *E. coli* π.χ το 0124 της *E. coli* αντιδρά με αντιορούς προς τα Ο-αντιγόνα της *Shigella dysenteriae*, αλλά αντιδρά και με μερικούς αντιορούς σαλμονελλών, κίτροβακτηρίων και προβιντένσιας.

Τα Η αντιγόνα είναι ουσίες πρωτεϊνικές από τη φλαγελλίνη των βλεφαριδών. Υπάρχουν 60 διαφορετικά Η-αντιγόνα στα διάφορα στελέχη της *E. coli* (τα Η1, Η2, Η3, Η4 Η60) αλλά τα συχνότερα είναι τα Η1, Η12, Η11. Οι αντιγονικές διαφορές στο αντιγόνο αυτό οφείλονται στη διαφορά των αμινοξέων στο μόριο της φλαγελλίνης.

Έχουν εξαιρετική ειδικότητα και δεν εμφανίζουν διασταυρούμενες αντιδράσεις με τα Η-αντιγόνα των διαφόρων άλλων εντεροβακτηριακών όπως αυτό παρατηρείται με τα Ο-αντιγόνα. Είναι ουσίες συγκεκριμένες και δεν υπάρχει μετάπτωση από μια φάση σε άλλη, είναι δηλαδή ενός μόνο είδους σε κάθε στέλεχος και αποτελεί ιδιότητα μόνιμη χρωμοσωμικά καθορισμένη. Καταστρέφονται με το βρασμό και μονιμοποιούνται με τη φορμόλη.

Η παραγωγή Η-αντιγόνου δηλαδή βλεφαρίδων από ένα καλλιέργημα ευνοείται όταν το μικρόβιο καλλιεργηθεί σε ημίρευστο υλικό και επωασθεί σε θερμοκρασία δωματίου.

Παρουσία αντι-Η αντισωμάτων, η *E. coli* συγκολλάται σε αδρές κροκύδες. Η συγκόλληση αυτή δεν γίνεται αν επωασθεί στη θερμοκρασία των 50°C αλλά ευνοείται στη θερμοκρασία των 30°C.

Τα Κ αντιγόνα δηλαδή κάψας ή ελύτρου είναι πολυσακχαρίδια ποικίλης δομής αλλά μερικά είναι πρωτεϊνικά όπως το Κ88 της *E. coli* που προκαλεί εντερίτιδα των χοίρων. Είναι μάλλον μια ομάδα αντιγόνων που προέρχεται από τις δομές της επιφάνειας της *E. coli* ανεξάρτητα αν αυτές οι δομές είναι συστατικά κάψας ή απλώς ουσίες της επιφάνειας της εξωτερικής μεμβράνης.

Έχουν διαχωρισθεί 100 περίπου αντιγονικοί τύποι Κ αντιγόνων (Κ1, Κ2, Κ3, Κ4..... Κ100). Τα αντισώματα προς τα Κ αντιγόνα προστατεύουν από πειραματική μόλυνση σε αντίθεση με τα Ο-αντισώματα που δεν έχουν την ικανότητα αυτή. Τα διάφορα Κ αντιγόνα συνδυάζονται με συγκεκριμένα Ο αντιγόνα.

Οι συνδυασμοί των 160 Ο αντιγόνων, των 60 Η αντιγόνων με τα 100 Κ αντιγόνα θα ήταν άπειροι αλλά στις διάφορες νόσους του ανθρώπου και των ζώων από E.coli καθώς και στις διάφορες φυσιολογικές χλωρίδες επικρατούν λίγοι μόνο συνδυασμοί των αντιγόνων .

Μερικά από τα Κ αντιγόνα έχουν σχέση με συγκεκριμένες νόσους ή είναι παράγοντες της παθογόνου δράσης του μικροβίου .Από τα πιο γνωστά Κ αντιγόνα έχουν ιδιαίτερα μελετηθεί τα εξής:

K1-αντιγόνο.Βρίσκεται στα στελέχη της E.coli που απομονώνονται από τα ούρα ασθενών με οξεία πυελονεφρίτιδα.Στελέχη E.coli από αυμπτωματική μικροβιοουρία δεν έχουν το Κ1 αντιγόνο καθώς και στελέχη από ασθενείς με κυστίτιδα χρονίζουσα.Κ1 αντιγόνο έχουν και τα 80% των E.coli που απομονώνονται από την νεογνική μηνιγγίτιδα και από τις σηψαιμίες.Είναι ένα πολυσακχαριδικό αντιγόνο με μεγάλη αντιγονική ομοιότητα με το πολυσακχαριδικό αντιγόνο του μηνιγγιτιδόκοκκου Β-ομάδας.Αντί –Κ1 ορός παρασκευάζεται με ένεση Neisseria meningitides ομάδας –Β σε άλογο.Το Κ1αντιγόνο ανιχνεύεται με καλλιέργεια σε άγαρ όπου έχει ενσωματωθεί αντι-Κ1 ορός.Μπορεί να γίνει και συγκολλητινάντιδράση με αντι-Ο7 Κ1 ορό.

Είναι παράγων της παθογόνου δυνάμεως της E.coli .Παρεμποδίζει τη μικροβιοκτόνο δράση του ορού και γενικά αντιδρά κατά των μηχανισμών της φυσικής άμυνας.Συνδυάζεται με συγκεκριμένους Ο-ορότυπους.Κ1 και Κ12 αντιγόνα βρίσκονται στους οροτύπους Ο1,Ο2,Ο7,Ο16,Ο18 και Ο4.

Κ88-αντιγόνο .Βρίσκεται στα στελέχη της E.coli που προκαλεί στα χοιρίδια εντερίτιδα.Το Κ99 βρίσκεται στα στελέχη που προκαλούν διάρροια στα μωσχάρια.

Κ92-αντιγόνο .Περιέχει σιαλικό οξύ και έχει αντιγονική ομοιότητα με το αντιγόνο το πολυσακχαριδικό της Neisseria meningitides C-ομάδας.

Με τα τρία αυτά αντιγόνα τα Ο,Κ και Η συντίθεται το αντιγονικό προφίλ των διαφόρων οροτύπων της E.coli που γράφεται ως εξής π.χ .Escherichia coli Ο26 : Κ 40 : Η12.

Παρόλον ότι θα μπορούσαν να γίνουν άπειροι συνδυασμοί ,λίγοι ορότυποι απαντούν στις νόσους αν και στο φυσικό περιβάλλον υπάρχουν πολλοί περισσότεροι π.χ οι ορότυποι του Ο55:Κ59 υπάρχουν 17 αλλά μόνο ένας ή δύο Η-τύποι (οι Ο55:Κ59:Η6 και Ο55:Κ59:Η7)είναι εντεροπαθογόνοι και βρίσκονται στον άνθρωπο.

Στην οροτυπία της E.coli τα αντι-Η αντισώματα είναι πολύ ειδικά και παρόλον ότι μέχρι σήμερα δεν χρησιμοποιήθηκαν πολύ στην οροτυπία ίσως θα είναι προτιμότεροι οι αντι-Η οροί από τους αντι-Κ ορούς .Οι ορότυποι Ο78:Η11 και Ο78:Η12 είναι εντεροτοξινογόνοι ,ενώ ο Ο6 δεν είναι εντεροτοξιγόνο αλλά είναι ουροπαθογόνος.[63]

Πίνακας 1. Απομόνωση της E. coli O157:H7 από ζώα στην Ελλάδα			
<u>Πηγή προέλευσης</u>	<u>Αριθμός δειγμάτων που εξετάστηκαν</u>	<u>Αριθμός θετικών δειγμάτων</u>	<u>Ποσοστό (%)</u>
Κόπρانا Αίγας	81	1	1,2
Κόπρانا προβάτου	171	0	0
Κόπρانا βοοειδών	99	0	0
Σύνολο	351	1	0,2

Πίνακας 1: Απομόνωση της E. coli O157:H7 από ζώα στην Ελλάδα

2.1.8 ΓΕΝΕΤΙΚΗ

Στα καλλιεργήματα της E.coli υπάρχουν πάντοτε φυσικοί μεταλλάκτες, δηλαδή άτομα που έχουν μια από τις ιδιότητες του είδους διαφορετική από ό,τι τα άλλα μέλη της ομάδας.Οι μεταλλάκτες αυτοί δεν αναγνωρίζονται γιατί δεν φανερώνουν τη διαφορετική τους ιδιότητα.Αν όμως η ομάδα βρεθεί υπό πίεση, δηλαδή κάτω από δυσμενείς συνθήκες , που όμως δεν είναι δυσμενείς για το συγκεκριμένο μεταλλάκτη, τότε αυτός επικρατεί και το στέλεχος εκδηλώνεται με μια διαφορετική ιδιότητα.Έτσι αναπτύσσονται κλώνοι με σταθερές πια ιδιότητες βιοχημικές, σακχαροδιασπαστικές ή αντιγονικές.Έτσι εξηγείται και η έντονη διαφορά μεταξύ των επιθετικών δηλαδή ελεύθερων στελεχών της E.coli που απομονώνονται από τη φύση και αυτών που απομονώνονται από τη χλωρίδα των νοσοκομειακών ασθενών.

Η E.coli είναι από τα μικρόβια που πολύ εύκολα προσβάλλεται από πλασμίδια και που εύκολα τα μεταδίδει γιατί τα F+ στελέχη της παράγουν συζευκτικά ινίδια με τα οποία έρχονται σε γενετικές συζεύξεις όχι μόνο με F- στελέχη άλλων εντεροβακτηριακών.

Οι γόνιοι των πλασμιδίων ελέγχουν πολλές από τις μη μόνιμες ιδιότητες της E.coli, όπως την παραγωγή εντεροτοξίνης, την παραγωγή παράγοντος αποικισμού τόσο των υπο μορφή ινιδίων όσο και εκείνων που εκδηλώνονται υπο μορφή K-αντιγόνου.

Το στέλεχος E.coli K12 είναι ένας τύπος που δεν διασπά τη λακτόζη αλλά μετά το 48ωρο παράγει μεταλλάκτες που τη διασπούν.Είναι πολύ ευαίσθητος σε γενετικές

επιδράσεις και χρησιμοποιείται σε πλασμιδιακές και κυρίως σε γενετικές μελέτες. Είναι ο ευπαθέστερος δέκτης (vector) γενετικής ύλης στις μεθόδους ανάλυσης του DNA των διαφόρων μικροοργανισμών.[63]

2.1.9 ΣΥΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΕΣ ΤΡΟΦΕΣ

Το μη μαγειρεμένο ή ακατέργαστο χάμπουργκερ (βόειο κρέας), ενεπλάκει σε πολλά κρούσματα τροφολοιμώξεων από *E. coli* O 157: H 7. Όπως επίσης και οι νεαροί βλάστες ήμερου τριφυλλιού, οι μη-παστεριωμένοι χυμοί φρούτων, το αποξηραμένο σαλάμι, το μαρούλι και το τυρόπηγμα. Από το ακατέργαστο γάλα εμφανίστηκαν πολλά κρούσματα τροφολοιμώξεων σε σχολείο του Καναδά το 1995.

2.1.10 ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Η *Escherichia coli* είναι μικρόβιο ευαίσθητο στις αμινογλυκοσίδες, τη χλωραμφενικόλη, τις τετρακυκλίνες, τις νιτροφουράνες και το ναλιδιξικό οξύ. Από τα β-λακταμικά είναι ευαίσθητο σε πολλές κεφαλοσπορίνες και ανθεκτικό σε μεγάλο ποσοστό στην πενικιλίνη αλλά ευαίσθητο σε άλλες ημισυνθετικές πενικιλίνες όπως η αμπικιλίνη κ.ά.

Εύκολα μολύνεται με πλασμίδια με γόνους αντοχής. Τα νοσοκομειακά στελέχη παρουσιάζουν αντοχή συχνά τύπου μεταδοτικής πολυαντοχής.

Τα ποσοστά των ανθεκτικών στελεχών και το pattern της αντοχής είναι διαφορετικό μεταξύ των διαφόρων στελεχών. Το ποσοστό π.χ. των ανθεκτικών στην αμπικιλίνη εντεροτοξιγόνων στελεχών της *E. coli* κυμαίνεται από 4% στις ΗΠΑ μέχρι 48% σε πολλές αναπτυσσόμενες χώρες.

2.1.11 ΔΙΑΓΝΩΣΗ Κ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Η αιμοραγική κολίτιδα είναι το όνομα της οξείας ασθένειας που προκαλείται από την *E. coli* O 157: H 7 και προσβάλλει τον άνθρωπο.

Η διάγνωση για την αιμοραγική κολίτιδα γίνεται με την απομόνωση της *E. coli* του ορότυπου O 157: H 7 ή διαφορετικά της verotoxin που παράγεται από την *E. coli* και βρίσκεται στα διαρροϊκά περιττώματα. Εναλλακτικά, τα περιττώματα μπορούν να εξεταστούν άμεσα για την παρουσία verotoxin. Η επιβεβαίωση μπορεί να ληφθεί από την απομόνωση της *E. coli* του ίδιου ορότυπου στα ενοχοποιημένα τρόφιμα.

Η ασθένεια χαρακτηρίζεται από δριμεία σύσπαση(κοιλιακός πόνος) και διάρροια που είναι αρχικά υδατώδης αλλά γίνεται τελικά αιματηρή. Περιστασιακά εμφανίζεται εμετός. Ο πυρετός είναι είτε χαμηλός είτε απών. Η ασθένεια είναι συνήθως αυτο-περιορισμένη και διαρκεί κατά μέσο όρο 8 ημέρες. Σε μερικές περιπτώσεις παρουσιάζεται μόνο υδατώδη διάρροια.

Μολυσματική δόση – άγνωστη, αλλά από μια έκθεση των στοιχείων που αφορά ξεσπάσματα, και συμπεριλαμβανομένης της δυνατότητας του οργανισμού να μεταδίδεται από άτομο σε άτομο σε οίκους φύλαξης και ευγηρίας, η μολυσματική δόση μπορεί να είναι παρόμοια με αυτήν για την *Shigella ssp*.

2.1.12 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ – ΝΟΣΟΙ ΑΠΟ *E.coli*

Η *E.coli* συνολικά και ειδικά οι συγκεκριμένοι ορολογικοί και τοξινογόνοι τύποι προκαλούν πολλές λοιμώξεις ,όχι μόνο εντερικές αλλά και σε άλλα συστήματα και όργανα.[65]

Οι μηχανισμοί των λοιμώξεων αυτών ποικίλλουν όσον αφορά τους μικροβιακούς παράγοντες όπως τοξίνες ,ένζυμα,προσκολλητίνες,παράγοντες αποικισμού,πλασμίδια και βακτηριοφάγοι με γόνους που ενισχύουν την επιθετικότητα ή την αντοχή του μικροβίου σε κάθε είδους ανταγωνιστές.Εκ μέρους του ξενιστή –μεγαλοοργανισμού η μείωση της φυσικής τοπικής ιστικής άμυνας ,της γενικής ανοσοαντιδραστικής ικανότητας και η μεσολάβηση των διαφόρων πρωτεϊνών και κυτοκινών του αίματος συμμετέχουν στην έναρξη της φλεγμονής στον τόπο μόλυνσης και αποικισμού ή στη μετάθεση της λοίμωξης από το γαστρεντερικό σε άλλα συστήματα ή όργανα.π.χ. η ιντερλευκίνη-2 ενισχύει τη μετάθεση της γαστρεντερικής λοίμωξης σε όργανα χωρίς χλωρίδα.

Η πηγή των εσεριχίων από τις οποίες θα προκληθεί η νόσος είναι είτε η γηγενής εντερική χλωρίδα είτε ένας πάσχων ή φορέας παθογόνου στελέχους *E.coli*,τοξινογόνου ή φέροντος ειδικό πλασμίδικό ή βακτηριοφαγικό φορτίο δεδομένου ότι οι περισσότεροι παθογενετικοί χαρακτήρες των εσεριχιων προσδιορίζονται από εξωχρωμοσωμικούς γόνους.

Ευπαθείς στις κολοβακτηριαδικές λοιμώξεις είναι αυτοί που έχουν μειωμένη την τοπική ιστική άμυνα ή το σύνολο των φυσικών αμυντικών μηχανισμών .

Ευνοϊκοί παράγοντες λοιμώξεως είναι η χρησιμοποίηση παρεμβατικών θεραπευτικών και διαγνωστικών αγωγών.

Η *E.coli* προκαλεί πολλές νόσους από όλα τα συστήματα που οφείλονται σε ποικίλους λειτουργικούς ,μεταβολικούς χαρακτήρες που αναπτύσσουν ορισμένες ομάδες του είδους αυτού.Χαρακτήρες της παθογόνου δράσεως είναι :Παραγωγή εντεροτοξινών,αιμολυσινών,προσκολλητινών,παραγόντων αποικισμού,παρουσία τοξικών αντιγονικών ουσιών,η διεισδυτικότητα κ.ά.

