



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

**Έλεγχος Δράσης βιοενεργών ουσιών Ακτινοβακτηρίων έναντι
παθογόνων (κλινικών) μικροοργανισμών**

Msc Μαμούχα Σταυρούλα

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επιβλέπουσα

Α.Δ. Καραγκούνη-Κύρτσου

Καθηγήτρια

Συνεπιβλέπουσα

Ε. Φακίρη

Διευθύντρια Μικροβιολογικού Εργαστηρίου,

Γ.Ν.Α Σισμανόγλειο



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»**

**Έλεγχος Δράσης βιοενεργών ουσιών Ακτινοβακτηρίων έναντι
παθογόνων (κλινικών) μικροοργανισμών**

Msc Μαμούχα Σταυρούλα

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επιβλέπουσα

Α.Δ. Καραγκούνη-Κύρτσου

Καθηγήτρια

Συνεπιβλέπουσα

Ε. Φακίρη

Διευθύντρια Μικροβιολογικού Εργαστηρίου,

Γ.Ν.Α Σισμανόγλειο

Εξεταστική επιτροπή:

1. Αμαλία Καραγκούνη-Κύρτσου, Καθηγήτρια
2. Διαλλινός Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής
3. Χατζηνικολάου Δημήτρης, Επίκουρος Καθηγητής

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΣΤΑΥΡΟΥΛΑΣ ΜΑΜΟΥΧΑ

ΘΕΜΑ : «Έλεγχος δράσης βιοενεργών ουσιών Ακτινοβακτηρίων έναντι παθογόνων
(κλινικών) μικροοργανισμών»

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η ικανότητα παραγωγής βιοενεργών ουσιών από περιβαλλοντικά στελέχη του γένους *Streptomyces* και κλινικά στελέχη των γενών *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Streptomyces* έναντι κλινικών παθογόνων μικροοργανισμών. Στη συνέχεια, συγκρίθηκε η δράση των παραγόμενων βιοενεργών ουσιών με τα ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά, σύμφωνα με τις οδηγίες που προτείνονται από τα Πρότυπα του Συμβουλίου κλινικών εργαστηρίων, Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

Η βιοενεργότητα των περιβαλλοντικών στελεχών είχε διερευνηθεί έναντι θετικών και αρνητικών κατά Gram περιβαλλοντικών μικροοργανισμών. Τα κλινικά στελέχη απομονώθηκαν από ανθρώπινα αναπνευστικά κυρίως δείγματα τα οποία καλλιεργήθηκαν σε στερεά και υγρά εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα και ταυτοποιήθηκαν με βιοχημικές και μοριακές τεχνικές.

Η μέθοδος που επιλέχθηκε για τον έλεγχο παραγωγής βιοενεργών ουσιών ήταν η Διάχυση Αντιμικροβιακής ουσίας σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Στα πλαίσια της Διπλωματικής αυτής χρησιμοποιήθηκαν ως μικροοργανισμοί δείκτες κλινικά στελέχη θετικών κατά Gram βακτηρίων των γενών *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Nocardia*, *Mycobacterium* και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων των γενών *Proteus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Escherichia*.

Από τα δέκα επτά στελέχη *Streptomyces* που εξετάστηκαν, τα δέκα τέσσερα παρήγαγαν βιοενεργές ουσίες που προκάλεσαν αναστολή μόνο των θετικών κατά Gram μικροοργανισμών δεικτών. Αναστολή ανάπτυξης παρατηρήθηκε σε δυο στελέχη του γένους *Staphylococcus*, σε δέκα στελέχη του γένους *Nocardia* και σε έξι *Mycobacterium* - other than - *tuberculosis*. Καμία βιοενεργή ουσία δεν παράχθηκε από τα κλινικά στελέχη των γενών *Nocardia*, *Mycobacterium* και *Streptomyces*.

Προκειμένου να συγκριθεί η δραστηριότητα των παραγόμενων βιοενεργών ουσιών με τα δισκία αντιβιοτικών του εμπορίου, πραγματοποιήθηκε εξέταση ευαισθησίας στους μικροοργανισμούς δείκτες των οποίων ανεστάλη η ανάπτυξη. Συγκρίνοντας τη διάμετρο της ζώνης αναστολής από την παραγόμενη βιοενεργή ουσία με την αντίστοιχη ζώνη του δισκίου αντιβιοτικού, παρατηρήθηκε ότι η δραστηριότητα των βιοενεργών ουσιών ήταν συγκρίσιμη και σε ορισμένες περιπτώσεις μεγαλύτερη από γνωστά αντιβιοτικά.

Λέξεις-κλειδιά: Δευτερογενείς ουσίες, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*

Abstract

SCREENING FOR ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF NATURAL PRODUCTS PRODUCED BY ENVIRONMENTAL AND CLINICAL ISOLATES OF ACTINOBACTERIA AGAINST CLINICAL STRAINS

The purpose of this work was to screen for bioactive compounds from environmental strains of *Streptomyces*, producing antibiotics, and from clinical isolates belonging to the genus *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*. The bioactive compounds were compared with the commercially available antibiotic disks used in General Hospital Sismanoglio.

According to previous studies, *Streptomyces* were bioactive against environmental strains. Clinical strains were cultured on solid and liquid selective media and identified by biochemical and molecular methods.

The screening for bioactive compounds was performed by Agar Diffusion Method. Clinical strains of Gram positive (*Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Nocardia*, *Mycobacterium*) and Gram negative (*Proteus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Escherichia*) bacterium were used as test organisms.

From the 17 *Streptomyces* tested, 14 produced bioactive compounds against Gram positive bacteria. Growth inhibition was noticed to 2 clinical strains *Staphylococcus*, 10 *Nocardia* strains and 6 *Mycobacterium* Other Than Tuberculosis. Clinical strains of *Nocardia*, *Mycobacterium* and *Streptomyces* did not produce any bioactive compound.

Susceptibility test (Kirby Bauer Method) was performed to all test organism whose growth was inhibited by bioactive compounds. Comparing the diameter zone of inhibition from bioactive compounds with that from antibiotic disks, they were equal and in some assays bigger. Those environmental strains are retained for further investigation, in particular, purification, structure elucidation, and mechanism of action of the active product.

Key words: Secondary Metabolites, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*

Στην κόρη μου Εύα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη

Κεφάλαιο 1^ο – Εισαγωγή

1.1	Βακτήρια του φύλου Actinobacteria	1
1.2	Βακτήρια του γένους <i>Streptomyces</i>	4
1.3	Βακτήρια γένους <i>Nocardia</i>	7
1.4	Βακτήρια γένους <i>Mycobacterium</i>	16
1.5	Βιοενεργές ενώσεις που έχουν απομονωθεί από περιβαλλοντικά και κλινικά στελέχη Ακτινοβακτηρίων	27
1.6	Βιβλιογραφικά προτεινόμενες μέθοδοι προσδιορισμού της βιοενεργότητας	35
1.7	Στόχοι διπλωματικής εργασίας	39

Κεφάλαιο 2^ο – Υλικά και Μέθοδοι

2.1	Έλεγχος βιοενεργότητας ενδογενών εδαφικών στελεχών του γένους <i>Streptomyces</i> και κλινικών στελεχών των γενών <i>Nocardia</i> , <i>Streptomyces</i> και <i>Mycobacterium</i>	42
2.2	Κλινικά στελέχη για τον έλεγχο δράσης βιοενεργών ουσιών	42
2.3	Θρεπτικά υποστρώματα	43
2.4	Διαλύματα - ρυθμιστικά διαλύματα	45
2.5	Επεξεργασία κλινικών δειγμάτων για απομόνωση και ταυτοποίηση βακτηρίων	47
2.5.1	Βακτήρια των γενών <i>Staphylococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i> και <i>Escherichia</i>	48
2.5.2	Βακτήρια των γενών <i>Nocardia</i> και <i>Streptomyces</i>	48
2.5.3	Βακτήρια του γένους <i>Mycobacterium</i>	
	A. Λήψη και προετοιμασία δειγμάτων	49
	B. Απομόνωση βακτηρίων του γένους <i>Mycobacterium</i> με τη μέθοδο εμπλουτισμού N – ακετυλ – L - κυστεΐνης (NALC-NaOH)	50
2.6	Φαινοτυπικός προσδιορισμός βακτηρίων	53
2.6.1	Χρώση Gram	53
2.6.2	Οξεάντοχη χρώση Ziehl Nielsen	54
2.7	Ταυτοποίηση κλινικών στελεχών του γένους <i>Mycobacterium</i>	55
2.7.1	Άμεση ενίσχυσης 16S rRNA αλληλουχιών του <i>Mycobacterium</i> με τη χρήση της τυποποιημένης μεθόδου Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test (A-MTD)	55
2.7.2	Τυποποιημένη μέθοδος ταυτοποίησης κλινικών στελεχών του γένους <i>Mycobacterium</i> - GenoType [®] Mycobacterium CM/AS της Hain Lifescience	59
2.8	Επιλογή μεθόδου ανίχνευσης βιοενεργων ουσιών – Μέθοδος Διάχυσης αντιβιοτικής ουσίας σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα	62
2.9	Εξέταση ευαισθησίας κλινικών στελεχών με τη μέθοδο Διάχυσης Αντιβιοτικού σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (Kirby-Bauer method)	66

Κεφάλαιο 3^ο – Αποτελέσματα

3.1	Απομόνωση κλινικών στελεχών του γένους <i>Mycobacterium</i>	69
3.2	Απομόνωση κλινικών στελεχών του γένους <i>Nocardia</i>	71
3.3	Απομόνωση κλινικών στελεχών του γένους <i>Streptomyces</i>	72
3.4	Απομόνωση κλινικών στελεχών των γενών <i>Staphylococcus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Proteus</i> και <i>Escherichia</i>	73
3.5	Ταυτοποίηση βακτηρίων του γένους <i>Mycobacterium</i>	73
3.6	Ταυτοποίηση βακτηρίων των γενών <i>Staphylococcus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Proteus</i> και <i>Escherichia</i>	76
3.7	Γένη του φύλου Ακτινοβακτηρίων που εξετάστηκαν για τη δράση βιοενεργών ουσιών	76
3.7.1	Ενδογενή, εδαφικά στελέχη του γένους <i>Streptomyces</i>	77
3.7.2	Κλινικά, παθογόνα στελέχη των γενών <i>Nocardia</i> , <i>Streptomyces</i> και <i>Mycobacterium</i>	78
3.8	Επιλογή μεθόδου για τον έλεγχο δράσης βιοενεργών ουσιών από ενδογενή, εδαφικά στελέχη του γένους <i>Streptomyces</i> και κλινικά στελέχη των γενών <i>Nocardia</i> , <i>Streptomyces</i> και <i>Mycobacterium</i>	78
3.9	Έλεγχος δράσης βιοενεργών ουσιών από ενδογενή, εδαφικά στελέχη γένους <i>Streptomyces</i> έναντι θετικών και αρνητικών κατά Gram κλινικών βακτηρίων	79
3.10	Έλεγχος δράσης βιοενεργών ουσιών κλινικών στελεχών γένους <i>Mycobacterium</i> - other than - <i>tuberculosis</i> έναντι θετικών κατά Gram κλινικών βακτηρίων	87
3.11	Έλεγχος δράσης βιοενεργών ουσιών κλινικών στελεχών γένους <i>Nocardia</i> έναντι θετικών και αρνητικών κατά Gram κλινικών βακτηρίων	88
3.12	Έλεγχος δράσης βιοενεργών ουσιών κλινικών στελεχών γένους <i>Streptomyces</i> έναντι θετικών και αρνητικών κατά Gram κλινικών βακτηρίων	89
3.13	Σύγκριση δράσης βιοενεργών ουσιών με αντιβιοτικά του εμπορίου	90

Κεφάλαιο 4 ^ο - Συζήτηση	123
------------------------------------	-----

Κεφάλαιο 5 ^ο - Βιβλιογραφικές αναφορές	129
---	-----

Παράρτημα 1 Δημοσιεύσεις από τη διπλωματική εργασία - 5 ^ο Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Νοσοκομειακών Λοιμώξεων - Ποστερ	146
Παράρτημα 2 Δημοσιεύσεις από τη διπλωματική εργασία - 5 ^ο Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Νοσοκομειακών Λοιμώξεων- Δημοσιεύσιμη εργασία	
Παράρτημα 3 Δημοσιεύσεις από τη διπλωματική εργασία - 11 th Conference of Bacterial Genetics and Ecology BAGECO - Poster	
Παράρτημα 4 Δημοσιεύσεις από τη διπλωματική εργασία - 2 ^ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο Τεχνολόγων Ιατρικών Εργαστηρίων - Προφορική Ανακοίνωση	

Κεφάλαιο 1^ο – Εισαγωγή

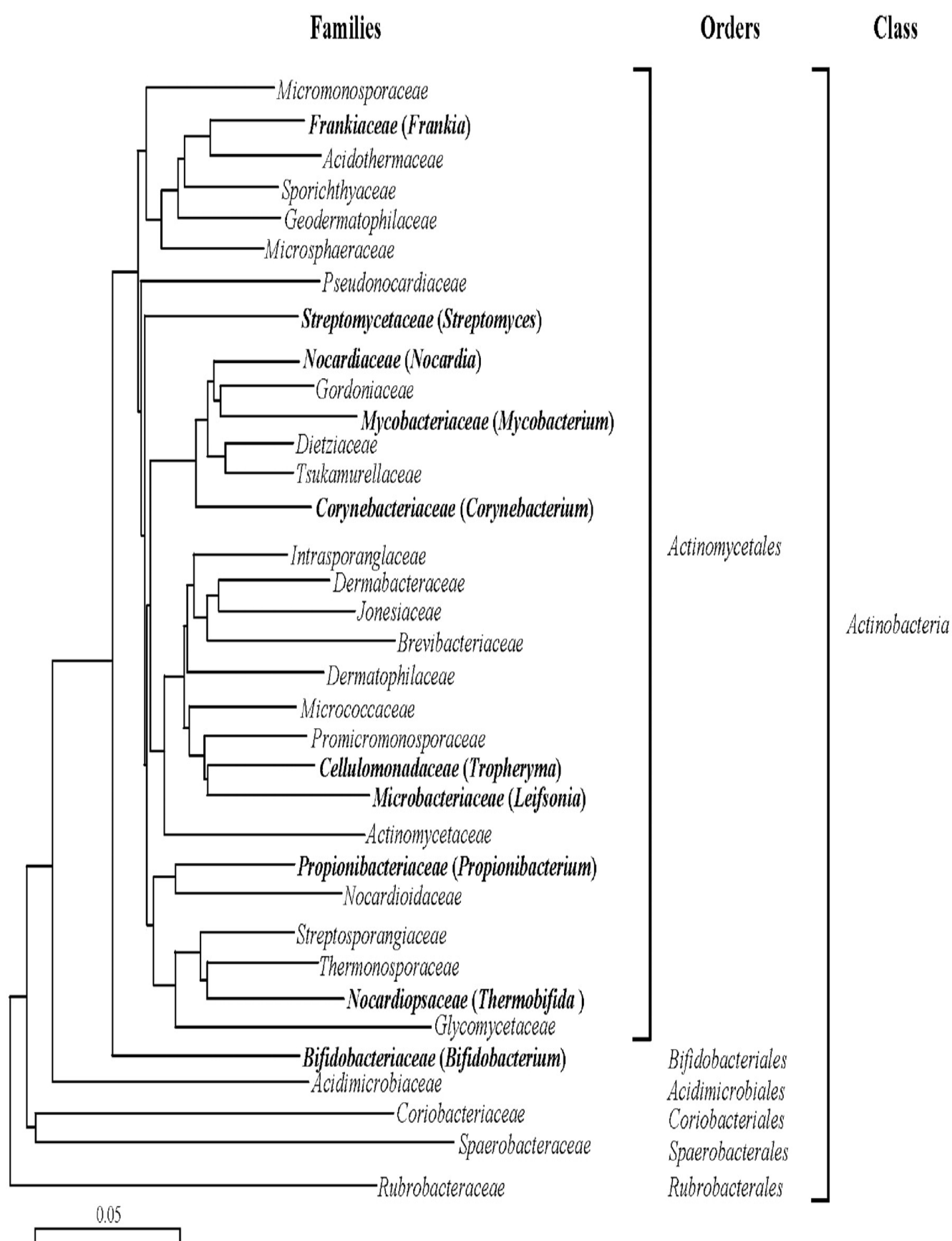
1.1 Βακτήρια του φύλου Actinobacteria

Τα Ακτινοβακτήρια είναι μια μεγάλη ομάδα νηματοειδών, θετικών κατά Gram βακτηρίων με εξαίρεση εκείνα των γενών *Acetobacterium*, *Butyrivibrio*, *Thermoanaerobacter* (Εικόνα 1.1) (Madigan και συνεργάτες 1997). Είναι αερόβια με υψηλή αναλογία βάσεων γουανίνης-κυτοσίνης (G+C) η οποία ποικίλει από 51 % σε ορισμένα *Corynebacterium* έως τουλάχιστον 70 % στα *Streptomyces* και *Frankia*. Εξαίρεση αποτελεί το παθογόνο *Tropheryma whippelii* με αναλογία G+C μικρότερη από 50 % (Ventura και συνεργάτες 2007). Το όνομα ακτινομύκητες οφείλεται στο *Actinomyces bovis*, το πρώτο βακτήριο που μελετήθηκε και προκαλεί ακτινομυκητώμα στις αγελάδες (Yadav 2007).

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά διαφέρουν ανάλογα με το γένος. Έτσι, μπορεί να είναι κόκκοι (*Micrococcus*), κοκκοβάκιλοι (*Arthrobacter*), νηματοειδή βακτήρια (*Nocardia*), να σχηματίζουν μηκύλια (*Streptomyces*) ή σχοινοειδή παράγοντα (*Mycobacterium*). Πολλά από τα Actinobacteria είναι γνωστά για την παραγωγή δευτερογενών ουσιών με βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον (*Streptomyces* και *Nocardia*). Το φύλο περιλαμβάνει παθογόνα βακτήρια (γένη *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Tropheryma*, *Corynebacterium* και *Propionibacterium*), σαπρόφυτα εδάφους (γένος *Streptomyces*), συμβιωτικά βακτήρια φυτών (γένος *Leifsonia*) και αποικιστές γαστρεντερικού σωλήνα (γένος *Bifidobacterium*). Τα ενδιααιτήματά τους μπορεί να είναι το έδαφος (βιοξυγίαση, βιοέλεγχος), τα υδατινα περιβάλλοντα και ο ανθρώπινος οργανισμός (προβιοτικά βακτήρια) (Ventura και συνεργάτες 2007).

Τα γένη που έχουν κλινικό ενδιαφέρον είναι τα γένη *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* και *Gordonia*. Τα βακτήρια γένους *Streptomyces* θεωρούνται ευκαιριακά παθογόνα παρόλο που μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές λοιμώξεις (Carey και συνεργάτες 2001, Kapadia και συνεργάτες 2007).

Βιοενεργοί μικροοργανισμοί έχουν απομονωθεί από χερσαία και υδάτινα ενδιααιτήματα καθώς και από κλινικά δείγματα. Η βιοενεργότητα των μικροοργανισμών του εδάφους είναι γνωστή. Οι οργανισμοί αυτοί λόγω εξελεκτικής πίεσης παραγουν αντιμικροβιακές ουσίες που επιτρέπουν την επιβίωσή τους.



Εικόνα 1.1 Φυλογενετικό δέντρο βακτηρίων φύλου Actinobacteria βάσει ενίσχυσης 16S rRNA μετά από μελέτη των Ventura και συνεργατών το 2007. Με μαύρο χρώμα αποδίδονται οι οικογένειες οι οποίες περιέχουν μέλη με χαρτογραφημένα γονιδιώματα (Ventura και συνεργάτες 2007)

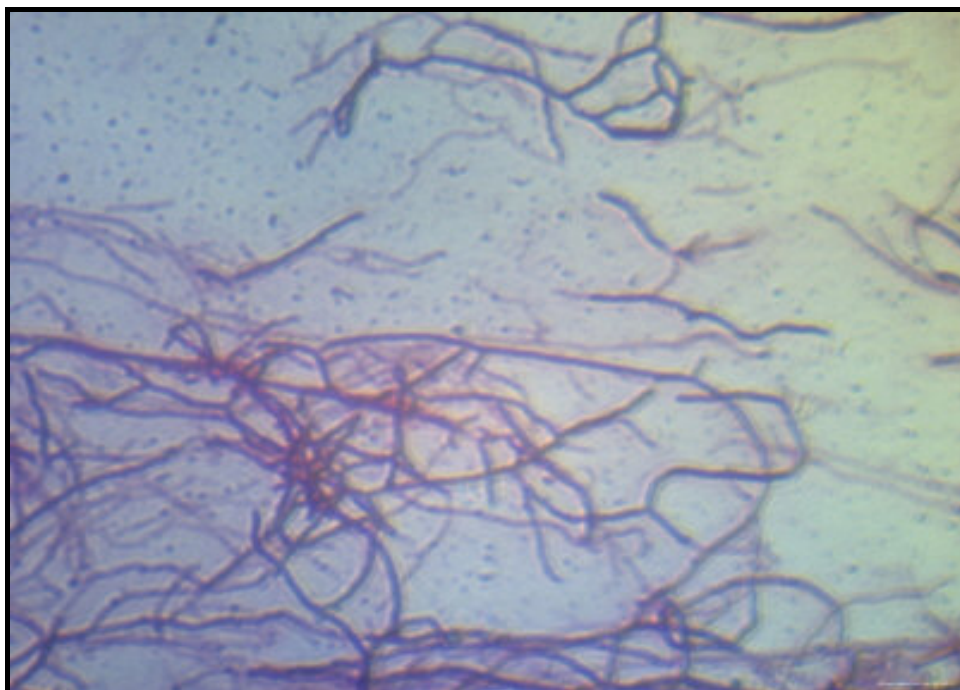
Περισσότερα από 120 ισχυρά αντιβιοτικά (kanamycin, gentamicin, cyclosporin A, adriamycine) προέρχονται από τέτοιου είδους βακτήρια ή μύκητες (Ahmed και συνεργάτες 2008).

Τα τελευταία είκοσι χρόνια γίνονται έρευνες για νέα αντιβιοτικά που παράγονται από θαλάσσιους μικροοργανισμούς. Το 1966 ανακαλύφθηκε το πρώτο αντιβιοτικό από ένα βακτήριο θάλασσας. Βιοενεργές ουσίες έχουν απομονωθεί από τις βιομεμβράνες που σχηματίζουν οι μικροοργανισμοί πάνω στους θαλάσσιους οργανισμούς αλλά και από επιφυτικά βακτήρια με σκοπό να αποτρέψουν τον αποικισμό άλλων βακτηρίων (Kim και συνεργάτες 2006, Tae Kyung και συνεργάτες 2006, Ahmed και συνεργάτες 2008). Τα έτη 1995-1998 πραγματοποιήθηκε έρευνα σε στελέχη ακτινοβακτηρίων που απομονώθηκαν από την Ανταρκτική (Nedialkova και Naidenova 2005). Το 60 % των στελεχών παρήγαγε αντιμικροβιακές και αντιμυκητιακές ουσίες για φυτοπαθογόνα βακτήρια (*Pseudomonas syringae* p.v. *tabaci*, *Xanthomonas campestris* p.v. *vesicatoriae*) και μύκητες (*Ascomphyta melonis*, *Cladosporium fulvum*, *Cladosporium* sp, *Fusarium avenaceum*) αντιστοιχα. Βιοενεργά αποδείχτηκαν και στελέχη ακτινοβακτηρίων που απομονώθηκαν από τη λίμνη Λακτοκ στην Ινδία. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας, τα 21 στελέχη από τα 37 παρήγαγαν βιοενεργές ουσίες (Shantikumar και συνεργάτες 2006).

Νέα αντιβιοτικά απομονώθηκαν και από κλινικά παθογόνους μικροοργανισμούς γένους *Nocardia* (Speitling και συνεργάτες 1998, Mikami και συνεργάτες 2000, Mukai και συνεργάτες 2006). Τα βακτήρια μετά την είσοδό τους στον άνθρωπο και τα ζώα, έχουν να αντιμετωπίσουν όλα τα μικρόβια της φυσιολογικής χλωρίδας του σώματος. Για το λόγο αυτό έχουν μηχανισμούς άμυνας, που πολλές φορές υπερσχύουν έναντι των κοινών μικροοργανισμών. Από κλινικά στελέχη ακτινοβακτηρίων απομονώθηκαν και αντιμυκητιακές ουσίες. Στη Γαλλία έγινε μια έρευνα σε 110 στελέχη κλινικών ακτινοβακτηρίων (91 στελέχη *Streptomyces*, 11 *Nocardia asteroides sensus stricto*, 3 *Nocardia farcinica*, 3 *Nocardia nova*, 1 *Nocardia brasiliensis* και 1 *Nocardia otitidiscaviarum*) και βρέθηκε ότι το 49 % παρήγαγαν βιοενεργές ουσίες με αντιμυκητιακή δράση (Lemriss και συνεργάτες 2003).

1.2 Βακτήρια του γένους *Streptomyces*

Το γένος *Streptomyces* περιλαμβάνει χημειοοργανότροφα, σποροφόρα ακτινοβακτήρια (Εικόνα 1.2). Είναι το πιο μελετημένο από τα υπόλοιπα γένη του φύλου των Actinobacteria που σχηματίζουν μηκύλιο (Ventura και συνεργάτες 2007). Αυτό οφείλεται καταρχήν στη μεγάλη συγκέντρωσή του στο έδαφος, στην ικανότητα αποικοδόμησης ενώσεων μεταβολισμού φυτών και ζώων συμπεριλαμβανόμενων πολυσακχαριτών (πχ. άμυλο, χιτίνη, πηκτίνη, λιγνοκυταρίνη), πρωτεϊνών (πχ. κερατίνη, ελαστίνη) και διαφόρων αρωματικών υποστρωμάτων αλλά και στο γεγονός ότι αποτελούν τη μεγαλύτερη φυσική πηγή παραγωγής αντιβιοτικών και άλλων δευτερογενών ουσιών (Ventura και συνεργάτες 2007). Επιπλέον, ο χαρακτηριστικός κύκλος αύξησής τους επιτρέπει να προσαρμόζονται σε απότομα μεταβαλλόμενες συνθήκες περιβάλλοντος αφού η ανθεκτική μορφή των σπορίων τους δίνει τη δυνατότητα να επιβιώνουν για μακρά χρονικά διαστήματα ξηρασίας, ψύχους, υδροστατικής πίεσης και αναερόβιων συνθηκών (Κατσίφας 1999, Διδακτορική Διατριβή).



Εικόνα 1.2 Στελεχος *Streptomyces* όπως φαίνεται στο φωτονικό μικροσκόπιο με χρώση κατά Gram (http://www.allposters.com/-sp/Streptomyces-Species-Gram-Stain-Posters_i4259683_.htm)

Οι περισσότεροι είναι οργανισμοί του εδάφους, αν και απαντούν και σε υδάτινα ενδιαιτήματα (Haknåg και συνεργάτες 2008). Τα αλκαλικά και ουδέτερα εδάφη είναι

κατάλληλα για την ανάπτυξη των στρεπτομυκήτων. Η χαρακτηριστική χωμάτινη οσμή του εδάφους, οφείλεται στην παραγωγή σειράς μεταβολιτών των στρεπτομυκήτων που ονομάζονται γεωσμίνες. Οι ουσίες αυτές είναι τερπενοειδή C₁₅ (ακόρεστες ενώσεις δακτυλίου άνθρακα, οξυγόνου και υδρογόνου). Μια κοινή γεωσμίνη είναι η trans-1.10-διμεθυλο-trans-9-δεκαλόλη (Madigan και συνεργάτες 1997).

Όσον αφορά στη φυσιολογία τους, παρουσιάζουν αρκετά μεγάλη διατροφική ευελιξία. Οι απαιτήσεις τους για απόλυτα απαραίτητους παράγοντες ανάπτυξης είναι σπάνιες, ενώ μπορούν να χρησιμοποιούν ευρύτατη ποικιλία σακχάρων, αλκοολών, οργανικών οξέων, αμινοξέων και ορισμένων αρωματικών ενώσεων. Ένα και μόνο στέλεχος μπορεί να διασπάσει πάνω από πενήντα διαφορετικές πηγές άνθρακα.

Οι στρεπτομύκητες είναι σε θέση να ανταγωνίζονται με επιτυχία τους άλλους μικροοργανισμούς του εδάφους για τους εξής λόγους: α) είναι σε θέση να αποικοδομούν σχετικά πολύπλοκα προϊόντα μεταβολισμού φυτών και ζώων συμπεριλαμβανόμενων πολυσακχαριτών, πρωτεϊνών (πχ. κερατίνη, ελαστίνη) και διαφόρων αρωματικών υποστρωμάτων, β) αρκούνται για την επιβίωσή τους σε μια ανόργανη πηγή αζώτου και δεν χρειάζονται βιταμίνες σαν αυξητικούς παράγοντες, γ) για τη μυκηλιακή τους αύξηση στο έδαφος χρησιμοποιούν μια πληθώρα επιφανειών, δ) ο χαρακτηριστικός κύκλος αύξησης (σπόρια-μυκήλια-σπόρια) τους επιτρέπει να προσαρμόζονται σε απότομα μεταβαλλόμενες συνθήκες περιβάλλοντος (Κατσίφας 1999, Διδακτορική Διατριβή).

Από το 1940-1957 ανακαλύφθηκαν περισσότερα από 1000 είδη *Streptomyces*. Μετά το 1970, ο συνολικός αριθμός έφτασε το 3100 (McNeil και Brown 1994). Το 1983 έγινε η προσπάθεια ομοδοποίησης 300 στελεχών *Streptomyces* και *Streptoverticillium* σε 41 μικρές ομάδες (2-5 στελεχών), 22 ομάδες με ένα μέλος και 20 κύριες ομάδες με 6-71 στελέχη. Τα ονόματα των ομάδων δόθηκαν από το πιο πρόσφατα μελετημένο στέλεχος της κάθε κατηγορίας. Για παράδειγμα, εφόσον το *Streptomyces anulatus* ανακαλύφθηκε πριν το *S. griseus*, το όνομα της ομάδας θα είναι *S. anulatus* (McNeil και Brown 1994).

Παρόλο που απομονώνονται βακτήρια του γένους *Streptomyces* από κλινικά δείγματα δεν αξιολογούνται επειδή σπάνια προκαλούν λοιμώξεις. Ωστόσο, έχουν απομονωθεί από τον άνθρωπο και τα ζώα ως ευκαιριακά παθογόνοι μικροοργανισμοί. Στελέχη που προκαλούν το ακτινομυκήτωμα, με εντοπισμό στο κεφάλι και το λαιμό, ανήκουν

στο *Streptomyces paraguayensis* και *S.somaliensis* (έχει απομονωθεί στη Σαουδική Αραβία, Νιγηρία, Ινδία, Βενεζουέλα, Μεξικό, Ν.Αφρική) (McNeil και Brown 1994). Το 1973, ταυτοποιήθηκαν 23 κλινικά στελέχη *Streptomyces*. Τέσσερα ανήκαν στο *S. somaliensis*, δυο στο *Streptomyces fradiae* ενώ τα υπόλοιπα 19 δεν ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο είδους (McNeil και Brown 1994). Μεταγενέστερη έρευνα, το 1980, μελέτησε 110 κλινικά στελέχη εκ των οποίων το 53 % ήταν *S. griseus* ενώ το 25 % *S. somaliensis* (Εικόνα 1.3). Τα υπόλοιπα ανήκαν στα γένη *Streptomyces albus*, *Streptomyces rimosus* και *Streptomyces lavendulae*. Στη συγκεκριμένη έρευνα, το *S. griseus* ήταν τρίτο στη συχνότητα απομόνωσης μετά τα *N. asteroides* και *N. brasiliensis* (Mishra και συνεργάτες 1980).

Το 1990, σε μελέτη διάρκειας 29 μηνών καταγράφησ κρουσμάτων από αερόβια ακτινοβακτήρια. Από τις 366 απομονώσεις, το *S. griseus* κατείχε πάλι την τρίτη θέση (7,7 %) μετά τα *N. asteroides* και *Actinomadura madurae*. Τα κλινικά δείγματα από τα οποία απομονώθηκε το *S. griseus* ήταν κυρίως πτύελα και αίμα (McNeil και συνεργάτες 1990). Έχουν αναφερθεί μεμονωμένα περιστατικά μη-μυκητωμικών μολύνσεων από *Streptomyces*.



Εικόνα 1.3 Ακτινομυκητώμα σε πόδι ασθενούς ύστερα από μόλυνση με *S. somaliensis* (Joshi 2008)

Για παράδειγμα, τα *Streptomyces violaceoruber*, *S. coelicolor* και *S. albus* έχουν απομονωθεί από αίμα, πτύελα, αμυγδαλές, δέρμα ασθενών με αναπνευστική στρεπτοτρίχωση, το *Streptomyces gedaensis* από πτύελα και αποστήματα, το

Streptomyces horton από πύο και το *Streptomyces willmorei* από στρεπτοτρίχωση στομάχου (McNeil και συνεργάτες 1990). Επίσης, στελέχη του γένους *Streptomyces* έχει απομονωθεί και από καλλιέργεια περικαρδιακού υγρού ασθενούς αλλά και από βρογχικές εκκρίσεις αποτελώντας αίτιο πνευμονίας σε οροθετικό HIV ασθενή (McNeil και συνεργάτες 1990).

1.3 Βακτήρια του γένους *Nocardia*

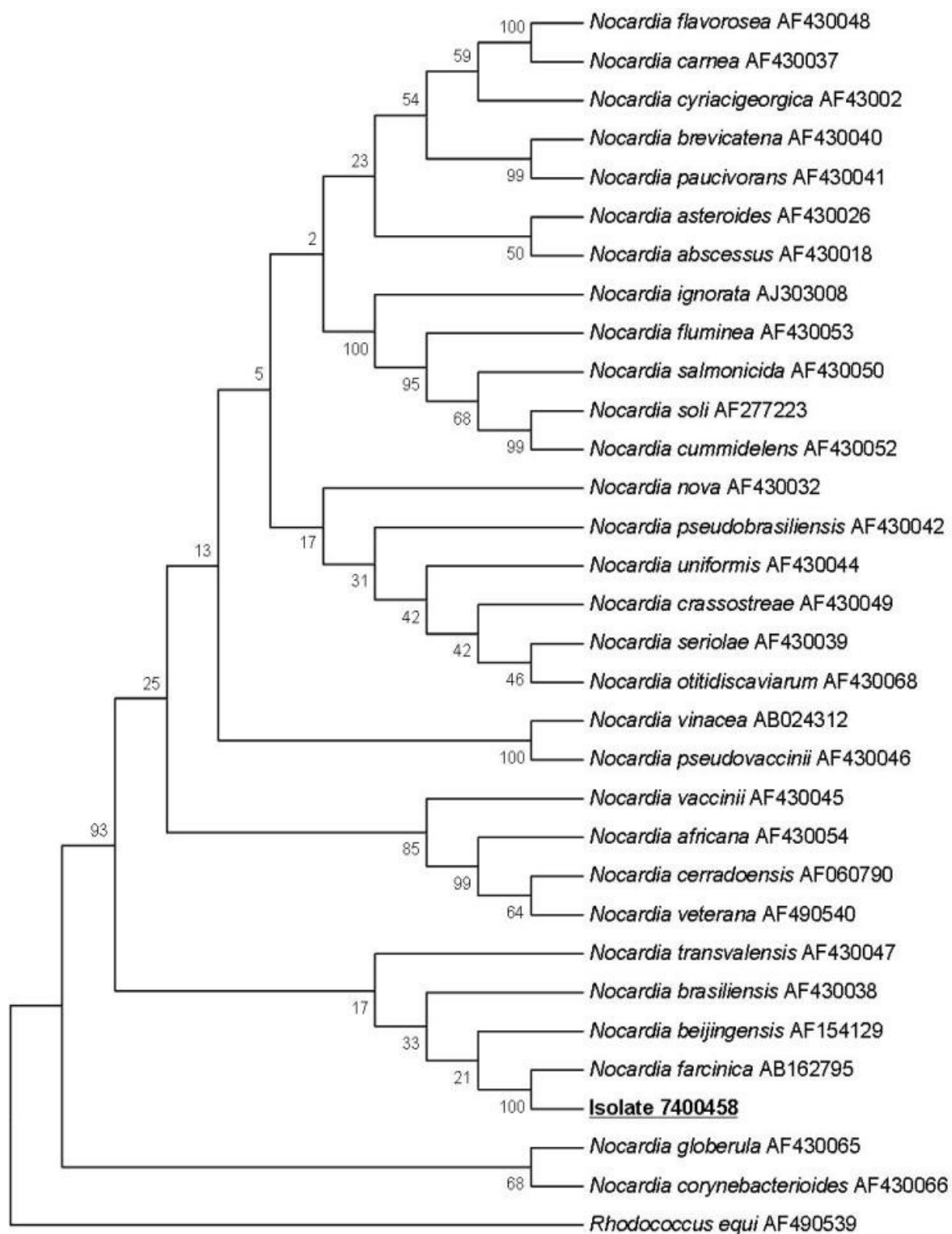
Τα στελέχη του γένους *Nocardia* ανήκουν στην οικογένεια Nocardiaceae της τάξης Actinomycetales (Wallace και Steele 1998). Πρόκειται για θετικά κατά Gram νηματοειδή βακτήρια (Εικόνα 1.4). Ο πρώτος μικροοργανισμός που χαρακτηρίστηκε *Nocardia* απομονώθηκε από μια αγελάδα με λεμφαδενίτιδα. Το όνομα δόθηκε από τον κτηνίατρο που το ανακάλυψε, τον Edmond Nocard το 1888. Ένα χρόνο αργότερα, ο Trevisan μελέτησε το βακτήριο και το ονόμασε *Nocardia farcinica* γνωστό και ως *Nocardia farcinica* Trevisan. Αρχικά περιγράφηκε ως μύκητας και αργότερα χαρακτηρίστηκε αερόβιο (Bernadete και συνεργάτες 2007). Είναι σαπροφυτικοί μικροοργανισμοί, απομονώνονται κυρίως από το έδαφος, το νερό (γλυκό ή αλμυρό) και από ύλη που βρίσκεται σε αποσύνθεση (Brown και McNeil 2003, Saubolle και Sussland 2003).

Στο γένος ανήκουν περισσότερα από 50 είδη που έχουν μελετηθεί με φαινοτυπικές και μοριακές τεχνικές (Raquel και συνεργάτες 2008). Τα μισά είδη έχουν χαρακτηριστεί ως παθογόνα για τον άνθρωπο και τα ζώα. Η μετάδοση γίνεται κυρίως αερογενώς.

Τα παθογόνα στελέχη που προσβάλλουν τον άνθρωπο είναι τα *N. asteroides complex* (*N. asteroides* VI, *N. farcinica*, *N. nova* και *N. abscessus*), *N. brasiliensis*, *N. otitidiscaviarum*, *N. transvalensis*, *N. cyriacigeorgica*, *N. asiatica*, and *N. beijingensis* (Mikami 2007). Μολύνει κυρίως ανοσοκατασταλμένους ασθενείς και η συχνότητα απομόνωσης ποικίλει ανάλογα με την γεωγραφική θέση.

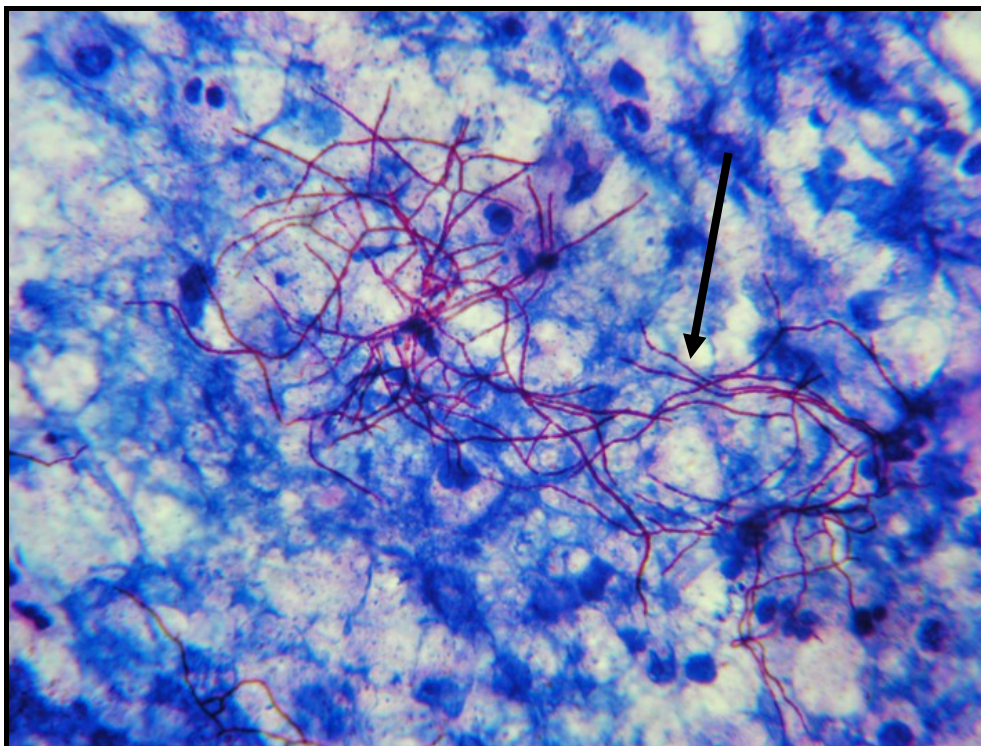
Κλασική μέθοδος ταυτοποίησης είναι η μελέτη της μορφολογίας και οι βιοχημικές δοκιμασίες. Όσον αφορά τη μορφολογία, οι αποικίες είναι συνήθως λευκές, μπορεί όμως να εμφανιστούν κίτρινες, ρόζ ή και πορτοκαλί (Agterof και συνεργάτες 2007). Μετά από χρώση Gram η μικροσκοπική τους εικόνα είναι χαρακτηριστική (Εικόνα 1.5). Έχουν επίσης χαρακτηριστική όσμη που θυμίζει χώμα. Οι βιοχημικές

δοκιμασίες περιλαμβάνουν την ανθεκτικότητα στη λυσοζύμη και την υδρόλυση της καζείνης, τυροσίνης, ξανθίνης και υποξανθίνης (Agterof και συνεργάτες 2007).



Εικόνα 1.4 Φυλογενετικό σχέσεις στελεχών γένους *Nocardia* βάσει στοιχείων ανάλυσης του 16S rRNA (Bittar και συνεργάτες 2010)

Ένα άλλο χαρακτηριστικό που συμβάλλει στην ταυτοποίηση του μικροοργανισμού είναι η ικανότητά του να μην αποχρωματίζεται με διαλύματα ισχυρών οξέων που χρυσιμοποιούνται κατά τη χρώση Zeihl Neelsen. Στα εθνικά εργαστήρια αναφοράς (πχ Εργαστήριο Αναφοράς Φυματίωσης Γ.Ν.Α. Σωτηρία) χρησιμοποιούνται μοριακές τεχνικές για το διαχωρισμό των ειδών και χάρη σε αυτές έχουν ταξινομηθεί περισσότερα από 50 είδη (Muñoz και συνεργάτες 2007).



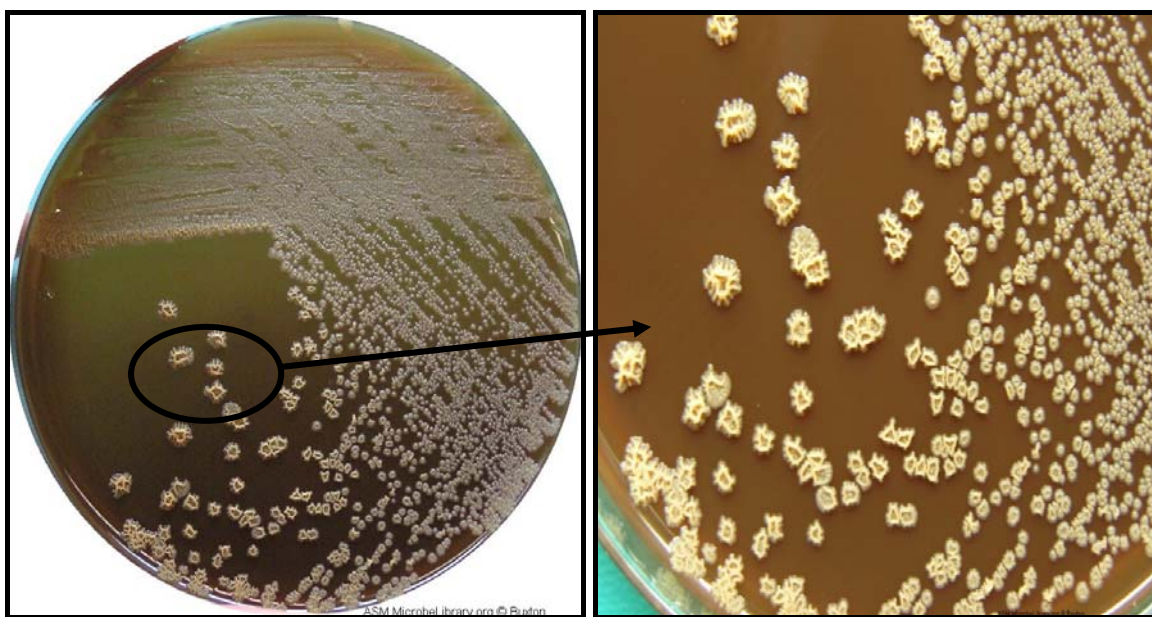
Εικόνα 1.5 Χαρακτηριστικές υφές στελέχους *Nocardia* με χρώση κατά Gram, κλινικό δείγμα βρογχικών εκκρίσεων (<http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com/2010/06/nocardia-species.html>)

Τα κλινικά δείγματα που αποστέλλονται στο εργαστήριο για την ανίχνευση βακτηρίων *Nocardia* είναι κυρίως πτύελα, βρογχικές εκκρίσεις και εκπλήσσεις και βιολογικά υγρά. Ερευνητές παρατήρησαν ότι είχαν θετικά αποτελέσματα (44 % ασθενών με αναπνευστική νοκαρδίαση) όταν το δείγμα ήταν βιοψία βρόγχου ή πνεύμονα, ή υλικό παρακέντησης.

Καλλιεργούνται σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα (σοκολατόχρωμο άγαρ), σε συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης (ατμόσφαιρα CO₂ 5 %, επώαση για τουλάχιστον 72 ώρες) (Εικόνα 1.6). Αναπτύσσονται επίσης σε μη εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα μυκήτων, μυκοβακτηρίων ή βακτηρίων (McNeil και Brown 1994). Όταν αναπτύσσονται σε Agar dextrose Sabouraud, η επώαση γίνεται αεροβίως για

επτά ημέρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Όταν εμφανιστούν αποικίες, ανακαλλιεργούνται σε θρεπτικό υπόστρωμα Lowenstein-Jensen (Bernadete και συνεργάτες 2007).

Γενικά, όταν το δείγμα προέρχεται από στείρο βιολογικό υγρό (πλευριτικό, ασκитικό και αίμα) ο χρόνος επώασης είναι περίπου δυο εβδομάδες ενώ όταν προέρχεται από μη στείρες περιοχές (δείγματα αναπνευστικού, δερματικής μόλυνσης) η επώαση παρατείνεται για τρεις εβδομάδες (McNeil και Brown 1994).



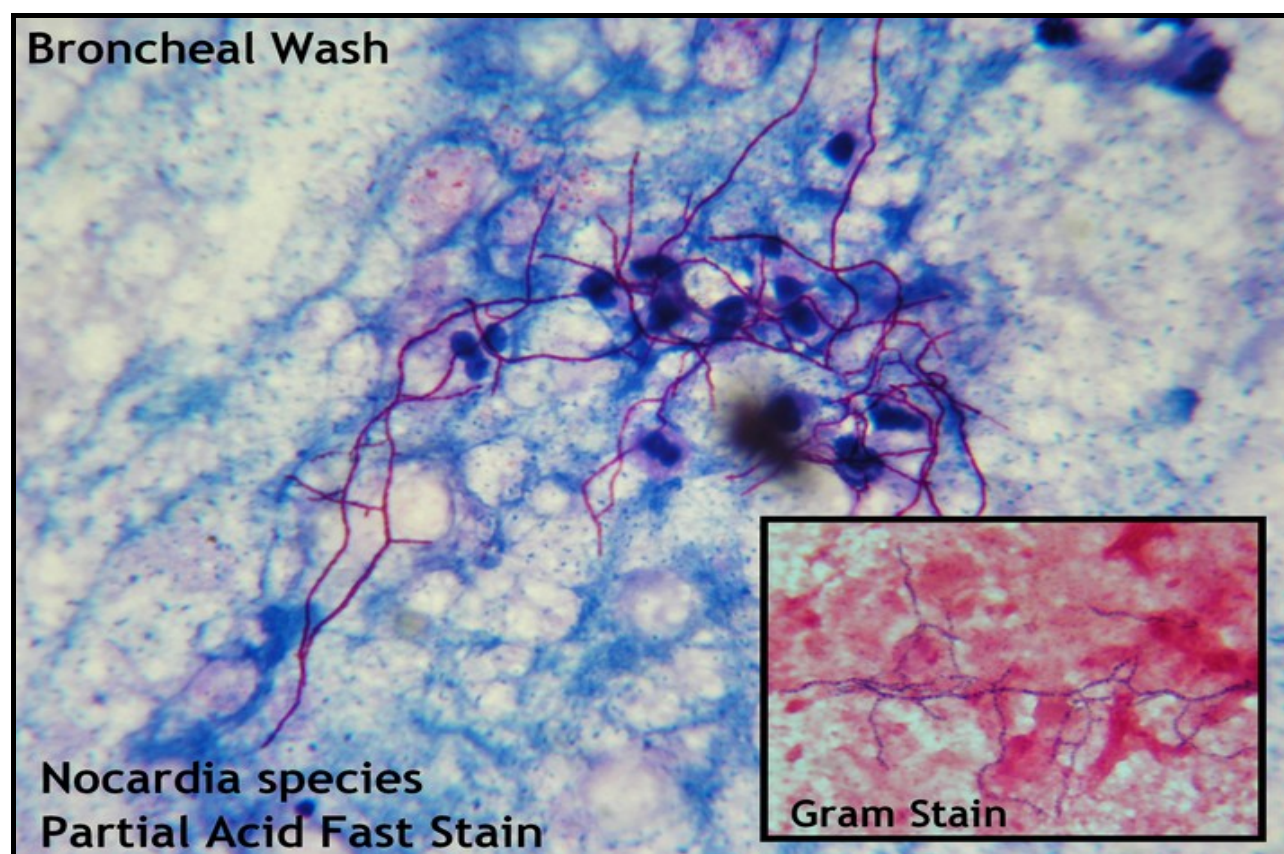
Εικόνα 1.6 Χαρακτηριστική ανάπτυξη του *N. asteroides* σε σοκολατόχρωμα θρεπτικό υπόστρωμα (www.microbelibrary.org/Culture%20Media/detail)

Είναι σημαντικό ο κλινικός ιατρός να αναγράφει στο παραπεμπτικό ότι υποψιάζεται νοκαρδίωση για να γίνουν στο εργαστήριο οι απαραίτητες εξετάσεις και να δοθεί η απαιτούμενη προσοχή, δεδομένου ότι το *Nocardia* αναπτύσσεται σε ειδικά θρεπτικά υλικά και μπορεί να χρειαστούν έως και 14 ημέρες μέχρι να εμφανιστούν οι αποικίες. Επομένως, είναι πιθανό όταν απομονωθεί κάποιο άλλο βακτήριο, τα τρυβλία να απορριφθούν χωρίς να εξεταστεί πιθανή συνυπάρχουσα λοίμωξη με το *Nocardia* (Brown και McNeil 2003). Για αυτό συχνά το βακτήριο απομονώνεται σε θρεπτικά υλικά μυκήτων ή *Mycobacterium*, τα οποία κρατούνται στο εργαστήριο για αρκετές εβδομάδες. Όμως, η επεξεργασία των δειγμάτων που ελέγχονται για φυματίωση, περιλαμβάνει ισχυρά αλκαλικά διαλύματα, που δρα ανασταλτικά για την ανάπτυξη στελεχών του γένους. Παρατηρήθηκε ότι το *N. asteroides* είναι δυνατόν να μην ανιχνευτεί ύστερα από τέτοια επεξεργασία. Το 1987, αποδείχθηκε ότι η επεξεργασία

των δειγμάτων με N-acetyl-L-cysteine, NaOH και $C_6H_5CH_2N(CH_3)_2RCl$ είναι τοξική για τα *Nocardia* (McNeil και Brown 1994).

Οι χρώσεις που χρησιμοποιούνται για τη φαινοτυπική ταυτοποίηση του είδους είναι η Gram και η Zeihl Neelsen (Εικόνα 1.7). Με τη χρώση Gram, το *Nocardia* φαίνεται ως θετικό βακτήριο με χαρακτηριστικές υφές (Brown και McNeil 2003). Όταν στη χρώση βάφονται αποικίες από καλλιέργεια, η εικόνα ποικίλει και εξαρτάται από το χρόνο επώασης και το είδος του θρεπτικού υλικού (Lowenstein-Jensen ή Middlebrook 7H10). Πιθανόν να μη σχηματίζει υφές ή ακόμα να μοιάζει με κοκκοβάκιλο αν δεν έχει αναπτυχθεί αρκετά (Brown και McNeil 2003).

Οι Saubolle και Sussland (2003) σύγκριναν τα αποτελέσματα ανίχνευσης του *Nocardia* σε 80 ασθενείς από το 1978-1989 που διακομίστηκαν στο Banner Good Samaritan Medical Center. Η έρευνα κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η χρώση Gram αποτελεί την πιο αξιόπιστη μέθοδο για την ανίχνευση του *Nocardia* (Εικόνα 1.9). Η οξεάντοχη χρώση χρησιμοποιείται συμπληρωματικά για επιβεβαίωση της νόσου.



Εικόνα 1.7 Χαρακτηριστική νηματοειδής μορφή του *N. asteroides* με χρώση κατά Gram και Zeihl Neelsen (Saubolle και Sussland 2003)

Η μορφολογία των αποικιών ποικίλει. Μπορεί να μοιάζουν με εκείνες των βακτηρίων (ιδιαίτερα το *N. farcinica*), η οποίες παροδικά γίνονται πορτοκαλί και στο τέλος άσπρες (το χρώμα τους εξαρτάται από την παρουσία αέριων υφών) ή να «ριζώνουν» στο θρεπτικό υπόστρωμα και να αποαπομακρύνονται δύσκολα. Αποικίες του *N. brasiliensis* παράγουν χαρακτηριστικές κίτρινες χρωστικές ενώ το *N. asteroides* type VI συνήθως καφέ, χρώμα που σπάνια παρατηρείται στα *Nocardia* (Brown και McNeil 2003).

Η νόσος που προκαλείται από τα *Nocardia* ονομάζεται νοκαρδίωση. Η νοκαρδίωση θεωρείται αναπνευστική κυρίως νόσος (πνευμονική λοίμωξη). Προσβάλλει ασθενείς με χρόνια αναπνευστικά προβλήματα και επανειλημμένη χρήση κορτικοστεροειδών (Saubolle και Sussland 2003). Πρόσφορο έδαφος δημιουργούν ορισμένες συνυπάρχουσες λοιμώξεις, οι μεταμοσχεύσεις οργάνων, η λευχαιμία και το AIDS (Martínez και συνεργάτες 2008). Η νοκαρδίωση μπορεί να εμφανιστεί πολλούς μήνες μετά από μια μεταμόσχευση (από ένα μήνα έως 13 χρόνια). Σύμφωνα με μια έρευνα σε μεταμοσχευμένους ασθενείς, το 63 % διαγιγνώστηκε με νοκαρδίωση ύστερα από ένα χρόνο ενώ το 14 % ύστερα από 5 χρόνια (Martínez και συνεργάτες 2008). Τα συμπτώματα της νόσου περιλαμβάνουν βήχα, δύσπνοια, κούραση, θωρακικό πόνο και απώλεια βάρους (Agterof και συνεργάτες 2007). Ως επιπλοκές έχουν αναφερθεί η περιτονίτιδα και το έλκος κερατοειδούς χιτώνα. Η διασπορά από τους πνεύμονες (βακτηριαιμία) οδηγεί σε περικαρδίτιδα, εμπύημα και μόλυνση ιστών ή αλλιώς διεσπαρμένη λοίμωξη όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.8 (Saubolle και Sussland 2003). Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να προσβάλλει και τα νεφρά.



Εικόνα 1.8 Δερματική μόλυνση από το *N. brasiliensis* (<http://www.medscape.com>)

Το βακτήριο εισέρχεται στον οργανισμό συνήθως δια μέσω της αναπνευστικής οδού, αλλά έχουν παρατηρηθεί και περιπτώσεις εισόδου του μικροοργανισμού από βρώση μολυσμένης τροφής και από ασυνέχεια του δέρματος (Martínez και συνεργάτες 2008). Όταν το βακτήριο εντοπίζεται στην επιδερμίδα παρατηρείται νέκρωση ιστών, δημιουργία αποστήματος και σπανιότερα κοκκιώματα (Saubolle και Sussland 2003). Δεν έχουν αναφερθεί κρούσματα μετάδοσης του βακτηρίου από άνθρωπο σε άνθρωπο. Παρόλα αυτά όμως, υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα που αναφέρουν τον αποικισμό με το ίδιο στέλεχος σε ασθενείς που νοσηλεύτηκαν στον ίδιο θάλαμο (Martínez και συνεργάτες 2008). Η κατανομή των στελεχών του γένους *Nocardia* είναι παγκόσμια και ποικίλει σε κάθε γεωγραφικό διαμέρισμα. Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, το είδος *Nocardia asteroides* VI, έχει απομονωθεί σε όλες σχεδόν τις Η.Π.Α., ενώ το *N. farcinica* είναι λιγότερο συχνό (Saubolle και Sussland 2003). Το *N. nova* απομονώνεται λιγότερο συχνά ενώ το *N. brasiliensis* απομονώνεται συχνότερα σε τροπικά ή υποτροπικά κλίματα, στη βορειοδυτική Αμερική (Brown και McNeil 2003). Στην Αμερική αναφέρονται ετησίως 500-1000 κρούσματα νοκαρδίαωσης με ετήσια τάση αύξησης (Agterof και συνεργάτες 2007). Αυτό οφείλεται αφενός στην αύξηση των ανοσοκατασταλμένων ασθενών, αφετέρου στην ανάπτυξη των μοριακών τεχνικών που καθιστούν την ταυτοποίηση νέων στελεχών συχνότερη.

Πίνακας 1.1 Κλινικά δείγματα στα οποία απομονώθηκαν βακτηρια γένους *Nocardia* (αποτελέσματα έρευνας 1998-2002, Saubolle και Sussland 2003)

Στέλεχος	Κλινικό δείγμα ^α						
	Αναπν	Αιμα	ΚΝΣ	Βιολ υγρά	Τράυμα	Οφθαλμος	Άγνωστα
<i>N.asteroides</i> complex(319)	275	6	2	4	24	2	24
<i>N. brasiliensis</i> (44)	5	0	0	1	34	1	3
<i>N. farcinica</i> (34)	19	14	3	0	7	1	0
<i>N. otitisdiscaviarum</i> (6)	5	0	0	0	1	0	0
<i>Nocardia</i> species (67)	45	3	2	3	4	0	10
Σύνολο	331	13	7	8	70	4	37

^α Αναπν, αναπνευστικού συστήματος (πτύελα, βρογχικές εκκρίσεις); ΚΝΣ, κεντρικό νευρικό σύστημα (εγκεφαλονωτιαίο υγρό); Βιολ υγρά, βιολογικά υγρά (περιτοναϊκό synovial); Τράυμα (ιστοί, λεμφαδένες); Άγνωστα, δείγματα άλλων εργαστηρίων

Σε μια επταετή έρευνα σε νοσοκομείο της Ευρώπης καταγράφηκαν 27 ασθενείς με διαγνωσμένη νοκαρδίαση (Muñoz και συνεργάτες 2007). Σε όλες τις περιπτώσεις οι κλιματολογικές συνθήκες συμβάλλουν στη διασπορά των στελεχών και η είσοδος δια μέσω αναπνευστικού συστήματος καθίσταται ευκολότερη (Saubolle και Sussland 2003). Τα αποτελέσματα της έρευνας των Saubolle και Sussland δίνονται στον Πίνακα 1.1 ενώ στον Πίνακα 1.2 αναγράφονται τα είδη που προκαλούν πνευμονικές και διεσπαρμένες λοιμώξεις.

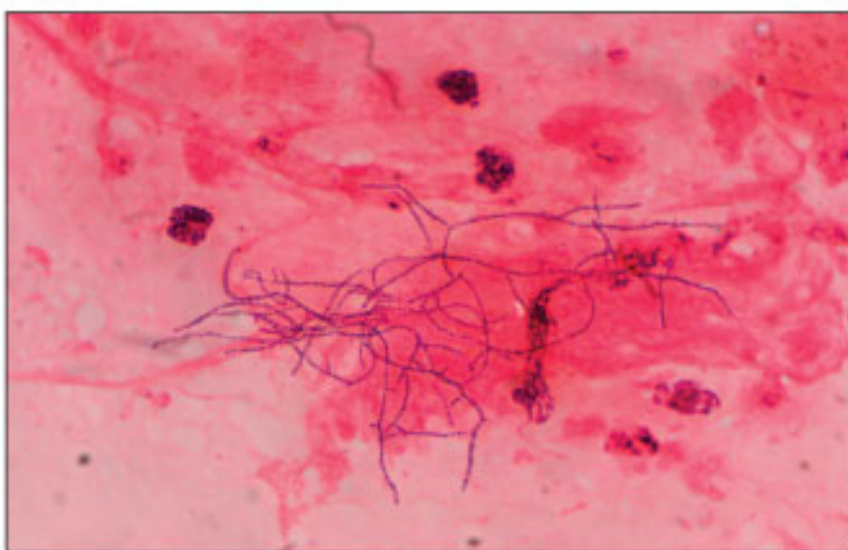
Πίνακας 1.2 Στελέχη *Nocardia* που προκαλούν πνευμονική και διεσπαρμένη λοίμωξη

	Πνευμονική	Διεσπαρμένη
<i>N. africana</i>	+	
<i>N. asiatica</i>	+	
<i>N. asteroides</i>	+	+
<i>N. beijingensis</i>	+	+
<i>N. brasiliensis</i>		
<i>N. cyriacigeorgica</i>	+	+
<i>N. farcinica</i>	+	+
<i>N. higeonsis</i>	+	+
<i>N. niigatensis</i>	+	
<i>N. nova</i>	+	+
<i>N. otidiscaviarium</i>	+	+
<i>N. paucivorans</i>	+	+
<i>N. pseudobrasiliensis</i>	+	+
<i>N. transvalensis</i>	+	+
<i>N. veterana</i>	+	

Το αντιβιοτικό για τη θεραπεία της νόσου είναι οι σουλφοναμίδες, οι οποίες μπορούν να χορηγηθούν και σε συνδυασμό με τα πρωτεύοντα αντιβιοτικά (μινοκυκλίνη, αμικασίνη, ιμιπενέμη και λινεζολίδη) για σοβαρές συστηματικές λοιμώξεις (Saubolle και Sussland 2003). Καλά αποτελέσματα έχουν και οι ευρέως

φάσματος κεφαλοσπορίνες, το αμοξυ-κλαβουλονικό οξύ, οι μακρολίδες, οι αμινογλυκοσίδες και οι φλουοροκινολόνες. Η διάρκεια της θεραπευτικής αγωγής ποικίλει και έχουν σημειωθεί αναζωπυρώσεις ύστερα από σύντομες αγωγές (Saubolle και Sussland 2003). Το *N. farcinica* είναι το πιο ανθεκτικό στέλεχος (Agterof και συνεργάτες 2007).

Το γονιδίωμα του στελέχους *N. farcinica* IFM 10152 χαρτογραφήθηκε το 2004 (Ishikawa και συνεργάτες 2004). Η χαρτογραφηση αφορούσε κλινικό στελεχος. Το κυκλικό χρωμοσωμα αποτελείται από 6,021,225 ζευγη βασεων, αναλογια γουανινης-κυτοσινης (G+C) 70.8 % και υπαρχουν δυο πλασμιδια (το (pNF1) με 184,027 ζευγη βασεων και G+C 67.2 % και το pNF2 με 87,093 ζευγη βασεων και G+C 68.4 %). Αποτελειται από 5,674 ανοιχτα πλαισια αναγνωσης και παρουσίασε αρκετές ομοιότητες με το γονιδίωμα των βακτηριων γενους *Mycobacterium*. Για παράδειγμα οι παθογόνες πρωτείνες εισβολής Mce (mammalian cell entry proteins). Στο γονιδίωμα του *N. farcinica* είναι οργανωμένες σε τέσσερα οπερόνια ενώ στο *M. tuberculosis* βρέθηκαν έξι. Οι Mce πρωτείνες απομονώθηκαν και από άλλα ακτινοβακτήρια. Στα *S. avermitilis* και *S. coelicolor* A3, μη παθογόνα βακτήρια εδάφους, υπάρχει ένα αντίγραφο του *mce* οπερονίου, υποδηλώνοντας ότι υπήρχε ένας κοινός προγόνος και με την πάροδο των χρόνων και ανάλογα με την οικοθέση και τις ανάγκες του μικροοργανισμού, τα γονίδια αυτά διπλασιάστηκαν (Parker και συνεργάτες 1995, Ishikawa και συνεργάτες 2004).



Εικόνα 1.9 Βακτήριο του γένους *Nocardia* ύστερα από χρώση κατά Gram (παρασκεύασμα από κλινικό δείγμα πτυέλων)

Πρωτεΐνες ομόλογες με τις Mce απομονώθηκαν και από το *Rhodococcus equi*, παθογόνο των ζώων και αποτελεί άλλο ένα χαρακτηριστικό της συγκεκριμένης ομάδας βακτηρίων. Επίσης, η χαρτογράφηση του γονιδιώματος του του συγκεκριμένου στελέχους έδωσε πληροφορίες για τις πρωτεΐνες χάρη στις οποίες το βακτήριο προσκολλάται στα κυττάρα και στη συνέχεια εισέρχεται προκαλλώντας τη λοίμωξη. Η Nfa34810 είναι μια εκκριτική πρωτεΐνη, μοριακού βάρους 49.8 kDa της οποίας το C-τελικό άκρο παρουσιάζει μεγάλη ομολογία (72 %) με την παθογόνο πρωτεΐνη-εισβολέα του μυκοβακτηρίου. Όμοια, η Nfa52080 ήταν κατά 51 % ομόλογη με την αντίστοιχη του *M. tuberculosis* και φαίνεται ότι είναι υπεύθυνη για τις εξωπνευμονικές λοιμώξεις (Ishikawa και συνεργάτες 2004).

Όπως και στο *M. tuberculosis*, απομονώθηκαν ένζυμα που προστατεύουν το βακτήριο από τις πρωτεΐνες που εκκρίνουν τα φαγοκύτταρα (καταλάσες KatA, -B, -C και -G, υπεροξειδικές δισμουτάσες SodC και -F και μια οξειδάση, η AhpD (Ishikawa και συνεργάτες 2004). Παρόλο που το *N. farcinica* είναι υποχρεωτικά αερόβιο, βρέθηκαν ένζυμα τα ένζυμα narGHIJ και nirBD που του επιτρέπουν να επιβιώσει και ανεροβίως (Ishikawa και συνεργάτες 2004). Έτσι εξηγείται η επιβίωσή του μέσα στα μακροφάγα..

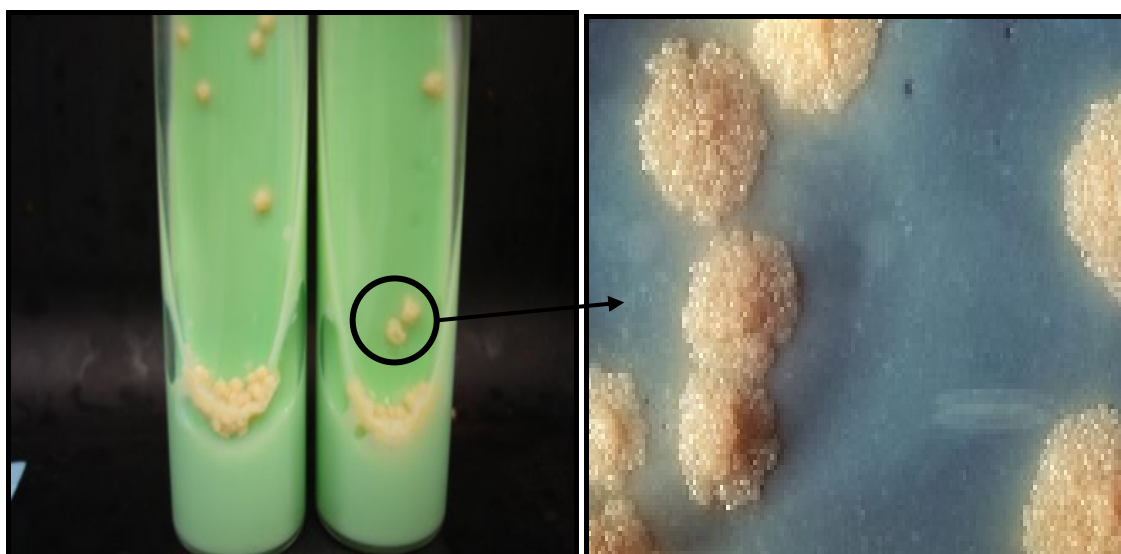
Η διαθεσιμότητα του ελεύθερου σιδήρου στους ιστούς είναι περιορισμένη για αυτό και τα βακτήρια παράγουν σιδηροφόρα μόρια προκειμένου να δεσμεύσουν το απαραίτητο αυτό ιχνοστοιχείο. Η ομάδα γονιδίων *nbtA* έως *nbtH* του *N. farcinica* ήταν όμοια με τα γονίδια σύνθεσης μυκοβακτινών. Επιπλέον, μελετήθηκαν γονίδια ανθεκτικότητας: β-λακταμάσες (Nfa23080, Nfa9770 και Nfa48460), φωσφοτρανσφεράσες αμινογλυκοσιδών (*nfa38480*, *nfa31340*, *nfa38620*) που οδηγούν σε ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη, τσενταμυκίνη και στρεπτομυκίνη αντίστοιχα καθώς και μεθυλοτρανσφεράσες (Nfa27210 and Nfa47240) που προσδίδουν ανθεκτικότητα στις μακρολίδες (Ishikawa και συνεργάτες 2004). Μέχρι σήμερα έχει χαρτογραφηθεί το γονιδίωμα του κλινικού στελεχούς *Nocardia farcinica* IFM 10152.

1.4 Βακτήρια του γένους *Mycobacterium*

Το γένος *Mycobacterium* είναι το μοναδικό στην οικογένεια Mycobacteriaceae και είναι πολύ καλά μελετημένο λόγω της παθογένειάς του. Η φυματίωση αποτέλεσε αντικείμενο έρευνας και μελέτης ήδη από την αρχαιότητα. Λεπτομερής περιγραφή

της νόσου αναφέρεται στα Ιπποκρατικά κείμενα ως «φθίση». Ο όρος «tuberculosis», λατινικής προέλευσης, δεν εμφανίζεται πριν το 1834 και προέρχεται από τη λέξη “tubercula” που στη νέα ελληνική γλώσσα αποδίδεται ως «φυμάτια». Από τους εκπροσώπους της ελληνορωμαϊκής Ιατρικής, ο Γαληνός πρώτος χαρακτηρίζει τη «φθίση» ή «φθόη» όπως αλλιώς αναφέρεται στα κείμενά του, ως νόσο μολυσματική, που οφείλεται σε ειδικό «παράσιτο».

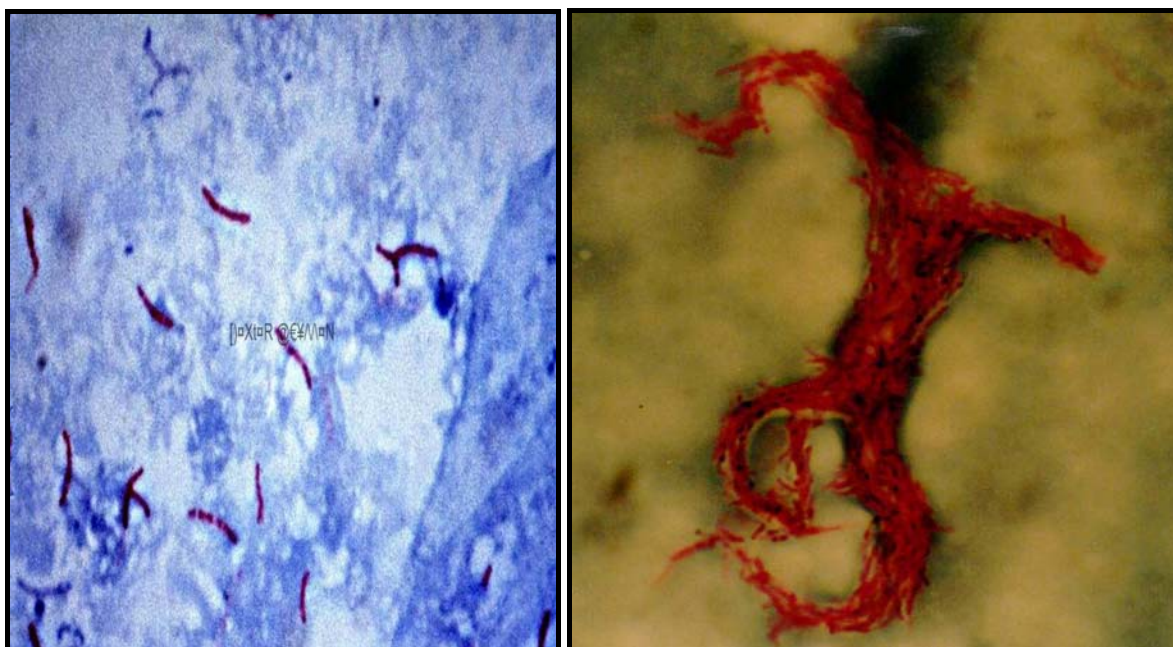
Τα μυκοβακτήρια κατατάσσονται σε δυο ομάδες. Η μια περιλαμβάνει τα είδη του *M. tuberculosis* complex, ενώ η άλλη τα άτυπα ή περιβαλλοντικά μυκοβακτηρια (*Mycobacterium* - other than - *tuberculosis*). Αυτά διαχωρίζονται σε 4 υποομάδες με βάση την παραγωγή χρωστικής και την ταχύτητα που αναπτύσσονται στα θρεπτικά υλικά. Οι υποομάδες αυτές περιλαμβάνουν διάφορα είδη από τα οποία άλλα είναι παθογόνα και άλλα όχι (Φακίρη και συνεργάτες 2009) και είναι οι εξής: υποομάδα I, περιλαμβάνει τα φωτοχρωμογόνα (στελέχη που παράγουν χρωστική στο φως), υποομάδα II, περιλαμβάνει τα σκοτοχρωμογόνα (στελέχη που παράγουν χρωστική στο σκοτάδι ή στο φως), υποομάδα III, περιλαμβάνει τα στελέχη που δεν είναι χρωμογόνα και η υποομάδα IV, η οποία περιλαμβάνει τα μη χρωμογόνα ταχέως αναπτυσσόμενα στελέχη (σε λιγότερο από μια εβδομάδα, Πίνακας 1.3). Τα στελέχη του γένους *Mycobacterium* των τριών πρώτων υποομάδων αναπτύσσονται βραδέως όπως και τα στελέχη του είδους *M. tuberculosis* complex. Η ομάδα *M. tuberculosis* complex περιλαμβάνει τα εξής είδη: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti* και *M. canetti* (Cole και συνεργάτες 1998, Baharoom 2008).