Αναλόγως των παραγόντων αυτών οι E.coli διαχωρίζονται στις ακόλουθες ομάδες:[66,17,18,19,67]

- 1.Εντεροτοξιγόνες ήETEC
- 2.Εντεροπαθογόνες ήEPEC
- 3.Εντεροδιεισδυτικές ήEIEC
- 4.Εντεροαιμοραγικές ήEHEC
- 5.Διάχυτης προσκολλησεως ήDAEC[16]
- 6.Ουροπαθογόνες

Τα νοσήματα που προκαλούνται είναι τα εξής:

ΕΝΤΕΡΙΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

- Γαστρεντερίτις
- Χολεροειδής εντερίτις
- Δυσεντεροειδές σύνδρομο
- Αιμορραγική κολίτις και αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο
- Εντερική κολοβακτηριδίαση

ΕΞΩΕΝΤΕΡΙΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

- Ουρολοίμωξη
- Αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο
- Μηνιγγίτις
- Σηψαιμία
- Ευκαιριακές λοιμώξεις
- Ενδοτοξικό σοκ

1. Εντεροτοξινογόνα E. coli (ETEC)

Η παθογόνος δράση τους βασίζεται στην παραγωγή θερμοευαίσθητων (LT-I και LT-II) και θερμοανθεκτικών (St_a και ST_b) εντεροτοξινών. Η LT-I είναι αντιγονικά όμοια με την τοξίνη που παράγει το Δονάκιο της χολέρας και διεγείρει την αδενυλκυκλάση. Η θερμοανθεκτική εντεροτοξίνη (ST) διεγείρει την γουανυλκυκλάση. Η ικανότητα ενός στελέχους E. coli να παράγει εντεροτοξίνη μεταδίδεται πιθανώς με πλασμίδια και από μόνη της δεν αποτελεί απαραίτητα εντεροπαθογόνο ικανότητα [68].

Οι συχνότεροι ορότυποι που προκαλούν τη νόσο είναι οι O78:H11, O6:H16, O148:H28, O8:H9. Τα ETEC μπορεί να προκαλέσουν χαμηλό πυρετό και υδαρή διάρροια, με αποτέλεσμα τη μεγάλη αφυδάτωση και την απώλεια ηλεκτρολυτών. Ο τρόπος μετάδοσής τους είναι η εντεροστοματική οδός μέσω μολυσμένων τροφίμων και νερού και απαντούν κυρίως στις αναπτυσσόμενες χώρες όπου οι συνθήκες υγιεινής είναι ανεπαρκείς. Η θεραπεία έγκειται στην καλή ενυδάτωση και αποκατάσταση των ηλεκτρολυτών, ενώ σπάνια χορηγούνται αντιβιοτικά.

2. Εντεροπαθογόνα E. coli (EPEC)

Οι πρώτοι ορότυποι που αναγνωρίστηκαν είναι οι O55 και O111, οι οποίοι τώρα έχουν σχεδόν εξαφανιστεί [65]. Έκτοτε, και άλλοι ορότυποι έχουν ενοχοποιηθεί. Η μετάδοση γίνεται μέσω επαφής με τα κόπρανα πάσχοντος [65]. Κύρια συμπτώματα είναι ο πυρετός, ο έμετος και οι υδαρείς κενώσεις [18].

Η παθογένεση της διάρροιας από τα στελέχη αυτά είναι άγνωστη. Είναι πιθανό η μεταφορά πλασμιδίων να είναι σημαντική για να καταστεί ένα στέλεχος λοιμογόνο, αν και δεν υπάρχει σαφής απόδειξη για την παραγωγή εντεροτοξίνης ή την εισβολή στον εντερικό βλεννογόνο των εντεροπαθογόνων E. coli [68]. Χαρακτηριστικό των EPEC που τις διαφοροποιεί και από τους άλλους τύπους εντεροπροσκολλητικών E. coli είναι ο εντοπισμένος τρόπος κυτταροπροσκόλλησης, όπου οι E. coli είναι προσκολλημένες κατά μικρές ομάδες σε ορισμένες μόνο περιοχές του κυττάρου [65,19]. Προσκολλώνται στις ψηκτροειδείς παρυφές του επιθηλίου του λεπτού εντέρου κυρίως μέσω παραγόντων προσκόλλησης που μεταδίδονται με πλασμίδια [67,68].

Για την ανίχνευση και ταυτοποίηση του αντιγόνου O των EPEC χρησιμοποιούνται αρχικά πολυδύναμοι και μεταμονοδύναμοι αντιοροί, ενώ σε περιπτώσεις επιδημιών ακολουθεί και προσδιορισμός του παθογενετικού αντιγόνου H [18,19]. Η θεραπεία βασίζεται στην ενυδάτωση και στην αποκατάσταση των ηλεκτρολυτικών διαταραχών ενώ συχνά χορηγούνται αντιβιοτικά για μείωση της πιθανότητας εξάπλωσης των παθογόνων βακτηριδίων στο περιβάλλον [67].

3. Εντεροδιεισδυτικά E. coli (EIEC)

Προκαλούν δυσεντερία με κύριο σύμπτωμα τη βλενώδη διάρροια, συχνά συνοδευόμενη από πυρετό και βλενοαιματηρές κενώσεις [17,65,18,19]. Μεταδίδονται μέσω μολυσμένων τροφών και νερού, ενώ η μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο, αν και πιθανή, είναι σπάνια. Ο παθογενετικός τους μηχανισμός –όμοιος με αυτόν των Σιγκελλών- έγκειται στη διείσδυση στο βλεννογόνο κυρίως του παχέως εντέρου, τον πολλαπλασιασμό τους εντός των

επιθηλιακών κυττάρων του βλεννογόνου και τελικά στην καταστροφή του επιθηλίου. Οι συχνότεροι ορότυποι είναι οι O143, O144, O16A, O124, O29. Η ταυτοποίησή τους είναι δύσκολη καθώς χαρακτηρίζονται από ποικίλες και διαφορετικές μεταξύ των διαφόρων ορότυπων βιοχημικές ιδιότητες. Για την ταυτοποίησή τους χρησιμοποιούνται η δοκιμασία Senery, η ELISA και οι DNA ανιχνευτές [65].

4.Εντεροαιμορραγικά E. coli (EHEC) ή Shiga toxin producing E. coli (STEC)

Προκαλούν φλεγμονή και αιμορραγία του βλεννογόνου του παχέος εντέρου (αιμορραγική κολίτιδα), με κύρια συμπτώματα τις υδαρείς, αιμορραγικές κενώσεις και κοιλιακό άλγος, απουσία πυρετού [17,65,18,19]. Η σημαντικότερη επιπλοκή της αιμορραγικής κολίτιδας (στο 2-7% των ασθενών) είναι η εμφάνιση αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου με κύρια χαρακτηριστικά την μικροαγγειοπαθητική αιμολυτική αναιμία, τη θρομβοπενία και την οξεία νεφρική ανεπάρκεια [18].

Η θνησιμότητα από αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο κυμαίνεται από 3-10%, ενώ το 4-30% των ασθενών παρουσιάζει χρόνιες νεφρικές, καρδιακές και νευρολογικές επιπλοκές [18]. Επιπλέον, ο ορότυπος EHEC O157:H7 αποτελεί το συνηθέστερο αίτιο οξείας νεφρικής ανεπάρκειας [18]. Πηγή των EHEC αποτελούν το μολυσμένο νερό και τροφή, συνήθως το μη καλά μαγειρεμένο βοδινό κρέας, ενώ η μετάδοση γίνεται μέσω της εντεροστοματικής οδού [18]. Χαρακτηριστικό των EHEC είναι ότι αντέχουν σε χαμηλό (όξινο) pH με αποτέλεσμα να επιβιώνουν στο γαστρικό υγρό. Η παθογενετική τους δράση βασίζεται στην παραγωγή δύο τύπων τοξινών [(verotoxin ή Shiga like toxin (SLT)): verotoxin 1 ή SLT-I και verotoxin 2 ή SLT-II, και στην επακόλουθη αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης. Και οι δύο τοξίνες αποτελούνται από 5 υπομονάδες B και μια υπομονάδα A. Μετά την είσοδό της στο κύτταρο-ξενιστή, η υπομονάδα A διασπάται σε δύο μόρια, εκ των οποίων το τμήμα A1 προσδένεται στην υπομονάδα 28S του ριβοσωμικού rRNA, με αποτέλεσμα την αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης [69]. Η γενετική πληροφορία για τη σύνθεση των δύο αυτών τοξινών μεταφέρεται από βακτηριοφάγο [69]. Υπάρχουν πάνω από 50 ορότυποι EHEC, όμως ο επικρατέστερος και γνωστότερος είναι ο O157:H7, ο οποίος ταυτοποιείται εύκολα γιατί δεν ζυμώνει τη σορβιτόλη [69,65].

5.Διάχυτης προσκόλλησης E. Coli (DAEC)

Η προσκόλλησή τους είναι διάχυτη. Ο τρόπος αυτός της προσκόλλησης θεωρείται πιθανός από την παρατήρηση, ότι τα στελέχη αυτά απαντώνται είτε μεμονωμένα είτε διάσπαρτα στην επιφάνεια Her-2 κυττάρων (καρκινική κυτταρική σειρά

λάρυγγος) [21]. Τα στελέχη της *E. coli* που απομονώνονται σε πυελονεφρίτιδα, έχουν σχεδόν πάντοτε το K1 αντιγόνο, ενώ αυτά που απομονώνονται σε κυστίτιδες δεν το έχουν, ή έχουν ένα άλλο από τα 5K αντιγόνα που βρέθηκαν [23, 22]

Οι συχνότεροι ορότυποι στην πυελονεφρίτιδα είναι οι O1:K1, O75:K1, O18:K1. Ουροπαθογόνα στελέχη που φέρουν το αντιγόνο K1 και μοιάζουν με τα ουροπαθογόνα, προκαλούν μηνιγγίτιδα , συνοδευόμενη από μικροβιαμία. Επιπλέον, η *E. coli* μπορεί να προκαλέσει πυώδεις φλεγμονές και αποστήματα σε διάφορους ιστούς και όργανα, καθώς και χολοκυστίτιδα,προστατίτιδα, κολπίτιδα.

6. Αυτοσυγκολλούμενα κυτταροπροσκολλητικά *E. coli* (EaggEC)

Τα EaggEC *E. coli* προκαλούν επίσης υδαρείς και βλεννώδεις κενώσεις, συνοδευόμενες από χαμηλό πυρετό και έμετο , τόσο στις αναπτυσσόμενες όσο και στις αναπτυγμένες χώρες. Επίσης, διάρροια εξαιτίας μόλυνσης από EaggEC έχει παρατηρηθεί και σε ασθενείς με AIDS. Σε αντίθεση με τα EPEC *E. coli*, τα EaggEC προσκολλώνται κατά συμπαγείς ομάδες (aggregates) αλλά αυτός ο τύπος προσκολλησεως δεν σχετίζεται με την παθογόνο δράση τους. Αναφέρεται ότι μετά την προσκόλλησή τους τα EaggEC επάγουν την έκκριση βλέννας, η οποία σχηματίζει ένα προστατευτικό στρώμα γύρω από την *E. coli* και πιθανώς εμποδίζει την απορρόφηση θρεπτικών συστατικών από τα κύτταρα του εντέρου [17,19].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1 Klebsiella spp.

3.1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Η *Klebsiella* είναι το πέμπτο γένος της οικογένειας των Enterobacteriaceae. Κατά το Bergey's manual [24], στο γένος αυτό ανήκουν 4 είδη και 2 υποείδη, τα οποία είναι τα εξής:

- Klebsiella pneumoniae* subsp. *Pneumoniae*
- K. pneumoniae* subsp. *Rhinoscleromatis*
- K. pneumoniae* subsp. *Ozaenae*
- K. oxytoca*
- K. terrigena*
- K. planticola*

Οι *K. Ozaenae* και *K. rhinoscleromatis* θεωρούνται σαν υποείδη της *K. pneumoniae* λόγω της ομοιότητας των με αυτήν στη σύνθεση του DNA.

Στελέχη που υδρολύουν την ορνιθίνη φέρονται σαν ξεχωριστό είδος με το όνομα *K. Ornitholitica* ή σαν *Klebsiella* group 47.

Όλα τα είδη έχουν τους γενικούς φαινοτυπικούς χαρακτήρες της οικογένειας των εντεροβακτηριακών. Χαρακτήρες του γένους διαχωριστικοί θεωρούνται η παρουσία ελύτρου και η εξ αυτού παραγωγή βλενωδών αποικιών, η έλλειψη κινητικότητας και η αδυναμία υδρολύσεως ορνιθίνης (εκτός μερικών στελεχών) που σχεδόν όλα τα άλλα γένη των εντεροβακτηριακών υδρολύουν. Τυπικό είδος του γένους είναι η *Klebsiella pneumoniae* subsp. *Pneumoniae*.

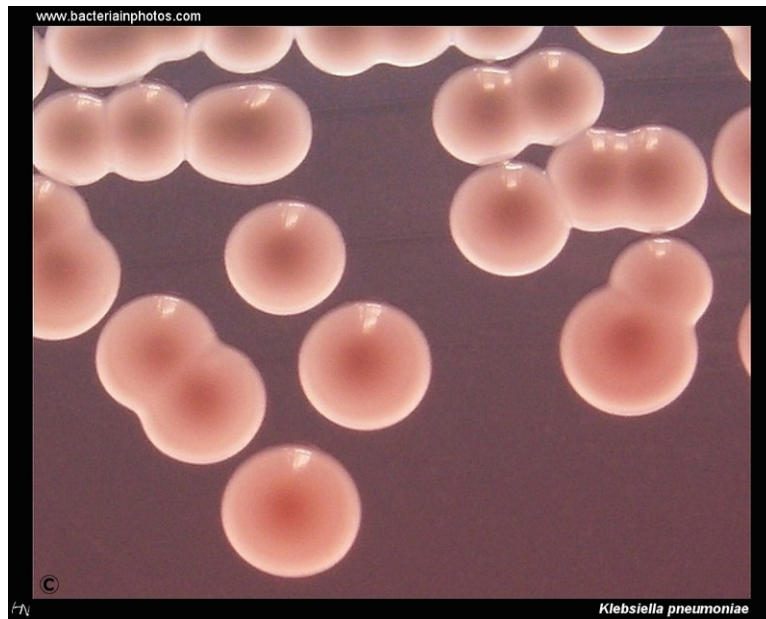
3.1.2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

Είναι Gram αρνητικό βακτηρίδιο, ακίνητο, μήκους 1-2 μm κάπως κοντύτερο από την *E. coli* και τα άλλα εντεροβακτηριακά, μόνο του ή σε ζεύγη σαν διπλοβάκιλλος ή σε κοντές αλυσίδες. Περιβάλλεται από κάψα δηλαδή έλυτρο που όταν είναι πολύ παχύ είναι ορατό με το οπτικό μικροσκόπιο. Έχει ινίδια τύπου 1 και 3. Είναι ασπορογόνο, αερόβιο και προαιρετικά αναερόβιο. Στο μόριο του DNA του τα C+G αποτελούν το 52-55%. [72]

3.1.3 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Αναπτύσσεται στα κοινά θρεπτικά υλικά. Υλικό εκλογής για εύκολη αναγνώριση της είναι το άγαρ MacConkey. Οι αποικίες της πάνω σε αυτό είναι μεγάλες, κόκκινες από τη διάσπαση της λακτόζης, υδαρείς, πολύ γυαλιστερές και βλενώδεις. Καμιά φορά είναι τόσο πολύ η παραγωγή βλέννης που όταν ακουμπήσουμε στην αποικία

με τον κρίκο κολλά σε αυτόν η βλέννη.Υπάρχουν όμως και αποικίες μη βλεννώδεις που δεν ξεχωρίζουν από τις αποικίες της E. coli που εμφανίζονται στις ανακαλλιέργειες.Στον ζωμό αναπτύσσεται άφθονα και σε λίγες ημέρες όλος ο ζωμός γίνεται μια βλεννώδης μάζα. Στο MacConkey μερικά στελέχη δεν αναπτύσσονται. Στο θρεπτικό άγαρ οι αποικίες είναι επίσης μεγάλες και βλεννώδεις και έχουν ένα χρώμα γκριζόλευκο. Ρυτιδώδεις R-αποικίες(Rough) σπάνια αναπτύσσονται.[72]



Εικόνα 7: Αποικίες από Klebsiella pneumoniae σε MacConkey agar



Εικόνα 8: Klebsiella σε MacConkey agar

3.1.4 ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Η *Klebsiella* είναι από τα πιο ενεργά εντεροβακτηριακά. Ζυμώνει τη γλυκόζη, τη λακτόζη και πολλά σάκχαρα όχι μόνο με παραγωγή οξέος αλλά και αερίου. Αλλά οι πιο χαρακτηριστικές βιοχημικές ιδιότητες είναι :

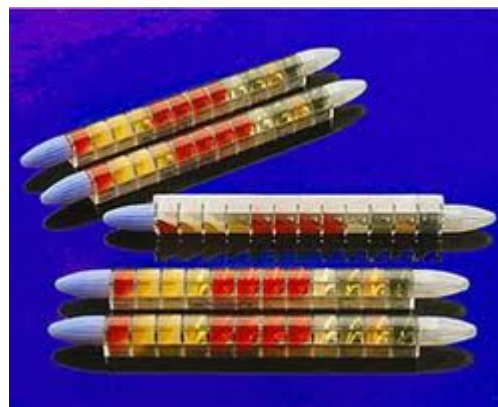
- Ινδόλη (-) (παράρτημα, εικ. 2)
- λυσίνη (+)
- Methyl Red M.R. (-)
- Voges-Proskauer V.P. (+) (παράρτημα, εικ. 3)
- Κιτρικά (+)
- Ουρία (+) (παράρτημα, εικ. 4)
- Λυσίνη (+)
- Ορνιθίνη (-)
- Κινητικότητα (-)
- Αέριο από γλυκόζη (+)
- Φαινυλαλανίνη (PPA) (-)
- H₂S (-)

Από τις σακχαροδιασπαστικές της ιδιότητες η πιο χαρακτηριστική είναι η παραγωγή αερίου από το άμυλο ,ιδιότητα που την ξεχωρίζει από τα εντεροβακτήρια.