Εικόνα 1.10 Χαρακτηριστικές αποικίες του *M. tuberculosis* complex (<http://www.cosmosbiomedical.com/education/bacteriology/1-M.Tuberculosis.shtml>)

Τα *Mycobacterium* μπορούν να αναπτυχθούν με διακλαδώσεις ή νηματοειδώς. Αντίθετα όμως με τους υπόλοιπους ακτινομύκητες, τα νημάτια των *Mycobacterium* κατακερματίζονται με την παραμικρή διαταραχή σε ραβδόμορφα ή κοκκοειδή στοιχεία. Οι αποικίες είναι σκληρές, σηνήθως λευκές και αποκολλόνται δύσκολα (Εικόνα 1.10).

Είναι γνωστά και με τον όρο οξεάντοχα και αλκοολάντοχα βακτήρια (Acid-Alcohol-Fast) μετά από χρώση Ziehl Neelsen επειδή αφού χρωματιστούν κόκκινα με μια βασική χρωστική (φαινικούχος φουξίνη), μετά από ειδική επεξεργασία δεν αποχρωματίζονται όταν προστεθεί στο παρασκεύασμα αιθυλική αλκοόλη που περιέχει 3 % HCl (Εικόνα 1.11). Όλα τα άλλα βακτήρια και επιθηλιακά κύτταρα χρωματίζονται κυανά (κυανούν του μεθυλενίου).



Εικόνα 1.11 Οξεάντοχή του *Mycobacterium* ύστερα από χρώση Ziehl Neelsen. Στη (B) παρατηρείται η σχοινοειδής διάταξη του *M. tuberculosis* complex (<http://emedicine.medscape.com/article/969401-overview>)

Γενικά, το *Mycobacterium* είναι ανθεκτικό σε χημικούς παράγοντες όπως τα αλκάλια και οι φαινόλες λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε λιπίδια (Φακίρη και συνεργάτες 2009).

Η ιδιαιτερότητα του *Mycobacterium* οφείλεται στη σύνθεση της κυτταρικής του μεμβράνης. Αν και θετικό κατά Gram βακτήριο, έχει περίπλοκη μεμβράνη και σε αυτή οφείλεται η παθογένεια, η υδροφοβικότητα και η ικανότητα να επιβιώνει σε αντίξοες συνθήκες (Εικόνα 1.12).

Στο κυτταρικό τοίχωμα των *Mycobacterium* βρίσκονται:

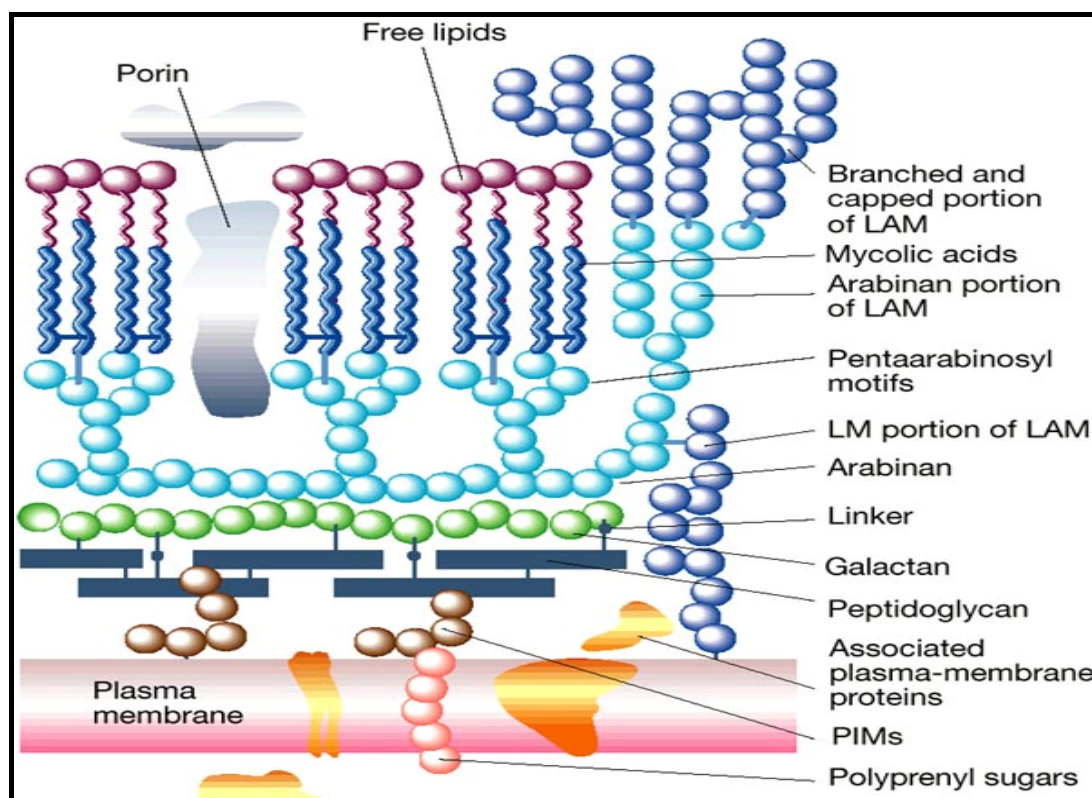
- α) Κηροί (εστέρες λιπαρών οξέων με λιπαρές αλκοόλες).
- β) Κηρός D (WAX D). Πρόκειται για ένα πεπτιδογλυκολιπίδιο που αποτελείται από τρία αμινοξέα, D- και L-αλανίνη, D-γλουταμινικό οξύ και α και ε-διαμινοπιμελικό οξύ, από τα αμινοσάκχαρα γλυκοζαμίνη και γαλακτοζαμίνη και τα ουδέτερα σάκχαρο αραβινόζη, γαλακτόζη και μαννόζη. Ο πολυσακχαρίτης είναι ενωμένος με εστερικό δεσμό με το μυκολικό οξύ το οποίο είναι β-υδροξυ-λιπαρό οξύ στο οποίο οφείλεται η οξεαντοχή του (Φακίρη και συνεργάτες 2009).

Πίνακας 1.3 Ταξινόμηση *Mycobacterium* κατά Runyon (Jarzembowski και Young 2008)

Είδος	Ενδιαιτήματα	Παθογένεια
<i>M. tuberculosis complex</i>		
<i>M. tuberculosis complex</i>	Άνθρωπος	Παθογόνο
<i>M. tuberculosis</i>	Άνθρωπος	Παθογόνο
<i>M. canetti</i>	Άνθρωπος	Παθογόνο
<i>M. africanum</i>	Άνθρωπος	Παθογόνο
<i>M. microtti</i>	Άνθρωπος	Παθογόνο
<i>M. bovis</i>	Αγελάδα	Παθογόνο
<i>M. bovis BCG</i>	Αγελάδα	Παθογόνο
<i>ΑΤΥΠΑ Mycobacterium</i>		
<i>Υποομάδα I - Runyon Group I (φωτοχρωμογόνα)</i>		
<i>M. kansasii</i>	Νερό, αγελάδα	Δυνητικά παθογόνο
<i>M. marinum</i>	Νερό, ψάρι	Δυνητικά παθογόνο
<i>M. simae</i>	Περιβάλλον	Δυνητικά παθογόνο
<i>Υποομάδα II - Runyon Group II (σκοτοχρωμογόνα)</i>		
<i>M. szulgai</i>	Περιβάλλον	Δυνητικά παθογόνο
<i>M. scrofulaceum</i>	Νερό, έδαφος	Δυνητικά παθογόνο
<i>M. goodii</i>	Περιβάλλον	Δυνητικά παθογόνο
<i>Υποομάδα III - Runyon Group III (μη χρωμογόνα)</i>		
<i>M. avium complex</i>	Περιβάλλον	Δυνητικά παθογόνο
<i>M. xenopi</i>	Περιβάλλον	Δυνητικά παθογόνο
<i>M. terrae</i>	Περιβάλλον	Δυνητικά παθογόνο
<i>Υποομάδα IV - Runyon Group IV (ταχέως αναπτυσσόμενα)</i>		
<i>M. fortuitum</i>	Περιβάλλον, ζώα	Δυνητικά παθογόνο
<i>M. abscessus</i>	Περιβάλλον	Δυνητικά παθογόνο
<i>M. peregrinum</i>	Περιβάλλον	Δυνητικά παθογόνο
<i>M. chelonae</i>	Περιβάλλον, ζώα	Δυνητικά παθογόνο

γ) Σχοινοειδής παράγοντας (cord factor). Πρόκειται για ένα γλυκολιπίδιο (μουκοσίδιο), που αποτελείται από τρεχαλόζη ενωμένη με δυο μόρια μυκολικού οξέος (ομάδα περίπλοκα διακλαδιζόμενων αλυσίδων υδροξυλιπιδίων). Σε αυτό οφείλεται και η σχοινοειδής ανάπτυξη.

Οι αποικίες των *Mycobacterium* - other than - *tuberculosis* είναι ευδιάκριτες στο θρεπτικό μέσο σε περίπου 7 ημέρες (Adekambi και Drancourt 2004). Στην Εικόνα 1.13 παρατηρείται στέλεχος του είδους *M. kansasii* μετά από επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα Lowenstein Jensen. Η ανακάλυψή των *Mycobacterium* - other than - *tuberculosis* στελεχών έγινε σχετικά νωρίς μετά από την ανακάλυψη του *M. tuberculosis* από τον Koch, όταν ταξινομήθηκαν ως «άτυπα μυκοβακτηρια» με βάση τα *in vitro* χαρακτηριστικά τους. Τα άτυπα *Mycobacterium* δεν αποχρωματίζονται με διαλύματα ισχυρών οξέων που χρησιμοποιούνται κατά τη χρώση Zeihl Neelsen, με διαφορετική όμως βιολογική συμπεριφορά και μικρότερη λοιμογόνο δύναμη συγκριτικά με το *Mycobacterium* της φυματίωσης.



Εικόνα 1.12 Κυτταρική μεμβράνη του *M. tuberculosis*. LAM, lipoarabinomannans; LM, lipomannans; PIM, phosphatidylinositol mannosides (www.nature.com/fig_tab/406788a0_F2.html)

Μέχρι τώρα, έχουν αναγνωρισθεί 91 είδη *Mycobacterium* - other than - *tuberculosis*, αλλά παρά τη συνεχή ταυτοποίηση των νέων ειδών, το 30 % που εντοπίζεται στο νερό, το έδαφος και τον αέρα δεν έχει ακόμη ταυτοποιηθεί (Γερογιάννη και συνεργάτες 2008). Πρώτος ο Pinner, το 1935, χρησιμοποίησε τον όρο «άτυπα μυκοβακτηρια», ενώ από τότε τους αποδόθηκαν και άλλες ονομασίες, όπως «μυκοβακτηρίδια διαφορετικά της φυματίωσης» (*Mycobacterium* - other than - *tuberculosis*) και «αταξινόμητα» (unclassified) αλλά και «περιβαλλοντικά μυκοβακτηρίδια» (Environmental Mycobacteria, EM).

Η κύρια πηγή μόλυνσης από τα άτυπα *Mycobacterium* είναι το περιβάλλον. Σύμφωνα με μελέτες τα είδη που μολύνουν ανθρώπους και ζώα είναι διαφορετικά (Adekambi και Drancourt 2004). Από το νερό έχουν απομονωθεί τα *M. marinum*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. simiae* ενώ από το έδαφος τα *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*. Στις περισσότερες περιπτώσεις η λοίμωξη των πνευμόνων από άτυπα *Mycobacterium* ακολουθεί πολύ αργή πορεία. Ωστόσο, φαίνεται ότι σε καταστάσεις ανοσοκαταστολής η ανάπτυξη των μικροοργανισμών ευνοείται και μπορεί να απειλήσει άμεσα τη ζωή του ασθενούς (Πίνακας 1.4).



Εικόνα 1.13 Παραγωγή χρωστικών από το *M. kansasii* μετά από καλλιέργεια σε θρεπτικό υπόστρωμα Lowenstein Jensen

Ένα χαρακτηριστικό πολλών στελεχών του γένους *Mycobacterium* είναι η ικανότητα σχηματισμού κίτρινων καροτενοειδών χρωστικών. Η φωτοεπαγωγή σχηματισμού καροτενοειδών χρωστικών γίνεται από μικρού μήκους κύματος (κυανό φως) και μόνο

σε αερόβιες συνθήκες. Υπάρχουν ενδείξεις ότι το κρίσιμο στάδιο της φωτοεπαγωγής είναι μια φωτοκαταλυόμενη οξειδωση και φαίνεται ότι ένα από τα πρώτα ένζυμα βιοσύνθεσης καροτενοειδών είναι φωτοεπαγόμενο. Όπως και τα άλλα βακτήρια που περιέχουν καροτενοειδή, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι οι ενώσεις αυτές προστατεύουν τα βακτήρια από οξειδωτικές βλάβες (Madigan και συνεργάτες 1997).

Η φυματίωση μεταδίδεται κυρίως με τους πυρήνες των σταγονιδίων (βήχα, εντονη ομιλία, φτάρνισμα, γέλιο). Τα σταγονίδια φθάνουν στις κυψελίδες, όπου δημιουργούν περιοχές μόλυνσης και παραμένουν μολυσματικοί για 8-10 ημέρες (Μπουζιά και Χριστοπούλου-Αλετρα 2006).

Άλλοι παράγοντες που ευνοούν τη μόλυνση είναι, η γενετική προδιάθεση, η αδύναμη κράση, η κακή διατροφή, η ανθυγιεινή εργασία και γενικά η καταπόνηση του σώματος. Μόνο άτομα που νοσούν από πνευμονική ή λαρυγγική φυματίωση μεταδίδουν τη νόσο.

Η φυματίωση διακρίνεται σε πνευμονική και εξωπνευμονική. Πριν εμφανιστεί η λοίμωξη από τον ιό του AIDS, πάνω από το 80 % των περιπτώσεων της φυματίωσης είχαν πνευμονική εντόπιση. Τα τελευταία όμως χρόνια αυτό έχει αρχίσει να αλλάζει. Υπάρχουν μάλιστα περιπτώσεις στις οποίες η φυματίωση έχει ταυτόχρονα πνευμονική και εξωπνευμονική εντόπιση, ιδιαιτέρως όταν συνυπάρχει λοίμωξη από τον ιό του AIDS. Όταν ο οργανισμός προσβληθεί από το *M. tuberculosis* complex δεν είναι απαραίτητο να νοσήσει. Ο βάκιλος επιβιώνει μέσα στα φαγοκύτταρα για μεγάλο χρονικό διάστημα (λανθάνουσα μορφή) και ελευθερώνεται σε εξασθένηση του ανοσοποιητικού συστήματος (Φακίρη και συνεργάτες 2009).

Η κλινική εικόνα περιλαμβάνει βήχα (διαρκεί τρεις ή περισσότερες εβδομάδες) με αιματηρά πτύελα, ακούσια απώλεια βάρους, κόπωση, χαμηλός πυρετός, νυχτερινές εφιδρώσεις, ρίγη, απώλεια της όρεξης, πόνος στο θώρακα με την αναπνοή ή το βήχα (πλευρίτιδα). Όταν η φυματίωση εντοπίζεται σε όργανα εκτός των πνευμόνων τα σημεία και συμπτώματα ποικίλλουν ανάλογα με τα όργανα που εμπλέκονται (Φακίρη και συνεργάτες 2009). Τα στελέχη *Mycobacterium* - other than - *tuberculosis* προκαλούν κυρίως δερματικές αλλοιώσεις (Εικόνα 1.14).

Πίνακας 1.4 Ταξινόμηση των άτυπων μυκοβακτηριων που απομονώνονται από τους ανθρώπους σύμφωνα με την American Thoracic Society (ATS)

Κλινική νόσος	Συχνοί αιτιολογικοί παράγοντες	Γεωγραφική κατανομή	Μορφολογικά χαρακτηριστικά	Ασυνήθιστοι αιτιολογικοί παράγοντες
Πνευμονική νόσος	<i>M. avium complex</i>	Παγκόσμια	Μη χρωμογόνο, βραδέως αναπτυσσόμενο (>7 ημέρες)	<i>M. simiae</i> , <i>M. szulgai</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. celatum</i> , <i>M. asiaticum</i> , <i>M. haemophilum</i> , <i>M. smegmatis</i>
	<i>M. kansasii</i>	ΗΠΑ, Ευρώπη, περιοχές με ορυχεία	Χρωμογόνο	
	<i>M. abscessus</i>	Παγκόσμια, κυρίως ΗΠΑ	Ταχέως αναπτυσσόμενο, μη χρωμογόνο	
	<i>M. xenopi</i>	Ευρώπη, Καναδάς	Βραδέως αναπτυσσόμενο, χρωμογόνο	
	<i>M. malmoense</i>	Β. Ευρώπη, Ηνωμένο Βασίλειο	Βραδέως αναπτυσσόμενο, μη χρωμογόνο	
Λεμφαδενίτιδα	<i>M. avium complex</i>	Παγκόσμια	Μη χρωμογόνο	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. abscessus</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. haemophilum</i>
	<i>M. scrofulaceum</i>	Παγκόσμια	Χρωμογόνο	
	<i>M. malmoense</i>	Β. Ευρώπη, Ηνωμένο Βασίλειο	Βραδέως αναπτυσσόμενο	
Δερματική νόσος	<i>M. marinum</i>	Παγκόσμια	Φωτοχρωμογόνο, απαιτεί χαμηλές θερμοκρασίες	<i>M. avium complex</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>M. haemophilum</i>
	<i>M. chelonae</i>	ΗΠΑ	χρωμογόνο	
	<i>M. fortuitum</i>	Παγκόσμια	Ταχέως αναπτυσσόμενο, μη χρωμογόνο	
	<i>M. ulcerans</i>	Αυστραλία, Τροπικές περιοχές, Αφρική, Ασία	Βραδέως αναπτυσσόμενο, χρωμογόνο	
Γενικευμένη νόσος	<i>M. avium complex</i>	Παγκόσμια	Στελέχη ασθενών με AIDS, συνήθως χρωμογόνο (80%)	<i>M. abscessus</i> , <i>M. xenopi</i> , <i>M. malmoense</i> , <i>M. simiae</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. conspicuum</i> , <i>M. gevariae</i>
	<i>M. kansasii</i>	ΗΠΑ	Φωτοχρωμογόνο	
	<i>M. chelonae</i>	ΗΠΑ	Μη χρωμογόνο	
	<i>M. haemophilum</i>	ΗΠΑ, Αυστραλία	Μη χρωμογόνο, συχνά χαμηλές θερμοκρασίες και CO ₂ για την ανάπτυξη	

Οι κλασικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των *Mycobacterium* στα κλινικά δείγματα είναι οι οξεάντοχες χρώσεις στο άμεσο παρασκεύασμα και οι καλλιέργειες στα διαγνωστικά θρεπτικά υποστρώματα (στερεά και υγρά). Το μεγάλο πρόβλημα της εργαστηριακής διάγνωσης της φυματίωσης είναι ο παρατεταμένος χρόνος επώασης των καλλιεργειών (6-8 εβδομάδες). Για αυτό το λόγο, στα εργαστήρια μεγάλων νοσοκομείων (πχ Γ.Ν.Α. Σωτηρία, Γ.Ν.Α. Σισμανόγλειο), πραγματοποιούνται μοριακές τεχνικές που επιτρέπουν την έγκαιρη διάγνωση της νόσου.



Εικόνα 1.14 Δερματική αλλοίωση από *M. marinum* (<http://ard.bmj.com/content/vol60/issue6/cover.dtl>)

Η χημειοθεραπεία της λανθάνουσας φυματίωσης είναι στην πραγματικότητα προληπτική αγωγή (χημειοπροφύλαξη) που αποσκοπεί στην αποτροπή μελλοντικής νόσησης ατόμων με αυξημένο κίνδυνο. Ως άτομα υψηλού κινδύνου θεωρούνται σήμερα όλοι όσοι έχουν θετική φυματινοαντίδραση ανεξάρτητα από την ηλικία τους. Η πιθανότητα εμφάνισης ενεργού νόσου κατά τη διάρκεια της ζωής ατόμων με λανθάνουσα φυματίωση χωρίς ανοσοκαταστολή ανέρχεται σε 10 %. Η τυπική θεραπεία της λανθάνουσας μορφής φυματίωσης περιλαμβάνει τη χορήγηση ισονιαζίδης (INH) 5 mg kg^{-1} βάρους σώματος σε μία ημερήσια δόση με ανώτατο όριο τα 300 mg ημερησίως επί 9 μήνες. Οι ασθενείς πρέπει να εξετάζονται ανά μήνα για τυχόν σημεία εμφάνισης ηπατίτιδας ή άλλων ανεπιθύμητων αντιδράσεων στην ισονιαζίδη (Φακίρη και συνεργάτες 2009).

Η ενεργός φυματίωση απαιτεί θεραπεία τουλάχιστον 6 μηνών. Αρχικά χορηγείται συνδυασμός 3 ή 4 φαρμάκων από τα πρωτεύοντα αντιφυματικά που είναι η ισονιαζίδη, ριφαμπικίνη, εθαμβουτόλη, πυραζιναμίδη και στρεπτομυκίνη. Μόλις ληφθούν τα αποτελέσματα της ευαισθησίας του *Mycobacterium* η θεραπεία συνεχίζεται με τουλάχιστον 2 από τα φάρμακα στα οποία βρέθηκε ευαίσθητο. Ένα τυπικό θεραπευτικό σχήμα περιλαμβάνει μια αρχική φάση 2μηνιας διάρκειας με 4 φάρμακα (ισονιαζίδη, ριφαμπικίνη, εθαμβουτόλη, πυραζιναμίδη) που ακολουθείται από 4 ακόμα μήνες λήψης ισονιαζίδης και ριφαμπικίνης. Σε ορισμένες αναπτυσσόμενες κυρίως χώρες η συμμόρφωση των ασθενών στη θεραπεία γίνεται υπό την επίβλεψη υγειονομικού προσωπικού (Directly Observed Therapy-DOT).

Το πρότυπο στέλεχος H37Rv απομονώθηκε το 1905 και αποτελεί βασικό εργαλείο έρευνας γιατί σε αντίθεση με κλινικά στελέχη, διατηρεί τη παθογένειά του κατά την μόλυνση πειραματόζων, είναι ευαίσθητο στα αντιβιοτικά και δεκτικό σε γενετικούς ανασυνδυασμούς. Το γονιδίωμα του έχει χαρτογραφηθεί και αποτελείται από ένα κυκλικό χρωμόσωμα 4,4 Mb (Cole και συνεργάτες 1998). Χαρακτηρίζεται από υψηλό ποσοστό G+C (65,6 %) και αποτελεί το δεύτερο μεγαλύτερο βακτηριακό διαθέσιμο γονιδίωμα, με πρώτο του *Escherichia coli* (Blattner και συνεργάτες 1997). Στην αλληλούχηση του εντοπίστηκαν πολλά επαναλαμβανόμενα τμήματα DNA, κυρίως μονάδων ένθεσης καθώς και χαρακτηριστικά του είδους γονίδια. Το ποσοστό G+C είναι σταθερό σε όλο το γονιδίωμα, υποδηλώνοντας ότι δεν υπάρχει οριζόντια μεταφορά γενετικού υλικού. Ωστόσο, βρέθηκαν γονίδια με μεγαλύτερη αναλογία G+C από την αναμενόμενη που κωδικεύουν τις πολυμορφικές, πλούσιες σε G+C πρωτεΐνες, τις PGRS (Cole και συνεργάτες 1998). Υπάρχουν 50 γονίδια σύνθεσης RNA που βρίσκονται στο μοναδικό *rrn* οπερόνιο, το οποίο παραδόξως απέχει από την περιοχή έναρξης της αντιγραφής (*oriC*) 1500 kb. Το γεγονός αυτό εξηγεί και τον αργό ρυθμό ανάπτυξης του *M. tuberculosis*. Επίσης, ορισμένα γονίδια του RNA κωδικεύουν ένζυμα αποικοδόμησης μη λειτουργικών πρωτεϊνών (10Sa RNA) και κάποια άλλα είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση RNase P.

Υπάρχουν 45 μόρια tRNAs που αναγνωρίζουν 43 από τα 61 κωδικόνια και το χαρακτηριστικό τους είναι ότι κανένα από αυτά δε φέρει την αδερίνη ως πρώτη βάση στο αντικωδικόνιο που μεταφέρει. Ιδιαίτερα για τη μεθειονίνη, στο γονιδίωμα του *Mycobacterium* βρέθηκαν τρία γονίδια που κωδικεύουν tRNAs. Το ένα από αυτά (*metV*) εντοπίζεται σε περιοχή που πιθανό είναι αλληλουχία λήξης (Cole και συνεργάτες 1998). Έχουν βρεθεί τουλάχιστον δυο προφάγοι του *M. tuberculosis*. Ο phiRv1 και ο phiRv2 μεγέθους 10 kb με παρόμοια οργάνωση γονιδιώματος ενώ κάποια προϊόντα γονιδίων τους είναι ομόλογα με εκείνα των βακτηριοφάγων του *Streptomyces* και των σαπροφυτικών *Mycobacterium*. Αποτελέσματα ερευνών που στηρίχτηκαν στη δράση των προφάγων υποδηλώνουν ότι η οριζόντια μεταφορά γενετικού υλικού έγινε όταν ακόμα το *M. tuberculosis* ήταν αποικιστής του εδάφους, πριν προσαρμοστεί στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον.

Υπάρχουν 3924 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης που υποδηλώνουν ότι το 91 % του γονιδιώματος είναι λειτουργικό και ότι τα ψευδογονίδια είναι λίγα. Όπως ήταν αναμενόμενο λόγω της υψηλής αναλογίας G+C, τα κωδικόνια έναρξης GTG χρησιμοποιούνται περισσότερο (35 %) σε σύγκριση με το *Bacillus subtilis* (9 %) και

E. coli (14 %), παρόλο που το ATG είναι το πιο διαδεδομένο (61 %) (Cole και συνεργάτες 1998). Σπάνια χρησιμοποιείται το ATC για το γονίδιο *infC*, το ορθόλογό του στα *B. subtilis* και *E. coli* έχει κωδικόνιο έναρξης το ATT. Επίσης, διαθέτει δεκατρείς παράγοντες σ- και περισσότερες από εκατό ρυθμιστικές πρωτεΐνες.

Το 59 % των γονιδίων έχει φορά αντιγραφής ίδια με εκείνη του DNA (στο *B. subtilis* το ποσοστό φτάνει το 75 %). Στα βακτήρια, τα γονίδια που έχουν την ίδια πολικότητα με το DNA εκφράζονται καλύτερα. Το 59 % που παρατηρήθηκε στο *M. tuberculosis* επιβεβαιώνει τον αργό ρυθμό ανάπτυξης του. Η συγκριτική γονιδιωματική έδειξε μια προτίμηση στα αμινοξέα Ala, Gly, Pro, Arg και Trp, τα οποία είναι πλούσια σε G+C, ενώ σε μικρότερο ποσοστό χρησιμοποιούνται τα Asn, Ile, Lys, Phe και Tyr (πλούσια σε A+T). Το γεγονός αυτό ενισχύει και την υψηλή αναλογία G+C στο γονιδιώμα του. Η προσαρμοστική ικανότητα του *M. tuberculosis* να επιβιώνει σε διαφορετικά περιβάλλοντα εξασφαλίζεται με μια πληθώρα ενζύμων που του επιτρέπουν να ρυθμίζει το μεταβολισμό του σε αερόβιες, μικροαερόφιλες ή αναερόβιες συνθήκες. Το *M. tuberculosis* είναι από τη φύση του ανθεκτικό σε πολλά αντιβιοτικά, δυσχεραίνοντας την καταπολέμηση της νόσου. Η ιδιότητά του αυτή αποδίδεται στην υδρόφοβη φύση της κυτταρικής του μεμβράνης που λειτουργεί σαν φραγμός αλλά και στην παρουσία γονιδίων που κωδικεύουν πρωτεΐνες διάσπασης αντιβιοτικών (Cole και συνεργάτες 1998). Πρόκειται για υδολυτικά ένζυμα, β-λακταμάσες, αμινογλυκοσιδοτρανσφεράσες καθώς και μέλη των ABC μεταφορέων.

Η χαρτογράφηση του γονιδιώματος του H37Rv έδειξε ότι υπάρχει μόνο ένα οπερόνιο, το *mbt*, υπεύθυνο για τη βιοσύνθεση των σιδηροφόρων. Ο σίδηρος είναι απαραίτητο ιχνοστοιχείο για την ανάπτυξη του *Mycobacterium*. Όταν αυτό βρίσκεται στον ανθρώπινο οργανισμό, λαμβάνει το σίδηρο από την αιμοσφαιρίνη και τη λακτοφερρίνη μέσω των σιδηροφόρων μορίων, τις μυκοβακτίνες και εξωχελίνες. Οι πρωτεΐνες αυτές διακρίνονται σε δυο ομάδες, ανάλογα με την παρουσία ή όχι του 2-υδροξυφαινύλοξαζολινικού δακτυλίου. Το *M. tuberculosis* παράγει μόνο τις μυκοβακτίνες ενώ ορισμένα μη παθογόνα, όπως το *M. smegmatis*, παράγουν και τις εξωχελίνες. Υπάρχουν και οι καρβοξυμυκοβακτίνες οι οποίες αφού δεσμεύσουν το σίδηρο εισέρχονται στο κύτταρο δια μέσω πορινών. Οι μυκοβακτίνες διαφέρουν μεταξύ τους στη ομάδα R1 και δρουν συνεργατικά. Η υδρόφιλη μυκοβακτίνη εκκρίνεται στον εξωκυτταρικό χώρο όταν το βακτήριο βρίσκεται σε υδάτινο περιβάλλον ενώ η λιπόφιλη δρα ως ιονοφόρο μόριο για να μεταφέρει το σίδηρο δια μέσου της κυτταρικής μεμβράνης.

Το 10 % της λειτουργικότητας του γονιδιώματος αποδίδεται στις δυο μεγάλες οικογένειες πρωτεϊνών, πλούσιων σε γλυκίνη, τις PE και PPE των οποίων τα γονίδια είναι οργανωμένα σε συνεργίωμα. Αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες γνωστές ως PGRSs (polymorphic repetitive sequences) και MPTRs (major polymorphic tandem repeats). Η ονοματολογία τους οφείλεται στα αμινοξέα Pro–Glu (PE) και Pro–Pro–Glu (PPE) που εντοπίζονται στο N-άκρο (Cole και συνεργάτες 1998).

Πριν από τη χαρτογράφηση του γονιδιώματος του *Mycobacterium*, οι πληροφορίες για την παθογένειά του περιοριζόντουσαν στα εξής: στην πρωτεΐνη Mce, στην ύπαρξη της υπεροξειδάσης που το προστατεύει από τις ελευθερες ρίζες οξυγόνου του φαγοκυττάρου και στον παράγοντα σ - (*sigA*) μεταλλάξεις του οποίου οδηγούν σε μείωση της παθογένειας του *M. tuberculosis*. Η σύσταση της κυτταρικής μεμβράνης σαφώς συμβάλλει στη μολυσματικότητα όμως εξαιτίας της σύνθετης δομής της, είναι δύσκολο να προσδιοριστούν διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που προσδίδουν ανθεκτικότητα. Αμφιλεγόμενος είναι ο ρόλος των των Mce (mycobacterial cell entry) πρωτεϊνών. Πρόκειται για πολυπεπτίδια μεγέθους 1,535 ζευγών βάσεων των οποίων τα γονίδια είναι οργανωμένα σε οπερόνια (*mce1–mce4*) και έχουν προέλθει από διπλασιασμό ενός αρχικού γονιδίου. Άλλες πρωτεΐνες που θα μπορούσαν να έχουν παθογόνες ιδιότητες είναι φωσφολιπάσες-C, λιπάσες, εστεράσες και πρωτεάσες. Σημαντικός είναι και ο ρόλος των βακτηριοφερριτινών (BfrA, BfrB) καθώς ο διαθέσιμος σίδηρος μέσα στα φαγοκύτταρα είναι περιορισμένος (Casali και Riley 2007, Cole και συνεργάτες 1998). Η παθογόνος δράση του *Mycobacterium* αποδίδεται στην ικανότητά του να επιζεί μέσα στα φαγοκύτταρα μετά τη φαγοκυττάρωσή του και να αντέχει σε συνθήκες που είναι δυσμενείς για τα άλλα βακτήρια όπως το όξινο pH, η υψηλή περιεκτικότητα σε CO₂ και γαλακτικό οξύ. Στην παθογένεια της νόσου συμβάλλει και το γεγονός ότι δεν επηρεάζεται από την παρουσία αντισωμάτων ειδικών για τα διάφορα αντιγόνα του.

1.5 Βιοενεργές ενώσεις που έχουν απομονωθεί από περιβαλλοντικά και κλινικά στελέχη Ακτινοβακτηρίων

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι προϊόντα μικροοργανισμών που αν και δεν είναι απαραίτητα για την ανάπτυξή τους, συμβάλλουν σημαντικά στην επιβίωσή τους. Πρόκειται για αντιβιοτικά, χρωστικές, τοξίνες, φερομόνες, αναστολείς ενζύμων,

αντικαρκινικές ουσίες, ουσίες για επιβίωση ή συμβίωση και ορισμένους παράγοντες ανάπτυξης (Demain 1998). Η μικροβιακή βιοτεχνολογία χρησιμοποιεί αυτούς τους μεταβολίτες στο χώρο της υγείας, γεωργίας και βιομηχανίας. Οι στρεπτομύκητες παράγουν αντιβιοτικά τα οποία είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που παρουσιάζουν μια μεγάλη ποικιλία χημικών ουσιών (Kingston 2004). Περιλαμβάνουν αμινογλυκοσίδια, πολυκετίδια, μακρολιπίδια, β-λακτάμες, πεπτίδια, πολυένια, πολυαιθέρες, τετρακυκλίνες κ.α. (Δέλλιου 2008). Εκτός της δράσης των αντιβιοτικών, οι στρεπτομύκητες παράγουν πολλές άλλες βιοενεργές ενώσεις οι οποίες είναι αντιμυκητιακές, αντιϊικές, αντιογκικές, αντιπαρασιτικές, εντομοκτόνες και ζιζανιοκτόνες (Πινακας 1.5). Η παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών ελέγχεται από τη σύσταση των θρεπτικών υλικών (ανάλογα με την πηγή, πχ γλυκόζη ή γλυκερόλη, ακολουθείται συγκεκριμένο βιοχημική οδό), το ρυθμό ανάπτυξης του μικροοργανισμού και την επαγωγή ή καταστολή ενζύμων που συμμετέχουν στη μεταβολική οδό βιοσύνθεσής τους. Οι υπεύθυνες συνθετάσες εντοπίζονται στο χρωμοσώμα DNA (λιγότερο συχνά στο πλασμιδιακό) υπο τη μορφή συνεργιώματος. Σε αντίθεση με τους πρωτογενείς μεταβολίτες, δεν έχει μελετηθεί πλήρως η βιοσύνθεση των δευτερογενών (Demain 1998).

Τα αντιβιοτικά σχηματίζονται από πρόδρομες ενώσεις που προέρχονται από τον κεντρικό μεταβολισμό του άνθρακα, οπότε υπερπαραγωγή αντιβιοτικών απαιτεί ικανοποιητική παροχή πρόδρομων ενώσεων.

Η πηγή άνθρακα στην οποία μεγαλώνει ο στρεπτομύκητας επηρεάζει την παραγωγή των αντιβιοτικών, καθώς ανάλογα με την πηγή (πχ γλυκόζη ή γλυκερόλη) ακολουθείται συγκεκριμένο βιοχημικό μονοπάτι (Demain 1998). Η μορφολογική ανάπτυξη και ο δευτερογενής μεταβολισμός είναι υπό τον έλεγχο ποικίλων θρεπτικών συστατικών του περιβάλλοντος όπως άνθρακας, άζωτο, φώσφορος κ.α. Σήματα για την έκκριση δευτερογενών μεταβολιτών αποτελούν οι αλλαγές του pH, έλλειψη θρεπτικών συστατικών, αλλαγή θερμοκρασίας και η παρουσία ουσιών με ρόλο καταστολέα ή επαγωγέα. Οι μεταβολές αυτές επάγουν την έκφραση ρυθμιστικών γονιδίων με αποτέλεσμα τη χημική (δευτερογενής μεταβολισμός) και μορφολογική (μορφογένεση) διαφοροποίηση (Demain 1998). Τα σήματα αυτά ελέγχουν την έκφραση γονιδίων που παράγουν θετικούς μεταγραφικούς παράγοντες δευτερογενούς μεταβολισμού. Όταν το θρεπτικό υλικό είναι επαρκές και συνεπώς δεν είναι απαραίτητη η έκκριση δευτερογενών μεταβολιτών, μια ρυθμιστική πρωτεΐνη σε ρόλο

καταστολέα είναι δεσμευμένη στο DNA του μικροοργανισμού και εμποδίζει την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων. Σε ρόλο επαγωγέα μπορεί να είναι μια γ-βουτυρολακτόνη όταν προκειται για ακτινοβακτήριο, μια N-ακυλομοσερίνη όταν είναι αρνητικό κατά Gram βακτήριο ή κάποιο ολιγοπεπτίδιο στα θετικά κατά Gram.

Πίνακας 1.5 Είδη του φύλου Actinobacteria που παράγουν αντιβιοτικά

Είδος	Αντιβιοτικό	Δράση	Ενδιαίτημα	Βιβλιογραφία
<i>Streptomyces noursei</i>	Nystatin	Αντιμυκητιακή	Έδαφος	Fjærvik και Zotchev 2005
<i>Streptomyces nodosus</i>	Amphotericin	Αντιμυκητιακή	Έδαφος	Zotchev και Caffrey 2006
<i>Streptomyces natalensis</i>	Natamycin	Αντιμυκητιακή	Έδαφος	Farid και συνεργάτες 2000
<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Kanamycin, gentamicin	Αντιμυκητιακή	Έδαφος	Kharel και συνεργάτες 2004
<i>Streptomyces erythreus</i>	Erythromycin A	Αντιμυκητιακή	Έδαφος	Weber και συνεργάτες 1985
<i>Streptomyces fradiae</i>	Neomycin	Αντιβακτηριακή	Έδαφος	Jnawali και συνεργάτες 2009
<i>Streptomyces griseus</i>	Streptomycin	Αντιβακτηριακή	Έδαφος	Distler και συνεργάτες 2006
<i>Streptomyces rimosus</i>	Tetracycline	Αντιβακτηριακή	Έδαφος	Asagbra και συνεργάτες 2005
<i>Streptomyces orientalis</i>	Vancomycin	Αντιβακτηριακή	Έδαφος	Banskota και συνεργάτες 2006
<i>Streptomyces mediterranei</i>	Rifamycin	Αντιβακτηριακή	Έδαφος	Feng-Xu και συνεργάτες 2008
<i>Streptomyces alboflavus</i>	Tetracycline	Αντιβακτηριακή	Έδαφος	Asagbra και συνεργάτες 2005
<i>Streptomyces alboniger</i>	Puromycin	Αντιβακτηριακή	Έδαφος	Abou-Zeid και συνεργάτες 2007
<i>Streptomyces lincolnensis</i>	Lincomycin	Αντιβακτηριακή	Έδαφος	Choi και Cho 2004
<i>Streptomyces vendagensis</i>	Tetracycline	Αντιβακτηριακή	Έδαφος	Asagbra και συνεργάτες 2005
<i>Streptomyces platensis</i>	Migrastatin	Αντικαρκινικά	Έδαφος	Lim και συνεργάτες 2009
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Rapamycin	Αντιβακτηριακή	Έδαφος	Chen και συνεργάτες 2009
<i>Streptomyces venezuelae</i>	Chloramphenicol	Αντιβακτηριακή	Έδαφος	Izard και Ellis 2001
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Tetracycline	Αντιβακτηριακή	Έδαφος	Asagbra και συνεργάτες 2005
<i>Streptomyces avermitilis</i>	Avermectin	Αντιβακτηριακή	Έδαφος	Ventura και συνεργάτες 2007
<i>Salinispora</i>	rifamycin B, SV	Αντιμυκητιακή	Θάλασσα	Tae Kyung και συνεργάτες 2006
<i>Nocardia. brasiliensis</i>	B ^a A, Brasil. ^b A, E ^c E	Αντιβακτηριακή	A.O ^d	Yasushi και συνεργάτες 1997
<i>Nocardia. pseudobrasiliensis</i>	nocardicyclins	Αντιβακτηριακή	A.O	Tanaka και συνεργάτες 1997
<i>Nocardia transvalensis</i>	Transvalencin A, B	M.B.K. ^e	A.O	Mukai και συνεργάτες 2006
<i>Nocardia</i> sp. CS682	Nargenicin	Αντιβακτηριακή	A.O	Sohng και συνεργάτες 2008
<i>Micromonospora chinospora</i>	Kanamycin, gentamicin	Αντιβακτηριακά	Έδαφος	Kharel και συνεργάτες 2004
<i>Micromonospora. riseorubida</i>	Mycinamicin II	Αντιβακτηριακή	Έδαφος	Anzai και συνεργάτες 2009

^a:Brasilinolide, ^b:brasilicardin, ^c:erythromycin E, ^d:ανθρώπινος οργανισμός, ^e:αντιμυκητιακή, αντιβακτηριακή, αντικαρκινική, ανοσοκατασταλτική

Τα μόρια αυτά βοηθάνε στην επιβίωση, σπορίωση, παθογένεια, παραγωγή χρωστικών και αντιβιοτικών (Demain 1998). Σημαντικός είναι ο A-παράγοντας, μια γ-βουτυρολακτόνη που επάγει μορφολογικές και χημικές διαφοροποιήσεις στα *S*.

griseus και *S. bikiniensis*. Είναι υπεύθυνος για το σχηματισμό μυκηλίων, σπορίων, κονιδίων και συνθετασών στρεπτομυκικής (Εικόνα 1.15). Στο γονιδίωμα του *S. griseus* έχουν βρεθεί σαράντα αντίγραφα της πρωτεΐνης. Ο παράγοντας αυτός επάγει την έκφραση των εξής γονιδίων:

- *aphD*. Γονίδιο υπεύθυνο για την παραγωγή στρεπτομυκίνης καθώς και πρωτεϊνών που προσίδουν ανθεκτικότητα του στελέχους στο συγκριμένο αντιβιοτικό (πχ 6-φωσφοτρανσεράση της στρεπτομυκίνης)
- *strR*. Ρυθμιστικό γονίδιο που συμμετέχει στο μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης στρεπτομυκίνης
- *strB*. Γονίδιο για αμινοτρανσφεράσες, παραγωγή στρεπτομυκίνης

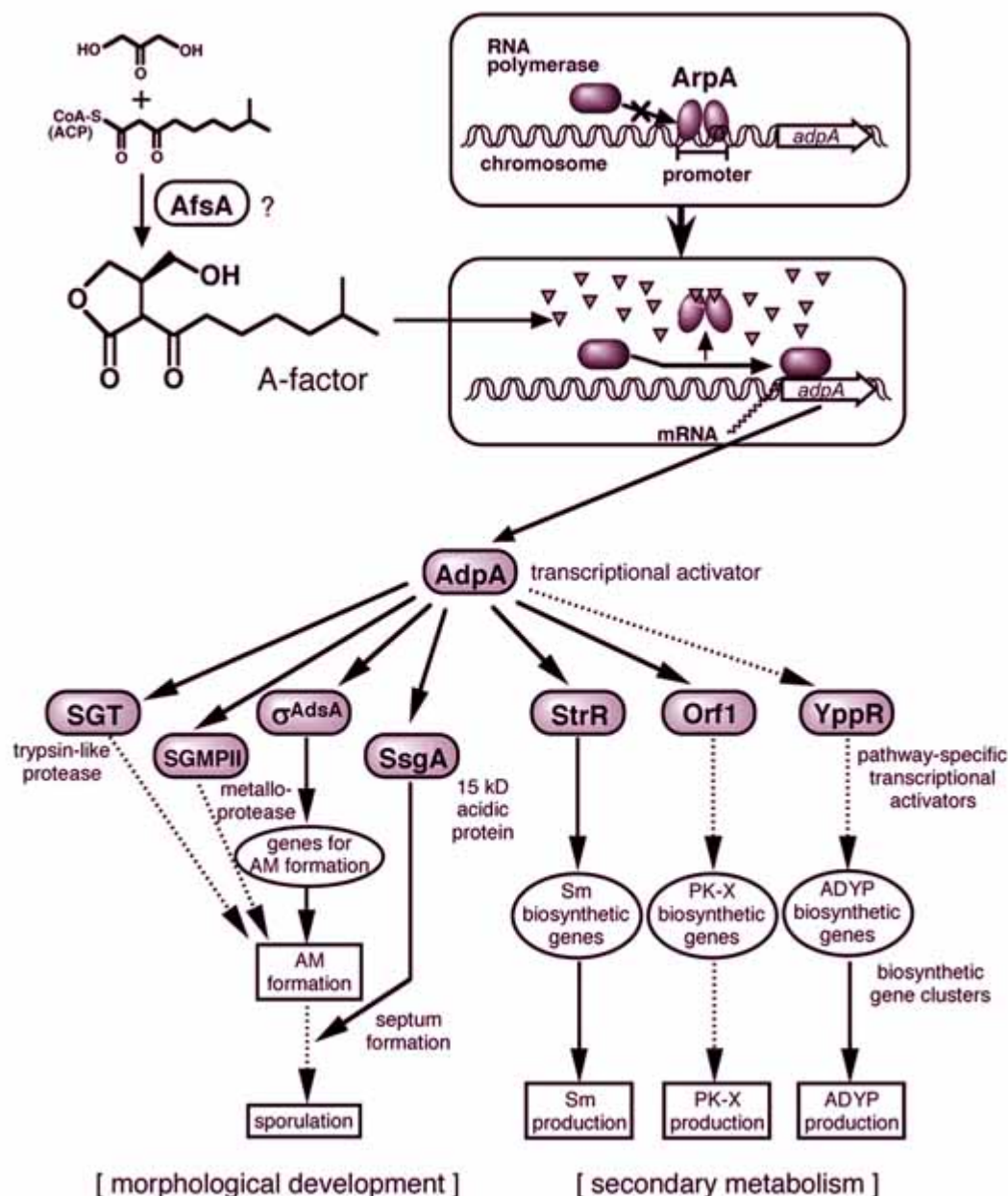
Από τα τρία αυτά γονίδια, μόνο ο υποκινητής του *strR* ελέγχεται από τον Α-παράγοντα και συνεπώς αυτός ρυθμίζει την έκφραση των υπολοίπων (*aphD* και *strB*) (Demain 1998). Έχει βρεθεί ότι στο *S. griseus*, ο Α-παράγοντας ανιχνεύεται πριν την παραγωγή της στρεπτομυκίνης και καταστέλεται λίγο πριν το αντιβιοτικό φτάσει στη μέγιστη συγκέντρωσή του.

Επάγει την έκφραση τουλάχιστον δέκα γονιδίων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση της στρεπτομυκίνης αλλά και στην ανθεκτικότητα της (Khokhlov και συνεργάτες 1967, Demain 1998). Στο *Streptomyces virginiae* έχουν αναφερθεί πέντε διαφορετικές γ-βουτυρολακτόνες (*virginiae* butanolides-VBs), υπεύθυνες για την παραγωγή της βιργιναμίνης. Η προσθήκη συνθετικών VBs *in vitro* για 8-11,5 ώρες, οδηγεί σε αύξηση του αντιβιοτικού κατά 200 % (Yang και συνεργάτες 1996).

Στο *Streptomyces pristinaespiralis* η παραγωγή πριστιναμυκίνη ελέγχεται από έναν παράγοντα παρόμοιο με τον Α-παράγοντα που συναντάται στο *S. griseus* (Demain 1998). Το *Streptomyces* sp. FRI-5 οφείλει το μπλε χρώμα του στη λακτόνη IM-2 που είναι υπεύθυνη και για την παραγωγή αντιβιοτικού. Η IM-2 καταστέλει την παραγωγή της D-κυκλοσερίνης και επάγει την παραγωγή της μπλε χρωστικής και τεσσάρων αντιβιοτικών (Demain 1998). Όπως αναφέρθηκε τα περισσότερα στελέχη παραγωγής βιοενεργών ενώσεων προέρχονται από περιβαλλοντικά οικοσυστήματα.

Ορισμένα όμως κλινικά στελέχη του φύλου Actinobacteria έχουν την δυνατότητα αυτή, όπως είναι τα παρακάτω.

Το *N. brasiliensis* IFM 0406 παράγει το brasilinolide Α αντιμυκητιακό για τα το *Aspergillus niger*. Το *N. brasiliensis* απομονώθηκε από ασθενή με πνευμονική νοκαρδίωση. Οι έλεγχοι που έγιναν στο Κέντρο Ερευνών Παθογόνων Μυκήτων στην Ιαπωνία, αφορούσαν τη δράση του στελέχους έναντι βακτηρίων και μυκήτων.



Εικόνα 1.15 Ο A-factor επάγει την παραγωγή αντιβιοτικών (δεξιά) και την έναρξη της sporώσεως (www.bioscience.org/2002/v7/d/horinouc/figures.htm)

Η καλλιέργεια έγινε σε βιοαντιδραστήρα ενώ η ταυτοποίηση με βιοχημικές μεθόδους. Το αντιβιοτικό που απομονώθηκε ελέγχθηκε με μικροαραιώσεις και η MIC για το *Aspergillus niger* ήταν 3,13 mg ml⁻¹ (Yasushi και συνεργάτες 1997). Περεταίρω έρευνες του στελέχους έδειξαν ότι παράγει έναν ανοσοκατασταλτικό παράγοντα, το Brasilicardin A (BraA) (Usui και συνεργάτες 2006). Η ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων προϋποθέτει την λήψη εξωκυτταρικών ουσιών με ρόλο επαγωγέα. Αυτές δεσμεύονται σε ειδικούς υποδοχείς και εισέρχονται στο κύτταρο. Το BraA, αδρανοποιεί το μεταφορέα αμινοξέων συστήματος L. Πειράματα σε ποντίκα έδειξαν

ότι επειδή δεν αναστέλει τη δράση της ιντερλευκίνης, διαφέρει από τα ευρώς χρησιμοποιούμενα ανοσοκατασταλτικά (κυκλοσπορίνη FK-506, και ραπαμυκίνη) (Usui και συνεργάτες 2006). Το *N. brasiliensis* IFM 0466 που απομονώθηκε πάλι από ασθενή με νοκαρδίαση, βρέθηκε ότι παράγει erythromycin E και το αντιμυκητιακό brasilinolide B, το οποίο σε αντίθεση με το μικρό εύρος δράσης του brasilinolide A, είναι αποτελεσματικό έναντι πολλών μυκήτων (Mikami και συνεργάτες 2000, Πίνακας 1.6).

Πίνακας 1.6 Αντιμυκητιακή δράση του brasilinolide B (κλινικό στέλεχος *N. brasiliensis*)

Μικροοργανισμός δείκτης	MIC ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
<i>Aspergillus niger</i>	12,5
<i>Aspergillus fumigatus</i> IFM 41219	12,5
<i>Paecilomyces variotti</i>	12,5
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	25
<i>C. albicans</i> IFM 40007	12,5
<i>C. albicans</i> 94-2530	25
<i>C. krusei</i> M 1005	25
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	12,5
<i>C. grabrata</i> ATCC 90030	25
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 90112	12,5
<i>Cry. Neoformans</i> 145A	25

Πίνακας 1.7 Αντιμικροβιακή δράση των nocardicyclins A και B (κλινικό στέλεχος *N. pseudobrasiliensis*)

Μικροοργανισμός δείκτης	MIC ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	
	A	B
<i>Micrococcus luteus</i> IFM 2066	1,56	12,5
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	3,13	100
<i>Escherichia coli</i> NIH JC2	>100	>100
<i>Bacillus subtilis</i> PCI 189	6,25	3,13
<i>Nocardia translavensis</i> IFM0333	3,13	6,25
<i>N. pseudobrasiliensis</i> IFM0624	25	25
<i>N. brasiliensis</i> IFM0236	6,25	>100
<i>N. otidiscaviarum</i> IFM0239	1,56	>100
<i>N. nova</i> IFM0290	0,78	1,56
<i>N. asteroides</i> IFM0284	1,56	3,13
<i>N. farcinica</i> IFM0284	3,13	12,5
<i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC607	1,56	3,13
<i>M. phlei</i> ATCC11758	0,78	3,13
<i>M. flavescens</i> ATCC14474	3,13	12,5
<i>Aspergillus niger</i> ATCC40606	>100	>100
<i>Candida albicans</i> ATCC90028	>100	>100

Το 1997 μελετήθηκαν βιοενεργές ουσίες από το *N. pseudobrasiliensis* IFM0624 (JCM 9894), που ονομάστηκαν nocardicyclins A και B (Grafel και συνεργάτες 1997). Τα αντιβιοτικά αυτά αναστέλλουν την ανάπτυξη θετικών κατά Gram βακτηρίων αλλά όχι αρνητικών κατά Gram βακτηρίων και μυκήτων. Αξιοσημείωτο είναι ότι το ίδιο το στέλεχος *N. pseudobrasiliensis* ήταν ευαίσθητο στα αντιβιοτικά που παράγει σε συγκεντρώσεις 25 ml ml⁻¹. Το nocardicyclin A ήταν πιο δραστικό από το B όταν χρησιμοποιήθηκαν οργανισμοί δείκτες Gram-θετικά βακτήρια (*Staphylococcus aureus* 209P, *N. brasiliensis* IFM 0236 και *N. otitidiscaviarum* IFM 0239). Αυτό οφείλεται στη στερεοχημική δομή των nocardicyclins. Τα αποτελέσματα βιοενεργότητας δίνονται στον Πίνακα 1.7.

Όμοιως, το κλινικό στέλεχος *N. brasiliensis* IFM 075 ύστερα από έλεγχο για παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, βρέθηκε ότι αναστέλλει την ανάπτυξη θετικών κατά Gram βακτηρίων αλλά όχι αρνητικών κατά Gram (εξαιρείται το *Klebsiella pneumoniae*) ή μυκήτων (Πίνακας 1.8). Αυτό οφείλεται σε μια νέα ανθρακυκλίνη, την SO-075R1 (Maeda και συνεργάτες 1992).

Πίνακας 1.8 Αντιμικροβιακή δράση του κλινικού στελέχους *N. brasiliensis* IFM 075

Μικροοργανισμός δείκτης	MIC (μg ml ⁻¹)
<i>Micrococcus luteus</i> IFM 2066	< 0,2
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 IFM 2014	3,13
<i>S. albus</i> IFM 2013	50,0
<i>S. citreus</i> IFM 2075	1,56
<i>Bacillus cereus</i> IFM 5058	0,78
<i>B. subtilis</i> PCI 219	6,25
<i>Corynebacterium xerosis</i> IFM 2075	0,78
<i>Mycobacterium sp</i> 607	3,13
<i>Escherichia coli</i>	>100,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> IFM 3008	6,25
<i>Pseudomonas auroginosa</i> IFM 1045	>100,0
<i>Aspergillus niger</i> IFM 40606	>100,0
<i>Penicillium chrysogenum</i> Q176	>100,0
<i>Candida albicans</i> 1001	>100,0
<i>Cryptococcus neoformans</i> IFM 40038	>100,0

Η ουσία αυτή έχει μεγάλες ομοιότητες με την mutactimycin A που παράγεται από στελέχη στρεπτομυκήτων. Βρέθηκε επίσης ότι τα στελέχη *N. asteroides*, *N. farcinica*, *N. nova* και *N. otitidiscaviarum* ήταν ευαίσθητα στο SO-075R1 με Ελάχιστη Συγκέντρωση αντιβιοτικού (Minimum Inhibitory Concetration-MIC) 6,25-1,5 mg/ml

ενώ όταν οργανισμοί δείκτες χρησιμοποιήθηκαν 6 στελέχη *N. brasiliensis*, παρατηρήθηκε ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό (Maeda και συνεργάτες 1992).

Από ασθενή που έπασχε από ακτινομυκήτωμα απομονώθηκε στέλεχος *Nocardia* το οποίο ταυτοποιήθηκε με βάση τον φαινότυπο, τη μορφολογία και τα φυλογενετικά χαρακτηριστικά του.

Πίνακας 1.9 Αντιμικροβιακή δράση του transvalencin A (κλινικό στέλεχος *Nocardia transvalensis*)

Μικροοργανισμός δείκτης	MIC ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	
	pH 7,3	pH 6,0
<i>Micrococcus luteus</i> IFM 2066	16	0,5
<i>Escherichia coli</i> NIH JC-2	>32	>32
<i>Candida Albicans</i> ATCC 90028	>32	>32
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 90112	4	>32
<i>Aspergillus niger</i> IFM 5368	>32	>32
<i>Paecilomyces varioti</i> IFM 40913	16	>32
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> IFM 10489	2	8

Πρόκειται για *Nocardia transvalensis* (IFM 10065) με ισχυρές αντιμυκητιακές ιδιότητες (Hoshino και συνεργάτες 2004). Το αντιβιοτικό που παράγει είναι μια θιαζοδιλίνη (transvalencin A). Η δραστηριότητα φαίνεται στον Πίνακα 1.9. Όπως παρατηρείται και από τον πίνακα, το transvalencin A αναστέλλει την ανάπτυξη θετικών κατά Gram βακτηρίων.

Πίνακας 1.10 Αντιμικροβιακή δράση του κλινικού στελέχους *Nocardia transvalensis* IFM 10065

Μικροοργανισμός δείκτης	MIC ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
<i>Nocardia asteroides</i> IFM 0319	1
<i>Nocardia farcinica</i> IFM 0284	1
<i>Nocardia translavensis</i> IFM 10065	>64
<i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC 607	0,125
<i>Gordonia branchialis</i> IFM 0150	<0,125
<i>Corynebacterium xerosis</i> IFM 2057	4
<i>Micrococcus luteus</i> IFM 2066	16
<i>Bacillus subtilis</i> PCI 189	0,25
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	1
<i>Staphylococcus aureus</i> CUH 3666 (MRSA)	>64
<i>Escherichia coli</i> NIH JC2	>64
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	>64
<i>Aspergillus niger</i> IFM 5368	>64
<i>Cryptococcus neofarmans</i> ATCC 90112	>64
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> IFM 10489	>64

Από ασθενή με νοκαρδίωση απομονώθηκε και το *Nocardia transvalensis* IFM 10065 που παράγει το transvalencin Z (Mukai και συνεργάτες 2006). Είναι μια βιοενεργή ουσία με αντιμικροβιακές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Όπως και τα προηγούμενα αντιβιοτικά, είναι δραστικό σε θετικά κατά Gram βακτήρια και ιδιαίτερα στα οξεάντοχα (*Corynebacterium xerosis*, *Gordonia branchialis* και *Mycobacterium smegmatis*, με MIC μικρότερη από 0,125 mg ml⁻¹ (Πίνακας 1.10).

Το *Nocardia transvalensis* IFM 0456 (NIH 34-43-6) απομονώθηκε από ασθενή στην Ταϊλάνδη και μελετήθηκε από μια ομάδα επιστημόνων στο Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας της Μπαγκκοκ (National Institute of Health, Bangkok) (Speitling και συνεργάτες 1998). Στον έλεγχο που έγινε για την ανίχνευση βιοενεργών μορίων χρησιμοποιήθηκαν θετικοί κατά Gram και αρνητικοί κατά Gram μικροοργανισμοί δείκτες. Βρέθηκε ότι παράγει το αντιβιοτικό 3'-O-demethyl mutactimycin το οποίο ήταν δραστικό μόνο εναντίον των θετικών κατά Gram βακτηρίων (Πίνακας 1.11).

Αποτελέσματα άλλων ερευνών έδειξαν ότι εδαφικό στέλεχος *Nocardia* ήταν βιοενεργό έναντι αναερόβιων βακτηρίων (Oishi και συνεργάτες 1982) και ανθεκτικών στελεχών γένους *Staphylococcus* και *Enterococcus* (Pucci και συνεργάτες 2004).

Πίνακας 1.11 Αντιμικροβιακή δράση του SO-075R1 (1), mutactimycin (2) και 3'-O-demethyl mutactimycin (3)

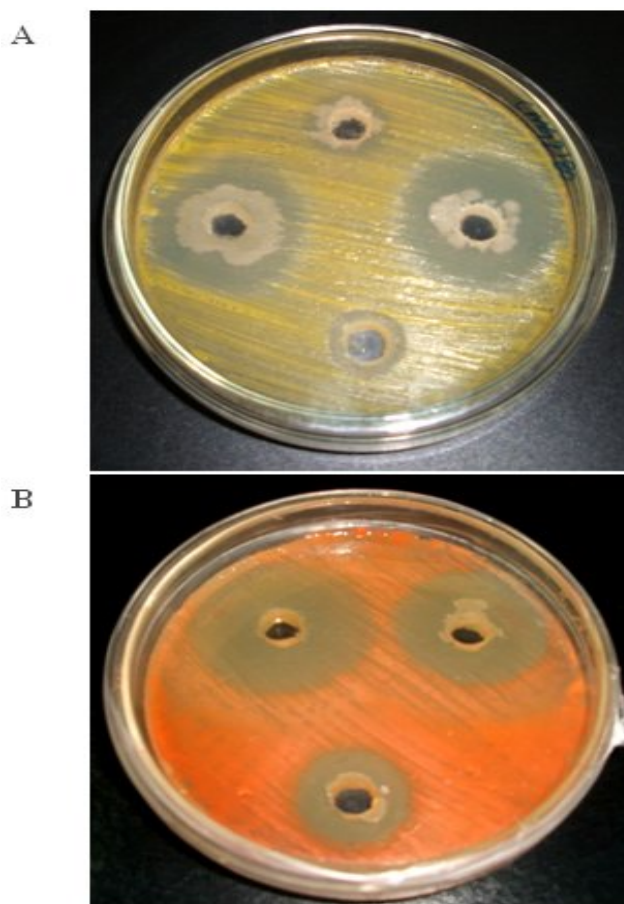
Μικροοργανισμός δείκτης	MIC (μg ml ⁻¹)		
	1	2	3
<i>Micrococcus luteus</i> IFM 2066	3,13	3,13	25,0
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	1,56	3,13	25,0
<i>Escherichia coli</i> NIH JC2	>100	100	>100
<i>Bacillus subtilis</i> PCI 189	3,13	6,25	50,0
<i>Corynebacterium xerosis</i> IFM 2057	156	312	125

1.6 Βιβλιογραφικά προτεινόμενες μέθοδοι προσδιορισμού της βιοενεργότητας

Βιβλιογραφικά προτείνονται συνολικά επτά μέθοδοι ανίχνευσης βιοενεργών ουσιών από μικροβιακά στελέχη.

A. Μέθοδος διάχυσης αντιβιοτικής ουσίας από πηγαδάκια (Well Diffusion Assay, Nedialkova και Naidenova 2005, Shantikumar και συνεργάτες 2006, Parungao και συνεργάτες 2007, Ahmed και συνεργάτες 2008, Εικόνα 1.16).

Σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό, συνήθως χρησιμοποιείται το Mueller Hinton Agar ενοφθαλμιζεται εναιώρημα του μικροοργανισμού δείκτη 0,5 κλιμακας MacFarland (10^8 cfu ml⁻¹). Η επίστρωση γίνεται με βαμβακοφόρο στυλεό σε τρεις κάθετες μεταξύ τους κατευθύνσεις. Στη συνέχεια, ανοίγονται μικρές οπές (4 mm) με κατάλληλο αποστειρωμένο εξάρτημα στις οποίες προστίθενται 20-50 µl υγρής καλλιέργειας από το μικροοργανισμό που εξετάζεται για παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών. Το τρυβλίο επωάζεται αναποδα σε κατάλληλες συνθήκες και παρατηρείται για τυχόν ζώνη αναστολής γύρω από το πηγαδάκι. Ανάλογα με τον αριθμό στελεχών που θα ελεγχουν επιλέγεται και το μέγεθος του τρυβλίου. Ένα τετράγωνο τρυβλίο (35,6 x 35,6 cm) χωράει μέχρι και 81 πηγαδάκια διαστάσεων από 5,5 ως 4,5 mm.



Εικόνα 1.16 Ανίχνευση βιοενεργής ουσίας με τη μέθοδο από πηγαδάκια (A-B Ahmed και συνεργάτες 2008)

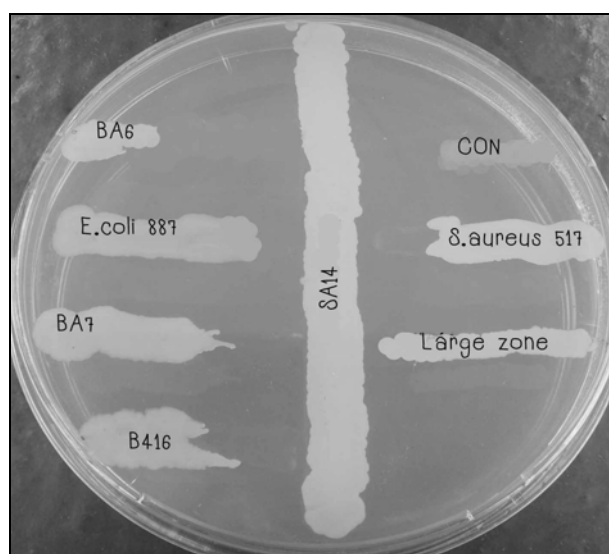
B. Μέθοδος Διάχυσης αντιβιοτικής ουσίας από στερεή καλλιέργεια (Agar Diffusion Assay, Kakore κα συνεργατες 2004, Nedialkova και Naidenova 2005).



Εικόνα 1.17 Έλεγχος βιοενεργότητας με τη μέθοδο Διάχυσης αντιβιοτικής ουσίας από στερεή καλλιέργεια (Kakore και συνεργάτες 2004)

Ακολουθείται η ίδια διαδικασία όπως και στην προηγούμενη μέθοδο με τη διαφορά ότι αντί για δημιουργία μικρών οπών τοποθετούνται τμήματα αποικιών από τον μικροοργανισμό που ερευνάται για παραγωγή βιοενεργών ουσιων. Τα τμήματα αυτά πρέπει να είναι σποριομένα (Εικόνα 1.17).

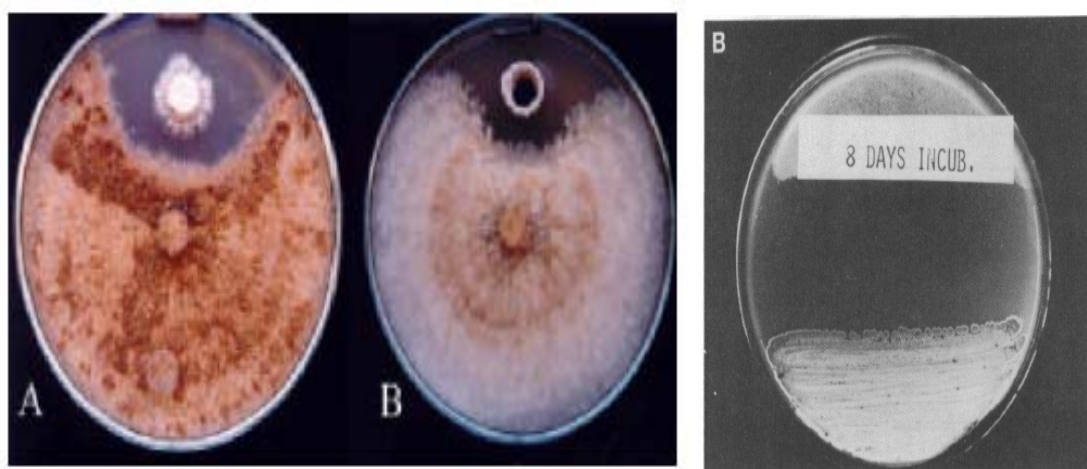
Γ. Μέθοδος Κάθετου ενοφθαλμισμού του μικροοργανισμού δεικτου (Cross streak method, Bhagabati και συνεργάτες 2004, Yadav 2007). Μεμονωμένη αποικία του υπό εξέταση μικροοργανισμού απλώνεται κάθετα σε τρυβλίο και επωάζεται σε κατάλληλες συνθήκες (Εικόνα 1.18).



Εικόνα 1.18 Εφαρμογή μεθόδου κάθετου ενοφθαλμισμού του μικροοργανισμού (Bhagabati και συνεργάτες 2004)

Όταν αναπτυχθεί, απλώνεται κάθετα στην αρχική ανάπτυξη του μικροοργανισμού ο οργανισμός δείκτης, προσέχοντας να μην έρθει σε επαφή με τον ήδη ανεπτυγμένο μικροοργανισμό. Το τρυβλίο επωάζεται σε κατάλληλες συνθήκες και στη συνέχεια παρατηρείται ή όχι η αναστολή του μικροοργανισμού δείκτη. Οι βακτηριοστατικές ιδιότητες μετρώνται πάλι σε χιλιοστά.

Δ. Μέθοδος Καθετου ενοφθαλμισμού για μύκητες (Cross streak method, Williston και συνεργάτες 1947). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται όταν ο μικροοργανισμός δείκτης αναπτύσσεται τείνοντας να καλύψει όλη την επιφάνεια του τρυβλίου (πχ μύκητες, Εικόνα 1.19).

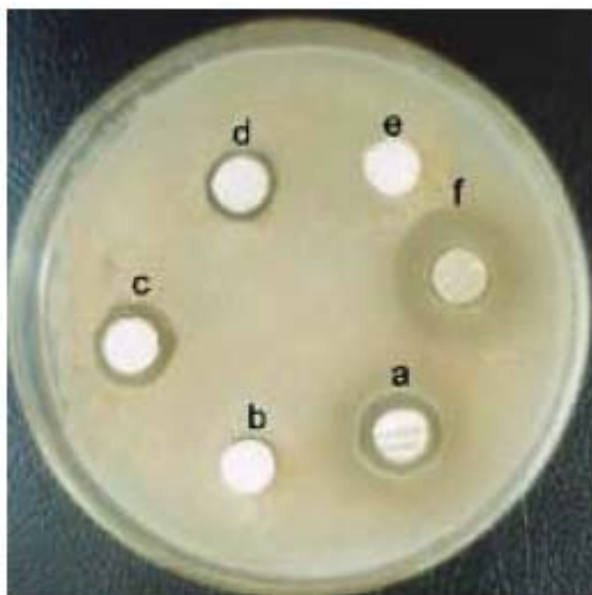


Εικόνα 1.19 Αναστολή ανάπτυξης μύκητα από βακτήριο γένους *Streptomyces* (Α-Β: Shahrokhi και συνεργάτες 2005, Γ: στο κάτω μέρος του τρυβλίου έχει αναπτυχθεί βιοενεργό στέλεχος *Streptomyces* το οποίο έχει αναστείλει την ανάπτυξη μύκητα)

Αρχικά στο τρυβλίο αναπτύσσεται ο μικροοργανισμός που εξετάζεται για παραγωγή αντιβιοτικού. Όταν έχουν σχηματιστεί σπόρια, υποβάλλεται σε ακτινοβολία UV για 10 λεπτά και στη συνέχεια αντιδιαμετρικά καλλιεργείται ο μικροοργανισμός δείκτης. Στην Εικόνα 1.19 παρατηρείται η βιοενεργότητα στελεχούς στρεπτομυκητα και η αναστολή ανάπτυξης ενός μύκητα.

Ε. Μέθοδος με χρήση ELISA (Devienne και Raddi 2002). Ο μικροοργανισμός δείκτης είναι διαλυμένος σε διάλυμα στο οποίο η συγκέντρωση του δείγματος μπορεί να ελεγχθεί. Οι μέθοδοι αραίωσης μπορούν να αυτοματοποιηθούν και να χρησιμοποιηθούν σε πλάκες μικροτιτλοδότησης τύπου ELISA (microtiter plates) 96, 384 ή 1536 θέσεων (Casey και συνεργάτες 2004). Στα πηγαδάκια του μπλοκ τοποθετούνται το υπο εξέταση στέλεχος και ο μικροοργανισμός δείκτης μαζί με κατάλληλο θρεπτικό υποστρώμα. Το δείγμα φωτομετρείται και υπολογίζεται η βιομάζα.

ΣΤ. Μέθοδος Διάχυσης Αντιβιοτικής ουσίας σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα-ποσοτική μέθοδος (Basilio και συνεργάτες 2003, Al-Bari και συνεργάτες 2006). Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, η βιοενεργή ουσία απομονώνεται και τοποθετείται συγκεκριμένη ποσότητα σε διηθητικό χαρτί διαμέτρου 6 mm. Σε τρυβλίο ενοφθαλμίζεται ο μικροοργανισμός δείκτης 0,5 κλίμακας MacFarland (10^8 cfu ml⁻¹) και τοποθετούνται τα δισκία με τη βιοενεργή ουσία (Εικόνα 1.20).