Ευνοική θερμοκρασία αναπτύξεως είναι η των 47°C και οι ακραίες αναπτύξεως της,απο 12°C μέχρι 43°C.Καταστρέφεται με θέρμανση στους 55°C για 30 λεπτά.Επιζεί στην ξήρανση για μήνες.[72]

3.1.5 ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΔΟΜΗ

Δύο είναι τα κύρια αντιγόνα της *Klebsiella*.Το K-αντιγόνο ελύτρου και το O-σωματικό LPS(λιποπολυσακχαριδικό)αντιγόνο.Βάσει των δύο αυτών αντιγόνων η *Klebsiella* διαχωρίζεται σε K-τύπους και σπανιότερα σε O-τύπους.



Εικόνα 9: enterotubes

O-τύποι υπάρχουν έντεκα. Οι τέσσερις από αυτούς έχουν αντιγονική ομοιότητα με τα O-αντιγόνα της E.coli. Για την οροτυπία της Klebsiella δεν χρησιμοποιούνται τα O-αντιγόνα, πρώτα γιατί είναι λιγότερα από τα K, και δεύτερο γιατί τα O-αντιγόνα παρουσιάζουν αντιγονικές ομοιότητες με τα O-αντιγόνα της E.coli. Επιπλέον είναι δυσκολότερο να παρασκευασθούν αντι-O οροί από ό,τι αντι-K οροί. Λόγω της θερμοανθεκτικότητας των K-αντιγόνων είναι δύσκολο να παρθεί καθαρό O-αντιγόνο για την παρασκευή των O-ορών.

Τα K-αντιγόνα είναι στα περισσότερα στελέχη μονοσακχαριδικά και περιέχουν γλυκουρονικό οξύ και 2-3 σακχαρίδια έχουν αντιγονικές ομοιότητες με τα K-αντιγόνα του πνευμονιοκόκκου, της E.coli και της Salmonella B-ομάδας. Βάσει αυτών διαχωρίζονται σε τύπους A, B, C έως F. Κατ'άλλους διαχωρίζονται 82K τύποι (1, 2, 3, 4, 5, 6 82)

Άλλα αντιγόνα είναι τα ινιδιακά. Η Klebsiella παράγει ένα είδος ινιδίων πυκνών που δίνουν αιμοσυγκόλληση μανόζη ευαίσθητη και έναν άλλο τύπο αραιών και λεπτών ινιδίων που συγκολλούν ερυθρά βοδιού κατεργασμένα με ταννίνη ανθεκτική στη μαννόζη.

Υπάρχουν και R-αντιγόνα που αποκαλύπτονται μετά την απώλεια των K- και O-αντιγόνων.

Η **οροτυπία K** προηγήθηκε των μελετών για τα άλλα αντιγόνα γιατί επιτρέπει την εύκολη αναγνώριση διαφορών μεταξύ των διαφόρων στελεχών. Έτσι οι πρώτοι έξι K τύποι δηλαδή οι τύποι 1, 2, 3, 4, 5 και 6 βρίσκονται μεταξύ των στελεχών που απομονώνονται από το αναπνευστικό. Π.χ. στον τύπο 3 περιλαμβάνονται όλα τα στελέχη K. rhinoscleromatis τα απομονούμενα από πτύελα, και στους τύπους 4, 5, 6 ή K. ozaenae. Ο τύπος 2 έχει αντιγονική ομοιότητα με τον πνευμονιόκοκκο τύπου 2 και σ' αυτόν ανήκουν στελέχη από πνευμονία.

Η τεχνική της οροτυπίας είναι η κλασική της εξοιδήσεως του ελύτρου και μικροσκόπηση με σινική μελάνη. Στο εμπόριο υπάρχουν αρκετοί K-αντι-οροί. Γίνεται και με άλλες μεθόδους. [72]

3.1.6 ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

Η Klebsiella είναι μικρόβιο κοινό της φυσιολογικής χλωρίδας του σώματος και του περιβάλλοντος αλλά είναι ευκαιριακά παθογόνο. Δεν παράγει τοξίνες αλλά προκαλεί ποικιλία νόσων και ιδιαίτερα όταν συντρέχει οποιαδήποτε μείωση της φυσικής άμυνας.

Στα ποντίκια προκαλούν βαριά νόσο οι K-τύποι 1 και 2 όταν το στέλεχος βρίσκεται σε smooth φάση. [72]

3.1.7 ΝΟΣΟΙ ΑΠΟ KLEBSIELLA

Πνευμονία. Από τις διάφορες πνευμονίες διαφορετικής αιτιολογίας η Klebsiella αποτελεί το 0,5-5%. Συνήθως είναι δευτεροπαθείς αλλά υπάρχουν και πρωτοπαθείς. Προδιαθεσικοί παράγοντες είναι κάθε μείωση της φυσικής άμυνας, η ύπαρξη νόσων του αναπνευστικού ή βλαβών του πνευμονικού ιστού, ο διαβήτης κ.ά. Προκαλείται από τους K-τύπους 1,2 και 3. Η κλινική εικόνα είναι παρόμοια με αυτή της πνευμονιοκοκκικής πνευμονίας αλλά σαν πιο διαβρωτικό μικρόβιο που φαίνεται να είναι η Klebsiella, προκαλεί τήξη ιστών και δημιουργία πνευμονικών αποστημάτων. Η νόσος είναι βαριά με υψηλή θνητότητα αν παραμείνει χωρίς θεραπεία. Συνοδεύεται συχνά από μικροβιαϊμία. Η θεραπεία γίνεται με κεφαλοσπορίνες σε συνδυασμό με γενταμικίνη ή άλλη αμινογλυκοσίδη. Είναι ανθεκτική στην πενικιλίνη. Η οξεία βρογχοπνευμονία είναι μια άλλη αναπνευστική νόσος από Klebsiella.

Ουρολοιμώξεις. Η Klebsiella είναι το δεύτερο κατά σειρά μετά την E.coli αίτιο ουρολοιμώξεων. Είναι συχνότερη στις υποτροπές και στις ουρολοιμώξεις που δεν υποβλήθηκαν σε σωστή θεραπεία. Είναι συχνότερη και από την E.coli στις ουρολοιμώξεις από αποφρακτική ουροπάθεια. Στις δευτεροπαθείς ουρολοιμώξεις όπως στις αποφρακτικές ουροπάθειες συνυπάρχει με πρώττα συνήθως αλλά όχι σπάνια με E.coli ή με Enterococcus. Οι ουροπαθογόνοι ορότυποι ανήκουν συχνά στους K-τύπους 8,9 και 10.

Μηνιγγίτις και σηψαιμία . Η μηνιγγίτις και σηψαιμία από Klebsiella εμφανίζονται υπό μορφή μολύνσεων επιδημικών και ενδημικών. Είναι βαριά νοσήματα με υψηλή θνητότητα. Το στέλεχος το επιδημικό είναι συνήθως πολυανθεκτικό στα αντιβιοτικά.

Ενδοτοξικό σοκ. Παρατηρείται σε ζώα με σηψαιμία και σε ζώα που παίρνουν ενδοφλέβια υγρά μολυσμένα με Klebsiella.[72]

Μαστίτιδα. Η μαστίτιδα που προκαλείται είναι οξείας ή υπεροξείας μορφής και συχνά το ζώο αντιδρά δυσμενώς στην θεραπεία.

Λοιμώδης μητρίτιδα των ιπποειδών. Αναπαραγωγική ασθένεια που μεταδίδεται σεξουαλικά από άλογο σε άλογο, με τεχνητή γονιμοποίηση εάν το σπέρμα του επιβήτορα έχει μολυνθεί ή έμμεσα μέσω μολυσμένου νερού ή των μέσων. Προκαλεί στειρότητα και μερικές φορές την αποβολή.

3.1.8 ANTIBIOTIKA

Εξαρχής είναι εντεροβακτηριακό ανθεκτικό στα αντιβιοτικά περισσότερο από την Escherichia coli. Είναι ανθεκτικό στην πενικιλίνη, την αμπικιλίνη και την καμπενικιλίνη. Επειδή όμως εύκολα μολύνεται από παράγοντες αντοχής σχεδόν όλα τα νοσοκομειακά στελέχη παρουσιάζουν πλασμιδιακή [25,70] αντοχή σε πολύ

περισσότερα αντιβιοτικά συμπεριλαμβανομένων κεφαλοσπορίνων και αμινογλυκοσιδών.[71]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4.1 SALMONELLA

4.1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Είναι το τρίτο κατά σειρά γένος της οικογένειας των Enterobacteriaceae, και το συχνότερο αίτιο εντερολοιμώξεων στις υγειονομικά προοδευμένες χώρες.

Κατά το Bergey's Manual [26] όλες οι σαλμονέλλες και οι αριζόνες ανήκουν σε ένα είδος το οποίο συνίσταται από πέντε υπογενή I, II, III, IV, V. Σε κάθε υπογένος υπάγονται ορισμένοι βιότυποι ως ακολούθως [27]:

-Υπογένος I :Τυπικές σαλμονέλλες

S.choleraesuis

S.hirschfeldii

S.typhi

S.paratyphi-A

S.schotmuelleri

S.typhimurium

S.enteritidis

S.gallinarum

-Υπογένος II: Άτυπες σαλμονέλλες

S.salamae

-Υπογένος III: >>>>

S.arizonae

-Υπογένος IV :>>>>

S.houtenae

-Υπογένος V : Δουλισιτόλη ,ONPG και KCN (+)

S.bongori

Κατά την ταξινόμηση κατά Ewing[28] οι σαλμονέλλες ανήκουν στη φυλή Salmonelleae με ένα γένος Salmonella και ένα είδος τη S.enterica. Το είδος αυτό εμφανίζεται με 5 υποειδή τα εξής :

- 1.Salmonella enterica subsp.Enterica
- 2.S.enterica subsp.Salamae
- 3.S.enterica subsp.Arizonae ,S.enterica subsp.Diarizonae
- 4.S.enterica subsp.Houtenae
- 5.S.enterica subsp.Bongori

Κατά την ταξινόμηση του CDC [29] στο γένος Salmonella ανήκουν οι εξής υποομάδες: Στην 1^η υποομάδα ανήκουν στελέχη των οροτύπων Salmonella serotype choleraesuis, Salmonella serotype paratyphi, Salmonella serotype gallinarum, Salmonella serotype pullorum.

Στις άλλες υποομάδες ανήκουν τα στελέχη :

S.salamae, S.arizonae , S.diarizonae, S.houtenae ,S.bongori και S.choleraesuis subsp.indica.

Τα γένη ,υπογένη ,είδη και υποείδη των σαλμονελλών έχουν τους γενικούς φαινοτυπικούς χαρακτήρες της οικογένειας των Enterobacteriaceae, ήτοι διασπούν την γλυκόζη και ανάγουν τα νιτρικά και τους ειδικούς χαρακτήρες του γένους που επιτρέπουν το διαχωρισμό από τα άλλα γένη της οικογένειας.

Οι ειδικοί χαρακτήρες του γένους είναι οι εξής:

- **Δεν διασπούν τη λακτόζη**
- **Είναι κινητά βακτήρια**
- **Παράγουν αέριο από τη διάσπαση της γλυκόζης**
- **Διασπούν τη λυσίνη**
- **Παράγουν H₂S**

Πίνακας 2.		
Είδη σαλμονέλων, υποείδη, ορότυποι, και οι συνηθισμένοι βιότοποί τους, σχέδιο Kaufmann-White		
Είδη και υποείδη σαλμονέλων	Αριθμός ορότυπων στα υποείδη	Συνηθισμένος βιότοπος
<i>S. enterica</i> subsp. <i>Enterica</i> (I)	1454	Θερμόαιμα ζώα
<i>S. enterica</i> subsp. <i>Salamae</i>	489	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
<i>S. enterica</i> subsp. <i>Arizonae</i>	94	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
<i>S. enterica</i> subsp. <i>Diarizonae</i>	324	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
<i>S. enterica</i> subsp. <i>Houtenae</i>	70	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
<i>S. enterica</i> subsp. <i>Indica</i>	12	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
<i>S. bongori</i>	20	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον

Πίνακας 2: πίνακας Kaufmann-White

4.1.2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

Είναι μικρόβια Gram αρνητικά ,κινούμενα με περίτριχες βλεφαρίδες.Μόνο δύο είδη είναι ακίνητα η *S.gallinarum* και η *S.pullorum*.Είναι αερόβια ,ασπορογόνα,καταλάση θετικά ,οξειδάση αρνητικά.Δεν έχουν έλυτρο εκτός από τη *S.typhi* που παράγει κάψα όταν καλλιεργηθεί στους 22°C.Έχουν ινίδια .Διασπούν τη γλυκόζη με παραγωγή αερίου εκτός από τη *S.typhi* που δεν παράγει αέριο και σπανιότατα μερικοί μεταλλάκτες των άλλων σαλμονελλών.Δεν ζυμώνουν τη λακτόζη και δεν παράγουν β-γαλακτοσιδάση.Το ποσοστό της δυάδας G+C στο μόριο του DNA είναι 50-53%.Όλες οι σαλμονέλλες λύνονται από ένα συγκεκριμένο φάγο τον O1 των Felix-Callow που τον απομόνωσαν και από τότε χρησιμοποιείται ευρέως ως διαγνωστικό τέστ για αυτό το είδος.[74]



Εικόνα 10: Salmonella σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

4.1.3 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Αναπτύσσονται στα κοινά θρεπτικά υλικά .Οι αποικίες στο θρεπτικό άγαρ είναι σχετικά μεγάλες ,διαμέτρου 2-3 mm, χαμηλές ,κυκλικές, με περιφέρεια λοβώδη ,γυαλιστερές μάλλον διαφανείς. Αλλά μπορεί να είναι και πολύ μικρές .Στο MacConkey agar είναι άχρωμες μικρότερες από ότι στο άγαρ στο οποίο είναι διαφανείς. Στον ζωμό προκαλούν διάχυτη θολερότητα. Αναπτύσσονται στα ειδικά εκλεκτικά θρεπτικά υλικά των σαλμονελλών στα οποία δεν αναπτύσσεται η E.coli και τα άλλα εντεροβακτηριακά. Τέτοια ειδικά υλικά είναι το SSagar ,το XLDagar, το άγαρ με δεσοξυχολικό(DCA), το Wilson-Blair ,το άγαρ με στίλβον πράσινο, ο ζωμός με σεληνίτη. Ευνοική θερμοκρασία αναπτύξεως είναι η των 37°C αλλά αναπτύσσονται και σε άλλες θερμοκρασίες από 10°C έως 42°C .Αναπτύσσονται ακόμη σε συνθετικά υλικά όπως το υλικό Koser όπου η μόνη πηγή άνθρακος είναι το κιτρικό νάτριο. Βλεννώδεις αποικίες εμφανίζονται στο άγαρ όταν παραταθεί η επώαση.[74]

4.1.4 ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Οι βασικές βιοχημικές ιδιότητες είναι οι εξής:

-Ινδόλη (-)

-Methyl Red (MR) (+)

- Voges-Proskauer (VP) (-)

-Κιτρικά (+)

-NO₃ (+)

-Απαμίνωση της φαινυλαλαμίνης(PPA) (-)

-KCN (-)

-Λυσίνη (+)

-Ορνιθίνη (+)

-ONPG (-)

-H₂S (+)

-Ουρία (-)

-Λακτόζη (-)

-Γλυκόζη (+)(οξύ και αέριο)

-Σουκρόζη (-)

-Σαλικίνη (-)

Kliglerυλικό :Αλκαλικό/όξινο /H₂S/αέριο

Από τις ιδιότητες αυτές οι πιο σταθερές είναι :

MR (+),VP (-),Ουρία (-),PPA (-).