Εικόνα 1.20 Στο τρυβλίο αρχικά ενοφθαλμίζεται ο μικροοργανισμός δείκτης και στη συνέχεια τοποθετούνται με αποστειρωμένη λαβίδα εμποτισμένα δισκία βιοενεργούς ουσίας (<http://www.ias.ac.in/currsci/feb252004/593.pdf>)

Ζ. Μέθοδος Διάχυσης Αντιβιοτικής ουσίας σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα - ποιοτική μέθοδος. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται στο Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, στον τομέα Βοτανικής για την ανίχνευση δευτερογενών μεταβολιτών από στρεπτομύκητες εδάφους. Περιγράφεται αναλυτικά στην παραγραφο 2.8.

1.7 Στόχοι της εργασίας

Βάση τη βιβλιογραφία που αναφέρθηκε στην Εισαγωγή, δημιουργούνται τα παρακάτω ερωτήματα. Ποιές μέθοδοι είναι κατάλληλες για την απομόνωση στελεχών των γενών *Nocardia*, *Mycobacterium* και *Streptomyces* από κλινικά δείγματα και πως αυτά μπορούν τα ταυτοποιηθούν με μοριακές τεχνικές; Επιπλέον, ποια μέθοδος προτείνεται για την ανίχνευση της δράσης βιοενεργών στελεχών; Είναι δυνατόν

βιοενεργά στελέχη γένους *Streptomyces* να αναστείλουν την ανάπτυξη παθογόνων, κλινικών μικροοργανισμών; Κλινικά στελέχη Ακτινοβακτηριών είναι βιοενεργά και αν ναι, είναι η δράση τους αποτελεσματικότερη από εκείνη των δισκίων αντιβιοτικών που προτείνονται από τα Πρότυπα του Συμβουλίου κλινικών εργαστηρίων, Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

Λαμβάνοντας υπόψη τα ανωτέρω ερωτήματα τέθηκαν οι στόχοι της Διπλωματικής Εργασίας. Πρώτος στόχος ήταν η απομόνωση και ταυτοποίηση κλινικών στελεχών των γενών *Nocardia*, *Mycobacterium* και *Streptomyces* από κλινικά δείγματα που προσκομίστηκαν στο Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας, Τμήμα Φυματίωσης. Η απομόνωση έγινε από αναπνευστικά και μη δείγματα με τη μέθοδο Εμπλουτισμού με Ν-ακετυλοκυστεΐνη και καλλιέργειες σε στερεά και υγρά θρεπτικά υποστρώματα ενώ η ταυτοποίηση με τις τυποποιημένες μεθόδους Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test και GenoType[®] Mycobacterium CM/AS (παράγραφοι 2.5 και 2.7 αντίστοιχα).

Ο δεύτερος στόχος της Διπλωματικής Εργασίας αφορούσε στην επιλογή κατάλληλης μεθόδου ανίχνευσης βιοενεργών ουσιών. Δοκιμάστηκαν οι εξής βιβλιογραφικά προτεινόμενες μέθοδοι: Μέθοδος διάχυσης αντιβιοτικής ουσίας από πηγαδάκια, Μέθοδος κάθετου ενοφθαλμισμού μικροοργανισμού δείκτη και η Μέθοδος διάχυσης αντιβιοτικής ουσίας σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (παράγραφος 1.6). Η μέθοδος που εφαρμόστηκε ήταν η Διάχυση αντιβιοτικής ουσίας σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, η οποία εφαρμόζεται στο εργαστήριο του Μικροβιολογίας, του Τομέα Βοτανικής, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α.).

Ο τρίτος στόχος ήταν ο έλεγχος δράσης βιοενεργών ουσιών δεκα έξι ενδογενών στελεχών του γένους *Streptomyces* της μικροβιακής Τράπεζας του εργαστηρίου Μικροβιολογίας του Ε.Κ.Π.Α. έναντι κλινικών παθογόνων μικροοργανισμών (στελέχη των γενών *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Escherichia* και *Proteus*).

Ο τέταρτος στόχος της Διπλωματικής Εργασίας ήταν ο έλεγχος δράσης βιοενεργών ουσιών από δέκα τρία κλινικά στελέχη γένους *Nocardia*, είκοσι επτά κλινικά στελέχη γένους *Mycobacterium* και τέσσερα κλινικά στελέχη γένους *Streptomyces* που διατηρούνται στην Τράπεζα στελεχών του Γ.Ν.Α. Σισμανογλείου και του Γ.Ν.Α. Σωτηρία, έναντι των προαναφερθέντων κλινικών παθογόνων μικροοργανισμών.

Ο πέμπτος στόχος ήταν η σύγκριση της δραστηριότητας των παραγόμενων βιοενεργών ουσιών με τα δισκία αντιβιοτικών του εμπορίου. Πραγματοποιήθηκε εξέταση

ευαισθησίας στους μικροοργανισμούς δείκτες των οποίων ανεστάλη η ανάπτυξη σύμφωνα με τη μέθοδο Kirby-Bauer (παράγραφος 2.9).

Κεφάλαιο 2 – Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Έλεγχος βιοενεργότητας ενδογενών εδαφικών στελεχών του γένους *Streptomyces* και κλινικών στελεχών των γενών *Nocardia*, *Streptomyces* και *Mycobacterium*

Στην παρούσα Διπλωματική Εργασία εξετάστηκε η βιοενεργότητα δέκα έξι ενδογενών στελεχών του γένους *Streptomyces*, δέκα τριών κλινικών στελεχών γένους *Nocardia*, τεσσάρων κλινικών στελεχών στελεχών *Streptomyces* και είκοσι επτά κλινικών στελεχών *Mycobacterium* - other than - *tuberculosis* έναντι κοινών κλινικών παθογόνων μικροοργανισμών. Τα δέκα έξι στελέχη *Streptomyces* επιλέχθηκαν από την Τράπεζα στελεχών του εργαστηρίου Μικροβιολογίας, του Τομέα Βοτανικής, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α.) και η βιοενεργότητά τους είχε ελεγχθεί έναντι περιβαλλοντικών μικροοργανισμών δεικτών (Δέλλιου 2008, Διπλωματική Εργασία) ενώ τα κλινικά στελέχη απομονώθηκαν από αναπνευστικά και μη δείγματα τα οποία προσκομίστηκαν στο Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας του Γ.Ν.Α. Σισμανογλείου στα πλαίσια καθημερινής εξέτασης ασθενών. Από τα δέκα τρία στελέχη του γένους *Nocardia*, τα έξι παραχωρήθηκαν από το Εργαστήριο Αναφοράς της Φυματίωσης, Γ.Ν.Α Σωτηρία. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε και ένα στέλεχος (*Streptomyces chrestomyceticus*) από την Γερμανική Τράπεζα Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH ως θετικός μάρτυρας.

2.2 Κλινικά στελέχη για τον έλεγχο δράσης βιοενεργών ουσιών

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο δράσης βιοενεργών ουσιών Ακτινοβακτηρίων ήταν θετικά και αρνητικά κατά Gram κλινικά στελέχη των γενών *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Proteus* και *Escherichia*. Η ομάδα των στελεχών γένους *Staphylococcus* αποτελούνταν από ένα στέλεχος *Staphylococcus aureus* απομονωμένο από δείγμα ούρων, ένα στέλεχος *Staphylococcus epidermidis* και ένα Methicilline Resistant *St. aureus* (MRSA) από δείγματα πύου. Η ομάδα των στελεχών γένους *Enterococcus* αποτελούνταν από ένα στέλεχος *Enterococcus sp*, ένα

Enterococcus faecalis, ένα *Enterococcus faecium* και ένα Vancomycin Resistant Enterococcus (VRE) που είχαν απομονωθεί από δείγματα κοπράνων. Τα δέκα τρία βακτήρια του γένους *Nocardia* δεν είχαν ταυτοποιηθεί σε επίπεδο είδους και είχαν απομονωθεί από αναπνευστικά δείγματα. Τα είκοσι επτά στελέχη του γένους *Mycobacterium* απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας του Γ.Ν.Α. Σισμανογλείου από αναπνευστικά (πτύελα, βρογχικές εκκρίσεις, βρογχοκυψελιδικό εκπύμα) και μη αναπνευστικά δείγματα (πλευριτικό υγρό, ασκитικό υγρό, ούρα). Χρησιμοποιήθηκαν δώδεκα στελέχη *Mycobacterium* - other than - *tuberculosis* και δέκα πέντε στελέχη *M. tuberculosis* complex. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε ένα στέλεχος *Klebsiella pneumoniae*, ένα *Pseudomonas aeruginosa*, ένα *Proteus mirabilis* και ένα *Escherichia coli*. Τα *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* και *E. coli* είχαν απομονωθεί από δείγμα ούρων ενώ το *P. aeruginosa* από δείγμα πτυέλων.

2.3 Θρεπτικά υποστρώματα

Στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Lowenstein-Jensen Medium (Sorlozano και συνεργάτες 2009): Εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας στελεχών του γένους *Mycobacterium*. Το υλικό φέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα υπό κλίση. Περιέχει (g l⁻¹): ασπαραγίνη (6), KH₂PO₄ (4), MgSO₄ (0,4), C₆H₆O₇Mg (1), πατατάλευρο (50), πράσινο του μαλαχίτη (0,67) (Becton, Dickinson and Company 220908).

Στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Middlebrook 7H11 Agar (Muralidhar και Srivastava 2004, Palomino 2005): Εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας στελεχών του γένους *Mycobacterium* sp. Περιέχει (g l⁻¹): πυριδοξίνη (0,01), βιοτίνη (0,005), αγαρ (13,5), πράσινο του μαλαχίτη (0,0025), Na₂HPO₄ (1,5), KH₂PO₄ (1,5), MgSO₄ (0,05), ZnSO₄ (0,01), CuSO₄ (0,1), Na₃C₃H₅O(CO₂) (0,4), (NH₄)₂SO₄ 0,5, CaCl₂ (0,005), υδρολάση καζείνης (1) και γλυκερόλη 5 ml, ενισχυτικό παράγοντα OADC 100 ml (Becton, Dickinson and Company 295964).

Στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Mueller Hinton Agar (Parungao και συνεργάτες 2007): Καλλιιεργήθηκαν οι μικροοργανισμοί που εξετάστηκαν για τον έλεγχο παραγωγής βιοενεργών ουσιών. Περιέχει (g l⁻¹): σκόνη κρέατος (5,4), υδρολάση καζείνης (5,25), άμυλο (0,4), άγαρ (5,1). Ρύθμιση pH πριν την αποστείρωση ρυθμίστηκε στο 7,1 (Oxoid CM0337).

Στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MacConkey Agar No3 (Šiširak και συνεργάτες 2010): Διαγνωστικό θρεπτικό υλικό για διαχωρισμό των μικροοργανισμών που ζυμώνουν τη λακτόζη. Περιέχει (g l⁻¹): πεπτόνη (20), λακτόζη (10), NaCl (5), άγαρ (15), μπλε του μεθυλενίου (0,001), χολικά άλατα No3 (1,5). Ρύθμιση pH πριν την αποστείρωση ρυθμίστηκε στο 7,1 (Oxoid CM0115)

Στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Agar Dextrose Sabouraud με χλωραμφαινικόλη (Lemriss και συνεργάτες 2003): Εκλεκτικό θρεπτικό αυτό υπόστρωμα μυκήτων. Περιέχει (g l⁻¹): δεξτρόζη (40), χλωραμφαινικόλη (0,50), πεπτόνη (10,0), άγαρ (15) (Conda Cat1090).

Στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Σοκολατόχρωμου άγαρ (Saubolle και Sussland 2003): Εκλεκτικό θρεπτικό υλικό καλλιέργειας στελεχών του γένους *Nocardia sp.* Περιέχει (g l⁻¹): πεπτόνη (23), άμυλο (1,0), NaCl (5,0), άγαρ (10,0). Το pH του θρεπτικού υποστρώματος πριν την αποστείρωση ρυθμίστηκε στο 7,3. (Columbia Blood Agar Base CM0331, Oxoid).

Στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Αιματούχου άγαρ (Desai και συνεργάτες 2001): Χρησιμοποιήθηκε για τις καλλιέργειες των ταχέως αναπτυσσόμενων μικροοργανισμών. Περιέχει (g l⁻¹): άγαρ (12), πεπτόνη (15), NaCl (5), εκχύλισμα ζύμης (5) και αίμα 5 % (Blood Agar Base No. 2, Becton Dickinson and Company – BD-905099).

Υγρό θρεπτικό Middlebrook 7H9 Broth (Chitra και Prasad 2001): Εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα υγρής καλλιέργεια στελεχών του γένους *Mycobacterium sp.* Φέρεται σε φιαλίδια των 7 ml (Mycobacteria Growth Indicator -Tube BBL™ MGIT™). Περιέχει (g l⁻¹): 7H9 Middlebrook θρεπτικό ζωμό (5,9), υδρολυμένη καζείνη (1,25). Στο θρεπτικό υπόστρωμα προστέθηκαν 800 μl από τα ανασυσταμένα

λυοφιλοποιημένα αντιβιοτικά (φιαλίδιο PANTA, Πίνακας 2.6, Becton, Dickinson and Company 245122).

Πίνακας 2.1 Λυοφιλοποιημένα αντιβιοτικά που περιέχονται στο σωληνάριο MGIT και οι ομάδες μικροοργανισμών που αναστέλλονται από τη δράση τους

BBL MGIT PANTA	Αναστολή ανάπτυξης μικροβίων
Πολυμυξίνη Β (6.000 units)	Gram (-) βακτήρια
Αμφοτερικίνη Β (600 µg)	Μύκητες
Ναλιδικό οξύ (2.400 µg)	Gram (-) βακτήρια
Τριμεθοπρίμη (600 µg)	Gram (-) & (+) βακτήρια
Αζλοκιλίνη (600 µg)	<i>Pseudomonas</i> , <i>Aeromonas</i> , Gram (+) κόκκοι

Όλα τα στερεά θρεπτικά υποστρώματα αποστειρώθηκαν σε θερμοκρασία 121 °C και σε πίεση 1atm για 15 λεπτά.

2.4 Διαλύματα - ρυθμιστικά διαλύματα

Διάλυμα γλυκερόλης (Casey και συνεργάτες 2004): διάλυμα διατήρησης των μικροβιακών στελεχών στου -80 ° C. Περιέχει: γλυκερόλης 10 % (w/v).

Διάλυμα αποβουτυρωμένου γάλακτος (Σαββίδης 2004, Διδακτορική Διατριβή): διάλυμα διατήρησης των μικροβιακών στελεχών σε λυοφιλιωμένη μορφή. Περιέχει: 10 g l⁻¹ σκόνη γάλακτος (Difco 298240).

Διάλυμα NaOH και N-ακετυλ-L-κυστεΐνης (Fadzilah και συνεργάτες 2009): Κάθε φιαλίδιο περιέχει NaOH 20,00 g, Na₃C₆H₅O₇ · 2H₂O 14,5 g και την αμπούλα που βρίσκεται μέσα που περιέχει 0,375 g N-ακετυλ-L-κυστεΐνη (Mycoprep™ Reagent).

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (Fadzilah και συνεργάτες 2009): Περιείχε (g l⁻¹): Na₂HPO₄ 2,37 και KH₂PO₄ 2,27 (Becton, Dickinson and Company 240862).

Διάλυμα ενισχυτικού παράγοντα Bactec OADC (Lu και συνεργάτες 2002): Φέρεται σε φιαλίδια των 15 ml. Περιέχει (g l⁻¹): γαλακτικό οξύ (3,5), στεατικό

πολυοξαιθυλένιο (2,3), αλβουμίνη (116), γλυκόζη (23) και βιοτίνη (0,012). Χρησιμοποιείται για τον εμπλουτισμό των φιαλιδίων BBL MGIT PANTA (Becton, Dickinson and Company 245122).

Διάλυμα Κυανού του μεθυλενίου (Rishi και συνεργάτες 2007). Για την οξεάντοχη χρώση Zeihl Neelsen. Περιείχε: 2400 ml απεσταγμένο νερό, 240 ml αιθανόλη 95 % (w/v), 36 g μπλε του μεθυλενίου και 60 ml φαινόλης (Liofilchem 80277). Παρασκευάστηκε ως εξής: σε ογκομετρική φιάλη που περιείχε 240 ml αιθανόλης 95 % (w/v), προστέθηκαν 36 g μπλε μεθυλενίου και παρέμειναν στους 37 °C για 24 ώρες. Στη συνέχεια προστέθηκαν 60 ml φαινόλης (η οποία είχε ρευστοποιηθεί σε υδατόλουτρο στους 100 °C) και 2400 ml απεσταγμένο νερό.

Διάλυμα Φουξίνης (Rishi και συνεργάτες 2007): Για την οξεάντοχη χρώση Zeihl Neelsen. Περιείχε: 2400 ml απεσταγμένου νερού, 240 ml αιθανόλης 95 % (w/v), 24 g βασικής φουξίνης και 120 ml φαινόλης (DC Panreac 251332). Η παρασκευή της χρωστικής έγινε όπως και στη χρωστική μπλε του μεθυλενίου με τη διαφορά ότι αντί για το μπλε του μεθυλενίου προστέθηκε φουξίνη.

Διάλυμα αιθανόλης και HCl (οξινοσμένη αλκοολη): Για την οξεάντοχη χρώση Zeihl Neelsen. Περιείχε: 970 ml αιθανόλης 95 % (w/v) και 30 ml HCl.

Διάλυμα Φαινόλης: Χρησιμοποιείται στην οξεάντοχη χρώση Zeihl Neelsen. Περιέχει: C₆H₅OH (Analax 203-632-7).

Διάλυμα HCl: Χρησιμοποιείται στην οξεάντοχη χρώση Zeihl Neelsen. Περιέχει: HCl 37 % (DC Panreac 131020).

Διάλυμα Lugol: Χρησιμοποιήθηκε κατά τη χρώση Gram. Η χρωστική διατίθεται στο εμπόριο (DC Panreac 251774). Η χρωστική περιέχει (g l⁻¹): 3,3 ιώδιο, 6,6 ιωδιούχο κάλιο.

Διάλυμα Crystal Violet Χρησιμοποιείται στη χρώση Gram. Η χρωστική διατίθεται στο εμπόριο. Παρασκευή χρωστικής: σε ογκομετρική φιάλη προστίθενται 200 ml

αιθανόλης 95 % (w/v), 800 ml απεσταγμένου νερού, 20 g κυανό του μεθυλενίου και 8 g οξάλικό αμμώνιο. Ανάδευση (DC Panreac 251762).

Διάλυμα Σαφρανίνης: Χρησιμοποιείται στη χρώση Gram. Η χρωστική διατίθεται στο εμπόριο. Παρασκευή χρωστικής: σε ογκομετρική φιάλη προστίθενται 100 ml αιθανόλης 95 % (w/v), 900 ml απεσταγμένου νερού και 40 g σαφρανίνη. Ανάδευση (Fluka RA1222291).

Διάλυμα Ακετόνης - Αιθανόλης (Scharlau AC0311): Χρησιμοποιείται στη χρώση Gram. Παρασκευή αποχρωματιστικού: σε ογκομετρική φιάλη προστίθενται ίση ποσότητα αιθανόλης 95 % (w/v) και Acetone solution. Ανάδευση (Scharlau AC0311).

Αμπούλες NaCl 0,9 % των 10 ml: Για την παρασκευή μικροβιακού εναιωρήματος θολερότητας 0,5 Mac Farland (απαιτούνται 4-5 μεμονωμένες και ομοιόμορφες αποικίες για να παραχθεί εναιώρημα 10^8 κύτταρα ml^{-1}) (Demo S.A).

Αμπούλες εναίσιμου ύδωρ: Για το παρασκεύασμα χρώσης (Demo S.A).

2.5 Επεξεργασία κλινικών δειγμάτων για απομόνωση και ταυτοποίηση βακτηριών

Στην παρούσα Διπλωματική Εργασία έγινε ένας ποιοτικός έλεγχος δράσης βιοενεργών ουσιών από ενδογενή εδαφικά στελέχη του γένους *Streptomyces* και κλινικά στελέχη των γενών *Nocardia*, *Streptomyces* και *Mycobacterium* - other than - *tuberculosis*. Τα στελέχη *Streptomyces* διατηρούνταν στην Τράπεζα Στελεχών του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας, Τομέα Βοτανικής και η βιοενεργότητά τους είχε εξεταστεί στη Διπλωματική Εργασία της Δέλλιου (2008).

Για τον έλεγχο δράσης βιοενεργών χρησιμοποιήθηκαν κλινικά στελέχη θετικών και αρνητικών κατά Gram μικροοργανισμών. Αναλυτικότερα, εξετάστηκε η αναστολή ανάπτυξης των εξής κλινικών παθογόνων βακτηριών: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, Methicilline *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, Vancomycine Resistant *Enterococcus*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*,

Nocardia, *Mycobacterium* - other than – *tuberculosis* και *Mycobacterium tuberculosis complex*.

2.5.1 Βακτήρια των γενών *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas* και *Escherichia*

Τα βακτήρια των γενών *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Proteus* και *Escherichia* απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα ούρων. Το δείγμα είχε συλλεχθεί σε αποστειρωμένο δοχείο. Η απομόνωση έγινε καλλιέργεια σε θρεπτικά υποστρώματα. Αναλυτικότερα, με κρίκο των 10 μl λήφθηκε ποσότητα δείγματος και τοποθετήθηκε σε αιματούχο άγαρ και MacConkey άγαρ. Τα τρυβλία επώστηκαν σε κλίβανο 37 °C για 24 ώρες. Ίση ποσότητα δείγματος μονιμοποιήθηκε για τη χρώση κατά Gram.

Το κλινικό βακτήριο του γένους *Pseudomonas* απομονώθηκε από κλινικό δείγμα πτυέλων ύστερα από καλλιέργεια 10 μl σε αιματούχο άγαρ, MacConkey άγαρ και σοκολατόχρωμο άγαρ. Η επώση των δυο πρώτων θρεπτικών υποστρωμάτων έγινε σε κλίβανο 37 °C για 24 ώρες ενώ το σοκολατόχρωμο άγαρ επώστηκε σε συνθήκες σε κλίβανο CO₂, 37 °C για 24 ώρες. Ίση ποσότητα δείγματος μονιμοποιήθηκε για τη χρώση κατά Gram.

Η ταυτοποίηση έγινε με το αυτοματοποιημένο, ταυτοποιητικό σύστημα Wider, στηριζόμενη στις βιοχημικές ιδιότητες του μικροοργανισμού.

Τα κλινικά στελέχη γένους *Enterococcus* καθώς και τα *St. epidermidis*, Methicilline *Staphylococcus aureus* ήταν διατηρημένα σε ημιαποβουτυρωμένο γάλα στους -80 °C, στην Τράπεζα Στελεχών του Γ.Ν.Α. Σισμανόγλειο.

2.5.2 Βακτήρια των γενών *Nocardia* και *Streptomyces*

Τα βακτήρια των γενών *Nocardia* και *Streptomyces* απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα αναπνευστικών εκκρίσεων. Με αποστειρωμένο κρίκο ενοφθαλμίστηκαν 10 μl σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα σοκολατόχρωμου άγαρ και επώστηκαν σε ατμόσφαιρα CO₂ 5 %, στους 35 °C για 4 έως 5 ημέρες. Ίση ποσότητα δείγματος, μονιμοποιήθηκε για τη χρώση κατά Gram.

2.5.3 Βακτήρια του γένους *Mycobacterium*

Α. Λήψη και προετοιμασία δειγμάτων

Τα κλινικά δείγματα που προσκομίστηκαν στο Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας ήταν κυρίως αναπνευστικά (πτύελα, βρογχικές εκκρίσεις, βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα) και μη αναπνευστικά (πλευριτικό υγρό, ασκητικό, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, πύο, υλικό βιοψίας).

Πτύελα και λοιπά αναπνευστικά δείγματα

Η εξέταση πτυέλων για απομόνωση βακτηρίων του γένους *Mycobacterium* προαπαιτεί συλλογή 3-5 πρωινών δειγμάτων διαδοχικών ημερών σε ευρύστομο, αποστειρωμένο φιαλίδιο με βιδωτό πώμα. Κατάλληλο θεωρείται το δείγμα που είναι βλεννοπυώδες και όχι έκκριμα της οπίσθιας ρινοφαρυγγικής κοιλότητας. Η προετοιμασία των πτυέλων συνίσταται σε ρευστοποίηση και εμπλουτισμό. Με τις μεθόδους αυτές επιτυγχάνεται η απαγκίστρωση των βακτηρίων του γένους *Mycobacterium sp* από τη βλέννα και η συγκέντρωσή τους σε μικρότερο όγκο εξεταστέου υλικού.

Ούρα

Απαιτείται η συλλογή δειγμάτων πρωινής ουρήσεως τριών συνεχών ημερών. Αρχικά έγινε φυγοκέντρωση και τα ιζήματα συγκεντρώθηκαν σε αποστειρωμένα φιαλίδια με βιδωτό πώμα.

Βιολογικά υγρά (πλευριτικό υγρό, ασκητικό υγρό, εγκεφαλονωτιαίο υγρό)

Η επεξεργασία του δείγματος εξαρτάται από την ποσότητα που έχει ληφθεί και τον πιθανό αποικισμό με άλλα βακτήρια. Όταν ο όγκος του υγρού παρακέντησης ήταν μεγαλύτερος των 10 ml το δείγμα υπέστη φυγοκέντρωση στις 3000 στροφές για 10 λεπτά και εμβολιάστηκε σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα (παράγραφος 2.6.2). Εάν το κλινικό δείγμα ήταν επιμολυσμένο μετά τη φυγοκέντρωση έγινε εμπλουτισμός με τη μέθοδο της Ν-ακετυλοκυστεΐνης όπως περιγράφεται παρακάτω.

Υλικό βιοψίας (κυρίως από λεμφαδένα ή άλλη πάσχουσα περιοχή)

Όταν το υλικό είχε ληφθεί με ειδικό στυλεό αργινίου η επεξεργασία έγινε όπως περιγράφεται στην επόμενη παράγραφο. Στην περίπτωση δείγματος ιστού, προηγήθηκε τεμαχισμός με αποστειρωμένα νυστεράκια μιας χρήσεως

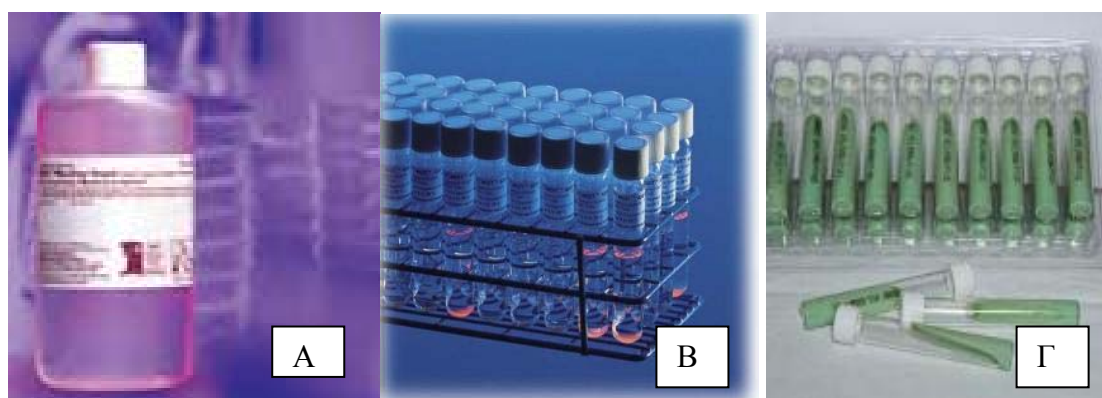
B. Απομόνωση βακτηρίων του γένους *Mycobacterium* με τη μέθοδο εμπλουτισμού N – ακετυλ – L - κυστεΐνης (NALC-NaOH)

Στα κλινικά δείγματα που προσκομίστηκαν έγινε εμπλουτισμός και ρευστοποίηση με διάλυμα NaOH και N-ακετυλ-L-κυστεΐνης (NALC-NaOH) σύμφωνα με τυποποιημένη (Chitra και Prasad 2001, Palomino 2005, Parungao και συνεργάτες 2007, Sorlozano και συνεργάτες 2009), σε θάλαμο βιολογικής ασφάλειας ΙΙΙ. Η πλειονότητα των κλινικών δειγμάτων είχε επιμολυνθεί από την φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα και περιείχαν πολλή βλέννα. Συνεπώς, έπρεπε ρευστοποιηθούν και να απομακρυνθούν οι υπόλοιποι μικροοργανισμοί ώστε να αναπτυχθούν τα βακτήρια του γένους *Mycobacterium* sp. Τα στάδια επεξεργασίας των δειγμάτων ήταν τα εξής:

1. Σε δοχείο τύπου falcon των 50 ml τοποθετήθηκε ποσότητα κλινικού δείγματος (μέχρι 5 ml). Όταν το δείγμα ήταν ούρα, προηγήθηκε φυγοκέντρηση σε κλινική φυγόκεντρο (3000 rpm για 10 λεπτά), απορρίφθηκε το υπερκείμενο και εξετάστηκε το ίζημα. Στο δείγμα προστέθηκε ίση ποσότητα διαλύματος NALC-NaOH.
2. Ανάδευση σε vortex μέχρι να ρευστοποιηθεί και ομογενοποιηθεί.
3. Επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
4. Προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων (παράγραφος 2.3) μέχρι τελικού όγκου 45 ml.
5. Φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 15 λεπτά.
6. Απόρριψη υπερκείμενου και αραίωση ιζήματος με 3 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων
7. Ακολούθησε εμβολιασμός σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Lowenstein-Jensen και 0,5 ml σε κάθε σωληνάριο τύπου Bactec MGIT 960 (Εικόνα 2.1). Δυο σταγόνες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα για την οξεάντοχη χρώση.
8. Τα δοκιμαστικά σωληνάκια με το στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Lowenstein-Jensen επωάστηκαν στον κλίβανο στους 37 °C σε κεκλιμένη θέση για τουλάχιστον 3 εβδομάδες ενώ τα σωληνάκια με το θρεπτικό ζωμό Middlebrook 7H9 τοποθετήθηκαν

στο αυτοματοποιημένο σύστημα Bactec MGIT 960 του οίκου Becton, Dickinson and Company για 7-20 ημέρες (Εικόνα 2.2).

Το NaOH που περιέχεται στο διάλυμα NALC-NaOH χρησιμοποιείται για την καταστολή των ταχέως αναπτυσσόμενων μικροβίων αλλά και για την ρευστοποίηση του δείγματος. Η συγκέντρωσή του φιαλίδιο είναι 2 % (w/v). Η συγκέντρωση αυτή είναι τοξική και για ορισμένα στελέχη του γένους *Mycobacterium sp* όταν παραταθεί ο χρόνος αναμονής των 20 λεπτών επώασης (3^ο στάδιο επεξεργασίας δειγμάτων) ή αυξηθεί η συγκέντρωση του NaOH με σκοπό να ελαττωθούν οι επιμολύνσεις (Peres και συνεργάτες 2009).



Εικόνα 2.1 Χημικά διαλύματα MycoPrep™ Reagent (A) και υποστρώματα για την καλλιέργεια *Mycobacterium* υγρά Middlebrook 7H9 Broth (B) και στερεά Lowenstein Jensen (Γ)

Γι' αυτό το λόγο μέσα στο φιαλίδιο υπάρχει αμπούλα με N-acetyl-L-cysteine (NALC) η οποία πρέπει να ελευθερωθεί στο διάλυμα πριν τη χρησιμοποίησή του. Πρόκειται για ένα βλεννολυτικό παράγοντα. Όταν προστίθεται σε ίση ποσότητα δείγματος, η τελική συγκέντρωση του NaOH πέφτει στο 1 % (w/v) και έτσι καθίσταται λιγότερο τοξική για τα βακτήρια γένους *Mycobacterium*.

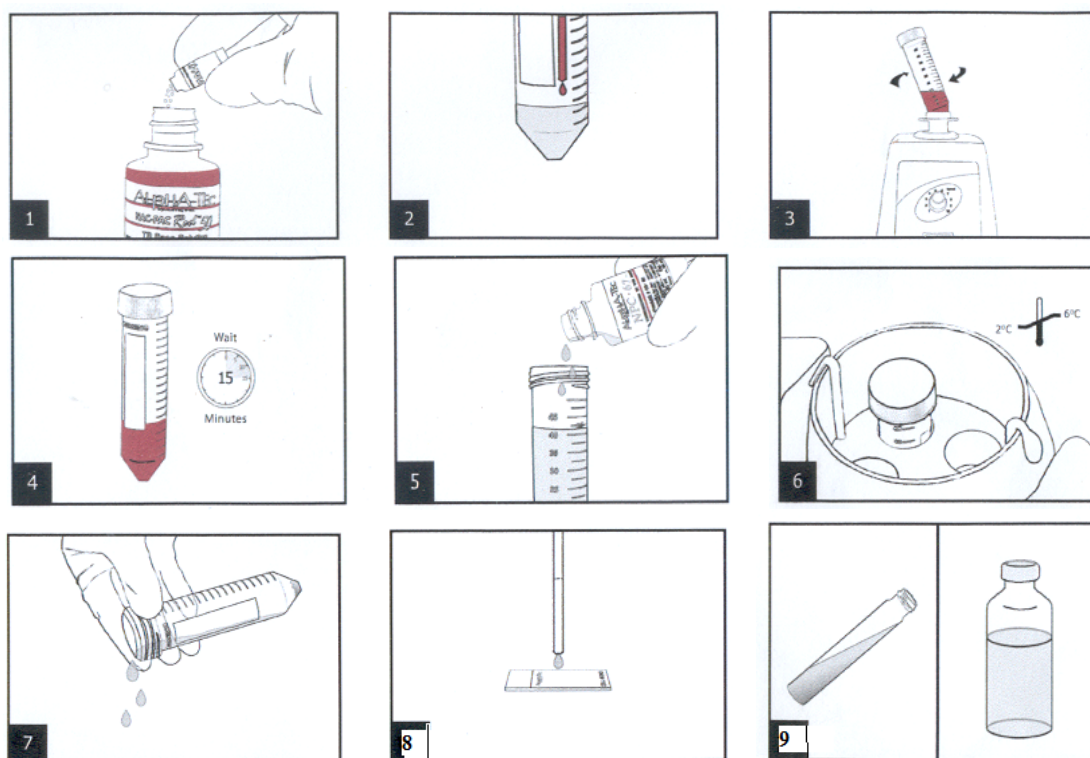
Το κιτρικό νάτριο που εμπεριέχεται στο φιαλίδιο δεσμεύει ελεύθερα μεταλλικά ιόντα που πιθανόν να υπάρχουν στο δείγμα και αναστέλλουν τη δράση του N-acetyl-L-cysteine. Το διάλυμα φωσφορικών αλάτων (Phosphate Buffer Saline-PBS) χρησιμοποιείται για τις πλύσεις δείγματος. Περιορίζει τη δράση του NALC-NaOH και βοηθάει στην καθίζηση των βακτηρίων του γένους *Mycobacterium sp* κατά τη φυγοκέντρωση.

Στην Εικόνα 2.3 δίνεται σχηματικά όλη η επεξεργασία που ακολουθήθηκε στο Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας για την απομόνωση βακτηρίων του γένους *Mycobacterium* από κλινικά δείγματα.



Εικόνα 2.2 Αυτοματοποιημένος αναλυτής Bactec MGIT 960 για την επώαση υγρών καλλιιεργειών *Mycobacterium*

Τα σωληνάρια με το θρεπτικό ζωμό 7H9 Middlebrook φέρουν στο πυθμένα τους ενσωματωμένη σιλικόνη που είναι εμπλουτισμένη με αλάτι ρουθενίου, ουσία η οποία φθορίζει σε συνθήκες μειωμένου οξυγόνου (Hillemann και συνεργάτες 2006).



Εικόνα 2.3 Στάδια επεξεργασίας κλινικών δειγμάτων για απομόνωση βακτηρίων του γένους *Mycobacterium* (1: προετοιμασία διαλύματος Ν-ακετυλ-Λ-κυστεΐνη, 2: προσθήκη ίση ποσότητας αντιδραστηρίου-δείγματος σε κωνικό φάλκον, 3: vortex, 4: παραμονή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, 5: προσθήκη διαλύματος φωσφορικών, 6: φυγοκέντρωση, 7: απόρριψη υπερκειμένου, 8: παρασκεύασμα, 9: καλλιέργεια σε θρεπτικά υποστρώματα

Αρχικά, μετά τον εμβολιασμό, η ποσότητα οξυγόνου στα φιαλίδια είναι μεγάλη και ως εκ τούτου δεν παράγεται φθορισμός. Όταν όμως αναπτυχθούν τα στελέχη του γένους *Mycobacterium* ή και άλλοι μικροοργανισμοί στο ζωμό με συνέπεια την κατανάλωση οξυγόνου, ο δείκτης φθορίζει με τη βοήθεια υπεριώδους ακτινοβολίας σε μήκος κύματος 365 nm. Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών επισημαίνεται με φωτεινό και ηχητικό σήμα του μηχανήματος. Η επώαση γίνεται στους 37 °C με αυτόματη ανακίνηση μια φορά κάθε 10 λεπτά. Το θετικό αποτέλεσμα αντιστοιχεί σε ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε συγκέντρωσή 10^5 - 10^6 colony forming units ml⁻¹ (cfu ml⁻¹). Η ταχύτητα ανάπτυξης του *Mycobacterium* στο φιαλίδιο MGIT εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους στο δείγμα, τη συλλογή και επεξεργασία του δείγματος και την κατάσταση του ασθενούς (κλινικά συμπτώματα, λήψη θεραπευτικής αγωγής).