Η S.typhi διαφέρει από τις άλλες σαλμονέλλες κατά το ότι :δεν παράγει αέριο από τη διάσπαση της γλυκόζης ,δεν αποκαρβοξυλιώνει την ορνιθίνη και δεν αναπτύσσεται στο κιτρικούχο υλικό.[74]

4.1.5 ΟΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ

Οι ορολογικές εξετάσεις που γίνονται για την ταυτοποίηση των σαλμονελλών είναι:

- **Αναζήτηση αντισωμάτων στο αίμα**
- **Οροαντίδραση WIDAL**
- **Μικροσυγκολλητιναντίδραση**
- **Συγκολλητιναντίδραση Felix**
- **Συγκόλληση σωματιδίων Latex**
- **Αντίδραση έμμεσης αιμοσυγκόλλησης**
- **Αναζήτηση αντι-Vί αντισωμάτων**
- **Αναζήτηση σαλμονελλικών αντιγόνων στο αίμα και τα ούρα**

Κατά την πορεία των διεισδυτικών σαλμονελλώσεων ,όπως στον τυφοειδή πυρετό ,στους παράτυφους,τις εξωεντερικές σαλμονελλώσεις,εμφανίζονται στον ορό του αίματος αντισώματα IgM στην αρχή ,IgG μετά ,σε αυξανόμενο τίτλο.Η παρουσία των αντισωμάτων γίνεται αντιληπτή με διάφορες ανοσολογικές μεθόδους η πιο απλή από τις οποίες είναι η συγκόλληση της ομόλογης ομάδας ή είδους σαλμονέλλας.[30]Η οροδιαγνωστική των σαλμονελλώσεων με την μέθοδο αυτή είναι γνωστή σαν αντίδραση WIDAL.[31]Είναι από τις παλαιότερες εργαστηριακές μεθόδους διαγνώσεως που παρ'όλες τις αμφισβητήσεις για την αξία και την χρησιμότητα της εξακολουθεί να ζητείται και να αποτελεί την εξέταση πρώτης εκλογής για τους περισσότερους κλινικούς ιατρούς που μπορεί να ξεχάσουν να ζητήσουν μια καλλιέργεια κλινικού δείγματος ή ακόμη και αιμοκαλλιέργειας ποτέ όμως δεν ξεχνούν την WIDAL.[74]

4.1.6 ΟΡΟΛΟΓΙΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΟΡΟΤΥΠΙΑ ΣΑΛΜΟΝΕΛΛΩΝ

Για την οροτυπία κάθε σαλμονέλλας χρειάζονται αρκετοί οροί αλλά για την ορολογική ταυτοποίηση του μικροβίου σαν σαλμονέλλας και την οροτυπία των κοινών σαλμονελλών όπως του τυφοειδούς,των παρατύφων Α,Β και C μερικών συχνών εντεροπαθογόνων σαλμονελλών που απαντούν στη χώρα μας χρειάζονται λίγοι οροί που προσφέρονται στο εμπόριο από πολλούς Οίκους.Είναι όλοι οροί ζώνων ανοσοποιηθέντων με τα αντιγόνα των σαλμονελλών από τους οποίους με

προσροφήσεις έχουν παρασκευασθεί οι μονοδύναμοι οροί. Η ποιότητα των ορών αυτών δεν είναι πάντοτε καλή γιατί δεν είναι καλά προσροφημένοι και δίνουν αντιδράσεις με δύο διαφορετικά αντιγόνα. Είναι οροί συγκολλητικοί αραιωμένοι στον τίτλο τους. Οι οροί που θα πρέπει να προμηθευθεί ένα καλό εργαστήριο με συχνές απομονώσεις σαλμονελλών είναι οι εξής :

Οροί συγκολλητικοί	Αριθ. Ορών	Αντισώματα που περιέχουν
Πολυδύναμος ορός	1	Αντισώματα προς τα Ο-αντιγόνα των ομάδων A,B,C1,C2,D,E1,E2,Vi
Μονοδύναμοι οροί αντι-Ο	9	Αντισώματα σε κάθε ορό χωριστά για τα A,B,C1,C2,D1,D2,E1,E2,E3
Μονοδύναμοι οροί αντι-Η 1 ^{ης} φάσεως	12	Αντισώματα προς τα Η-αντιγόνα 1 ^{ης} φάσεως a,b,c,d,eh,l,k,lv,r,y,gm,gst
Μονοδύναμοι οροί αντι-Η 2 ^{ης} φάσεως	5	Αντισώματα προς τα Η-αντιγόνα 2 ^{ης} φάσεως 1,2 1,5 1,6 ,enx ,Z6
Μονοδύναμος αντι-Vi	1	Αντισώματα προς το Vi

Με τους ορούς αυτούς γίνεται η ταυτοποίηση των περισσοτέρων σαλμονελλών. Σε ένα μικρότερο εργαστήριο ή σε ιδιωτικό μπορεί να χρησιμοποιηθούν ακόμη λιγότεροι οροί μεταξύ των οποίων οι απαραίτητοι είναι οι εξής:

Πολυδύναμος ορός αντι-Ο

Μονοδύναμοι οροί των ομάδων B,C1,C2 και D

Μονοδύναμοι αντι-Η οροί b,c,d,i

Μονοδύναμος αντι- Vi

Η πλήρης οροτυπία κάθε σαλμονέλλας είναι έργο των Εθνικών Κέντρων όπου μπορεί κάθε γιατρός μικροβιολόγος να στείλει τη σαλμονέλλα που απομόνωσε για ταυτοποίηση και οροτυπία.

Τεχνική. Η καλλιέργεια του μικροβίου για την ταυτοποίηση και την οροτυπία πρέπει να είναι καθαρή, ελεγμένη, άφθονη πάνω σε θρεπτικό άγαρ, κατά προτίμηση 24ωρη. Πάνω σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετούμε δύο σταγόνες πυκνό εναιώρημα του μικροβίου που εξετάζουμε σε ισότονο διάλυμα NaCl. Στη μια προσθέτουμε μια σταγόνα από τον πολυδύναμο ορό και ανακατεύουμε με τον κρίκο καλά. Η άλλη σταγόνα παραμένει σαν μάρτυρας τυχόν αυτοσυγκόλλησης. Κινούμε την πλάκα μπρος πίσω για να βοηθήσουμε την

συγκόλληση. Αν το μικρόβιο είναι σαλμονέλλα θα προκληθεί σαφής συγκόλληση στη σταγόνα όπου έχουμε βάλει τον πολυδύναμο ορό. Αν δεν γίνει καμία συγκόλληση θα βάλουμε στην άλλη σταγόνα τον αντι-Vί ορό και θα ανακατέψουμε για να πεισθούμε ότι η μη συγκόλληση με τον πολυδύναμο ορό δεν οφείλεται σε παρουσία Vί αντιγόνου στην επιφάνεια του μικροβίου που παρεμποδίζει την Ο-συγκόλληση. Αν το μικρόβιο συγκολλήθηκε με τον πολυδύναμο ορό θα προχωρήσουμε στις δοκιμές συγκολλήσεως με τους πολυδύναμους αντι-Ο ορούς αρχίζοντας από τους αντι-B και αντι-D και εφόσον δεν συγκολληθεί με αυτούς θα δοκιμάσουμε με τους άλλους αντι-Ο ορούς που διαθέτουμε. Το μικρόβιο θα συγκολληθεί με κάποιον από αυτούς. Στη συνέχεια θα κάνουμε τις δοκιμές συγκολλήσεως με τους αντι-H ορούς της αντίστοιχης ομάδας. Στις περισσότερες περιπτώσεις θα πάρουμε ένα τελικό αποτέλεσμα ικανοποιητικό. Παράδειγμα ταυτοποιήσεως σαλμονέλλας:

Πολυδύναμος ορός : (+)

Μονοδύναμοι αντι-Ο: αντι-D(-) αντι-B (+)

Μονοδύναμοι αντι-H : αντι-b(-), αντι-I (+)

Μονοδύναμοι αντι-H 2^{ης} φάσεως αντι-1,2(+)

Συμπέρασμα : *Salmonella typhimurium* αντιγονική φόρμουλα= 1,4,5,12:i:1,2.

Αν ήταν *S.typhi* θα έδινε τις εξής συγκολλήσεις :

Πολυδύναμος (+)

Αντι-D (+)

Αντι-d (+)

Αντι-1,2(-)

Αν το μικρόβιο δεν συγκολληθεί με κανέναν από τους περισσότερους ορούς που διαθέτουμε ή αν συγκολληθεί με περισσότερους από έναν ορό, πράγμα που δεν είναι σπάνιο δεν σημαίνει ότι το μικρόβιο δεν είναι σαλμονέλλα.

Οι παράγοντες που παρεμβαίνουν στις αντιδράσεις αυτές είναι οι εξής:

Από μέρος του μικροβίου. Μπορεί να μη ανέπτυξε μερικά από τα βλεφαριδικά του αντιγόνα ή μπορεί να έχασε κάποιο από τα Ο-αντιγόνα του. Μπορεί να έχει αναπτύξει πολλά περιβληματικά και ινιδιακά αντιγόνα που παρεμβαίνουν στις αντιδράσεις με τους διάφορους ορούς. Μπορεί να είναι μια σπάνια σαλμονέλλα που δεν την πιάνουν οι οροί που έχουμε.

Από μέρους των ορών οι περισσότεροι από τους αστάθμητους παράγοντες είναι :Οροί αδύνατοι, κακώς διατηρημένοι,οροί που έληξε η προθεσμία χρήσεως, οροί δευτέρας διαλογής που διοχετεύονται στην ελληνική αγορά.Αυτοί είναι συνήθως οροί κακώς προσροφημένοι διατηρούντες δηλαδή αντισώματα για περισσότερα από ένα Η-αντιγόνα.Συνήθως είναι αδύνατος ο αντι-Ι ορός και πολύ μικτός και μη ειδικός ο αντι-d ορός.

Πιο καλοί είναι οι οροί που περιέχουν μονοκλωνικά αντισώματα όπως ο Mab(Monoclonal antibody) [32].Αυτός αντιδρά με το O:8 πολυσακχαρίδιο των σαλμονελλών της C2 και C3 ομάδας και τις διαχωρίζει από αυτές της C1 ομάδας.

Ο πιο εύκολος τρόπος οροτυπίας είναι αυτός με το έγχρωμο Latex που παρασκευάζεται σε οίκο της Γαλλίας που φέρεται σαν Wellcolex.Με αυτό αναγνωρίζονται οι συχνότερες οροομάδες των σαλμονελλών και των σιγκελλών.[33]

4.1.7 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Οι μολύνσεις με τα βακτηρίδια του γένους *Salmonella* αποτελούν τον αιτιολογικό παράγοντα για ποικίλες οξείες και χρόνιες παθήσεις στα πτηνά. Τα πουλερικά και τα προϊόντα πουλερικών αποτελούν τη βασική πηγή μόλυνσης του γένους *Salmonella*. Οι πτηνοτρόφοι βρίσκονται αντιμέτωποι με τις αυξανόμενες πιέσεις από τις αρχές δημόσιας υγείας και τους καταναλωτές σχετικά με τα ζητήματα ασφάλειας τροφίμων. Η απομόνωση των *Salmonella* αναφέρεται συχνότερα στα πουλερικά και στα ζωικά προϊόντα αυτών από ότι σε οποιαδήποτε άλλη ζωική πηγή. Αυτό το αποτέλεσμα οφείλεται εν μέρει στην υψηλή επικράτηση των μολύνσεων *Salmonella* στα πουλερικά αλλά απεικονίζει και την εμπορικότητα του πουλερικού και της γαλοπούλας ως ζωικό τρόφιμο, άρα και την επιθυμία για εφαρμογή ενεργών εξεταστικών προγραμμάτων για τα μολυσμένα σμήνη και τα προϊόντα πουλερικών σε πολλές χώρες. Το όλο και μεγαλύτερο διεθνές πεδίο της σύγχρονης βιομηχανίας προϊόντων πουλερικών έχει δημιουργήσει νέες και πιο σύνθετες ευκαιρίες για τη διάδοση του γένους *Salmonella*. [75]

Οι περισσότερες σαλμωνέλλες είναι παθογόνες για τα ζώα και τα πτηνά. Η σαλμονέλωση θεωρείται ζωνόσος διότι η ανθρώπινη ασθένεια επέρχεται από τα μολυσμένα ζώα. Η μετάδοση γίνεται από την απεκκριτική και τη στοματική οδό. Τα ζώα που προσβάλλονται είναι τα πτηνά, οι χοίροι, τα βοοειδή, τα πρόβατα, τα άλογα, τρωκτικά, όλα τα κατοικίδια (από σκύλους μέχρι χελώνες και παπαγάλους) και πολλά άλλα. Στις όρνιθες η *S. gallinarum* προκαλεί τον τύφο των ορνίθων και τη λευκή διάρροια των νεοσσών, ενώ η *S. pullorum* προκαλεί κυρίως τη λευκή διάρροια των νεοσσών. Στις πάπιες, ιδιαίτερα στους νεοσσούς, η *S. typhimurium* και κατά δεύτερο λόγο η *S. enteritidis*, προκαλούν σηψαιμία και διάρροια. Στα περισσότερα σχεδόν αποκλειστικά η *S. typhimurium*, προκαλεί σηψαιμία ή χρόνια

σαλμονέλωση με κλινικά συμπτώματα εντερίτιδας και αρθρίτιδας. Χαρακτηριστικό κλινικό σύμπτωμα είναι η αρθρίτιδα στον αγκώνα, που εμφανίζεται με διόγκωση και τυρώδες περιεχόμενο η οποία αποκαλείται χαρακτηριστικά "κόμπος στο φτερό". Στο χοίρο, η *S. cholerae-suis* προκαλεί χρόνια ή οξύ σηψαιμικής μορφής νόσημα, ή εντοπίζεται σε ορισμένα όργανα, προκαλώντας έκδηλα κλινικά συμπτώματα, όπως διάρροια, βήχα, χλωτότητα και απίσχναση. Επίσης η *S. typhimurium* και η *S. typhi-suis*, συχνά προκαλούν διάρροια στους χοίρους. Στα βοοειδή, οι *S. typhimurium*, η *S. pneumoniae* και η *S. enteritidis* προκαλούν εντερίτιδες, σηψαιμίες και αρθρίτιδες. Η *S. abortus* προκαλεί αποβολές στις αγελάδες. Στο πρόβατο, η *S. typhimurium* και η *S. pneumoniae*, σε ορισμένες περιπτώσεις προκαλούν εντερίτιδες, ενώ η *S. abortus* προκαλεί αποβολές, οι οποίες στη χώρα μας, αποτελούν πρόβλημα στην προβατοτροφία. Στο άλογο, η *S. abortus-equi* προκαλεί αποβολές στις φορβάδες. Η *S. typhimurium* είναι σε θέση να προκαλέσει αποβολές στις φορβάδες, ωστόσο προκαλεί συχνότερα εντερίτιδες [34]. Τα φίδια, οι σαύρες και κυρίως οι χελώνες έχουν αναχθεί τα τελευταία χρόνια σε σημαντική πηγή μόλυνσης από *Salmonella* για τον άνθρωπο. Σύμφωνα με έρευνες το 13% των περιπτώσεων σαλμονέλωσης που εντοπίστηκαν το 1996 στη Σουηδία σχετίζονται με ερπετά. Στις ΗΠΑ υπολογίζεται ότι ποσοστό 3% των νοικοκυρών διαθέτει ένα ερπετό. Η σαλμονέλωση εμφανίζεται μετά από άμεση ή από έμμεση επαφή με τα περιττώματα των ερπετών. Τα κρούσματα σαλμονέλωσης στις περιπτώσεις αυτές είναι αυξημένα στα παιδιά μικρής ηλικίας, επειδή αυτά έρχονται συχνότερα σε επαφή με τα κατοικίδια ερπετά και παράλληλα δεν έχουν αναπτύξει επαρκώς το ανοσοποιητικό τους σύστημα. Η μετάδοση της του γένους *Salmonella* απευθείας από ζώο σε ζώο είναι εύκολη, εξαιτίας της μαζικής τους παραμονής σε συγκεκριμένους χώρους και της ομαδικής τους διακίνησης. Σημαντική είναι ακόμη και η συμβολή των μολυσμένων ζωοτροφών στην μετάδοση της νόσου στα ζώα .

4.1.8 ΠΗΓΕΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ

Οι πηγές μόλυνσης με *Salmonella* για τα πτηνά είναι πολυάριθμες. Τα πουλερικά και πολλά άλλα ζώα είναι συχνά φορείς, συχνότερα μολυσμένα και πιο σπάνια κλινικά άρρωστα, τα οποία μπορούν να εκκρίνουν *Salmonella* με τα περιττώματά τους και να διαμορφώσουν μια μεγάλη δεξαμενή και μια πηγή μόλυνσης για άλλα ζώα, τους ανθρώπους και το περιβάλλον .[34]

Τα πουλερικά μολύνονται συχνά μέσω της οριζόντιας μετάδοσης από τα απορρίμματα, τα περιττώματα, την τροφή, το νερό, τοχνούδι, τη σκόνη, τα ξύσματα, το άχυρο, τα έντομα, τον εξοπλισμό και άλλα και από την επαφή με άλλους νεοσσούς ή κοτόπουλα, τρωκτικά, κατοικίδια ζώα, άγρια πουλιά, οικόσιτα και άγρια

ζώα και με το προσωπικό. Η κάθετη μετάδοση εμφανίζεται όταν μολύνονται τα ωοθυλάκια ή όταν τα αναπτυσσόμενα αυγά μολύνονται στον ωαγωγό.

Τα πρωτόκολλα διαχείρισης μιας πτηνοτροφικής μονάδας μπορούν να έχουν μια σημαντική επιρροή στο βαθμό μετάδοσης της *Salmonella*. Πολλοί από τους παράγοντες που επηρεάζουν την οριζόντια και κάθετη μετάδοση είναι αλληλένδετοι. [75]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

5.1 PROTEUS

5.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Στο γένος αυτό ανήκουν τα εξής είδη :[41]

-P.vulgaris

-P.mirabilis

-P.myxofaciens

-P.rettgeri

Όλα τα είδη έχουν τους βασικούς χαρακτήρες των εντεροβακτηριακών.Είναι Gram αρνητικά βακτηρίδια ,αερόβια που διασπούν τη γλυκόζη με παραγωγή αερίου.Δεν ζυμώνουν τη λακτόζη.Είναι μικρόβια του φυσικού περιβάλλοντος και αποικίζουν τον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου και των ζώων.Απομονώνονται πολύ συχνά από τις καλλιέργειες των κλινικών δειγμάτων συνήθως σαν επιμολύνοντα μικρόβια .

5.1.2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

Ο πρωτέας είναι βακτηρίδιο Gram αρνητικό,μικρό,με πολυμορφισμό και εκφυλωτικές μορφές κατά τη φάση της αναπτύξεως και στασιμότητας και με νηματοειδείς μορφές κατά τη φάση του ερπυσμού.Διατάσσονται μόνα τους ή σε ζεύγη ή σε αλυσίδες και το σώμα τους είναι ευθύ χωρίς κάμψη .Το πιο χαρακτηριστικό μορφολογικό τους στοιχείο είναι οι πολύ μακριές τους βλεφαρίδες .Είναι αερόβια ή προαιρετικά αναερόβια .Η ιδιότητα παραγωγής βλεφαρίδων χάνεται σε μερικά στελέχη οπότε τα στελέχη αυτά λέγονται Ο-στελέχη .Επίσης,πολλά στελέχη έχουν ινίδια.[77]



Εικόνα 11:Ανάπτυξη Proteus σε Blood Agar

5.1.3 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Αναπτύσσονται σε όλα τα κοινά θρεπτικά υλικά .Στο άγαρ δεν παράγουν μεμονωμένες αποικίες αλλά απλώνουν σε όλη την επιφάνεια όσα ερπύζουν .Ο ερπυσμός γίνεται κατά κύματα που διακρίνονται στην επιφάνεια του άγαρ σαν ομόκεντροι κύκλοι που διαχωρίζονται μεταξύ τους με ζώνες λεπτής και πυκνής ανάπτυξης.Ο ερπυσμός αυτός είναι βοηθητικός στην απομόνωση και ταυτοποίηση των πρωτέων αλλά ταυτόχρονα είναι εμπόδιο στην ανάπτυξη και την απομόνωση των άλλων μικροβίων που συνυπάρχουν.Η παρεμβολή αυτή γίνεται πιο ενοχλητική στις καλλιέργειες των κοπράνων γιατί επικαλύπτονται οι αποικίες των άλλων εντεροβακτηριακών.Αναστολή του ερπυσμού γίνεται σε υλικά που περιέχουν χολή ή ταυροχολικό νάτριο όπως είναι το υλικό MacConkey ,το SS άγαρ ,το δεσοξυχολικό κιτρικούχο άγαρ,το XLD κ.α

Αν δύο στελέχη πρωτέα αναπτυχθούν σε δύο απέχοντα σημεία και ερπύζοντα συναντηθούν τότε θα συμβεί το εξής :

Ή σταματά ο ερπυσμός και των δύο στελεχών σε απόσταση μερικών χιλιοστομέτρων ή διεισδύει το ένα κύμα ερπυσμού στο κύμα ερπυσμού του άλλου στελέχους.

Στο MacConkey κάνει άχρωμες αποικίες (δεν ζυμώνει την λακτόζη).Σε υλικά που περιέχουν θειούχες ενώσεις κάνουν μαύρες αποικίες αν παράγουν H₂S.Στο υλικό TSI και στο KLIGLER προκαλούν έντονο μαύρισμα.Οι πρωτείες δεν παράγουν χρωστική στα θρεπτικά υλικά .Στο αιματούχο άγαρ πολλά στελέχη του P.vulgaris προκαλούν αιμόλυση.[77]

5.1.4 ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Σαν εντεροβακτηριακά οι πρωτείες διασπούν τη γλυκόζη με παραγωγή αερίου ,ανάγουν τα νιτρικά,παράγουν καταλάση και δίνουν αρνητική τη δοκιμή οξειδάσης .Έχουν μερικές βιοχημικές ιδιότητες κοινές αλλά και πολλές διαφορετικές .

Βιοχημικές ιδιότητες κοινές σε όλους τους πρωτείες :

- **Κινητικότητα (+)**
- **KCN (-)**
- **Methyl Red (MR) (+)**
- **ONPG (-)** (παράρτημα, εικ.5)
- **Απαμίνωση της φαινυλανίνης(PPA) (+)**
- **Λυσίνη (-)**
- **Αργινίνη (-)**
- **Χρωστική (-)**

Οξύ απο :

Γλυκόζη (+)

Φρουκτόζη (+)

Γαλακτόζη (+)

Αραβινόζη (-)

Σορβιτόλη (-)

Δεν διασπούν :

Λακτόζη (-)

Ινουλίνη (-)

Δουλσιτόλη (-)

5.1.5 ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΔΟΜΗ

Οι πρωτείες έχουν ένα σωματίδιο Ο-αντιγόνο και ένα βλεφαριδικό Η-αντιγόνο. Βάσει των ορολογικών διαφορών που παρουσιάζουν τα αντιγόνα αυτά στα διάφορα στελέχη των πρωτέων διαχωρίζονται σε ορολογικές ομάδες και ορολογικούς τύπους.

Βάσει του κοινού Ο-αντιγόνου, οι *P.vulgaris* και *P.mirabilis* έχουν διαχωρισθεί σε 110 Ο-ορολογικούς τύπους. Επίσης έχουν διαχωρισθεί και σε Η-τύπους. Ο- και Η-ορότυποι διαχωρίσθηκαν και σε άλλα είδη πρωτέων αλλά η οροτυπία δεν έχει χρησιμότητα στη διαγνωστική μικροβιολογία.[77]

5.1.6 ΝΟΣΟΙ ΑΠΟ ΠΡΩΤΕΙΣ

Λοιμώξεις του ουροποιητικού. Ο *Proteus* είναι το τρίτο μετά την *E.coli* και την *Klebsiella* αίτιο των ουρολοιμώξεων.

Στις αποφρακτικές ουροπάθειες προκαλούν πυελονεφρίτιδα μόνοι ή σε συνδυασμό με την *Klebsiella* ή την *E.coli*. Σπανιότερα προκαλεί ουρολοιμώξεις ο *P.vulgaris* που συνήθως βρίσκεται στις μολυσμένες από μικρόβια του σώματος και της περιγεννητικής περιοχής ουροκαλλιέργειας .

Διαπυήσεις τραυματικών επιφανειών. Ο *Proteus* μόνος αλλά συνηθέστερα μαζί με άλλα εντεροβακτηριακά ή με αναερόβια μικρόβια βρίσκονται στις μολύνσεις των χειρουργικών και άλλων τραυμάτων.

Μολύνσεις εγκαυμάτων . Ο *P.rettgeri* καθώς και άλλοι πρωτείες επιμολύνουν τα εγκαύματα.

5.1.7 ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η χημειοθεραπεία θα στηριχθεί στο αντιβιογράμμα.

Ο *Proteus* παρουσιάζει μεγάλη ποικιλία στην ευαισθησία του στα αντιβιοτικά. Πιο ευαίσθητα είναι τα στελέχη του ινδόλη-αρνητικού δηλαδή του *P.mirabilis* . Οι περισσότεροι *Proteus* είναι ανθεκτικοί στην πενικιλίνη ,την αμπικιλίνη και τις κεφαλοσπορίνες με εξαίρεση την κεφοξιτίνη και την κεφαμαντόλη. Είναι ευαίσθητοι στις αμινογλυκοσίδες, δηλαδή στη γενταμικίνη ,την τομπραμυκίνη, τη σισσομικίνη και την αμικασίνη.[77]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

6.1 SHIGELLA

6.1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Είναι το δεύτερο γένος της οικογένειας των εντεροβακτηριακών, μετά το γένος *Escherichia* κατά το *Bergey's Manual*[35,36]. Κατά την ταξινόμηση του CDC[50] δεν είναι ξεχωριστό είδος αλλά μαζί με την *Escherichia* αποτελούν ένα ενιαίο γένος, των *Escherichia-Shigella* γιατί έχουν συγγένεια στη δομή του DNA των κατά 75-100%.

Όλες οι σιγκέλλες έχουν τους ίδιους φαινοτυπικούς χαρακτήρες (καλλιεργητικούς και βιοχημικούς), διαφέρουν μόνο στην αντιγονική δομή. Βάση της διαφοράς αυτής οι σιγκέλλες διαχωρίστηκαν σε είδη ή υποομάδες A,B ,C και D. Όπως και να χαρακτηρισθούν τα 4είδη ή ομάδες φέρουν όνομα είδους και είναι τα εξής.

Η *Shigella dysenteriae* με 10 ορότυπους, η *S.flexneri* με 13 ορότυπους και υποτύπους και υποείδη, η *S.boydii* με 15 οροτύπους και η *S.sonnei* χωρίς αντιγονικές διαφορές των στελεχών της χωρίς δηλαδή οροτύπους.

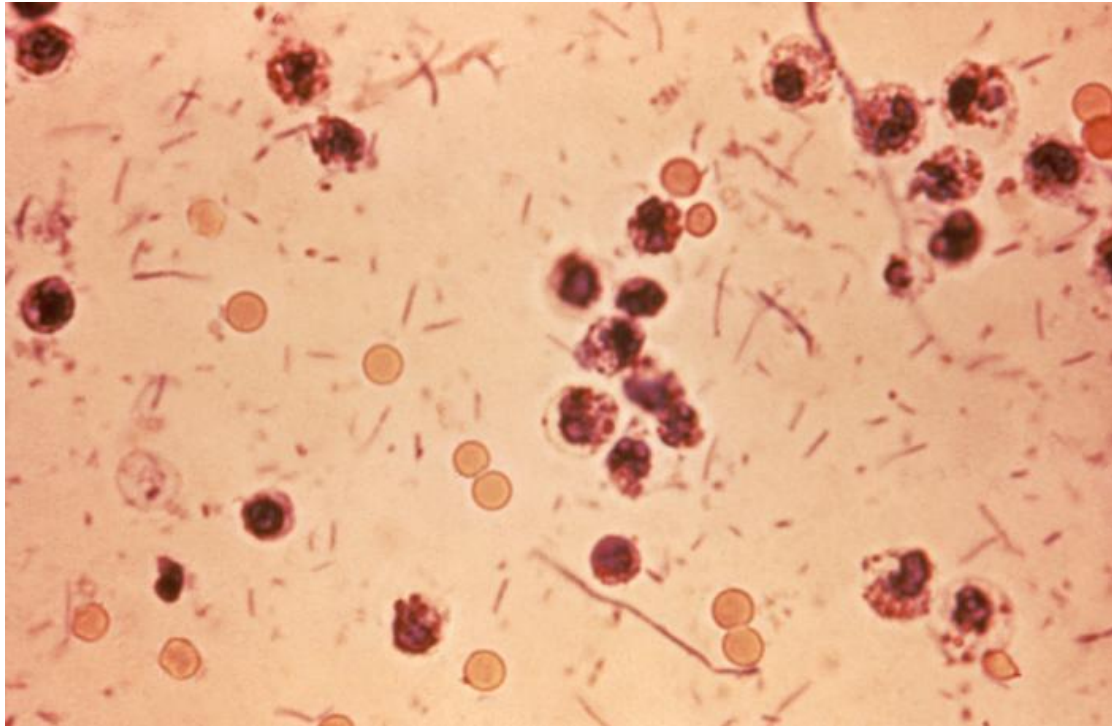
Όλα τα είδη, υπότυποι και βιότυποι και των 4 ομάδων έχουν στους γενικούς χαρακτήρες της οικογένειας των Εντεροβακτηριακών και κοινούς ειδικούς φαινοτυπικούς χαρακτήρες. Οι κοινοί αυτοί χαρακτήρες, που επιτρέπουν το διαχωρισμό τους από τα κολοβακτηρίδια, είναι οι εξής: **1)Δεν ζυμώνουν τη λακτόζη. 2)Δεν κινούνται. 3)Δεν διασπούν τη λυσίνη. 4)Δεν παράγουν αέριο από τη διάσπαση της γλυκόζης και άλλων σακχάρων.**

Από τις σαλμονέλλες διαχωρίζονται από το ότι δεν παράγουν υδρόθειο.

6.1.2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

Οι σιγκέλλες ,ανεξάρτητα του είδους των,έχουν τους ίδιους μορφολογικούς και καλλιεργητικούς χαρακτήρες.Είναι Gram αρνητικά βακτηρίδια μικρά ,κοντύτερα από την *E.coli* και τη *Salmonella*,χωρίς έλυτρο,ακίνητα αερόβια και προαιρετικά αναερόβια.

Μερικά στελέχη αναπτύσσουν περιβληματικό αντιγόνο και πολλά αναπτύσσουν ινίδια .Είναι καταλάση θετικά ,οξειδάση αρνητικά.[76]



Εικόνα 12:Shigella (μεγέθυνση 1000 φορές)

6.1.3 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Αναπτύσσονται στα κοινά θρεπτικά υλικά.Οι αποικίες τους στο άγαρ είναι μικρότερες από τις αποικίες των σαλμονελλών εκτός από τη *S.sonnei* που μπορεί να κάνει αποικίες μεγαλύτερες.Στο MacConkey και στο SS άγαρ οι αποικίες είναι άχρωμες επειδή δεν διασπούν την λακτόζη με εξαίρεση τη *S.sonnei* που μετά από 48ωρη επώαση παράγει αποικίες κόκκινες από τη διάσπαση της λακτόζης .Στο αιματούχο άγαρ οι αποικίες των σιγκελλών της A υποομάδας παράγουν ζώνη αιμολύσεως.

6.1.4 ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Σαν εντεροβακτηριακά που είναι οι σιγκέλλες διασπούν τη γλυκόζη και ανάγουν τα νιτρικά ,αλλά δεν παράγουν αέριο από τη γλυκόζη εκτός εξαιρέσεων.Οι κοινές βιοχημικές ιδιότητες για όλες τις σιγκέλλες είναι οι εξής:[76]

- Λακτόζη(-)
- Κινητικότητα(-)
- Αέριο από τη γλυκόζη (-)
- Methyl Red(MR) (+)
- Voges-Proskauer (VP) (-)

- Ανάπτυξη στο κιτρικούχο υλικό (-)
- Παρουσία KCN(-)
- Διάσπαση ουρίας (-)
- Απομίνωση της Φαινυλαλανίνης (-)
- Παραγωγή υδρόθειου (-)
- Αποκαρβοξυλίωση λυσίνης (-)

6.1.5 ΘΕΡΑΠΕΙΑ –ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Οι σιγκέλλες είναι ευαίσθητες στα εξής αντιβιοτικά:Στις σουλφοναμίδες ,τα β-λακταμικά ,τις κινολόνες ,το ναλιδιξικό οξύ.Κλινικές μελέτες είχαν αποδείξει ότι η χορήγηση σουλφοναμιδών μειώνει τη διάρκεια της νόσου και την αποβολή σιγκελλών με τις κενώσεις.Η κοτριμοξαζόλη και η αμπικιλλίνη θεωρήθηκαν σαν τα φάρμακα εκλογής.Σήμερα στις προηγμένες χώρες δεν δίνεται κανένα αντιμικροβιακό φάρμακο .Εφαρμόζεται μια συμπτωματική θεραπεία με διόρθωση πιθανής ηλεκτρολυτικής διαταραχής και χορήγηση ήπιου αντισηπτικού του εντέρου.Άλλωστε τα περισσότερα στελέχη έχουν αναπτύξει αντοχή στις σουλφοναμίδες και στην αμπικιλλίνη ,πολλά δε στελέχη έχουν γίνει ανθεκτικά σε πολλά αντιβιοτικά .Πολυαντοχή εμφανίζεται σε όλες τις ομάδες σιγκελλών.

Οι σιγκέλλες είναι τα πρώτα μικρόβια στα οποία παρατηρήθηκε και περιγράφηκε το φαινόμενο της μεταβίβασης αντοχής προς ένα ή περισσότερα αντιβιοτικά από το ένα μικρόβιο στο άλλο με πλασμίδια που φέρουν το γόνο της αντοχής.Και ενώμέχρι το 1959 όλες οι σιγκέλλες ήταν ευαίσθητες στις σουλφοναμίδες και σε πολλά αντιβιοτικά,ξαφνικά κατά τη διάρκεια μιας επιδημίας στην Ιαπωνία,βρέθηκαν οι σιγκέλλες ανθεκτικές.Η μεταβιβάσιμη αυτή αντοχή είναι πολυαντοχή και αφορά σε πολλά αντιβιοτικά όπως η τετρακυκλίνη,η χλωραμφενικόλη,η στρεπτομυκίνη και οι σουλφοναμίδες.Προς την αμπικιλλίνη ήταν ευαίσθητες όλων των ειδών οι σιγκέλλες μέχρι το 1968.Το 1973 ήταν ανθεκτικές τα 87% των στελεχών της *S.sonnei* και τα 66% της *S.flexneri* καθώς και όλα τα επιδημικά στελέχη σε μια επιδημία στο Bagladech , της *S.dysenteriae*.