2.6 Φαινοτυπικός προσδιορισμός βακτηρίων

Οι χρώσεις χρησιμοποιήθηκαν για το διαχωρισμό των μικροοργανισμών σε δυο ομάδες ανάλογα α) με τη δομή του τοιχώματός τους (θετικά ή αρνητικά κατά Gram) και β) την ανθεκτικότητα σε οξέα (Ziehl Nielsen).

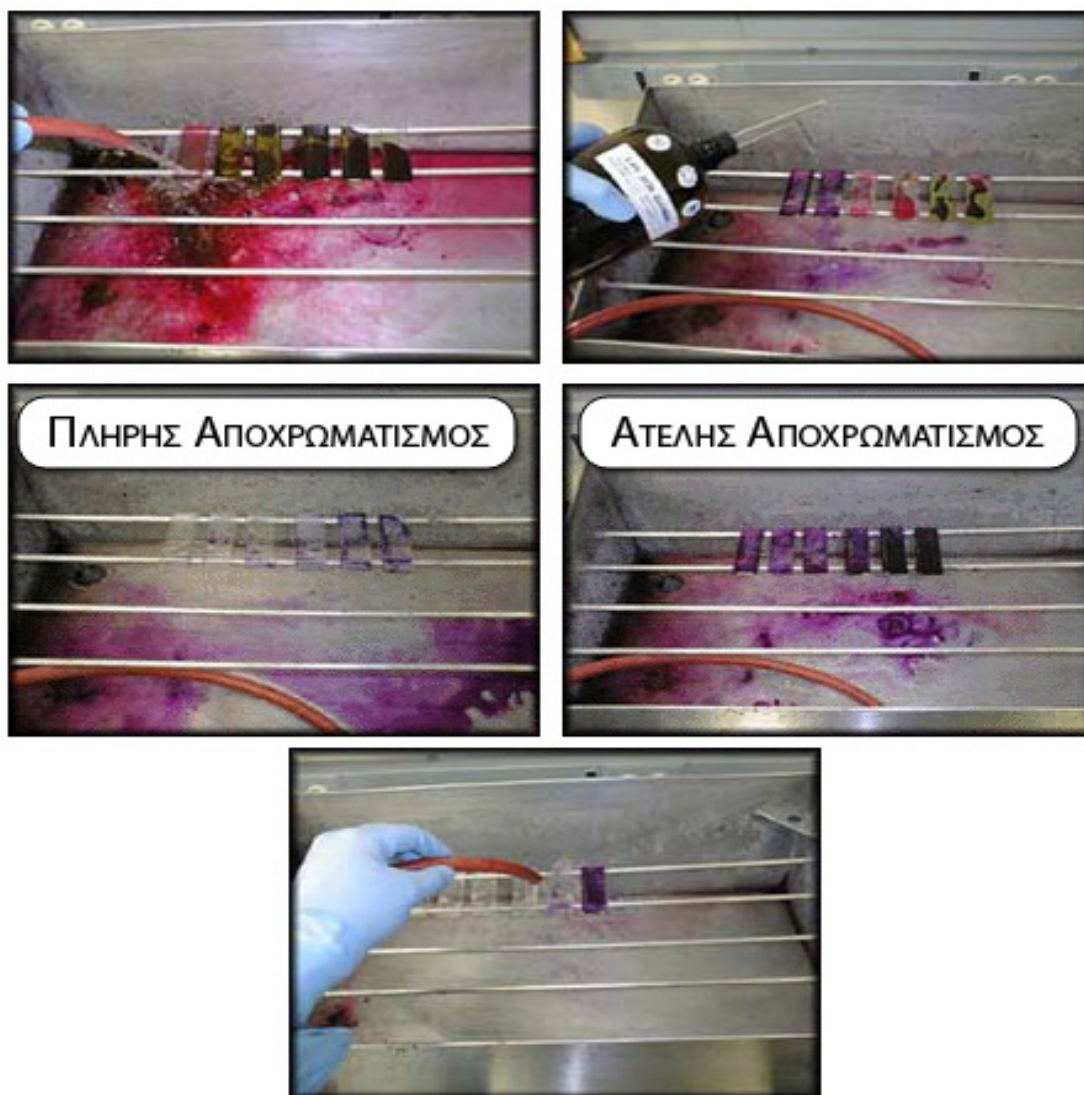
2.6.1. Χρώση Gram. Ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται στο βιβλίο «Εργαστηριακές Ασκήσεις Μικροβιολογίας», Καραγκούνη-Κύρτσου (2001). Τα βακτήρια του γένους *Mycobacterium sp* δε χρωματίζονται καλά με τη χρώση Gram, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε λιπίδια.



Εικόνα 2.4 Μικροσκοπική εικόνα παρασκευάσματος βακτηρίου γένους *Mycobacterium* με χρώση κατά Gram

Εάν όμως αφαιρεθεί το λιπιδικό τμήμα τότε το κύτταρο δε θα είναι οξεάντοχο, αλλά θετικό κατά Gram (Madigan και συνεργάτες 1997).

2.6.2 Οξεάντοχη χρώση Ziehl Nielsen. Η χρώση χρησιμοποιήθηκε για τη διάκριση των οξεάντοχων μικροοργανισμών του γένους *Mycobacterium*. Οι οξεάντοχοι οργανισμοί φαίνονται στο παρασκεύασμα κόκκινοι (Εικόνα 2.4), ενώ οι μη οξεάντοχοι φαίνονται κυανοί. Αρχικά καλύφθηκαν τα παρασκευάσματα με φαινικούχο φουξίνη και ταυτόχρονη θέρμανση με φλόγα μέχρι να εκλυθούν υδρατμοί, ώστε να διεισδύσει η χρωστική στο τοίχωμα των βακτηρίων γένους *Mycobacterium*. Η χρωστική παρέμεινε για 10 λεπτά. Ακολούθησε ξέπλυμα με νερό βρύσης, αποχρωματισμός με οξινοσμένη αλκοόλη και στη συνέχεια προστέθηκε κυανού του μεθυλενίου 5 λεπτά (Εικόνα 2.5).



Εικόνα 2.5 Στάδια χρώσης Ziehl Nielsen

2.7 Ταυτοποίηση κλινικών στελεχών του γένους *Mycobacterium*

2.7.1 Άμεση ενίσχυσης 16S rRNA αλληλουχιών του *Mycobacterium* με τη χρήση της τυποποιημένης μεθόδου Amplified *Mycobacterium* Tuberculosis Direct Test (A-MTD)

Η εξέταση της GEN-PROBE (A-MTD) ανιχνεύει το ριβοσωμικό ριβονουκλεϊκό οξύ (rRNA) του *M. tuberculosis* complex σε ιζήματα που έχουν προετοιμαστεί από πτύελα (προκλητά ή με απόχρεμψη), βρογχικά δείγματα (πχ βρογχοκυψελιδικές εκκρίσεις ή βρογχικές αναρροφήσεις) ή τραχειακές αναρροφήσεις. Η εξέταση A-MTD ανιχνεύει το rRNA τόσο σε αναπτυσσόμενους όσο και σε μη αναπτυσσόμενους σε καλλιέργεια οργανισμούς. Η αρχή της μεθόδου έγκειται στον πολλαπλασιασμό με ενδιάμεση μεταγραφή (transcription-mediated amplification-TMA) για την ανίχνευση του ριβοσωμικού ριβονουκλεϊκού οξέος του *M. tuberculosis* complex.

Το πλεονέκτημα του A-MTD ότι ο πολλαπλασιασμός και η ανίχνευση λαμβάνουν χώρα σε ένα σωληνάριου, μειώνοντας τις επιμολύνσεις. Από την άλλη πλευρά όμως, δεν μπορεί να διαχωρίσει τα *M. tuberculosis* complex ούτε να διαπιστώσει την ευαισθησία στα φάρμακα Έχει ικανοποιητικά αποτελέσματα για θετικά αλλά και αρνητικά δείγματα και η χρήση του έχει εγκριθεί από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration-FDA) για την απομόνωση του *M. tuberculosis*. Η ευαισθησία του για αναπνευστικά δείγματα είναι 90.9 –95.2 % ενώ η ειδικότητα φτάνει το 98.8–100 % (Soini και Musser 2001).

1. Απομόνωση DNA από ίζημα επεξεργασμένου κλινικού δείγματος

Ποσότητα 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος αραίωσης δείγματος μυκοβακτηρίου (Πίνακας 2.6) τοποθετήθηκε σε 450 μl δείγματος (το δείγμα είχε υποστεί την επεξεργασία με διάλυμα NALC-NaOH όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.6.2). Μετά από ανακίνηση σε Vortex τα σωληνάρια τοποθετήθηκαν μέσα στο ειδικό υποδοχέα του λουτρού υπερήχων (Εικόνα 2.6). Η διαδικασία διαρκεί 15 λεπτά και τα παράγωγα ονομάζονται «προϊόντα κυτταρόλυσης».

2. Ενίσχυση της 16S rRNA αλληλουχίας και υβριδοποίηση

Στο στάδιο αυτό, επιπλέον των αγνώστων δειγμάτων, έγινε παράλληλα χρήση αρνητικού και θετικού μάρτυρα. Συγκεκριμένα, προστέθηκαν 50 μl αντιδραστήριου πολλαπλασιασμού στον πυθμένα κάθε σωληναρίου και 200 μl έλαιο.



Εικόνα 2.6 Συσκευή υπερήχων για τη λύση του δείγματος στην εξέταση *Mycobacterium Tuberculosis* Direct (MTD) Test και λουμινόμετρο (GEN-PROBE LEADER) που χρησιμοποιήθηκε στην μέτρηση χημειοφωταύγειας

Προστέθηκαν 25 μl δείγματος στο κάτω μέρος του σωληναρίου χρησιμοποιώντας εκτεταμένου μήκους ρύγχος με υδρόφοβο φίλτρο. Τα σωληνάρια στη συνέχεια επώαστηκαν αρχικά στους 95 °C για 15 λεπτά και στη συνέχεια στους 42 °C για 5 λεπτά. Ακολούθησε προσθήκη 25 μl του μίγματος ενζύμων σε κάθε σωληνάριο, ανάδευση και επώαση στους 42 °C για 30 λεπτά. Για την υβριδοποίηση, σε κάθε σωληνάριο προστέθηκαν 100 μl αντιδραστηρίου υβριδισμού και τα σωληνάρια καλύφτηκαν με πώματα. Ανακινήθηκαν σε vortex μέχρι να αποκτήσει το μίγμα ομοιόμορφο κίτρινο χρώμα. Ακολούθησε επώαση στους 60 °C για 15 λεπτά. Στη συνέχεια απομακρύνθηκαν από τη θερμαινόμενη πλάκα και έγινε προσθήκη 300 μl αντιδραστηρίου επιλογής.

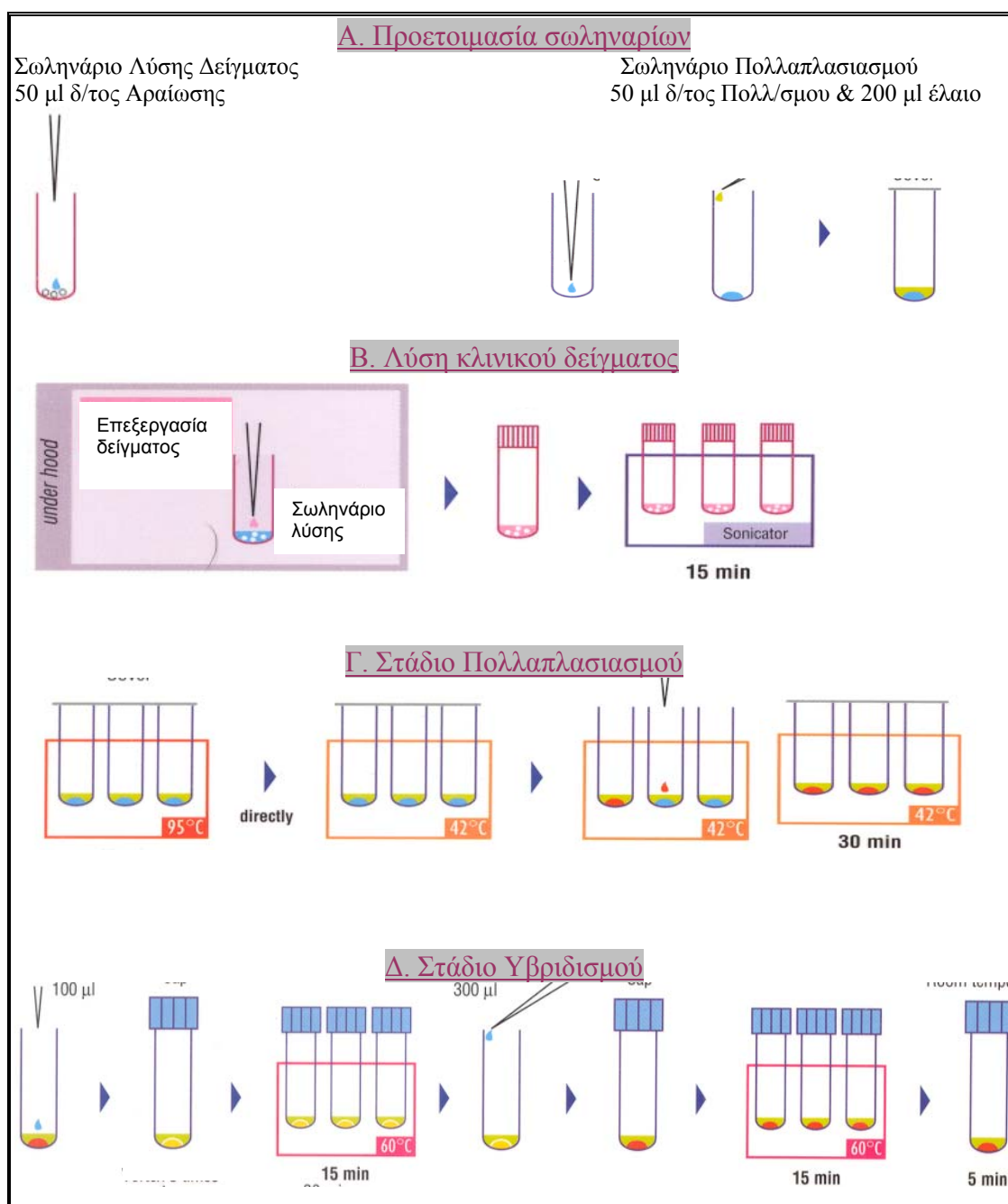
Ακολούθησε ανακίνηση με vortex μέχρι να αποκτήσει το μίγμα ομοιόμορφο ρόδινο χρώμα. Τέλος, επώαστηκαν στους 60 °C για 15 λεπτά και στη συνέχεια παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 5 λεπτά. Στην Εικόνα 2.7 φαίνεται σχηματικά όλη η διαδικασία που περιγράφηκε (Εικόνα 2.7). Η μέτρηση έγινε στο λουμινόμετρο GEN-PROBE LEADER (Εικόνα 2.6).

Τα αποτελέσματα ερμηνεύτηκαν ως εξής:

α) για τιμές μικρότερες των 30000 RLU (relative light units) είναι αρνητικά για *M. tuberculosis complex*

β) για τιμές από 30000 RLU έως 499999 RLU πρέπει να επαναληφθεί η εξέταση χρησιμοποιώντας το ίζημα που έχει απομένει. Εάν η νέα μέτρηση είναι μεγαλύτερη των 30000 RLU τότε το δείγμα είναι θετικό για rRNA *M. tuberculosis complex* ενώ αν είναι μικρότερη των 30000 RLU είναι αρνητικό.

γ) για τιμές μεγαλύτερες των 500000 RLU είναι θετικά για rRNA *M. tuberculosis complex*.



Εικόνα 2.7 Διαδικασία αμεσής εξέτασης πολλαπλασιασμού (ενίσχυσης 16S rRNA) *Mycobacterium* *Mycobacterium Tuberculosis Direct (MTD) Test* (bioMérieux ref.39006/Gen-Probe Cat.No.1001F)

Η ανασύσταση των αντιδραστηρίων έγινε ως εξής (Πίνακας 2.2):

Πίνακας 2.2 Αντιδραστήρια μεθόδου Mycobacterium Tuberculosis Direct (MTD) Test

Αντιδραστήριο	Σχόλια – Παρασκευή διαλύμενων αντιδραστηρίων
1. Πολλαπλασιασμού	
Ρυθμιστικό Διάλυμα Αραίωσης Δείγματος (Mycobacterium Specimen Dilution Buffer) (SDB)	Διάλυμα ενίσχυσης αλληλουχίας στόχου, περιέχει <3 % απορρυπαντικό
Αντιδραστήριο Πολλαπλασιασμού (Mycobacterium Tuberculosis Amplification Reagent) (A)	Νουκλεϊκά οξέα λυοφιλοποιημένα σε ρυθμιστικό διάλυμα, Για τη δημιουργία
Ρυθμιστικό διάλυμα ενίσχυσης του 16S rDNA (Mycobacterium Amplification Buffer) (AB)	Ρυθμιστικό διάλυμα
Αντιδραστήριο Ελαίου (Mycobacterium Oil Reagent) (O)	Έλαιο σιλικόνης που προσφέρει μόνωση
Μίγμα Ενζύμων (Mycobacterium Enzyme Reagent) (E)	Περιέχει αντίστροφη μεταγραφάση και πολυμεράση λυοφιλοποιημένα σε
Ρυθμιστικό Διάλυμα Αραίωσης Ενζύμων (Mycobacterium Enzyme Dilution Buffer) (EDB)	Ρυθμιστικό διάλυμα γλυκερόλης
2. Υβριδοποίηση	
Αντιδραστήριο Υβριδισμού (Mycobacterium Tuberculosis Hybridization)	<100ng/φιαλίδιο μη μολυσματικού ανιχνευτή DNA, λυοφιλοποιημένο σε
Ρυθμιστικό διάλυμα Υβριδισμού (Mycobacterium Hybridization Buffer) (HB)	Περιέχει απορρυπαντικό
Αντιδραστήριο Επιλογής (Mycobacterium Selection Reagent) (S)	Διάλυμα βορικού άλατος
Αρνητικός Ορός Ελέγχου Negative control (NC)	Αρνητικός μάρτυρας
Θετικός Ορός Ελέγχου Positive control (PC)	Θετικός μάρτυρας

Αντιδραστήριο πολλαπλασιασμού. Έγινε ανασύσταση του λυοφιλοποιημένου αντιδραστηρίου πολλαπλασιασμού (A) με 3,0 ml ρυθμιστικό διάλυμα πολλαπλασιασμού (AB). Ανακινήθηκε σε vortex και παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να γίνει διαυγές.

Αντιδραστήριο ενζύμων. Προστέθηκαν 1,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος ενζύμων μυκοβακτηρίου Mycobacterium Enzyme Dilution Buffer (EDB) στο λυοφιλοποιημένο αντιδραστήριο ενζύμων μυκοβακτηρίου (E) και στη συνέχεια αναδεύτηκε.

Αντιδραστήριο υβριδισμού. Η ανασύσταση του λυοφιλοποιημένου αντιδραστηρίου υβριδισμού (H) έγινε με προσθήκη 6 ml ρυθμιστικού διαλύματος υβριδισμού (HB). Ανακινήθηκε σε vortex μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές.

2.7.2 Τυποποιημένη μέθοδος ταυτοποίησης κλινικών στελεχών του γένους *Mycobacterium*- GenoType[®] *Mycobacterium* CM/AS της Hain Lifescience (GmbH ver 1.0)

Η τυποποιημένη μέθοδος έχει τη δυνατότητα ταυτοποίησης 16 στελεχών του γένους *Mycobacterium*: *M. avium*, *M. celatum*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. peregrinum*, *M. phlei*, *M. scrofulaceum*, *M. tuberculosis*, *M. xenopi*, *M. marinum*, *M. avium complex (MAC)*.

Η μέθοδος στηρίζεται στην αρχή του ανάστροφου υβριδισμού. Το DNA αρχικά απομονώνεται από τα κύτταρα με *in-house* τεχνικές και ακολουθεί πολλαπλασιασμός και αποδιάταξη. Στο στάδιο του υβριδισμού, το DNA υβριδοποιείται με ειδικούς DNA-ανιχνευτές για τα είδη των μυκοβακτηριδίων. Ακολουθεί έκπλυση με στόχο την απομάκρυνση κάθε μη ειδικής ένωσης. Στο τέλος γίνεται προσθήκη στρεπταβιδίνης συζευγμένης με αλκαλική φωσφατάση.

1. Απομόνωση DNA από καθαρή καλλιέργεια

Το DNA απομονώθηκε από κύτταρα που συλλέχθηκαν από στερεή καλλιέργεια 20-40 ημερών. Τα κύτταρα μεταφέρθηκαν με αποστειρωμένο κρίκο εμβολισμού σε erppendorf, χωρητικότητας 2 ml, που περιείχαν 300 μl απεσταγμένο νερό. Σε περίπτωση που η απομόνωση έπρεπε να γίνει από υγρό μέσο, λήφθηκε 1 ml καλλιέργειας και τοποθετήθηκε σε erppendorf. Στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 14000 rpm. Απορρίφθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρήθηκε με 100 μl απεσταγμένο νερό. Ακολούθησε επώαση στους 95 °C και μετά εμβάπτιση σε λουτρό υπερήχων για 15 λεπτά. Στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 14000 rpm και χρησιμοποιήθηκαν 5 μl υπερκειμένου για PCR.

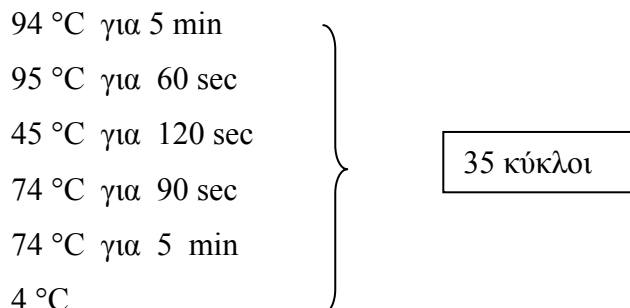
2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Το απομονωμένο DNA από τα επιλεγμένα στελέχη *Mycobacterium*, χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση τμήματος της 23S rRNA αλληλουχίας. Ως αρνητικός μάρτυρας της αντίδρασης PCR χρησιμοποιήθηκε απεσταγμένο νερό 5 μl. Η σύσταση του μείγματος της PCR αντίδρασης ήταν η εξής:

- 35 μl dNTP's
- 10 μl buffer (περιέχει MgCl₂ 1,5-2,5 mM ανάλογα με το buffer)

- 0,2 μl Taq πολυμεράση (1-2 U)
- 5 μl δείγματος

Οι συνθήκες της αντίδραση περιελάμβαναν τα παρακάτω στάδια:

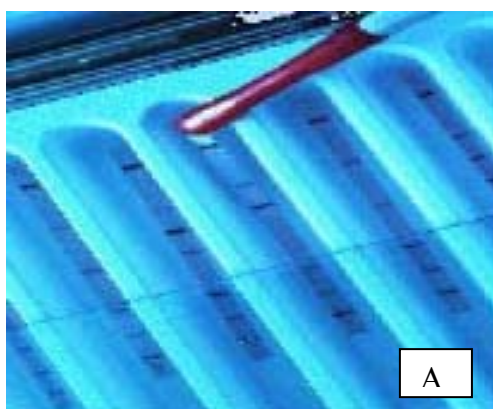


3. Υβριδοποίηση

Στο στάδιο της υβριδοποίησης τα δείγματα τοποθετήθηκαν στις ειδικές υποδοχές (Εικόνα 2.8) που περιέχονται στην τυποποιημένη δοκιμασία της GenoType[®] Mycobacterium CM/AS της Hain Lifescience GmbH. Τα στάδια της υβριδοποίησης περιγράφονται παρακάτω.

1. Τοποθετήθηκαν 20 μl διαλύματος αποδιάταξης (DEN) στη μια γωνία των υποδοχών και προστέθηκαν 20 μl απομονωμένου DNA
2. Ακολούθησε ομογενοποίηση με αυτόματη πιπέτα.
3. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά
4. Από την άλλη άκρη των υποδοχών, προστέθηκε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος (HYB).
5. Τοποθετήθηκε η ειδική ταινία πάνω από κάθε υποδοχή
6. Η πλατφόρμα με τις ταινίες επώαστηκε για 30 λεπτά στους 45 °C σε ανακινούμενο υδατόλουτρο.
7. Αφαιρέθηκε με αυτόματη πιπέτα το διάλυμα που βρισκόταν σε κάθε υποδοχή.
8. Προστέθηκε 1 ml διάλυμα πλύσης (STR) σε κάθε υποδοχή.
9. Ακολούθησε νέα επώαση για 15 λεπτά στους 45 °C σε ανακινούμενο υδατόλουτρο/TwinCubator
10. Αφαιρέθηκε με αυτόματη πιπέτα το διάλυμα που βρισκόταν σε κάθε υποδοχή.
11. Προστέθηκε 1 ml διάλυμα πλύσης (RIN) σε κάθε υποδοχή για 1 λεπτό σε κινούμενη πλατφόρμα και θερμοκρασία δωματίου
12. Προστέθηκε 1 ml αραιωμένου διαλύματος σύζευξης (CON-C).
13. Η πλατφόρμα με τις ταινίες επώαστηκε για 30 λεπτά κινούμενη πλατφόρμα

14. Αφαιρέθηκε με αυτόματη πιπέτα το διάλυμα που βρισκόταν σε κάθε υποδοχή.
15. Έγινε πλύση 2 φορές με 1 ml διάλυμα πλύσης (RIN) για 1 λεπτό σε κινούμενη πλατφόρμα, απόρριψη αντιδραστηρίου και νέα πλύση με 1 ml απεσταγμένο νερό για 1 λεπτό
16. Προστέθηκε 1 ml αραιωμένου υποστρώματος (SUB-C) και επώαστηκε στο σκοτάδι για 3-10 λεπτά, χωρίς ανακίνηση και ελέγχοντας την αντίδραση μέχρι να γίνουν ορατοί οι θετικοί μάρτυρες.
17. Τερματισμός της αντίδρασης με 1 ml απεσταγμένο νερό
18. Οι ταινίες αφαιρέθηκαν προσεκτικά με λαβίδα και τοποθετήθηκαν σε διηθητικό χαρτί για να στεγνώσουν.



A



B

Εικόνα 2.8 A: Ειδικές υποδοχές για το στάδιο του υβριδισμού. Διακρίνονται οι ταινίες νιτροκυτταρίνης B: Κυκλοποιητής

Σε κάθε ταινία νιτροκυτταρίνης διακρίνονται 17 διαφορετικά πρότυπα ζωνών που αντιστοιχούν σε διαφορετικά στελέχη του γένους *Mycobacterium*.

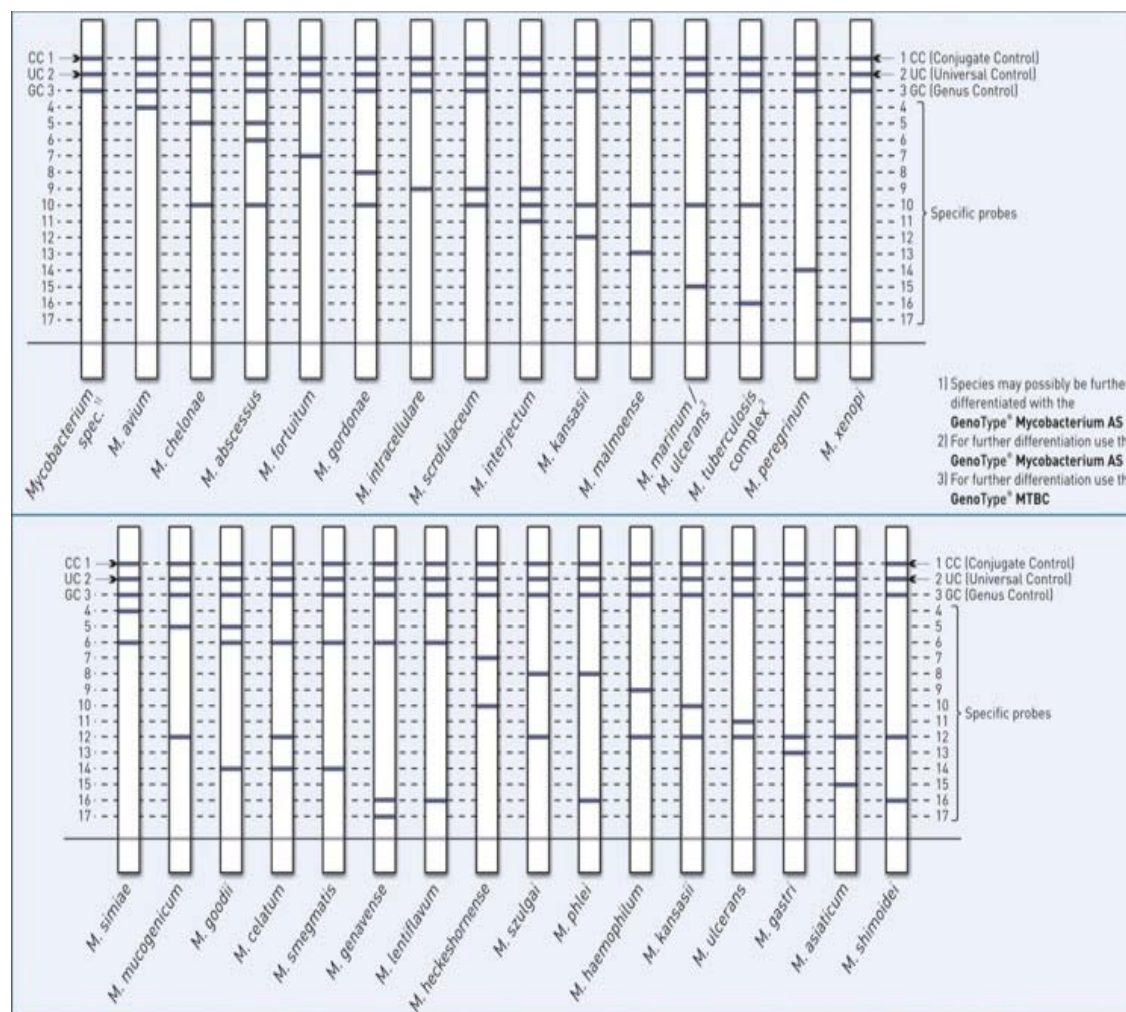
1: Ζώνη επιβεβαίωσης υβριδισμού (Conjugate Control-CC). Η ζώνη αυτή δείχνει ότι πραγματοποιήθηκε με επιτυχία ο υβριδισμός και η χρωματομετρική αντίδραση με την στρεπταβιδίνη

2: Ζώνη ένδειξης φύλου (Universal Control-UC). Δείχνει ότι ανιχνεύτηκε είδος ακτινοβακτηρίου

3: Ζώνη ένδειξης γένους (Genus Control-GC). Η ζώνη αυτή δείχνει ότι το απομονωμένο είδος ανήκει στο γένος *Mycobacterium*.

4-17: Ζώνες ταυτοποίησης απομονωθέντος στελέχους.

Στην Εικόνα 2.9 φαίνονται οι ζώνες πάνω στις ταινίες νιτροκυτταρίνης.



Εικόνα 2.9 Μορφή ταινιών νιτροκυτταρίνης μετά από την ολοκλήρωση της μεθόδου όπως δίνονται από τον εγχειρίδιο της μεθόδου.

2.8 Επιλογή μεθόδου ανίχνευσης βιοενεργων ουσιών – Μέθοδος Διάχυσης αντιβιοτικής ουσίας σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα

Οι μέθοδοι που δοκιμάστηκαν ήταν η Μέθοδος Διάχυσης αντιβιοτικής ουσίας από πηγαδάκια και η Μέθοδος Καθέτου Ενοφθαλμισμού στο θρεπτικό υπόστρωμα (παράγραφος 1.6). Και στις δυο μεθόδους θρεπτικό υπόστρωμα για τον έλεγχο βιοενεργότητας ήταν το Mueller Hinton Agar. Στη Μέθοδο διάχυσης αντιβιοτικής ουσίας από πηγαδάκια, ενοφθαλμίστηκε στο τρυβλίο κλινικό στέλεχος για έλεγχο δράσης βιοενεργών ουσιών υπό μορφή εναιωρήματος 0,5 κλίμακας MacFarland (αναλυτική περιγραφή στην επόμενη παράγραφο). Στη συνέχεια με σωληνοειδές εξάρτημα διαμέτρου 10 mm απομακρύνθηκαν τμήματα θρεπτικού υποστρώματος και στις οπές που σχηματίστηκαν τοποθετήθηκε υγρή καλλιέργεια του μικροοργανισμού

που εξετάστηκε για δράση βιοενεργών ουσιών. Ακολούθησε επώαση και έλεγχος για ζώνη αναστολής. Η μέθοδος δεν μπόρεσε να εφαρμοστεί σε όλες τις περιπτώσεις εξαιτίας των διαφορετικών χρόνων επώασεων των μικροοργανισμών και απορρίφθηκε. Στη Μέθοδο Καθέτου Ενοφθαλμισμού στο θρεπτικό υπόστρωμα ενοφθαλμίστηκε με κρίκο 10 μl αποικία βακτηριών γένους *Streptomyces* η οποία απλώθηκε όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.18 (σελ 38). Το τρυβλίο επωάστηκε και όταν παρατηρήθηκε σποριοση υποβλήθηκε για 10 λεπτά σε ακτινοβολία UV. Στη συνέχεια, κατά τον ίδιο τρόπο ενοφθαλμίστηκε εναιώρημα κλινικού στελέχους για έλεγχο δράση βιοενεργών ουσιών (0,5 κλίμακας MacFarland) και επωάστηκε σε κατάλληλες συνθήκες. Η μέθοδος απορρίφθηκε εξαιτίας των διαφορετικών διατροφικών απαιτήσεων των μικροοργανισμών και του ερπυσμού του στελέχους *Proteus sp.* Η μέθοδος που εφαρμόστηκε ήταν η Μέθοδος Διάχυσης Αντιβιοτικής ουσίας σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Έγιναν οι εξής χειρισμοί:

1. Ανακαλλιέργειες στελεχών των γενών *Streptomyces*, *Nocardia*, *Mycobacterium*

Από τα εναιωρήματα γλυκερόλης κάθε στελέχους έγινε εμβολιασμός σε τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα που ευνοεί την ανάπτυξη κάθε μικροοργανισμού (παράγραφος 2.4).



Εικόνα 2.10 Στο τρυβλίο διακρίνονται αποικίες στελεχών γένους *Streptomyces* οι οποίες έχουν καλυφθεί με θρεπτικό υπόστρωμα Mueller Hinton στο οποίο έχει εμβολιαστεί μικροοργανισμός δείκτης γένους *Nocardia*

Μεταφέρθηκε μικρή ποσότητα με τον κρίκο εμβολιασμού σε τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα Mueller Hinton ή Middlebrook 7H11. Τα υποστρώματα αυτά

επιλέχθηκαν επειδή είναι διαυγή και διευκολύνουν την ανάγνωση της ζώνης αναστολής. Σε κάθε τρυβλίο εμβολιάστηκαν έξι στελέχη (Εικόνα 2.10) Ακτινοβακτηρίων (*Streptomyces sp*, *Nocardia sp*, *Mycobacterium sp*) που εξετάστηκαν για παραγωγή βιοενεργών ουσιών. Μετά την επώαση ακολούθησε ακτινοβόληση των τρυβλίων με υπεριώδη ακτινοβολία για 10 λεπτά. Στη συνέχεια τα τρυβλία εμβολιάστηκαν με εναιώρημα κλινικού στελέχους για έλεγχο δράσης βιοενεργών ουσιών.

2. Παρασκευή εναιωρήματος μικροοργανισμού δείκτη 0,5 κλίμακας MacFarland

Το εναιώρημα με το μικροοργανισμό δείκτη ετοιμάστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες από τα Πρότυπα του Συμβουλίου Κλινικών Εργαστηρίων, Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) ως εξής:

Με ειδικό αποστειρωμένο κρίκο εμβολιασμού που μπορεί να συλλέξει συγκεκριμένη ποσότητα, επιλέχθηκαν 4-5 αποικίες από καθαρή καλλιέργεια και αραιώθηκαν σε 2 ml φυσιολογικό ορό μέσα σε γυάλινο αποστειρωμένο σωληνάριο. Το εναιώρημα (0,5 της κλίμακας MacFarland) χρησιμοποιείται στη συνέχεια της δοκιμασίας (Parungao και συνεργάτες 2007). Σημαντικό είναι να χρησιμοποιηθεί εντός 10 λεπτών από τη στιγμή που παρασκευάστηκε. Στην περίπτωση που μικροοργανισμός δείκτης ήταν κλινικό στέλεχος γένους *Nocardia* ή *Mycobacterium*, στο σωληνάριο προστέθηκαν γυάλινα σφαιρίδια για καλύτερη ανάδευση προκειμένου να διασπαστούν οι αποικίες των μικροβίων. Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου και ξανά ανάδευση. Το τελικό εναιώρημα ήταν 1 της κλίμακας MacFarland (Ambaye και συνεργάτες 1997).