Ανθεκτικά είναι και στελέχη της *S.sonnei* στις ΗΠΑ .Το ναλιδιξικό οξύ ,οι νεότερες κινολόνες και το ampicillinπρινoxil δοκιμάζονται.[52,53]Νεώτερες κλινικές μελέτες στρέφονται στη χρησιμοποίηση κεφαλοσπορινών 2^{ης} και 3^{ης} γενιάς που είναι δραστικές σε όλα τα είδη των σιγκελλών.[76]

6.1.6 ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΔΟΜΗ

Δεν διαθέτουν αντιγόνα βλεφαριδικά αλλά το σωματικό τους λιποπολυσακχαριδικό(LPS) αντιγόνο παρουσιάζει μεγάλη αντιγονική ικανότητα και πολλές διαφορές ανάμεσα στα στελέχη της κάθε υποομάδας.Αυτό επιτρέπει τον ορολογικό διαχωρισμό των στελεχών σε ορότυπους και υποτύπους για επιδημιολογικούς και ταξινομικούς σκοπούς.Θεωρείται ότι είναι ένας από τους παράγοντες της τοξικότητας των σιγκελλών.[38]Οι ορολογικές διαφορές συχνά συμβαδίζουν με ορισμένες βιοχημικές διαφορές μεταξύ των οροτύπων.Τα 38 αντιγόνα που διαχωρίστηκαν και που για αυτά παρασκευάστηκαν όροι, μοιάζουν στη μεγάλη τους πλειονότητα(δηλαδή τα 30 από αυτά) με τα O-αντιγόνα της E.coli.

6.1.7 ΟΡΟΤΥΠΙΑ

Η οροσυγκόλληση στην πλάκα είναι το πρώτο βήμα στην ταυτοποίηση των σιγκελλών.Γίνεται με τους πολυδύναμους ορούς ομάδων για την ταυτοποίηση και με μονοδύναμους ορούς για τον ορολογικό διαχωρισμό των διαφόρων οροτύπων μέσα σε κάθε υποομάδα σιγκελλών.Ορός αντι-A ομάδας ή αντι-S.dysenteriae ή δύο πολυδύναμοι χωριστά για τους άλλους. Ορός αντι-B ομάδας ή αντι-S.flexneri Ορός αντι-C ή αντι-S.boydii ή περισσότεροι ξεχωριστά για μερικούς οροτύπους Ορός αντι-D ομάδας ή ορός αντι-S.sonnei.Η τεχνική είναι της συγκολλήσεως πάνω στην πλάκα.Το εναιώρημα της σιγκέλλας γίνεται από καλλιέργημα σε θρεπτικό άγαρ μέσα σε σταγόνα ισότονου NaCl ή σε διάλυμα ιωδιούχου υδραργύρου, πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα.Παρασκευάζονται τόσες σταγόνες τέτοιου εναιωρήματος όσοι οι οροί που διαθέτουμε συν μια σταγόνα σαν μάρτυρας.Σε κάθε ένα από τα εναιωρήματα αυτά προστίθεται σταγόνα των αντίστοιχων ορών, ανακατεύονται με κρίκο και ανακινούνται στο χέρι και διαβάζεται η εμφάνιση ή όχι σαφούς συγκολλήσεως.Αν το μικρόβιο συγκολληθεί αμέσως και πολύ έντονα με έναν από τους ορούς θα καλλιεργηθεί αμέσως και στα υλικά των βιοχημικών δοκιμών.Αν μετά 24ωρο το αποτέλεσμα των βιοχημικών δοκιμών ταιριάζει με το αναμενόμενο από σιγκέλλα, το μικρόβιο θα χαρακτηριστεί σαν σιγκέλλα και θα δοθεί απάντηση.Αν το μικρόβιο δεν συγκολληθεί με τους ορούς των σιγκελλών παρ'όλο που στο Kligler ή το TSI έμοιαζε για σιγκέλλα και δεν έμοιαζε με σαλμονέλλα, δηλαδή δεν παρήγαγε υδρόθειο, τότε θα θερμανθεί το εναιώρημα σε βραστό νερό για 15 min για να καταστραφεί τυχόν επιφανειακό αντιγόνο που παρεμποδίζει την O-συγκόλληση.Αν και μετά τη θέρμανση δεν συγκολλάται το μικρόβιο με τους ορούς των σιγκελλών μπορεί να είναι σαλμονέλλα του τυφοειδούς που δεν παράγει υδρόθειο.Στην περίπτωση αυτή θα γίνει δοκιμή οροσυγκολλήσεως με τον αντι-D και εν ανάγκη και με τον αντι- Vi ορό των άλλων σαλμονελλών.Αν το μικρόβιο δεν συγκολλάται ούτε με τον αντισαλμονελλικό ορό μπορεί να πρόκειται για E.coli της ομάδας Alkalencens-Dispar που δεν παράγει αέριο,είναι ακίνητο και δεν παράγει υδρόθειο.Η ορολογική διάκριση από το είδος αυτό θα γίνει με τον

αντι- Alkalencens-Dispar(A-D) ορό.Καλλιεργήματα μικροβίου που στο TSI μοιάζουν με σιγκέλλα που δίνουν αρνητική την ουρεάση και δεν συγκολλώνται με τους αντι-σιγκελλικούς ορούς μπορεί να είναι ορότυποι σιγκελλών για τους οποίους δεν υπάρχουν αντισώματα στους πολυδύναμους αντι-ορούς των ομάδων που χρησιμοποιούμε.Μπορεί όμως να είναι μικρόβια άλλων γενών.Τέτοια μικρόβια στέλνονται στο Εθνικό Κέντρο Σιγκελλών όπου πιθανό να διαθέτουν προσροφημένους ειδικούς ορούς για τους σπάνιους οροτύπους.[76]



Εικόνα 13: Διαδικασία οροσυγκόλλησης σε πλάκα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

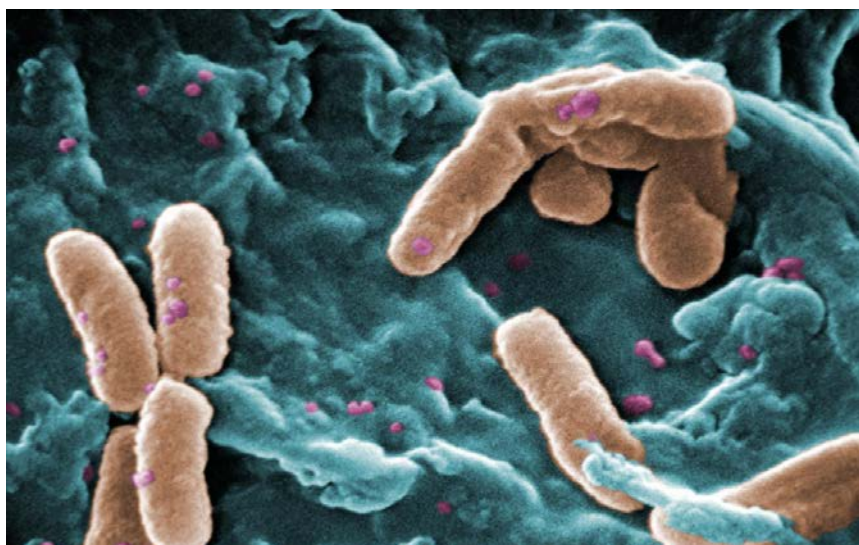
7.1 PSEUDOMONAS

7.1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Το γένος *Pseudomonas* περιλαμβάνει Gram αρνητικά βακτηρίδια ,κινητά ,τα οποία δεν σχηματίζουν σπόρους και δεν διασπούν την λακτόζη.

Στο γένος αυτό περιγράφονται 140 περίπου είδη εκ των οποίων μόνο ένα η Ψευδομονάδα η πυοκυανική είναι το κυρίως παθογόνο.Η *P. aeruginosa* είναι ευκαιριακό παθογόνο βακτήριο και προκαλεί λοιμώξεις σε θερμόαιμα και ψυχρόαιμα, σπονδυλωτά, υδρόβια και μη ζώα, έντομα και φυτά. Ο μικροοργανισμός απομονώθηκε για πρώτη φορά από τον Gessard το 1882 και χαρακτηρίστηκε ως παθογόνο βακτήριο από τον Charrin το 1890. Κατά καιρούς ο μικροοργανισμός έχει λάβει διάφορες ονομασίες.Στα άλλα είδη περιλαμβάνονται βακτηρίδια παθογόνα για τα φυτά και τα έντομα,όπως και διάφορα τα οποία ζουν ελεύθερα στο χώμα και στο νερό. Άλλες ψευδομονάδες που είναι δυνατόν να απομονωθούν από λοιμώξεις του ανθρώπου αλλά σε πολύ μικρότερη αναλογία από την *P. aeruginosa* είναι τα είδη: *P. fluorescens*, *P. maltophilia*, *P. ceracia*, *P. stutzeri*, *P.putida*, *P. mallei* και *P. pseudomallei*. [42] Παλαιότερα στις ψευδομονάδες περιλαμβάνονταν η *P.maltophilia*, *P.ceracia* κ.α. αλλά με τις νεότερες ταξινομήσεις άλλαξε η ονομασία σε *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bulkholderia ceracia* κλπ. Και κατατάσσονται πλέον στα διάφορα μη ζυμωτικά βακτηρίδια.

Η πλέον αξιοσημείωτη ιδιότητα του γένους *Pseudomonas* είναι η βιοχημική τους προσαρμοστικότητα.Έχουν δηλαδή την ικανότητα να χρησιμοποιούν μεγάλη ποικιλία οργανικών ουσιών ως μόνη ή κύρια πηγή άνθρακος και για αυτό έχουν μεγάλη σημασία για την διάσπαση διαφόρων ουσιών στο φυσικό περιβάλλον.



Εικόνα 14:Ψευδομονάδα σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

7.1.2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

Βακτηρίδιο Gram αρνητικό .Παρουσιάζει ζωηρή κίνηση με μια πολική βλεφαρίδα.Δεν έχει έλυτρο ,ούτε σχηματίζει σπόρους .Έχει διαστάσεις 1.5-3 μm μήκος και 0.5 μm πλάτος.Εξωτερικά του κυττάρου σε μερικά στελέχη υπάρχει πολυσακχαρικό έλυτρο που το προστατεύει από την φαγοκυττάρωση και από επικίνδυνες για αυτό ουσίες. Τα κύτταρα του βακτηριδίου *P. aeruginosa* διατάσσονται μεμονωμένα, σε ζεύγη και σε μικρές αλυσίδες. Επίσης χαρακτηρίζεται ως αμφίτριχο, διότι έχει μια μόνο βλεφαρίδα σε κάθε πόλο [78].

7.1.3 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Αναπτύσσεται εύκολα στα κοινά πεπτονούχα θρεπτικά υλικά όπως ο θρεπτικός ζωμός και το θρεπτικό άγαρ.Στο αιματούχο άγαρ μερικά στελέχη προκαλούν αιμόλυση.Αναπτύσσεται είσης στα εκλεκτικά θρεπτικά υλικά των εντεροβακτηριακών όπως το ManConkey,το EMB όπου παράγει άχρωμες αποικίες .Κάπως δυσκολότερα αναπτύσσεται στα πιο εκλεκτικά όπως το δεσοξυχολικό και το SS άγαρ.Ειδικά υλικά είναι το Cetrimide(Difco)και το *Pseudomonas agar* (BBL).Στο άγαρ οι αποικίες είναι γυαλιστερές ,υδαρείς ,κυκλικές ,επηρμένες στο κέντρο σαν αυγά μάτια με κυματοειδή παρυφή και επιφάνεια στίλβουσα και με ιριδισμό στις νεαρές καλλιέργειες που όμως γρήγορα χάνεται.Ο ιριδισμός είναι μεταλλικός και είναι εντονότερος στις περιοχές διάχυτης ανάπτυξης όπου γρήγορα εμφανίζονται σημεία αυτόλυσης.Από τις αποικίες διαχέεται προς το θρεπτικό υλικό κυανοπράσινη χρωστική και στο άνοιγμα του τριβλίου γίνεται αντιληπτή μια ευχάριστη μυρωδιά.

Οι μεγάλες αποικίες αναπτύσσονται στις καλλιέργειες των κλινικών δειγμάτων ενώ οι μικρές στις καλλιέργειες υλικών από το φυσικό περιβάλλον.

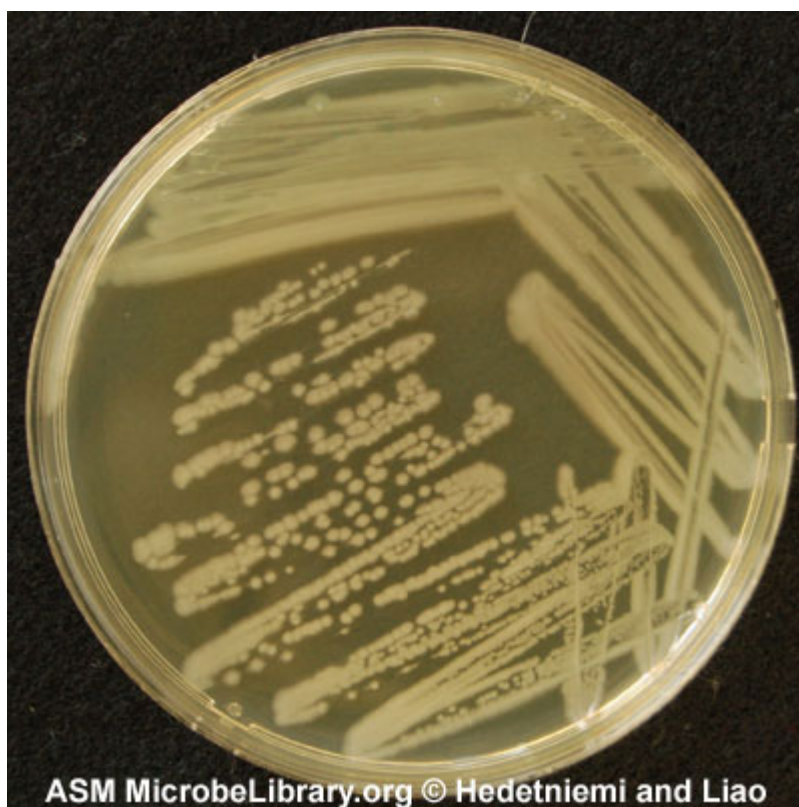
Η μορφολογία των αποικιών δεν είναι πάντοτε η τυπική. Έχουν διαχωρισθεί έξι μορφότυποι αποικιών όπως οι λείες, οι ξηρές, οι βλεννώδεις, οι ζελατινώδεις, οι σαν του κολοβακτηριδίου,οι μικρές κ.ά. Οι βλεννώδεις οφείλουν τη μορφή τους στην παραγωγή ενός βλεννώδους πολυσακχαριδίου. Η ουσία λέγεται κοινά slimeαλλά πολλοί την ονομάζουν mucoidy. Σε ένα πρωτοκαλλιέργημα κλινικού υλικού μπορεί να αναπτυχθούν αποικίες ψευδομονάδας διαφόρων μορφοτύπων. Στην κυστική ίνωση ,όπου χαρακτηριστικά στις καλλιέργειες πτυέλων αναπτύσσονται βλεννώδεις αποικίες, συνυπάρχουν και μη-βλεννώδεις[44]. Οι διαφορές στη μορφολογία των αποικιών συνοδεύονται και από βιολογικές, βιοχημικές, αντιγονικές και άλλες διαφορές καθώς από διαφορές στην ευαισθησία στα αντιβιοτικά.

Η *P.aeruginosa* παράγει μια γαλαζοπράσινη χρωστική που διαχέεται στο θρεπτικό υλικό, την πυοκυανίνη (pyocyanin). Πολλά στελέχη παράγουν παράλληλα μια πρασινίζουσα χρωστική την pyoverdine. Κάποια στελέχη παράγουν μια

κοκκινωπή, μη καροτινοειδή χρωστική την ργογβίν και κάποιια, μια καστανόμαυρη την ργομελανίν. Στα καλλιεργήματα η κύρια χρωστική που είναι η πυοκυανίνη μπορεί να καλυφθεί από την παραγωγή των λοιπών χρωστικών.

Υπάρχουν και στελέχη που δεν παράγουν καμιά χρωστική. Τα απυοκυανικά στελέχη διαφέρουν από τα πυοκυανικά και σε άλλες ιδιότητες, π.χ. έχουν μικρότερη ενζυμική δραστηριότητα, δεν είναι ευαίσθητα στην καρμπενικιλίνη, δεν εκλύουν οσμή, δεν ταυτοποιούνται με τους αντι-ορούς. Είναι συχνά ευαίσθητα στην τετρακυκλίνη, τη στρεπτομυκίνη και την καναμυκίνη.

Η πυοκυανική *pseudomonas* είναι μικρόβιο αυστηρά αερόβιο. Δεν μπορεί να αναπτυχθεί σε συνθήκες αναερόβιας καλλιέργειας. Μόνο στελέχη που μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα νιτρικά σαν δέκτες του υδρογόνου μπορούν να αναπτυχθούν αναεροβίως. Ευνοική θερμοκρασία είναι η 30°C. Αναπτύσσεται καλά στους 37°C αλλά μπορεί να αναπτυχθεί στους 42°C. Δεν μπορεί να αναπτυχθεί στους 4°C και κάτω. [78]



Εικόνα 15: Ανάπτυξη *P.aeruginosa* σε MacConkey agar

7.1.4 ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Όλα τα στελέχη της *P.aeruginosa* αναπτύσσονται στους 42 βαθμούς Κελσίου. Επιπλέον παράγουν οξειδάση και καταλάση, αλλά όχι υδρόθειο. Διασπούν

οξειδωτικώς την γλυκόζη, χωρίς την παραγωγή αερίου, όμως δεν την ζυμώνουν. Αντίθετα δεν διασπούν την μαλτόζη και την λακτόζη. Προκαλούν οξειδωτική διάσπαση του γλυκονικού καλίου, παράγοντας 2-κετογλυκονικό κάλιο. Στα περισσότερα στελέχη συναντάμε κινητικότητα (90% των στελεχών) και την δυνατότητα υδρόλυσης της αργινίνης (96-98% των στελεχών). Ποσοστό μεγαλύτερο του 50% των στελεχών της παράγουν την χρωστική πράσινη πυοκυανίνη. Σημαντικό είναι ότι από όλα τα είδη της ψευδομονάδας μόνο η *P. aeruginosa* έχει αυτήν την ιδιότητα. Η πυοκυανίνη χρωματίζει τα εκκρίματα των λοιμώξεων που οφείλονται στην συγκεκριμένη ψευδομονάδα, για αυτό και η Ψευδομονάδα η αεριογόνος ονομάζεται και πυοκυανική. Στελέχη που παράγουν πυοκυανίνη χαρακτηρίζονται εύκολα ως *P. aeruginosa* και δεν χρειάζονται άλλες δοκιμασίες για την τυποποίηση του μικροβίου. Οι ψευδομονάδες παράγουν σπανιότερα και άλλες χρωστικές, όπως τις πυοερυθρίνη, πυομελανίνη και φθοριοσεΐνη. Η φθοριοσεΐνη είναι πράσινη φθορίζουσα χρωστική και οι καλλιέργειες του μικροβίου που την παράγουν φθορίζουν, όταν προσπέσει σε αυτά υπεριώδης ακτινοβολία. Η πυοερυθρίνη είναι σκούρα ερυθρά χρωστική και η πυομελανίνη έχει χρώμα καστανό-μαυρο.[78]

7.1.5 ANTIΓΟΝΙΚΗ ΔΟΜΗ

Στο κυτταρικό τοίχωμα και στην εξωτερική μεμβράνη της *P.aeruginosa* υπάρχουν ισχυρά αντιγόνα όπως το λιποπολυσακχαρίδιο και οι πρωτεΐνες αντίστοιχα. Το λιποπολυσακχαριδικό αντιγόνο είναι το O-αντιγόνο και η ενδοτοξίνη του μικροβίου, και αποτελούν δύο από τους παράγοντες της παθογένειας του μικροβίου αυτού. Η μοριακή δομή του και η σύσταση των επιμέρους στοιχείων του ποικίλλουν[45].

Στα βλεννώδη στελέχη το LPS αντιγόνο έχει χάσει μέρος από τα πολυσακχαρίδια του αλλά διατηρεί στον πυρήνα του τον ολιγοσακχαριδικό.

Βάσει του αντιγόνου αυτού η *P.aeruginosa* έχει διαχωρισθεί σε 17 O-ορότυπους που αριθμούνται από το 1,2,3.....17. Ο ορότυπος ενός στελέχους συμπίπτει ,για μερικούς με την παθογόνο δράση ή με την ικανότητα επιβιώσεως ή ακόμη και με την αντοχή στα αντιβιοτικά[46]. Ο ορότυπος O12 είναι συνήθως πολυανθεκτικός στα αντιβιοτικά και είναι ο επικρατέστερος στις περισσότερες Ευρωπαϊκές χώρες[47].

Οι πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης [49] της ψευδομονάδας είναι πορίνες και επιτρέπουν τη διέλευση των αντιμικροβιακών φαρμάκων δια μέσου αυτών. Συμβάλλουν στη διαπερατότητα των αντιβιοτικών μέχρι του κυτταρικού τοιχώματος .Στελέχη ψευδομονάδας με ανεπαρκείς σε λειτουργικότητα όσον αφορά τις πορίνες αυτές, είναι λιγότερο διαπερατά από τα β-λακταμικά αντιβιοτικά.

Η βλεφαρίδα της *P.aeruginosa* καθώς και οι βλεφαρίδες των ψευδομονάδων που ανήκουν σε άλλα είδη είναι επίσης αντιγονικές αλλά εμφανίζουν μεγάλη αντιγονική ετερογένεια και δεν χρησιμοποιούνται για διαχωρισμό οροτύπων.

7.1.6 ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

Η *P.aeruginosa* είναι μικρόβιο παθογόνο. Οι παράγοντες που καθορίζουν την παθογένεια και την τοξικότητα των διαφόρων στελεχών της ψευδομονάδας είναι οι ακόλουθοι :

Τοξίνες Εξωτοξίνη Α

Ενδοτοξίνη

Εντεροτοξίνη

Αιμολυσίνες Γλυκολιπίδιο

Φωσφολιπάση

Πρωτεάσες Ελαστάση S

Αλκαλική πρωτεάση

Επιφανειακή βλέννη

Λοιπά ένζυμα Αλκαλική φωσφατάση

Φωσφολιπάση C

Ινωδολυσίνη

Λεκιθινάση

Εστεράση

Δνάση

Κοαγκουλάση

Χρωστικές Πυοκυανίνη

Πυοβερντίνη

Πυομελανίνη

Πυορουμπίνη

Η τοξίνη Α είναι εξωτοξίνη ,παράγεται από τα περισσότερα στελέχη ,αναστέλλει την πρωτεϊνοσύνθεση και είναι η πιο τοξική ουσία[66].

Η ενδοτοξίνη είναι το λιποπολυσακχαριδικό Ο-αντιγόνο της εξωτερικής μεμβράνης. Αναστέλλει την οψωνοποίηση και φαγωκυττάρωση. Είναι ουσία κυτταροτοξική, συμβάλλει στην καταστροφή των αγγείων στο μέσο τους κατά την ψευδομοναδική ωτίτιδα και απελευθέρωση παραγόντων φλεγμονής όπως οι αμίνες [67].

Το γλυκολιπίδιο είναι μια αιμολυσίνη θανατηφόρος και δερμονεκρωτική στα πειραματόζωα. Η φωσφολιπάση είναι επίσης αιμολυσίνη και είναι ουσία που προκαλεί νέκρωση των κυττάρων και ιστών.

Η αλκαλική πρωτεάση προκαλεί διάλυση του ελαστικού υμένα του ινώδους ιστού ενώ η ελαστάση τη διάλυση του ελαστικού υμένα των αγγείων. Και οι δύο αυτές πρωτεάσες συνδέονται άμεσα με τη λοιμογόνο δράση της ψευδομονάδας [68].

Η επιφανειακή βλέννη, το slime, προκαλεί λύση των επιθηλιακών κυττάρων επί των οποίων η βλεννώδης ψευδομονάδα έχει φτιάξει την αποικία της με αποτέλεσμα απελευθέρωση μυκίνης από τα κύτταρα.

Η αλκαλική φωσφατάση ανιχνεύεται στα κλινικά δείγματα με τη χρήση ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων. Η παρουσία της ανιχνεύεται πολύ πριν από την ανεύρεση της ψευδομονάδας στα βρογχικά εκκρίματα και δηλώνει έγκαιρα και με ταχεία τεχνική την έναρξη ψευδομοναδικής λοίμωξης.

Η φωσφολιπάση C παράγεται από τα μη βλεννώδη στελέχη. Προκαλεί αιμόλυση.

Η πυοκυανίνη αναστέλλει την ανάπτυξη της φυσιολογικής χλωρίδας του αναπνευστικού δένδρου λόγω της μικροβιοκτόνου δραστηριότητας της. Η διαταραχή αυτή της οικολογικής ισορροπίας της χλωρίδας ευνοεί την εγκατάσταση της ψευδομονάδας.

Η πρώτη φάση της παθογόνου δράσεως της ψευδομονάδας αρχίζει με την προσκόλληση της στα κύτταρα. Σε περιπτώσεις διεισδυτικών λοιμώξεων η είσοδος της στο αίμα γίνεται από το αναπνευστικό. Σε περιπτώσεις καθετηριασμών ή άλλων παρεμβατικών αγωγών από τα σημεία της τοπικής μηχανικής βλάβης.

Εκ μέρους του ξενιστού μεγαλοοργανισμού οι παράγοντες που ευνοούν την εγκατάσταση της ψευδομονάδας και την ανάπτυξη φλεγμονής και ιδιαίτερα σηψαιμίας, είναι οι αιματολογικοί όγκοι, το έγκαυμα, τα τραύματα και ο διαβήτης. [59]

7.1.7 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΨΕΥΔΟΜΟΝΑΔΑΣ

Η ταυτοποίηση του απομονωθέντος Gram αρνητικού γίνεται από τους καλλιεργητικούς και βιοχημικούς χαρακτήρες της ψευδομονάδας ως εξής.

Η πρώτη ταυτοποιητική δοκιμή εκτός από την παραγωγή της πυοκυανίνης είναι η δοκιμή της οξειδάσης.Γίνεται με ενστάλλαξη του αντιδραστηρίου πάνω στις ύποπτες αποικίες.

Οι υπόλοιπες ταυτοποιητικές δοκιμές είναι :

-Κινητικότητα (+)

-Χρώση βλεφαρίδας(με την τεχνική Leifson)

-Οξειδάση της γλυκόζης. Γίνεται σε ένα σωληνάριο F/O γλυκόζης χωρίς παραφίνη (θετικό ή αρνητικό)και σε άλλο σωληνάριο F/O γλυκόζης με παραφίνη (αρνητικό)

-Καταλάση (+) (παράρτημα, εικ. 6)

-Ινδόλη(-)

-Methyl Red (MR) (-)

- Voges Proskauer(VP) (-)

Βοήθεια σημαντική για την ταυτοποίηση της ψευδομονάδας προσφέρουν τα συστήματα των έτοιμων βιοχημικών δοκιμών όπως το API-σύστημα(παράρτημα, εικ.7). Με το API 20NE ταυτοποιούνται οι 6 συχνότερες ψευδομονάδες. Με το σύστημα αναγνώρισης Minitek για NF(nonfermentative) και NEF(nonenteric fermentative) Gram αρνητικά βακτήρια ταυτοποιούνται 16 είδη ψευδομονάδων.[78]

7.1.8 ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ-ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Η *P.aeruginosa* είναι ευαίσθητη σε μερικά β-λακταμικά αντιβιοτικά, στις αμινογλυκοσίδες και στα νεώτερα ειδικά αντιψευδομοναδικά, αντιμικροβιακά φάρμακα. Από τις πενικιλίνες η καρμπενικιλίνη ήταν το πρώτο αντιψευδομοναδικό αντιβιοτικό αλλά πολλά στελέχη έχουν γίνει ανθεκτικά. Από τις κεφαλοσπορίνες η κεφταζιντίμη είναι προς το παρόν η πιο δραστική. Από τις αμινογλυκοσίδες ήδη αρκετά στελέχη είναι ανθεκτικά στη γενταμικίνη και την αμικασίνη. Λιγότερα στελέχη είναι ανθεκτικά στη νετιλμικίνη. Ανθεκτικότητα τύπου πολυαντοχής,ήτοι σε πολλά αντιβιοτικά κατά διαφόρους μηχανισμούς,παρουσιάζουν τα νοσοκομειακά στελέχη.Ειδικό αντιψευδομοναδικό αντιβιοτικό είναι η αζτρεονάμη.[78]

7.1.9 ΝΟΣΟΙ ΑΠΟ ΨΕΥΔΟΜΟΝΑΔΑ

Ευπαθείς σε λοιμώξεις από την ψευδομονάδα είναι :

α)οι εγκαυματίες

β)τα υποβαλλόμενα σε ανοσοκατασταλτική θεραπεία ζώα

Οι νόσοι που οφείλονται στην ψευδομονάδα την πυοκυανική και προσβάλλουν τον **άνθρωπο** είναι οι εξής :

1)**Διαπύσηση εγκαυματικών επιφανειών και βαριά σηψαιμία** στους εγκαυματίες με υψηλή θνητότητα (77%).Το υγρό περιβάλλον του εγκαυματικού τραύματος [53],η υδατοθεραπεία[54],ο αποικισμός [55]και η μειωμένη αντίσταση του εγκαυματία είναι οι παράγοντες που ευνοούν τη λοίμωξη αυτή.

2)**Διαπυήσεις τυχαίων ή χειρουργικών τραυμάτων** με διάφορα μικρόβια σαν συνεργός στη διαπύσηση εξού και η ονομασία πυοκυανικό βακτηρίδιο.

3)**Οφθαλμία με τήξη του κερατοειδούς** και καταστροφή του βολβού σε ανθρώπους (και σε ζώα) που τραυματίστηκαν ή χειρουργήθηκαν στο μάτι.Κερατίτις και θυλακίτις εφόσον υπάρξει λύση συνεχείας στην εξωτερική επιφάνεια του κερατοειδούς είτε από εξωτερικά αίτια όπως είναι οι ποικίλης αιτιολογίας τραυματισμοί είτε από νόσους ή ανωμαλίες του ίδιου του ματιού[58,59].

4)**Ωτίτιδα μέση χρόνια**.Είναι το δεύτερο κατά σειρά συχνότητας μετά από τον χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο μικρόβιο που βρίσκεται στις ωτίτιδες πάσης μορφής[60].Ευνοικοί παράγοντες για την ανάπτυξη της θεωρούνται οι προηγηθείσες θεραπείες με αντιβιοτικά και οι επανειλημμένες προσβολές ,οι ανατομικές ανωμαλίες του ωτός ,η βλάβη του τυμπαντικού υμένα και κυρίως η χρόνια μέση ωτίτιδα με έκκριμα.Ο παθογενετικός μηχανισμός της ψευδομοναδικής ωτίτιδας εστιάζεται στην προσκόλληση των ψευδομονάδων στα επιθηλιακά κύτταρα όπου πολλαπλασιάζεται και στις πρωτεάσες που διαχέονται από τις μικροαποικίες όπως η ελαστάση και η αλκαλική πρωτεάση οι οποίες διαλύουν τα κύτταρα.Το πιο ωτοτοξικό στοιχείο στην επιμονή της ψευδομοναδικής ωτίτιδας φαίνεται να είναι το λιποπολυσακχαριδικό αντιγόνο LPS το οποίο παραμένει στο αυτί παρά την επιτυχή αντιμικροβιακή θεραπεία.Το αντιγόνο αυτό συμβάλλει στην καταστροφή των αγγείων και την εξίδρωση ορού στην κοιλότητα χωρίς να παραβλάπτεται η ευσταχιανή σάλπιγγα (παρατηρείται και στα ζώα).

5)**Ουρολοίμωξη** σε ανθρώπους (και σε ζώα) μετά από κυστεοσκόπηση ή εγχείρηση.

6)**Σηψαιμία θανατηφόρος** σε ανθρώπους με λευχαιμία και καρκινοπαθείς που βρίσκονται υπό έντονη ανοσοκατασταλτική θεραπεία [61].

7)**Οστεομυελίτις,κυτταρίτις** και παντοειδής άλλες τοπικές ή συστηματικές λοιμώξεις όλο και συχνότερα περιγράφονται.

Οι νόσοι που οφείλονται στη ψευδομονάδα και προσβάλλουν τα ζώα είναι οι εξής:

1)Στις αγελάδες προκαλεί **μαστίτιδες** που συνδέονται με το μολυσμένο νερό που χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό του μαστού.Ακόμα προκαλεί **πνευμονία, δερματίτιδα** και **εντερίτιδα** στα βοοειδή.

2)Στα πρόβατα προκαλεί **μαστίτιδα, πνευμονία** και **ωτίτιδα**.

3)Στους χοίρους προκαλεί **αναπνευστικές λοιμώξεις** και **ωτίτιδα**.

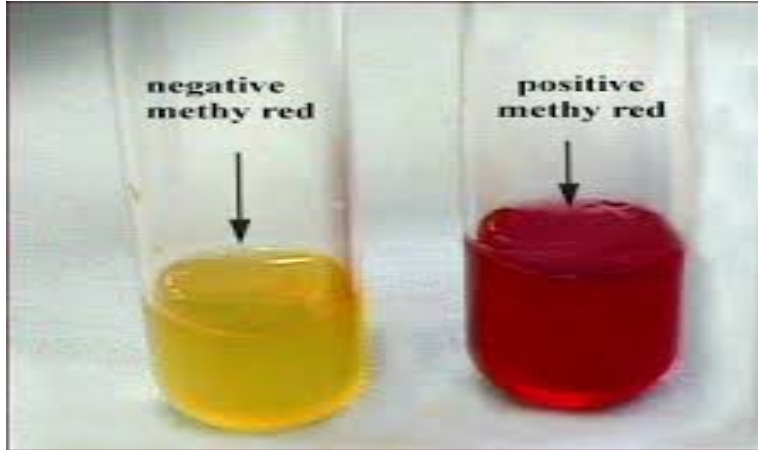
4)Στα άλογα προκαλεί **λοιμώξεις της γενετικής οδού, πνευμονία** και **ελκώδης κερατίτιδα**.

5)Στους σκύλους και στις γάτες προκαλεί **ωτίτιδα, κυστίτιδα, πνευμονία** και **ελκώδης κερατίτιδα**.

Μπορεί επίσης να προκαλέσει **πυώδης δερματίτιδα** σε όλα τα είδη.

Παράρτημα

Φωτογραφίες βιοχημικών δοκιμών G(-)



Εικόνα 1: Δοκιμασία Methyl Red (M.R.)