Παράλληλα, παρασκευάστηκε θρεπτικό υπόστρωμα Mueller Hinton ή Middlebrook 7H11 με μικρότερη συγκέντρωση (18 g l^{-1}) για να διαχυθούν καλύτερα οι παραγόμενες βιοενεργές ουσίες. Μετά την αποστείρωση του υποστρώματος, τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο 50 °C και προστέθηκε ο μικροοργανισμός για τον έλεγχο δράσης βιοενεργών ουσιών. Το θρεπτικό αυτό υπόστρωμα επιστρώθηκε στα τρυβλία που είχαν ακτινοβοληθεί με υπεριώδη ακτινοβολία.

3. Επώαση τρυβλίων

Τα τρυβλία παρέμειναν για λίγα λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να πήξει το θρεπτικό υπόστρωμα με τους μικροοργανισμούς για έλεγχο δράσης βιοενεργών ουσιών και στη συνέχεια επωάστηκαν, ανάλογα με τον μικροοργανισμό, στις

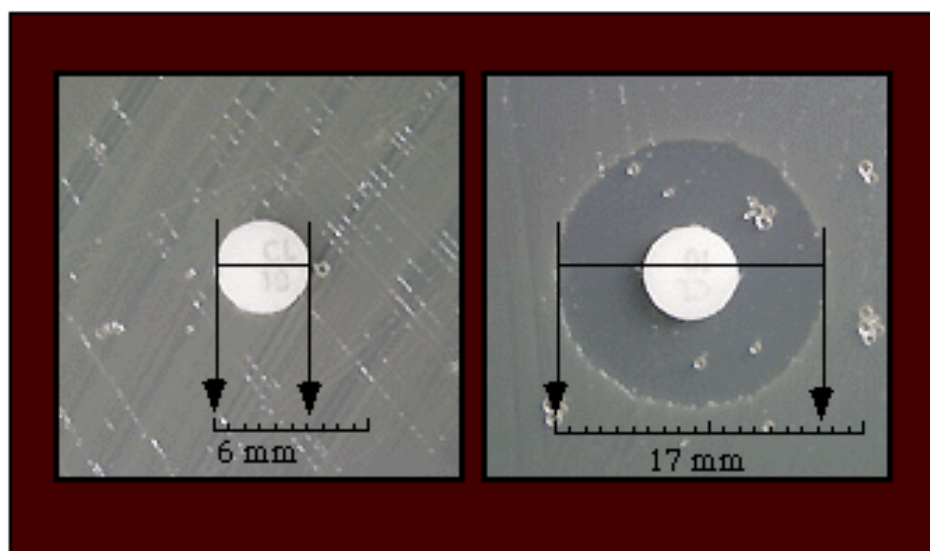
συνθήκες που αναφέρονται στον Πίνακα 2.3. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν δισκία αντιβιοτικών (μg δισκίο⁻¹): ampicillin, tetracycline, kanamycin, vancomycin, linezolid, rifambicine (Al-Bari και συνεργάτες 2006).

Πίνακας 2.3 Συνθήκες επώασης για μελέτη παραγωγής βιοενεργών ενώσεων

Γένος μικροοργανισμού δείκτη	Θερμοκρασία – χρόνος επώασης	Παρουσία – απουσία O ₂
Enterobacteriaceae	35-37°C - 18-20 h	Παρουσία
Staphylococci	35-37°C - 18-20 h	Παρουσία
Enterococci	35-37°C – 24 h	Παρουσία
Nocardiaceae	35-37°C – 72 h	Συνθήκες CO ₂ 5 %
Mycobacteriaceae	35-37°C - 40 ημέρες	Παρουσία

4. Ανάγνωση αποτελεσμάτων

Ως όριο ζώνης αναστολής ορίστηκε το σημείο όπου δεν παρατηρήθηκε μικροβιακή ανάπτυξη με γυμνό μάτι. Η μέτρηση των ζωνών αναστολής έγινε με γυμνό μάτι και με χάρακα κάτω από προσπίπτοντα φωτισμό (Εικόνα 2.11).



Εικόνα 2.11 Ανάγνωση ζώνης αναστολής

2.9 Εξέταση ευαισθησίας κλινικών στελεχών με τη μέθοδο Διάχυσης Αντιβιοτικού σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (Kirby-Bauer method)

Η ζώνη αναστολής που δημιουργήθηκε από τις παραγόμενες βιοενεργές ουσίες των στελεχών του γένους *Streptomyces*, συγκρίθηκε με την ζώνη αναστολής από τα ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά σε δισκία (Oishi και συνεργάτες 1982, Maeda και συνεργάτες 1992, Tanaka και συνεργάτες 1997, Zakia και συνεργάτες 2001, Pucci και συνεργάτες 2004). Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται αναλυτικά στον Πίνακα 2.4. Η εξέταση ευαισθησίας πραγματοποιήθηκε στα στελέχη των οποίων η ανάπτυξη ανεστάλη από τη δράση των βιοενεργών ουσιών (*St. aureus*, *St. epidermidis*, *Nocardia sp*, *Mycobacterium* – other than – *tuberculosis*).



Εικόνα 2.12 Αντιβιογράμμα με τη μέθοδο διάχυσης αντιβιοτικού σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (<http://www.interscience.fr/new/uk/software.php?banner=1200&actif=produits>)

Για τη σύγκριση δραστηριότητας των βιοενεργών ουσιών με τα αντιβιοτικά του εμπορίου, πραγματοποιήθηκε εξέταση ευαισθησίας όλων των κλινικών στελεχών που παρουσίασαν αναστολή ανάπτυξης από τη δράση των βιοενεργών ουσιών των ενδογενών εδαφικών στελεχών του γένους *Streptomyces*. Η εξέταση (Εικόνα 2.12) ευαισθησίας έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες από τα Πρότυπα του Συμβουλίου κλινικών εργαστηρίων, Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) ως εξής:

1. Παρασκευή εναιωρήματος μικροοργανισμού δείκτη 0,5 κλίμακας MacFarland

Ακολούθηθηκε η διαδικασία που περιγράφηκε στη παράγραφο 2.8.

2. Εμβολιασμός σε θρεπτικό υπόστρωμα Mueller Hinton Agar και τοποθέτηση δισκίων αντιβιοτικού

Με αποστειρωμένο βαμβακοφόρο στυλεό, εμποτισμένο στο εναιώρημα στελέχους, έγιναν τρεις επικαλύψεις (90° έκαστη) σε όλη την έκταση του τρυβλίου. Στη συνέχεια με αποστειρωμένη λαβίδα, τοποθετήθηκαν δισκία αντιβιοτικών σε επαρκή απόσταση μεταξύ τους.

3. Επιλογή δισκίων αντιβιοτικού

Σύμφωνα με τις οδηγίες από τα Πρότυπα του Συμβουλίου κλινικών εργαστηρίων, Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στην εξέταση ευαισθησίας των βακτηρίων των γενών *Nocardia* και *Mycobacterium* – other than – *tuberculosis* ήταν τα εξής: Ερυθρομικίνη, κεφτριαξονη, κεφεπίνη, κεφοταξίνη, αμοξυκλίνη-κλαβουλανικό, μινοκυκλίνη, σουλφομεθοξαζολη-τριμεθοπρίνη, γενταμυκίνη, αμικασίνη, τομπραμυκίνη, ριφαμικίνη, ιμιπενέμη, λινεζολίδη, σιπροφλοξασίνη και βανκομυκίνη.

Για τα βακτήρια του γένους *Staphylococcus* χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιβιοτικά: λινεζολίδη, πενικιλίνη, τετρακυκλίνη, οφλοξασίνη, αμικασίνη, σουλφομεθοξαζολη-τριμεθοπρίνη, τομπραμυκίνη, φουσιδικό οξύ, βανκομυκίνη, χλωραμφαινικόλη και γενταμυκίνη.

Για το βακτήριο *Escherichia coli* χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιβιοτικά: λεβοφλοξασίνη, κεφαζιδίνη, τομπραμυκίνη, αμικασίνη, τεϊκοπλανίνη, ιμιπενέμη, σιπροφλοξασίνη, χλωραμφαινικόλη, κολλιστίνη, κεφοξιτίνη, κεφουροξίμη, σουλφομεθοξαζολη-τριμεθοπρίνη, γενταμυκίνη και κεφοταξίμη.

4. Ανάγνωση αποτελεσμάτων

Η ανάγνωση αποτελεσμάτων έγινε όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο.

Πίνακας 2.4 Αντιμικροβιακοί παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν για την εξέταση ευαισθησίας των κλινικών στελεχών (Εθνικό Συνταγολόγιο 2007, Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων-ΕΟΦ)

Αντιμικροβιακός παράγοντας		Συγκέντρωση μg δισκίο ⁻¹	Κατηγορία	Θέση Δράσης
NN	Τομπραμυκίνη	10	Αμινογλυκοσίδες	Αναστολή πρωτεϊνσύνθεσης (δέσμευση στην 30S υπομονάδα)
GM	Γενταμυκίνη	10		
AN30	Αμικασίνη	30		
NEO	Νεομυκίνη	10		
CC	κλινδαμυκίνη	2		
VA	Βανκομυκίνη	30	Γλυκοπεπτίδια	Αναστολή σύνθεσης κυτταρικού τοιχώματος
E	Ερυθρομυκίνη	15	Μακρολίδες	Αναστολή πρωτεϊνσύνθεσης (δέσμευση στην 50S υπομονάδα)
LZD	Λινεζολίδη	30	Οξαζολιδόνες	Αναστολή πρωτεϊνσύνθεσης (δέσμευση στην 50S υπομονάδα)
AM	Αμπικιλίνη	10	β-λακταμικό	Αναστολή σύνθεσης πεπτιδογλυκάνης
P	Πενικιλίνη	10	Πενικιλίνη	
AMC	Αμοξυκιλίνη-κλαβουλανικό	30	β-λακταμικό με αναστολέα	
CIP	Σιπροφλοξασίνη	5	Κινολόνες	Αναστολή DNA γυράσης
LEV	Λεβοφλοξασίνη	5		
TE	Τετρακυκλίνη	30	Τετρακυκλίνες	Αναστολή πρωτεϊνσύνθεσης (δέσμευση στην 30S υπομονάδα)
MI	Μινοκυκλίνη	30		
STX	Σουλφομεθοξαζολη-τριμεθοπρίνη	23.75/1.25	Σουλφοναμίδες	Αναστολή σύνθεσης φυλλικού οξέος
RA	ΡΙφαμπικίνη	5	ΡΙφαμπίνες	Αναστολή σύνθεσης RNA
FA	Φουσιδικό οξύ	10		Αναστολή πρωτεϊνσύνθεσης
C	Χλωραμφαινικόλη	30	Αμφενικόλη	Αναστολή πρωτεϊνσύνθεσης
IPM	Ιμιπενέμη	10	Καρβαπενέμη	Αναστολή σύνθεσης κυτταρικού τοιχώματος
FEP	Κεφεπίνη	30	Κεφαλοσπορίνη	Αναστολή πρωτεϊνσύνθεσης (δέσμευση στην 50S υπομονάδα)
CTX	Κεφοταξίνη	30		
CRO	Κεφτριαξόνη	30		
CF	Κεφουροξίνη	30		
CAZ	Κεφταζιδίμη	30		
FOX	Κεφοξιτίνη	30		
CL	Κολλίστινη	10	Πολυμυξίνες	Αναστολή σύνθεσης κυτταρικού τοιχώματος
CC	Κλινταμυκίνη	2	Λινκοσαμίδες	Αναστολή πρωτεϊνσύνθεσης δέσμευση στην 50S

Κεφάλαιο 3 – Αποτελέσματα

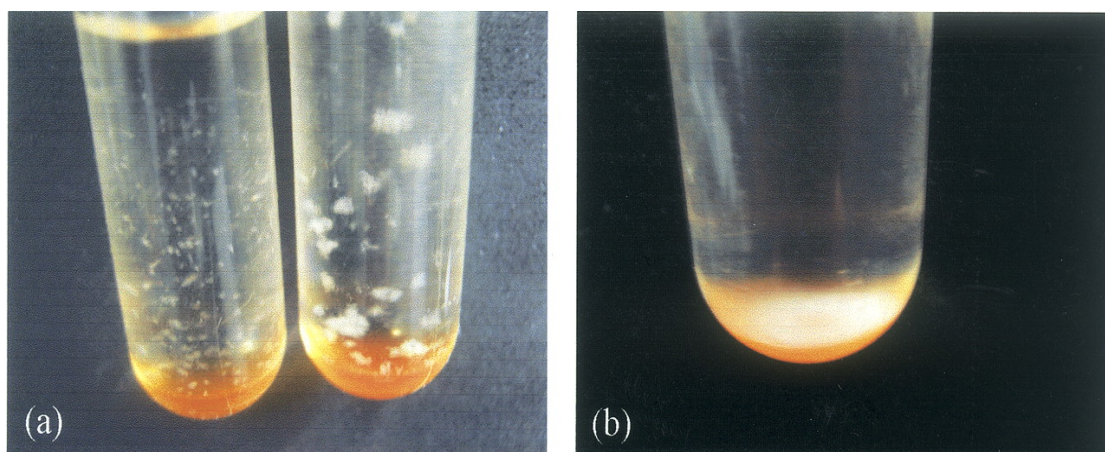
3.1 Απομόνωση κλινικών στελεχών του γένους *Mycobacterium*

Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 2.2, οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών (γένους *Streptomyces*) και κλινικών στελεχών (γενών *Mycobacterium*, *Nocardia*) ήταν κλινικά, παθογόνα στελέχη.

Στα πλαίσια της καθημερινής εξέτασης των ασθενών που προσκομίζονται στο Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας του Γ.Ν.Α. Σισμανογλείου, Τμήμα Φυματίωσης εξετάζονται αναπνευστικά και μη αναπνευστικά δείγματα με σκοπό την απομόνωση και ταυτοποίηση των βακτηρίων του γένους *Mycobacterium*.

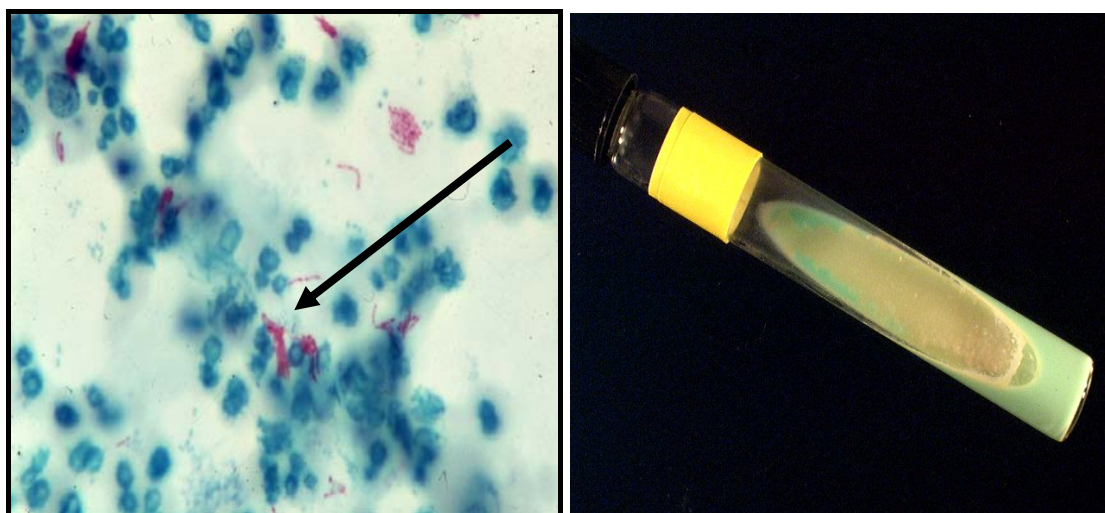
Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 1.4, τα βακτήρια του γένους *Mycobacterium* κατατάσσονται σε δυο ομάδες: η μια περιλαμβάνει τα είδη του *M. tuberculosis complex*, ενώ η άλλη τα άτυπα ή περιβαλλοντικά μυκοβακτηρια (*Mycobacterium - other than - tuberculosis*). Για την απομόνωση του *Mycobacterium* τα κλινικά δείγματα επεξεργάστηκαν με την προτυποποιημένη μέθοδο N-ακετυλοκυστεΐνη (παράγραφος 2.5.3), αναπτύχθηκαν σε υγρά (Middlebrook 7H9) και στερεά (Lowenstein Jensen) θρεπτικά υποστρώματα και 10 µl από αυτά μικροσκοπήθηκαν ύστερα από χρώση κατά Zeihl Neelsen. Οι υγρές καλλιέργειες επώαστηκαν στον αυτοματοποιημένο αναλυτή Bactec MGIT 960 ενώ τα στερεά θρεπτικά υποστρώματα τοποθετήθηκαν σε κεκλιμένο επίπεδο και επώαστηκαν σε αερόβιες συνθήκες για πενήντα ημέρες (παράγραφος 2.5.3). Δυο φορές την εβδομάδα γινόταν σχολαστικός μακροσκοπικός έλεγχος των στερεών υποστρωμάτων. Σε περίπτωση ανάπτυξης, απομονώθηκαν με αποστειρωμένο κρίκο αποικίες και το παρασκεύασμα μικροσκοπήθηκε ύστερα από χρώση κατά Zeihl Neelsen.

Οι αποικίες του *M. tuberculosis* στο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα ήταν λευκές, εύθρυπτες και αποκολλόνταν δύσκολα. Στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα παρατηρήθηκε κροκκίδωση χωρίς όμως θόλωση του ζωμού (Εικόνα 3.1). Κατά τη μικροσκόπηση εξετάστηκε η μορφολογία, η χαρακτηριστική διάταξη και ο κόκκινος χρωματισμός του βακτηρίου (Εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.1 Ανάπτυξη βακτηρίων γένους *Mycobacterium* σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα Middlebrook 7H9 (a) μετά από ανάδευση (b) κατά την επώαση

Απομονώθηκαν δεκα πέντε βακτήρια του γένους *M. tuberculosis* και τριάντα επτά *Mycobacterium* - other than - *tuberculosis*. Τα πρώτα χρησιμοποιήθηκαν μόνο ως στελέχη για τον έλεγχο δράσης βιοενεργών ουσιών από τα γένη *Streptomyces*, *Nocardia*, *Mycobacterium* ενώ τα δεύτερα ελέγχθηκαν και για τη βιοενεργότητά τους έναντι κλινικών παθογόνων μικροοργανισμών.



Εικόνα 3.2 Βακτήρια του γένους *M. tuberculosis* σε παρασκεύασμα μετά από χρώση Zeihl Neelsen και ανάπτυξη του βακτηρίου στο θρεπτικό υπόστρωμα Lowenstein Jensen

Η ευαισθησία και ειδικότητα των τεχνικών απομόνωσης μικροοργανισμών από κλινικά δείγματα που εφαρμόζονται στο Εργαστήριο Φυματίωσης του Νοσοκομείου Γ.Ν.Α. Σισμανόγλειο έχουν μελετηθεί και σύμφωνα με τα αποτελέσματα η καλλιέργεια σε ζωμούς είχε μεγαλύτερη ευαισθησία (Μαμούχα και συνεργάτες 2010α). Αναλυτικότερα, σε μια πενταετή έρευνα βρέθηκε ότι το 93,6% των *Mycobacterium* απομονώθηκε από καλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα

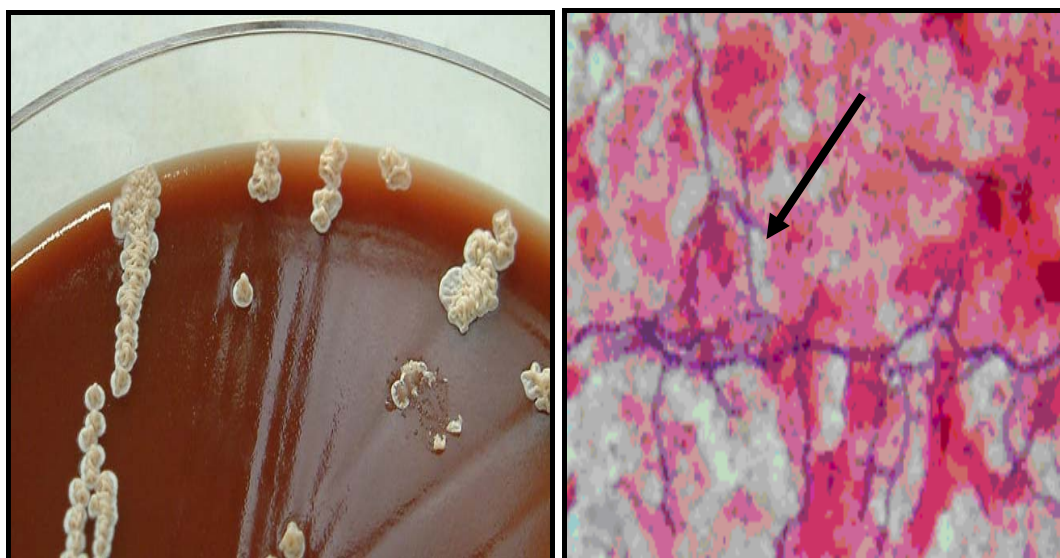
Middlebrook 7H9, ενώ το 78,7% στο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Lowenstein Jensen (Μαμούχα και συνεργάτες 2010β). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με εκείνα αντίστοιχων ερευνών (Liu και συνεργάτες 1983, Chien και συνεργάτες 2000). Η ανάπτυξη στελεχών στο Lowenstein Jensen παρατηρήθηκε κατά μέσο όρο την 3^η-5^η εβδομάδα, ενώ στο Middlebrook 7H9 θετικό αποτέλεσμα υπήρχε συνήθως σε 9-12 μέρες. Η πρόωμη αυτή ανάπτυξη των *Mycobacterium* στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα πιθανόν να οφείλεται στον ενισχυτικό παράγοντα που χρησιμοποιήθηκε, το Growth Supplement (OADC) που αναφέρεται στην παράγραφο 2.3. Οι λιγότερες επιμολύνσεις στο Middlebrook 7H9 αποδίδονται κυρίως στα λυοφιλοποιημένα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό την καταστολή των μικροβίων που επέζησαν μετά την επεξεργασία με τη NALC-NaOH.

Παρατηρήθηκε επίσης, ότι με τη χρώση Zeihl Neelsen ανιχνεύτηκε το 47,9% των *Mycobacterium* (παράγραφος 2.6). Αναλυτικότερα, από τις θετικές καλλιέργειες για *M. tuberculosis* complex, το 62,7% ήταν θετικές για οξεάντοχα στο άμεσο παρασκεύασμα, ενώ από τα *Mycobacterium* - other than - *tuberculosis* μόλις το 20,7% (Μαμούχα και συνεργάτες 2010α). Το μικρό αυτό ποσοστό οφείλεται στη δομή του κυτταρικού τοιχώματος ορισμένων *Mycobacterium* - other than - *tuberculosis*, η οποία δεν επιτρέπει να έχουν την αναμενόμενη εικόνα κατά τη μικροσκοπηση (Lipsky και συνεργάτες 1984). Επιπλέον, το θετικό αποτέλεσμα χρώσης εξαρτάται και από το μικροβιακό φορτίο του δείγματος που εξετάζεται πχ σε μικρό μικροβιακό φορτίο έχουμε αρνητικό αποτέλεσμα χρώσης ενώ σε μεγάλο θετικό.

3.2 Απομόνωση κλινικών στελεχών του γένους *Nocardia*

Στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας Γ.Ν.Α. Σισμανογλείου απομονώθηκαν από αναπνευστικά κλινικά δείγματα (πτύελα, βρογχικές εκκρίσεις, βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα) επτά βακτήρια του γένους *Nocardia*. Οι χαρακτηριστικές αποικίες στο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα (σοκολατόχρωμο άγαρ), η ανάπτυξη σε συνθήκες CO₂ 5 %, η μορφή ψευδομυκηλίου κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση, η εκκλιση χαρακτηριστικών αρωματικών ενωσεων κατά την ανάπτυξη σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (οσμή «χώματος»), τα κλινικά συμπτώματα της λοίμωξης και η εμπειρία του ιατρικού προσωπικού του Εργαστηρίου Κλινικής Μικροβιολογίας μας οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί ανήκουν στο γένος *Nocardia*. Στη Εικόνα 3.3 φαίνεται η χαρακτηριστική ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε

σοκολατόχρωμο θρεπτικό υπόστρωμα και μικροσκοπικό παρασκεύασμα μετά από χρώση κατά Gram.



Εικόνα 3.3 Στην εικόνα (Α) διακρίνεται τμήμα τρυβλίου σοκολατόχρωμου άγαρ με τη χαρακτηριστική ανάπτυξη του βακτηρίου γένους *Nocardia* και στην (Β) παρασκεύασμα χρωματισμένο κατά Gram

Συμφωνα με τα παραπάνω τα στελέχη ομαδοποιήθηκαν στο γένος *Nocardia* και χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο δράσης βιοενεργών ουσιών από τα ενδογενή εδαφικά στελέχη γένους *Streptomyces*. Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψη τα βιβλιογραφικά δεδομένα για την παραγωγή βιοενεργών ενώσεων από κλινικά στελέχη γένους *Nocardia* (παράγραφος 1.5) τα συγκεκριμένα στελέχη εξετάστηκαν για τη δράση βιοενεργών ουσιών. Έξι από τα δώδεκα στελέχη που μελετήθηκαν παραχωρήθηκαν από το Εργαστήριο Αναφοράς της Φυματίωσης, Γ.Ν.Α. Σωτηρία.

3.3 Απομόνωση κλινικών στελεχών του γένους *Streptomyces*

Εκτός από τα ενδογενή, εδαφικά στελέχη του γένους *Streptomyces* εξετάστηκαν και κλινικά στελέχη του γένους *Streptomyces* για δράση βιοενεργών ουσιών έναντι κλινικών παθογόνων. Τα τέσσερα στελέχη του γένους *Streptomyces* απομονώθηκαν από κλινικά, αναπνευστικά δείγματα που προσκομίστηκαν στο Εργαστήριο. Τα βακτήρια ομαδοποιήθηκαν στο γένος *Streptomyces* λαμβάνοντας υπόψη τη φαινοτυπική ανάπτυξη, τη μικροσκοπική παρατήρηση και την εμπειρία του ιατρικού προσωπικού του Εργαστηρίου.

3.4 Απομόνωση κλινικών στελεχών των γενών *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Proteus* και *Escherichia*

Κλινικά βακτηριακά στελέχη των γενών *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Proteus* και *Escherichia* χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών, εδαφικών (γένους *Streptomyces*) και κλινικών στελεχών (γενών *Nocardia*, *Mycobacterium* και *Streptomyces*). Η επεξεργασία των κλινικών δειγμάτων περιγράφηκε στην παράγραφο 2.5.1. Η απομόνωση έγινε ύστερα από ενοφθαλμισμό σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα και μικροσκοπική παρατήρηση παρασκευάσματος κατόπιν χρώσης κατά Gram (Εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.4 Κλινικό δείγμα ούρων ενοφθαλμισμένο σε θρεπτικό υπόστρωμα Mac Conkey αγαρ ύστερα από επώαση 24 ωρών

Κατά αυτό τον τρόπο απομονώθηκαν ένα στέλεχος γένους *Staphylococcus*, ένα στέλεχος γένους *Klebsiella*, ένα στέλεχος γένους *Pseudomonas*, ένα στέλεχος γένους *Proteus* και ένα στέλεχος γένους *Escherichia*. Ακολούθησε η ταυτοποίηση των συγκεκριμένων στελεχών στηριζόμενη στις βιοχημικές ιδιότητες του κάθε μικροοργανισμού.

3.5 Ταυτοποίηση βακτηρίων του γένους *Mycobacterium*

Μετά την απομόνωση των βακτηρίων του γένους *Mycobacterium* ακολούθησε η ταυτοποίηση με τις τυποποιημένες μεθόδους Amplified Mycobacterium Tuberculosis

Direct Test (A-MTD) και *Mycobacterium*-GenoType[®] *Mycobacterium* CM/AS (παράγραφος 2.7).

Πίνακας 3.1 Βακτηρια γένους *M. tuberculosis* που ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση της τυποποιημένης μεθόδου Amplified *Mycobacterium* Tuberculosis Direct Test (A-MTD). Οι εξαψήφιοι κωδικοί αφορούν την αρίθμηση των δειγμάτων στο Εργαστήριο Φυματίωσης

α/α	Στέλεχος	Κλινικό δείγμα
1	<i>M. tuberculosis</i> complex 504563	Υγρό παροχέτευσης
2	<i>M. tuberculosis</i> complex 5753191	Πτύελα
3	<i>M. tuberculosis</i> complex 626048	Πτύελα
4	<i>M. tuberculosis</i> complex 555511	Βρογχικές εκκρίσεις
5	<i>M. tuberculosis</i> complex 5753192	Πλευριτικό υγρό
6	<i>M. tuberculosis</i> complex 625992	Πτύελα
7	<i>M. tuberculosis</i> complex 566758	Υλικό βιοψίας
8	<i>M. tuberculosis</i> complex 504563	Πτύελα
9	<i>M. tuberculosis</i> complex 558809	Ούρα
10	<i>M. tuberculosis</i> complex 629394	Πτύελα
11	<i>M. tuberculosis</i> complex 558820	Πτύελα
12	<i>M. tuberculosis</i> complex 558826	Βρογχικές εκκρίσεις
13	<i>M. tuberculosis</i> complex 605736	Κλινικό δείγμα πτυέλων
14	<i>M. tuberculosis</i> complex 619976	Βρογχοκυψελιδικό εκπλυμα
15	<i>M. tuberculosis</i> complex 593712	Πτύελα

Με την πρώτη μέθοδο μοριακής ανίχνευσης ταυτοποιήθηκαν δέκα πέντε κλινικά στελέχη *M. tuberculosis* complex τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως μικροοργανισμοί για τον έλεγχο δράσης βιοενεργών ουσιών από τα περιβαλλοντικά στελέχη γένους *Streptomyces*. Το είδος το κλινικού δείγματος από το οποίο απομονώθηκε βακτήριο γένους *Mycobacterium* δίνεται στον Πίνακας 3.1. Με τη δεύτερη μέθοδο μοριακής ανίχνευσης ταυτοποιήθηκαν τριάντα επτά *Mycobacterium*- other than- *tuberculosis* τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο δράσης βιοενεργών ουσιών από τα περιβαλλοντικά στελέχη γένους *Streptomyces* και επιπλέον εξετάστηκαν για τυχόν

δράση βιοενεργών ουσιών. Το είδος το κλινικού δείγματος από το οποίο απομονώθηκε βακτήριο γένους *Mycobacterium* δίνεται στον Πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2 Βακτήρια *Mycobacterium* - other than - tuberculosis που ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο GenoType[®] *Mycobacterium* CM/AS της Hain Lifescience

α/α	Στέλεχος	Κλινικό δείγμα
1	<i>Mycobacterium fortuitum</i> 121459	Ούρα
2	MOTT 929190	Πτύελα
3	<i>Mycobacterium gordonae</i> 71410/07	Πτύελα
4	<i>Mycobacterium chelonae</i> 1227/07	Πτύελα
5	<i>M. fortuitum</i> 848/07	Πτύελα
6	<i>M. fortuitum</i> 3765/06	Πτύελα
7	<i>M. fortuitum</i> 3451/06	Πτύελα
8	<i>M. fortuitum</i> 3224/06	Πτύελα
9	<i>Mycobacterium intracellulare</i> 4104/06	Πτύελα
10	<i>M. intracellulare</i> 2832/06	Πτύελα
11	<i>M. intracellulare</i> 2858/06	Βρογχικές εκκρίσεις
12	<i>M. intracellulare</i> 3596/06	Πτύελα
13	MOTT 70937/07	Πτύελα
14	<i>Mycobacterium avium</i> 1037/07	Βρογχικές εκκρίσεις
15	<i>Mycobacterium peregrinum</i> 145557/07	Πτύελα
16	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i> 192536/07	Πτύελα
17	<i>M. intracellulare</i> 144239/07	Πτύελα
18	MOTT 3101/06	Πτύελα
19	<i>Mycobacterium smegmatis</i> 330960/07	Πτύελα
20	MOTT 1777/07	Πτύελα
21	<i>M. fortuitum</i> 69291/07	Βρογχικές εκκρίσεις
22	<i>M. fortuitum</i> 3452/06	Πτύελα
23	<i>M. fortuitum</i> 3224/06	Πτύελα
24	<i>M. fortuitum</i> 69290/07	Πτύελα

25	<i>M. fortuitum</i> 5320881	Πτύελα
26	<i>M. fortuitum</i> 624180	Πτύελα
27	<i>M. intracellulare</i> 526237	Πτύελα
28	<i>M. fortuitum</i> 614751	Πτύελα
29	<i>M. fortuitum</i> 638504	Πτύελα
30	<i>M. fortuitum</i> 5320882	Πτύελα
31	MOTT 229855/07	Βρογχικές εκκρίσεις
32	<i>M. lentiflavum</i> 628588	Πτύελα
33	MOTT 553490	Πτύελα
34	MOTT 538928	Βρογχοκυψελιδικό εκπλυμα
35	MOTT 523630	Πτύελα
36	MOTT 584544	Βρογχοκυψελιδικό εκπλυμα
37	<i>M. intracellulare</i> 2775/07	Πτύελα

Η ταχύτερη διάγνωση μέσω των μοριακών τεχνικών επιτρέπει την έγκαιρη χορήγηση θεραπευτικής αγωγής προς όφελος του ασθενούς, αλλά και της προστασίας της Δημόσιας Υγείας. Παρόλο που η άμεση ενίσχυση 16S rRNA αλληλουχιών του *Mycobacterium* με τη χρήση της τυποποιημένης μεθόδου Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test (παράγραφος 2.7) έχει έγκριση από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration-FDA) για αναπνευστικά δείγματα, μετά από μελέτες (Neonakis και συνεργάτες 2009, Baharoom 2008, Soini 2001) βρέθηκε ότι η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τα εξωαναπνευστικά κλινικά δείγματα.

3.6 Ταυτοποίηση βακτηρίων των γενών *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Proteus* και *Escherichia*

Η ταυτοποίηση έγινε με το τυποποιημένο σύστημα Wider του Οίκου Francisco Soria Melguizo. Πρόκειται για ένα αυτοματοποιημένο σύστημα το οποίο στηρίζεται στις βιοχημικές ιδιότητες του κλινικού στελέχους. Χρησιμοποιήθηκαν ειδικά πανελ που έφεραν μικροποσότητες χημικών ενώσεων για θετικά ή αρνητικά κατά Gram

βακτήρια. Η ταυτοποίηση έδωσε τα παρακάτω αποτελέσματα: *Staphylococcus aureus*, ένα στέλεχος *Proteus mirabilis*, ένα στέλεχος *Klebsiella pneumoniae*, ένα στέλεχος *Pseudomonas aeruginosa* και ένα στέλεχος *Escherichia coli*.

3.7 Γένη του φύλου των Ακτινοβακτηρίων που εξετάστηκαν για τη δράση βιοενεργών ουσιών

3.7.1 Ενδογενή, εδαφικά στελέχη του γένους *Streptomyces*

Μελέτες που έγιναν στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας, του Τομέα Βοτανικής, οδήγησαν στη συγκρότηση Τράπεζας Βιοενεργών Στελεχών. Από την Τράπεζα αυτή, επιλέχθηκαν δέκα έξι στελέχη τα οποία παρήγαγαν βιοενεργές ενώσεις έναντι θετικών και αρνητικών κατά Gram μικροβίων (Δέλλιου 2008, Διπλωματική Εργασία).