Εικόνα 2: Δοκιμασία ινδόλης



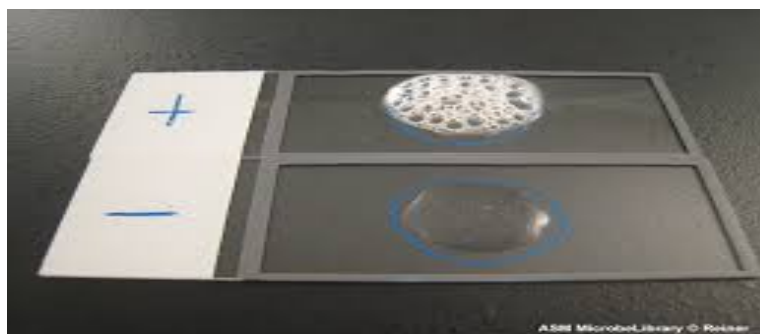
Εικόνα 3: Δοκιμασία Voges Proskauer (V.P)



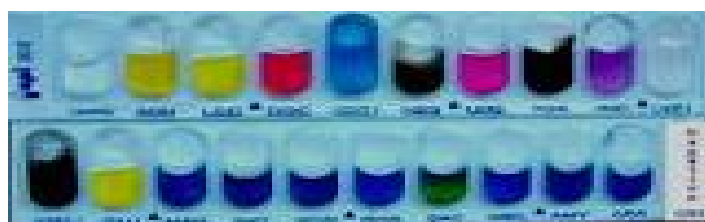
Εικόνα 4:Δοκιμασία ουρίας



Εικόνα 5:Δοκιμασία O.N.P.G.



Εικόνα 6:Δοκιμασία καταλάσης



Εικόνα 7:API 20E

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Wikipedia ,the free encyclopedia
2. Abbott S. Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and other Enterobacteriaceae. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 8th edition 2003, ASM Press, Washington D.C.,V1, p. 684-700.
3. Staley J, Krieg J, Krieg N. Classification of Procaryotic Organisms : An Overview. In Bergey's. Manual of Systematic Bacteriology Vol 1, Williams and Wilkins 1984, p. 1-7
4. Brenner DJ. Taxonomy, Classification and Nomenclature of Bacteria. In Manual of Clinical Microbiology 5th edit. A. Balows, W Hausler, K. Herrman, H. Isenberg, H. Shadomy. American Society for Microbiology Washington 1991, p. 209-215.
5. Ryan KJ, Tenover FC. Laboratory diagnosis of infectious disease. In Medical Microbiology, Tenover FC (Editor) Elsevier 1990, p. 233-273
6. Grimont F , Grimont PAD. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tool. Am Inst Pasteur Microbiol(Paris) 1986B : 165-175
7. Sneath P. Bacterial Nomenclature .In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 1. Williams and Wilkins 1984, p. 19-23.
8. Skerman VB, McGowan V, Sneath P (ed). Approved lists of bacterial names. Int J syst Bacteriol 1980, 30 : 225-420 .
9. Neidhardt F. The bacterial cell structure for growth, survival and colonization in JC Sherris(editor) Medical Microbiology Elsevier 1990 , p. 11-26
10. Brenner DJ. Family I Enterobacteriaceae. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.1. Williams & Wilkins, Baltimore 1984, p408-420
11. Ewing WH. Identification of Enterobacteriaceae 4th ed. New York ,Elsevier 1986.

12. Farmer JJ, Kelly M. Enterobacteriaceae. In Manual of clinical Microbiology. Amer Society Microbiol 1991, p 360-382 .
13. Farmer JJ III, Davis B, Hickman-Brenner et al. Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. J Clin Microbiol 1985, 21: 46-76
14. Ryan K. Enterobacteriaceae . In Sherris Medical Microbiology, Elsevier 1990, p. 357-383.
15. Murray P. R., Rosenthal K. S., Kobayashi G. S., Pfaller M. A.
Enterobacteriaceae in: (ed) Medical Microbiology Third edition, by Mosby Inc, Missouri, 1998, p. 232-244
16. Giron J, Jones T, Millan-Velasco F, Castromunoz E, Zarate L, Fry J et al. Diffuse adhering Escherichia coli as a putative cause of diarrhea in Mayan Children in Mexico. J Infect Dis 1991, 163:507-513.
17. Bailey & Scott. Enterobacteriaceae. In: Betty A. Forbes, Daniel F. Sahm, Alice S. Welfsfield. (ed.) Diagnostic Microbiology. 11th Edition. By Mosby Inc, Missouri, 2002 p. 365-377.
18. Gray LD. Escherichia, Salmonella, Shigella and Yersinia. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC and Tenover RH. (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 6th edition 1995, ASM Press, Washington D.C., V1, p. 450-456.
19. Prockop GW and Cockerill F. Enteritis caused by E. coli and Shigella and Salmonella species. Wilson WR, Sandy MA (ed). In: Current Diagnosis and Treatment in Infectious Disease, 2001. Lange Medical Books/McGraw-Hill p. 548-566.
20. Jallat C, Darfeuille-Michaud A, Rich C, Joly B. Survey of clinical isolates of diarrhoeogenic Escherichia coli: diffusely adhering E. coli strains with multiple adhesive factors. Res Microbiol. 1994 Oct; 145(8):621
21. Cheryl A. B., Brenner F. W., Fields P.I., Wells J. G., and Strockbine N.A.

- Escherichia, Shigella, and Salmonella. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 8th edition 2003, ASM Press, Washington D.C., V1, p. 654-671.
22. Kharsany A. B. M., Hoosens A. A., Kiepla P., Kirby P., and Sturm A. W. Phylogenetic analysis of *Calymmatobacterium granulomatis* based on rRNA gene sequences. 1999. J. Med. Microbiol. 48 : 841-847.
23. Abbott S. Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and other Enterobacteriaceae. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 8th edition 2003, ASM Press, Washington D.C., V1, p. 684-700.
24. rskov I. Klebsiella. In Bergey's Manual of Systematic Microbiology .William & Wilkins 4th Edit 1984,p.461-465
25. Arlet G, Sanson Le-Pors J, Rouveau M, Fournier G, Marie O, Sclemmer B, Philippon A. Outbreak of nosocomial infections due to Klebsiella pneumoniae producing SHV-4 β -lactamase. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1990,9 :797-803
26. Le Minor L. Genus III Salmonella .In Bergey's Manual 4th ed. Williams & Wilkins 1984,p.427-458.
27. Le Minor L, Veron M, Popoff M. Taxonomie de Salmonella .Ann Microbiol 1982,133B:223-243
28. Ewing W. The nomenclature of Salmonella its usage and definitions for the three species Can J Microbiol 1972,18:1629-1637.
29. Farmer III J, McWhorter, Brennen D, Morris G. The Salmonella-Arizona Group of Enterobacteriaceae: Nomenclature, classification and reporting. Clin Microbiol News 1984 ,6:63-66.
30. Sack BR, Sack DA. Immunologic methods for the diagnosis of infections by Enterobacteriaceae and Vibrionaceae. In Manual of Clinical Laboratory Immunology. 4th Edition ASM, 1992, 482-488.
31. Koelman J, Regensburg D, Van Katwijk F, MacLaren D. Retrospective study to determine the diagnostic value of Widal test in a non-endemic country. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992,11:167-170.

32. Duffey P, Kaniz J, Lee J, Hill W, Kokka R. Salmonella serogroup C2 and C3 identified by agglutination using an immunoglobulin G3(k) monoclonal antibody (32-1-E3) reactive with a somatic factor 8-like polysaccharide antigen. *J Clin Microbiol* 1992,30 :3050-3057.
33. Bouvet P, Jean Jean S. Evaluation of two colored Latex kits, the Wellcolex colour Salmonella test and the Wellcolex colour shigella test for serological grouping of Salmonella and Shigella species. *J Clin Microbiol* 1992,30:2184-2186.
34. Brenner DJ. Family I Enterobacteriaceae. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol.1. Williams & Wilkins, Baltimore 1984, p408-420
35. Ewing WH. Identification of Enterobacteriaceae 4th ed. New York, Elsevier 1986.
36. Farmer JJ, Kelly M. Enterobacteriaceae. In *Manual of clinical Microbiology*. Amer Society Microbiol 1991, p 360-382 .
37. Lindberg A, Karnell A, Weintraub A. The lipopolysaccharide of Shigella Bacteria as a virulence factor. *Rev Inf Dis* 1991 ,13 :279-284.
38. Salam M, Bennis M. Antimicrobial therapy of Shigellosis. *Rev Infect Dis* 1991,13: 332-341
39. Bratoeva M, John J, Barg N. Molecular epidemiology of trimethoprim-resistant Shigella boydi serotype 2 strains from Bulgaria. *J Clin Microbiol* 1992,30 :1428-1431.
40. Penner J. Genus proteus. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* .Vol 1 Williams and Willkins 1984, p.491-502
41. Palleroni NJ. Family Pseudomonadaceae. In *Bergey's Manual of systematic Bacteriology* .Vol 1 ,1984, p.141-199.
42. Gilardi G. Pseudomonas and related Genera. In *Manual of Clinical Bacteriology* ,5th Edition ,American Society for Microbiology ,1991,429-441.
43. Van Horn K. Mixed –morphotype broth microdilution susceptibility testing of Pseudomonas aeruginosa from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 1993,31 :458-459.
44. Schreiber JR, Cooper L, Diehn S, Dahlhauser P, Tosi M, Glass D et al. Variable region – identical monoclonal antibodies of different IgG subclass directed to pseudomonas aeruginosa. Lipopolysaccharide O-specific side chain function differently. *J Infect Dis* 1993 ,167:221-226. 4. Liu PV, Matsumoto H, Kusama H, Bergan T. Survey of heat stable major somatic antigen of pseudomonas aeruginosa. *Intern J system Bacteriol* 1983 ,3:256-264.

45. Legakis NJ, Aliferopoulou M, Papavasiliou J, Papapetropoulou M. Serotypes of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical specimens in relation to antibiotic susceptibility. *J Clin Microbiol* 1982,16:458.
46. Pitt TL, Livermore DM, Pitcher D, Vatopoulos AC, Legakis NJ. Multiresistant serotype O12 *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for a common strain in Europe. *Epiderm Infect* 1989,103 :565-567.
47. Farmer JJ, Weinstein RA, Zierdt CH, Brokopp CD. Hospital outbreaks caused by *Pseudomonas aeruginosa* : importance of serogroup O11. *J Clin Microbiol* 1982,16:266-270
48. Mutharia IM, Nicas TI, Hancock RE. Outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* serotype strains. *J Infect Dis* 1982,146:770-779.
49. Vazquez F, Mendoza Mc, Vilar A, Mendez FJ. Characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing septicemia in a Spanish Hospital 1981-1990. *J Microbiol Infect Dis* 1992,11:698-703.
50. Lazdunski A, Guzzo J, Filloux A, Bally M, Murgier M. Secretion of extracellular proteins by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* 1990,72:147-156.
51. Snell K, Holder IA, Leppla SA, Saelinger CB. Role of exotoxin and protease as possible virulence factors in experimental infections with *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 1978,19:839-845.
52. Taylor CD, Kibrey P, Burroughs E, Tredget EE. Site, bacteriology and risk factors occurring in a burn intensive care Unit. *Burns* 1992,18:332-335.
53. Tompson PD, Bowden ML, MacDonald K, Smith DJ, Prasad JK. A survey of burn hydrotherapy in United States. *J Burn Care Rehabil* 1990,11:151-155.
54. Tredget EE, Shankowsky HA, Joffe AM, Inkson T, Volpel K, Paranchych W et al. Epidemiology of infections with *Pseudomonas aeruginosa* in burn patients. The role of hydrotherapy. *J Med Microbiol* 1990,169-172.
55. Woods DE, Bass JA, Johanson WG, Straus DC. Role of adherence in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis patients. *Infect Immun* 1980,30:694-699.
56. Speert D, Campbell M, Davidson AG, Wong L. *Pseudomonas aeruginosa* colonization of the gastrointestinal tract in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis*. 1993,167:226-229
57. Insler MS, Core H. *Pseudomonas* keratitis and folliculitis from whirl – pool exposure. *Am J Ophthalmol* 1986,101:41-43.

58. Bottone EJ, Perez AA. Pseudomonas folliculitis acquired through use of a contaminated loofah sponge: an unrecognized potential Public Health problem. J Clin Microbiol 1993, 31:480-483.

59. Alcock SR. Acute otitis externa in divers working in the Northern Sea: a Microbiological survey of seven saturation divers. J Hygiene 1977, 78:395-409.

60. Sheckar R, Tice TW, Zierdl CH, Kalick CA. Outbreak of endocarditis by Pseudomonas aeruginosa serotype O11 among pentazocine and triphenamine abuser in Chicago. J Infect Dis 1985, 151:203-208

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

61. Παπαπαναγιώτου Ι., Κυριαζοπούλου-Δαλαΐνα Β. In: Εισαγωγή στην Ιατρική Μικροβιολογία, Ιολογία και Ανοσολογία, University StudioPress, 2005.

62. Αντιγόνη Αρσένη. Κλινική μικροβιολογία και εργαστηριακή διάγνωση λοιμώξεων (Τόμος 1) σελ. 237-244

63. Αρσένη Α. Enterobacteriaceae III. Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διάγνωση Λοιμώξεων 1994.

64. Παπαπαναγιώτου Ι., Κυριαζοπούλου-Δαλαΐνα Β. In: Εισαγωγή στην Ιατρική Μικροβιολογία, Ιολογία και Ανοσολογία, University Studio Press, 2005.

65. Καποτάς ΝΜ: Εμφάνιση αντοχής των Gram-αρνητικών βακτηρίων στα νεότερα μη υδρολυόμενα β-λακταμικά αντιβιοτικά. (1991).

66. Δουμπόγιας Ι., Τσακρής Α. Λοιμώξεις του Γαστρεντερικού Σωλήνα. Κλινική Μικροβιολογία. University Studio Press, 2000, 1:67-97

67. Αρσένη Α. Enterobacteriaceae II. Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διάγνωση Λοιμώξεων 1994. 276-309

68.Vatopoulos A,Philippou A,Tzouvelekis L,Komninou Z,Legakis N.Prevalance of a transferable SHV-5 type β -lactamasein clinical isolates of Klebsiella pneumonia and Escherichia Coli in Greece.J Antimicrob Chemother 1990,26:635-648.

69.Arseni A,Koutsia Ch,Liouira I,Mamoulaki M.In vitro activity of netilmicin against Klebsiella pneumonia.Clin Trials J 1979,16:133-139.

70. Αντιγόνη Αρσένη .Κλινική μικροβιολογία και εργαστηριακή διάγνωση λοιμώξεων(Τόμος 1) σελ.300-306

71. Λεοναρδόπουλος Ι., Κούρτη Ε. Εντεροβακτηριακά. Αντωνιάδης Α., Αντωνιάδης Γρ., Λεγάκης Ν., Τσελέντης Ι.

72.Αντιγόνη Αρσένη .Κλινική μικροβιολογία και εργαστηριακή διάγνωση λοιμώξεων(Τόμος 1) σελ.278-297

73. Αντιγόνη Αρσένη .Κλινική μικροβιολογία και εργαστηριακή διάγνωση λοιμώξεων(Τόμος 1) σελ.263-274

74.Αντιγόνη Αρσένη .Κλινική μικροβιολογία και εργαστηριακή διάγνωση λοιμώξεων(Τόμος 1) σελ.319-324

75. Αντιγόνη Αρσένη .Κλινική μικροβιολογία και εργαστηριακή διάγνωση λοιμώξεων(Τόμος 2) σελ.637-650

76.Βογιατζή-Ηλιάδη Α.Η pseudomonas aeruginosa στη χρόνια πνευμονοπάθεια ασθενών με κυστική ίνωση.Εφαρμ.Κλιν.Μικροβιολ.Εργ Διαγν 1991,6:63-71

ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

77. <http://mednews.com/>

78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

79. <http://www.zoomed.com/>

80. <http://doctors.in.gr/>

ΕΙΚΟΝΕΣ

Εικόνα 1:Wikipedia

Εικόνα 2:Wikipedia

Εικόνα 3: The picture is from The National Institute of Allergy and infectious diseases

Εικόνα 4: Dontorou A, Papadopoulou C, Filioussis G, Apostolou I, Economou V, Kansouzidou A. Isolation of a rare E.coli O157:H7 strain from farm animals in

Greece. Abstr n.50. 6th Congress of Balkan Military Medical Committee (BMMC),
2001, Plovdiv, Bulgaria

Εικόνα 5: <http://jcm.asm.org> (Journal Of Clinical Microbiology)

Εικόνα 6: From Wikipedia, the free encyclopedia

Εικόνα 7: From Wikipedia, the free encyclopedia

Εικόνα 8: From Wikipedia, the free encyclopedia

Εικόνα 9: From Wikipedia, the free encyclopedia

Εικόνα 10: Picture from the American society for microbiology (ASM microbelibrary)

Εικόνα 11: This image is a work of the Centers for Disease Control and Prevention, part of
the United States Department of Health and Human Services

Εικόνα 12: <http://www.nih.gov>

Εικόνα 13: From Journal of Clinical Microbiology are provided here courtesy of **American
Society for Microbiology (ASM)**

Εικόνα 14: Picture from The National Library of Medicine

Εικόνα 15: Picture from the American society for microbiology (ASM microbelibrary)