Πίνακας 3.3 Ενδιαστήματα ενδογενών, εδαφικών στελεχών που εξετάστηκαν για τη δράση βιοενεργών ουσιών (συνεχίζεται στη σελίδα 78)

Ενδογενή, εδαφικά στελέχη <i>Streptomyces</i>		
α/α	Στέλεχος	Προέλευση
1	<i>Streptomyces</i> CAG 4/1	Επιβαρυμένο γεωργικό χώμα Μαραθώνα
2	<i>Streptomyces</i> CAG 13/3	Επιβαρυμένο γεωργικό χώμα Μαραθώνα
3	<i>Streptomyces</i> M 53	Περιοχή Μαραθώνα
4	<i>Streptomyces</i> M 33	Περιοχή Μαραθώνα
5	<i>Streptomyces</i> M 24	Περιοχή Μαραθώνα
6	<i>Streptomyces</i> M 17	Περιοχή Μαραθώνα
7	<i>Streptomyces</i> M 16	Περιοχή Μαραθώνα
8	<i>Streptomyces</i> M 5	Περιοχή Μαραθώνα
9	<i>S. cyaneus</i> ASE 19	Ριζόσφαιρα ξυλώδους θάμνου, περιοχή Καισαριανής
10	<i>S. collinus</i> CAG 9	Επιβαρυμένο γεωργικό χώμα Μαραθώνα
11	<i>Streptomyces</i> CAG 9/2	Επιβαρυμένο γεωργικό χώμα Μαραθώνα
12	<i>Streptomyces</i> CAG 13/2	Επιβαρυμένο γεωργικό χώμα Μαραθώνα
13	<i>S. albidoflavus</i> K 3	Ριζόσφαιρα ξυλώδους θάμνου, στην περιοχή της Καισαριανής
14	<i>Streptomyces</i> M 63	Επιβαρυμένο γεωργικό χώμα Μαραθώνα

15	<i>Streptomyces</i> Vol 3	Τζημα από ηφαίστειο Σαντορίνης
16	<i>Streptomyces</i> M56	Επιβαρυμένο γεωργικό χώμα Μαραθώνα
17	<i>S. chrestomyceticus</i> DSM 40545	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

Επιπλέον, εξετάστηκε και η δράση βιοενεργών ουσιών του στελέχους *Streptomyces chrestomyceticus* DSM 40545 της Γερμανικής Τράπεζας Στελεχών Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. Τα στελέχη αυτά εξετάστηκαν για τη δράση βιοενεργών ουσιών και έναντι κλινικών, παθογόνων, στελεχών. Τα ενδιαυτήματα από τα οποία είχε γίνει η δειγματοληψία δίνονται στον Πίνακα 3.3.

3.7.2 Κλινικά, παθογόνα στελέχη των γενών *Nocardia*, *Streptomyces* και *Mycobacterium*

Λαμβάνοντας υπόψη τα βιβλιογραφικά δεδομένα για τη δράση βιοενεργών ουσιών από κλινικά στελέχη του φύλου Ακτινοβακτηρίων, εξετάστηκε η βιοενεργότητα δέκα τριών στελεχών του γένους *Nocardia*, τεσσάρων στελεχών του γένους *Streptomyces* και είκοσι επτά στελεχών του γένους *Mycobacterium*. Τα στελέχη αυτά απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα που προσκομίστηκαν στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας Γ.Ν.Α. Σισμανογλείου. Εξαίρεση αποτελούν έξι κλινικά στελέχη του γένους *Nocardia* που παραχωρήθηκαν από το Εργαστήριο Αναφοράς της Φυματίωσης, Γ.Ν.Α. Σωτηρία.

3.8 Επιλογή μεθόδου για τον έλεγχο δράσης βιοενεργών ουσιών από ενδογενή, εδαφικά στελέχη του γένους *Streptomyces* και κλινικά στελέχη των γενών *Nocardia*, *Streptomyces* και *Mycobacterium*

Οι μέθοδοι που δοκιμάστηκαν για τον έλεγχο δράσης βιοενεργών ουσιών ήταν η Μέθοδος διάχυσης αντιβιοτικής ουσίας από πηγαδάκια και η Μέθοδος Καθέτου Ενοφθαλμισμού στο θρεπτικό υπόστρωμα (παράγραφος 1.6). Η Μέθοδος διάχυσης αντιβιοτικής ουσίας από πηγαδάκια αν και επιτρέπει τον συνδυασμό διαφορετικών θρεπτικών υλικών, περιόριζε την επιλογή του μικροοργανισμού δείκτη. Θρεπτικό υπόστρωμα για τον έλεγχο βιοενεργότητας των βακτηριών ήταν το Mueller Hinton

Agar και στα πηγαδάκια να τοποθετήθηκε υγρή καλλιέργεια με θρεπτικό ζωμό που φέρει το μικροοργανισμό το οποίου ελέγχεται η βιοενεργότητα. Η απορριψη της μεθοδου οφειλεται στους διαφορετικους χρονους επωασης των μικροοργανισμων. Τα βακτηρια γενους *Streptomyces* χρειαζονται 72 ώρες επωασης ενώ τα κλινικά στελέχη των γενών *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas* 28-24 ωρες. Επιπλεον, στην περιπτωση του *M. tuberculosis* complex, η μέθοδος δεν μπόρεσε να εφαρμοστεί λόγω παρατεταμένου χρόνου επώασής του. Το υγρό αυτό θρεπτικό εξατμίστηκε πριν προλάβει να αναπτυχθεί το *M. tuberculosis* complex. Ωστόσο, όταν ο δείκτης ήταν κάποιο άτυπο μυκοβακτήριο, η μέθοδος είχε αποτελέσματα.

Η Μέθοδος Κάθετου Ενοφθαλμισμού στο θρεπτικό υπόστρωμα παρουσίασε σημαντικά μειονεκτήματα. Έπρεπε τόσο το υπό εξέταση στέλεχος όσο και το κλινικό στέλεχος για τον έλεγχο δράσης βιοενεργών ουσιών να μπορούν να αναπτυχθούν στο ίδιο υλικό μέσο. Αυτό δεν ήταν όλες τις φορές εφικτό. Για παράδειγμα, όταν ένα στέλεχος *Nocardia* καλλιεργείται σε Mueller Hinton Agar και το κλινικό στέλεχος για τον έλεγχο δράσης βιοενεργών ουσιών ήταν το *M. tuberculosis* complex, το οποίο αναπτύσσεται σε Middlebrook 7H11, η μέθοδος δεν μπορούσε να εφαρμοστεί. Επιπλέον, αν το κλινικό στέλεχος παρουσίαζε ερπισμό, πχ βακτήρια το γένους *Proteus*, τότε επιμολύνονταν όλο το τρυβλίο.

Λαμβάνοντας αυτά υπόψη, η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Μέθοδος Διάχυσης Αντιβιοτικής ουσίας σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (παράγραφος 2.8). Τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι ο συνδυασμός διαφορετικών θρεπτικών υλικών (ανάλογα με τους μικροοργανισμούς που χρησιμοποιούνται) και επώαση σε επιθυμητές συνθήκες χωρίς να επηρεάζεται η ανάπτυξή τους.

3.9 Έλεγχος δράσης βιοενεργών ουσιών από ενδογενή, εδαφικά στελέχη γένους *Streptomyces* έναντι θετικών και αρνητικών κατά Gram κλινικών βακτηρίων

Η διερεύνηση της βιοενεργότητας στελεχών του γένους *Streptomyces* έγινε με τη Μέθοδο Διάχυσης Αντιμικροβιακής ένωσης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Η μέθοδος περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 2.8). Τα κλινικά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο δράσης βιοενεργών ουσιών ήταν θετικά και αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Στον Πίνακα 3.3 δίνονται τα αποτελέσματα δράσης βιοενεργών ουσιών από τα ενδογενή, εδαφικά στελέχη του γένους *Streptomyces* που

διατηρούνταν στην Τράπεζας Στελεχών του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας, του Τομέα Βοτανικής έναντι κλινικών στελεχών του γένους *Staphylococcus*.

Πίνακας 3.3 Έλεγχος δράσης βιοενεργών ουσιών από ενδογενή, εδαφικά στελέχη γένους *Streptomyces* και του πρότυπου στελέχους *S. chrestomyceticus* DSM 40545 έναντι κλινικών στελεχών γένους *Staphylococcus*

Ενδογενή, εδαφικά στελέχη γένους <i>Streptomyces</i>		Κλινικά στελέχη γένους <i>Staphylococcus</i> Διάμετρος ζώνης αναστολής σε mm		
α/α	Στέλεχος	<i>St. aureus</i>	<i>St. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ^a
1	<i>Streptomyces</i> CAG 4/1	0	0	0
2	<i>Streptomyces</i> sp CAG 13/3	0	0	0
3	<i>Streptomyces</i> M 53	0	0	0
4	<i>Streptomyces</i> M 33	20	50	0
5	<i>Streptomyces</i> M 24	0	0	0
6	<i>Streptomyces</i> M 17	0	0	0
7	<i>Streptomyces</i> M 16	0	0	0
8	<i>Streptomyces</i> M 5	44	42	0
9	<i>Streptomyces cyaneus</i> ASE 19	0	0	0
10	<i>Streptomyces collinus</i> CAG 9	0	0	0
11	<i>Streptomyces</i> CAG 9/2	0	0	0
12	<i>Streptomyces</i> CAG 13/2	0	0	0
13	<i>Streptomyces albidoflavus</i> K 3	0	0	0
14	<i>Streptomyces</i> M 63	0	0	0
15	<i>Streptomyces</i> Vol 3	0	0	0
16	<i>Streptomyces</i> M56	0	0	0
17	<i>S. chrestomyceticus</i> DSM 40545	0	0	0
M ^b	RA5	0	0	8
	LZD	24	31	0

^a: Methicilline Resistant *Staphylococcus aureus*, ^b: μάρτυρας για έλεγχο ανάπτυξης μικροοργανισμού δείκτη χρησιμοποιήθηκε δισκίο αντιβιοτικού ριφαμπικίνης συγκέντρωσης 5 μg δισκίο⁻¹ και λινεζολίδης (LZD) συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹

Όπως προαναφέρθηκε, εκτός των δέκα έξι στελεχών εξετάστηκε και η δράση στελέχους γένους *Streptomyces* της Μικροβιακής Τράπεζας Στελεχών Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. Τα κλινικά αυτά στελέχη είχαν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί στο Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας του Γ.Ν.Α. Σισμανογλείου (παράγραφος 3.2).

Επιπλέον, για τον έλεγχο δράσης των βιοενεργών ουσιών εκτός του κλινικού στελέχους *St. aureus* χρησιμοποιήθηκαν ένα κλινικό στέλεχος *St. epidermidis* και ένα ανθεκτικό στη μεθικιλίνη *St. aureus* (Methicilline Resistance *Staphylococcus aureus* - MRSA), τα οποία διατηρούνταν στην Τράπεζα Στελεχών του Γ.Ν.Α. Σισμανογλείου. Η δράση των βιοενεργών ουσιών προσδιορίστηκε ποιοτικά, μετρώντας τη διάμετρο της ζώνης αναστολής ανάπτυξης του κλινικού στελέχους. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν δισκία αντιβιοτικών γνωστή συγκέντρωσης (Πίνακας 2.4).

Παρατηρήθηκε ότι μόνο τα στελέχη *Streptomyces* M33 (Σ-4) και *Streptomyces* M5 (Σ-8) ήταν βιοενεργά έναντι των κλινικών στελεχών *St. aureus* και *St. epidermidis*. Οι ζώνες αναστολής του στελέχους *Streptomyces* M5 (Σ-8) κυμάνθηκε στα ίδια επίπεδα και στα δύο στελέχη του γένους *Staphylococcus* (44 και 42 mm). Αντίθετα, το *Streptomyces* M33 (Σ-4) ανέστειλε σε μεγαλύτερο βαθμό την ανάπτυξη του *St. epidermidis* σε σχέση με του *Staphylococcus* (ζώνες αναστολής 50 και 20 mm αντίστοιχα). Κανένα από τα στελέχη δεν ανέστειλε την ανάπτυξη στο στέλεχος MRSA. Παρατηρήθηκε επίσης ότι το στέλεχος *S. chrestomyceticus* DSM 40545 δεν προκάλεσε αναστολή ανάπτυξης σε κανένα από τα κλινικά στελέχη.

Τα ενδογενή, εδαφικά στελέχη του γένους *Streptomyces* εξετάστηκαν και για τη δράση βιοενεργών ουσιών έναντι κλινικών στελεχών του γένους *Enterococcus*. Αναλυτικότερα, τα κλινικά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ένα στέλεχος *Enterococcus* sp, ένα *E. faecalis*, ένα *E. faecium* και ένα Vancomycin Resistant *Enterococcus* (VRE). Η δράση των βιοενεργών ουσιών προσδιορίστηκε ποιοτικά, μετρώντας τη διάμετρο της ζώνης αναστολής ανάπτυξης του κλινικού στελέχους. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν η ριφαμικίνη για το *E. faecium* με ζώνη αναστολής 20 mm, η βανκομυκίνη για τα *Enterococcus* sp και *E. faecalis* με ζώνη αναστολής 28 mm και 34 mm αντίστοιχα ενώ για το Vancomycine Resistant *Enterococcus* (VRE) η γενταμυκίνη με ζώνη αναστολής 26 mm. Παρατηρήθηκε ότι κανένα από τα ενδογενή, εδαφικά στελέχη του γένους *Streptomyces* αλλά ούτε και το πρότυπο στέλεχος *S. chrestomyceticus* DSM 40545 δεν ήταν βιοενεργά έναντι των συγκεκριμένων κλινικών στελεχών.

Η άλλη ομάδα κλινικών παθογόνων βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο δράσης βιοενεργών ουσιών ήταν κλινικά στελέχη του γένους *Nocardia*.

Πίνακας 3.5 Έλεγχος δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών γένους *Streptomyces* και του πρότυπου στελέχους *S. chrestomyceticus* DSM 40545 έναντι κλινικών στελεχών γένους *Nocardia* (Μικροβιακή Τράπεζα του Γ.Ν.Α. Σωτηρία)

Ενδογενή, εδαφικά στελέχη γένους <i>Streptomyces</i>		Κλινικά στελέχη γένους <i>Nocardia</i> Διάμετρος ζώνης αναστολής σε mm					
α/α	Στέλεχος	Noc 1	Noc 2	Noc 3	Noc 4	Noc 5	Noc 6
1	<i>Streptomyces</i> CAG 4/1	0	0	0	0	0	0
2	<i>Streptomyces</i> CAG 13/3	0	0	0	0	0	0
3	<i>Streptomyces</i> M 53	0	0	0	0	0	0
4	<i>Streptomyces</i> M 33	34	28	20	34	20	0
5	<i>Streptomyces</i> M 24	0	0	0	0	0	0
6	<i>Streptomyces</i> M 17	0	0	0	0	0	0
7	<i>Streptomyces</i> M 16	0	0	0	0	28	0
8	<i>Streptomyces</i> M 5	24	20	20	30	0	0
9	<i>S. cyaneus</i> ASE 19	0	0	0	0	0	0
10	<i>S. collinus</i> CAG 9	0	0	0	0	0	0
11	<i>Streptomyces</i> CAG 9/2	18	0	0	24	0	0
12	<i>Streptomyces</i> CAG 13/2	0	0	0	18	24	0
13	<i>S. albidoflavus</i> K 3	0	0	0	0	0	0
14	<i>Streptomyces</i> M 63	0	0	0	0	0	0
15	<i>Streptomyces</i> Vol 3	22	0	0	0	0	0
16	<i>Streptomyces</i> M56	0	0	0	0	18	0
17	<i>S. chrestomyceticus</i> DSM 40545	0	34	0	20	0	0
M ^a	AMC30	20	26	20	20	24	ND ^b

^a: μάρτυρας για έλεγχο ανάπτυξης μικροοργανισμών δεικτών δισκίο αντιβιοτικού αμοξικιλίνη-κλαβουλανικό (AMC30) συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹ b: δεν υπάρχουν δεδομένα

Εξετάστηκαν δέκα τρία κλινικά στελέχη εκ των οποίων τα έξι παραχωρήθηκαν από το Εργαστήριο Αναφοράς της Φυματίωσης Γ.Ν.Α Σωτηρία. Στον Πίνακα 3.5

φαίνονται τα αποτελέσματα δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών του γένους *Streptomyces* κα του πρότυπου στέλεχος *S. chrestomyceticus* DSM 40545 έναντι των στελεχών του Γ.Ν.Α Σωτηρία ενώ στον Πίνακα 3.6 έναντι των κλινικών στελεχών του Γ.Ν.Α. Σισμανογλείου.

Πίνακας 3.6 Έλεγχος δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών γένους *Streptomyces* και του πρότυπου στελέχους *S. chrestomyceticus* DSM 40545 έναντι κλινικών στελεχών γένους *Nocardia* (Μικροβιακή Τράπεζα του Γ.Ν.Α. Σισμανογλείου)

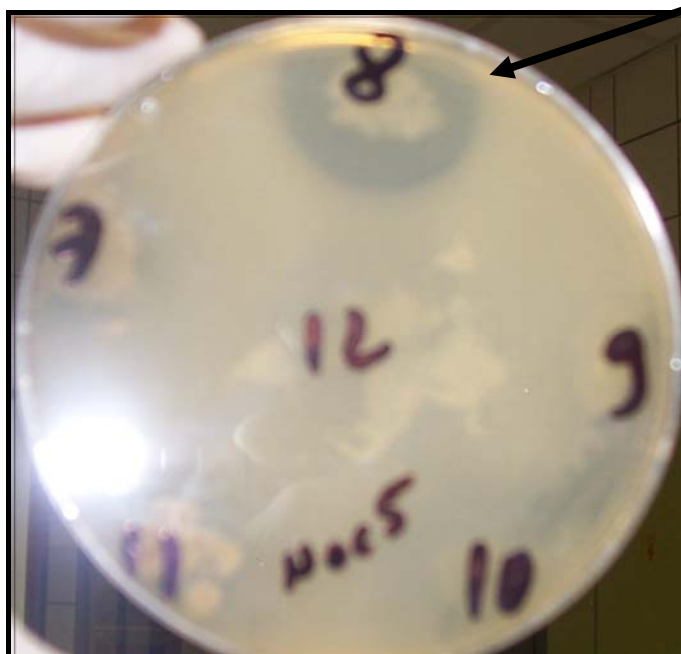
Ενδογενή, εδαφικά στελέχη γένους <i>Streptomyces</i>		Κλινικά στελέχη γένους <i>Nocardia</i> Διάμετρος ζώνης αναστολής σε mm						
α/α	Στέλεχος	1kat 2397	4kat 2297	5kat 2300	6kat 2080	2740	3124	10634
1	<i>Streptomyces</i> CAG 4/1	0	0	0	20	0	0	0
2	<i>Streptomyces</i> CAG 13/3	0	0	0	0	0	0	0
3	<i>Streptomyces</i> M 53	34	0	14	14	0	0	0
4	<i>Streptomyces</i> M 33	38	28	40	16	0	30	0
5	<i>Streptomyces</i> M 24	0	18	0	18	0	0	0
6	<i>Streptomyces</i> M 17	30	0	0	14	0	0	0
7	<i>Streptomyces</i> M 16	36	14	0	18	0	40	0
8	<i>Streptomyces</i> M 5	20	35	36	34	0	14	0
9	<i>S. cyaneus</i> ASE 19	0	0	0	0	0	0	0
10	<i>S. collinus</i> CAG 9	16	12	0	0	0	12	0
11	<i>Streptomyces</i> CAG 9/2	20	12	24	22	0	0	0
12	<i>Streptomyces</i> CAG 13/2	0	0	0	0	0	0	0
13	<i>S. albidoflavus</i> K 3	0	0	0	0	0	0	0
14	<i>Streptomyces</i> M 63	0	0	0	0	0	0	0
15	<i>Streptomyces</i> Vol 3	16	14	0	18	0	0	0
16	<i>Streptomyces</i> M56	0	16	0	0	0	18	0
17	<i>S. chrestomyceticus</i> DSM 40545	55	56	60	26	0	65	0
M ^a	AMC30	0	0	30	30	ND ^b	0	ND ^b

^a: μάρτυρας για έλεγχο ανάπτυξης μικροοργανισμών δεικτών δισκίο αντιβιοτικού αμοξικιλίνη-κλαβουλανικό (AMC30) συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹ ^b: δεν υπάρχουν δεδομένα

Παρατηρήθηκε ότι τα περισσότερα στελέχη γένους *Streptomyces* προκάλεσαν αναστολή στην ανάπτυξη των κλινικών στελεχών του γένους *Nocardia*. Δεν παρατηρήθηκε δράση βιοενεργών ουσιών από τα στελέχη *Streptomyces* CAG 13/3 (Σ-2), *Streptomyces cyaneus* ASE 19(Σ-9), *S. albidoflavus* K 3 (Σ-13) και το *Streptomyces* M 63 (Σ-14).

Οι διάμετροι των ζωνών αναστολής ήταν από 14 mm (στέλεχος *Streptomyces* M 53) έως 65 mm (στέλεχος *S. chrestomyceticus* DSM 40545) που ήταν και η μεγαλύτερη διαμετρος ζώνης αναστολής που παρατηρήθηκε για τα κλινικά στελέχη γένους *Nocardia*. Τα ενδογενή εδαφικά στελέχη που σημείωσαν τις περισσότερες δράσεις βιοενεργών ουσιών ήταν τα στελέχη *Streptomyces* M 33 (Σ-4) και *Streptomyces* M 5 (Σ-4).

Ως μάρτυρας για έλεγχο ανάπτυξης μικροοργανισμών δεικτών χρησιμοποιήθηκε δισκίο αντιβιοτικού αμοξικιλίνη-κλαβουλανικό (AMC30) συγκέντρωσης 30 μg.



Εικόνα 3.2 Τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα Mueller Hinton Agar. Διακρίνονται οι αποικίες ενδογενών εδαφικών στελεχών γένους *Streptomyces* και η δράση βιοενεργών ουσιών έναντι κλινικού στελεχούς γένους *Nocardia* (χρόνος επώασης 48 ώρες στους 37° C, συνθήκες CO₂)

Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι τα ενδογενή εδαφικά στελέχη ήταν πιο βιοενεργά έναντι των κλινικών βακτηριακών στελεχών γένους *Nocardia* που είχαν απομονωθεί από το Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας του Γ.Ν.Α Σισμανόγλειο. Όμοια, οι βιοενεργές ουσίες του πρότυπου στελεχούς *S. chrestomyceticus* DSM 40545 ήταν πιο δραστικές

για τα συγκεκριμένα κλινικά στελέχη. Στην Εικόνα 3.2 διακρίνονται οι διάμετροι των ζωνών αναστολής ανάπτυξης των κλινικών βακτηριακών στελεχών.

Πίνακας 3.7 Έλεγχος δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών γένους *Streptomyces* και του πρότυπου στελέχους *S. chrestomyceticus* DSM 40545 έναντι κλινικών στελεχών γένους *Mycobacterium* - other than - *tuberculosis* (*M. fortuitum* και MOTT^a) (συνεχίζεται στον Πίνακα 3.9)

Ενδογενή, εδαφικά στελέχη γένους <i>Streptomyces</i>		Κλινικά στελέχη γένους <i>Mycobacterium</i> Διάμετρος ζώνης αναστολής σε mm					
α/α	Στέλεχος	<i>M. fortuitum</i> 5320881	MOTT ^a 553490	<i>M. fortuitum</i> 614751	MOTT 538928	<i>M. fortuitum</i> 5320882	MOTT 432527
1	<i>Streptomyces</i> CAG 4/1	0	0	0	0	0	22
2	<i>Streptomyces</i> CAG 13/3	0	0	0	0	0	0
3	<i>Streptomyces</i> M 53	0	0	34	0	0	34
4	<i>Streptomyces</i> M 33	40	38	0	0	38	52
5	<i>Streptomyces</i> M 24	14	0	34	0	12	32
6	<i>Streptomyces</i> M 17	0	0	42	0	0	18
7	<i>Streptomyces</i> M 16	0	0	32	0	0	32
8	<i>Streptomyces</i> M 5	0	0	0	0	0	40
9	<i>S. cyaneus</i> ASE 19	0	0	0	0	0	0
10	<i>S. collinus</i> CAG 9	0	0	0	0	0	44
11	<i>Streptomyces</i> CAG 9/2	26	0	0	0	26	28
12	<i>Streptomyces</i> CAG 13/2	0	0	0	0	0	40
13	<i>S. albidoflavus</i> K 3	0	0	0	0	0	0
14	<i>Streptomyces</i> M 63	24	0	0	0	24	0
15	<i>Streptomyces</i> Vol 3	14	0	0	0	0	30
16	<i>Streptomyces</i> M56	36	0	0	0	30	42
17	<i>S. chrestomyceticus</i> DSM 40545	40	32	0	36	40	48

^a: μη ταυτοποιημένο στέλεχος *Mycobacterium* - other than - *tuberculosis* με τις μεθόδους μοριακής ταυτοποίησης που χρησιμοποιούνται στο Γ.Ν.Α Σισμανόγλειο (παράγραφος 2.7)

Επίσης, η βιοενεργότητα ενδογενών εδαφικών στελεχών του γένους *Streptomyces* εξετάστηκε και έναντι κλινικών βακτηρίων του γένους *Mycobacterium* (*Mycobacterium* - other than - *tuberculosis*). Όπως προαναφέρθηκε τα κλινικά αυτά

στελέχη είχαν απομονωθεί από αναπνευστικά και μη αναπνευστικά δείγματα. Τα κλινικά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν πέντε *Mycobacterium fortuitum*, ένα *Mycobacterium lentiflavum*, ένα *Mycobacterium intracellulare* και πέντε *Mycobacterium* - other than – *tuberculosis* που δεν μπόρεσαν να ταυτοποιηθούν με τις μεθόδους μοριακής ταυτοποίησης που χρησιμοποιούνται στο Γ.Ν.Α Σισμανόγλειο (παράγραφος 2.7).

Πίνακας 3.8 (συνέχεια από πίνακα 3.9) Έλεγχος παραγωγής βιοενεργών ουσιών περιβαλλοντικών στελεχών γένους *Streptomyces* έναντι κλινικών στελεχών γένους *Mycobacterium* Other Than Tuberculosis (*Mycobacterium lentiflavum*, *M. fortuitum*, *Mycobacterium intracellulare* και MOTT^a)

Ενδογενή, εδαφικά στελέχη γένους <i>Streptomyces</i>		Κλινικά στελέχη γένους <i>Mycobacterium</i> Διάμετρος ζώνης αναστολής σε mm					
α/α	Στέλεχος	<i>M. fortuitum</i> 624180	<i>M. lentiflavum</i> 628588	MOTT ^a 523630	<i>M. intracellulare</i> 526237	<i>M. fortuitum</i> 638504	MOTT ^a 584544
1	<i>Streptomyces</i> CAG 4/1	24	0	0	0	0	0
2	<i>Streptomyces</i> CAG 13/3	0	0	0	0	0	0
3	<i>Streptomyces</i> M 53	16	0	0	0	0	0
4	<i>Streptomyces</i> M 33	0	0	0	0	0	0
5	<i>Streptomyces</i> M 24	0	0	0	0	0	0
6	<i>Streptomyces</i> M 17	0	0	0	0	0	0
7	<i>Streptomyces</i> M 16	18	0	0	0	0	0
8	<i>Streptomyces</i> M 5	0	0	0	0	0	0
9	<i>S. cyaneus</i> ASE 19	0	0	0	0	0	0
10	<i>S. collinus</i> CAG 9	44	0	0	0	0	0
11	<i>Streptomyces</i> CAG 9/2	28	0	0	0	0	0
12	<i>Streptomyces</i> CAG 13/2	34	0	0	0	0	0
13	<i>S. albidoflavus</i> K 3	0	0	0	0	0	0
14	<i>Streptomyces</i> M 63	0	0	0	0	0	0
15	<i>Streptomyces</i> Vol 3	24	0	0	0	0	0
16	<i>Streptomyces</i> M56	28	0	0	0	0	0
17	<i>S. chrestomyceticus</i> DSM 40545	26	0	0	0	0	0

^a: μη ταυτοποιημένο στέλεχος *Mycobacterium* - other than – *tuberculosis* με τις μεθόδους μοριακής ταυτοποίησης που χρησιμοποιούνται στο Γ.Ν.Α Σισμανόγλειο (παράγραφος 2.7.1)

Τα αποτελέσματα δράσης βιοενεργών ουσιών δίνονται στον Πίνακα 3.7 και 3.8. Παρατηρήθηκε ότι δέκα τέσσερα από τα δέκα επτά στελέχη του γένους *Streptomyces* (συμπεριλαμβανομένου και του πρότυπου στελέχους *S. chrestomyceticus* DSM 40545) ήταν δραστικά έναντι των κλινικών στελεχών *Mycobacterium* - other than - *tuberculosis*.

Οι διάμετροι των ζωνών αναστολής ήταν από 12 mm (στέλεχος *Streptomyces* sp M 24) έως 48 mm (*S. chrestomyceticus* DSM 40545). Αναστολή σημειώθηκε σε τρία *M. fortuitum* και τρία μη ταυτοποιημένα στελέχη του γένους *Mycobacterium* (παράγραφος 3.2).

Η τελευταία ομάδα των θετικών κατά Gram κλινικών στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο δράσης των βιοενεργών ουσιών ήταν τα στελέχη *M. tuberculosis* complex. Παρατηρήθηκε ότι κανένα στέλεχος γένους *Streptomyces* δεν ήταν βιοενεργό για τα συγκεκριμένα βακτήρια. Συμπερασματικά, η δράση των βιοενεργών ουσιών προκάλεσε αναστολή ανάπτυξης μόνο των *Mycobacterium* - other than - *tuberculosis* και όχι των *M. tuberculosis* complex.

Τα ενδογενή εδαφικά στελέχη γένους *Streptomyces* καθώς και το πρότυπο στέλεχος *S. chrestomyceticus* DSM 40545 ελέγχθηκαν και για τη δράση βιοενεργών ουσιών έναντι αρνητικών κατά Gram κλινικών παθογόνων βακτηρίων (παράγραφος 2.5.1). Τα κλινικά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ένα στέλεχος *Proteus mirabilis*, ένα στέλεχος *Klebsiella pneumoniae*, ένα στέλεχος *Pseudomonas aeruginosa* και ένα στέλεχος *Escherichia coli*. Ύστερα από επώαση 24 ωρών στους 37 °C δεν παρατηρήθηκε καμία αναστολή ανάπτυξης των αρνητικών κατά Gram κλινικών παθογόνων βακτηρίων. Μάρτυρες για τον έλεγχο ανάπτυξης των μικροοργανισμών δεικτών χρησιμοποιήθηκαν δισκία αντιβιοτικών. Συγκεκριμένα η σιπροφλοξαίνη (CIP5) για τα *Pr. mirabilis*, *E. coli* και *Ps. aeruginosa* με διάμετροι ζωνών αναστολής 26 mm, 20 mm και 20 mm αντίστοιχα ενώ για το στέλεχος *Kl. pneumoniae* χρησιμοποιήθηκε η γενταμυκίνη και η διάμετρος ζώνης αναστολής ήταν 16 mm.

3.10 Έλεγχος δράσης βιοενεργών ουσιών κλινικών στελεχών γένους *Mycobacterium* - other than - *tuberculosis* έναντι θετικών κατά Gram κλινικών βακτηρίων

Από τα τριάντα επτά κλινικά στελέχη *Mycobacterium* - other than - *tuberculosis* που ταυτοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας του Γ.Ν.Α.

Σισμανογλείου, τα είκοσι επτά εξετάστηκαν για τη δράση βιοενεργών ουσιών έναντι θετικών κατά Gram κλινικών στελεχών. Τα στελέχη αυτά είχαν απομονωθεί από κλινικά αναπνευστικά δείγματα που προσκομίστηκαν στο Εργαστήριο.

Για τον έλεγχο δράσης βιοενεργών ουσιών χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια θετικά κατά Gram κλινικά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο δράσης βιοενεργών ουσιών από τα ενδογενή εδαφικά στελέχη γένους *Streptomyces* και το πρότυπο στέλεχος *S. chrestomyceticus* DSM 40545. Χρησιμοποιήθηκαν τα κλινικά στελέχη *St. aureus*, *St. epidermidis*, Methicilline Resistant *St. aureus* - MRSA, *Enterococcus sp*, *E. faecalis*, *E. faecium*, Vancomycin Resistant *Enterococcus* – VRE.

Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν δισκία αντιβιοτικών. Για το *St. epidermidis* και το MRSA η ριφαμπικίνη (RA5) συγκέντρωσης 5 µg με διάμετρο ζώνης αναστολής 36 mm και 8 mm αντίστοιχα ενώ για το *St. aureus* η λινεζολίδα (LZD) συγκέντρωσης 30 µg με διάμετρο ζώνης αναστολής 24 mm. Για το κλινικά στελέχη γένους *Enterococcus* χρησιμοποιήθηκε πάλι η λινεζολίδα και οι διάμετροι ζωνών αναστολής ήταν 23 mm για το *Enterococcus sp*, 22 mm για το *E. faecalis*, 31 mm για το *E. faecium* και 26 mm για το VRE.

Παρατηρήθηκε ότι κανένα από τα κλινικά στελέχη *Mycobacterium* - other than - *tuberculosis* δεν ανέστειλε την ανάπτυξη των κλινικών στελεχών γένους *Staphylococcus* και *Enterococcus*.

3.11 Έλεγχος δράσης βιοενεργών ουσιών κλινικών στελεχών γένους *Nocardia* έναντι θετικών και αρνητικών κατά Gram κλινικών βακτηρίων

Εκτός από τα ενδογενή εδαφικά στελέχη γένους *Streptomyces* και το πρότυπο στέλεχος *S. chrestomyceticus* DSM 40545, εξετάστηκε η δράση βιοενεργών ουσιών και κλινικών στελεχών του φύλου Ακτινοβακτηρίων. Το πρότυπο στέλεχος ήταν από τη Τράπεζα Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM 40545) και είναι γνωστό ότι παράγει αμινοκιντίνη, νεομυκίνη E,F [amino-cidin, neomycin E, F (=paromomycin)]. Λαμβάνοντας υπόψη τα βιβλιογραφικά δεδομένα για την παραγωγή βιοενεργών ουσιών από κλινικά στελέχη του γένους *Nocardia* (παράγραφος 1.5) εξετάστηκαν δεκα τρία κλινικά στελέχη γένους *Nocardia*. Έξι στελέχη παραχωρήθηκαν από το Γ.Ν.Α. Σωτηρία ενώ τα υπόλοιπα απομονώθηκαν στο Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας Γ.Ν.Α. Σισμανόγλειο. Όλα τα στελέχη του γένους *Nocardia* είχαν απομονωθεί από αναπνευστικά κλινικά δείγματα.

Για τον έλεγχο δράσης των βιοενεργών ουσιών χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια θετικά και αρνητικά κατά Gram κλινικά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο δράσης βιοενεργών ουσιών από τα ενδογενή εδαφικά στελέχη γένους *Streptomyces* και το πρότυπο στέλεχος *S. chrestomyceticus* DSM 40545 (*St. aureus*, *St. epidermidis*, Methicilline Resistant *St. aureus* - MRSA, *Enterococcus sp*, *E. faecalis*, *E. faecium*, Vancomycin Resistant *Enterococcus* - VRE, *Pr. mirabilis*, *Kl. pneumoniae*, *Ps. aeruginosa* και *E. coli*). Παρατηρήθηκε ότι κανένα από τα εξεταζόμενα κλινικά στελέχη γένους *Nocardia* δεν ανέστειλε τα θετικά και αρνητικά κατά Gram κλινικά βακτήρια.

Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν δισκία αντιβιοτικών. Αναλυτικότερα για τα *St. aureus* και *St. epidermidis* χρησιμοποιήθηκε η βανκομυκίνη (VA30) με διάμετρο ζώνης αναστολής 16 mm και 18 mm αντίστοιχα ενώ για το MRSA η ριφαμικίνη (RA5) με διάμετρο ζώνης αναστολής 8 mm. Για τα κλινικά στελέχη γένους *Enterococcus* χρησιμοποιήθηκε πάλι η λινεζολίδη και οι διάμετροι ζωνών αναστολής ήταν 23 mm για το *Enterococcus sp*, 22 mm για το *E. faecalis*, 31 mm για το *E. faecium* και 26 mm για το VRE.

Για τα *Pr. mirabilis*, *E.coli* και *Ps. aeruginosa* χρησιμοποιήθηκε η σιπροφλοξασίνης (CIP5) με διάμετρο ζώνης αναστολής 26 mm, 24 mm και 22 mm αντίστοιχα ενώ για το κλινικό στέλεχος γένους *Kl. pneumoniae* χρησιμοποιήθηκε η γενταμυκίνης (GM10) με ζώνη αναστολής 16 mm.

3.12 Έλεγχος δράσης βιοενεργών ουσιών κλινικών στελεχών γένους *Streptomyces* έναντι θετικών και αρνητικών κατά Gram κλινικών βακτηρίων

Στο Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας του Γ.Ν.Α Σισμανογλείου απομονώθηκαν τέσσερα κλινικά στελέχη γένους *Streptomyces* τα οποία όμως δεν αξιολογήθηκαν ως παθογόνα από τον Εργαστηριακό και Κλινικό Ιατρό. Τα στελέχη αυτά είχαν απομονωθεί από αναπνευστικά κλινικά δείγματα. Για τον έλεγχο δράσης βιοενεργών ουσιών χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια θετικά και αρνητικά κατά Gram κλινικά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο δράσης βιοενεργών ουσιών από τα ενδογενή εδαφικά στελέχη γένους *Streptomyces* και το πρότυπο στέλεχος *S. chrestomyceticus* DSM 40545. Χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια κλινικά στελέχη για τον έλεγχο δράσης βιοενεργών ουσιών (*St. aureus*, *St. epidermidis*, Methicilline Resistant *St. aureus* - MRSA, *Enterococcus sp*, *E. faecalis*, *E. faecium*, Vancomycin Resistant

Enterococcus - VRE, *Pr. mirabilis*, *Kl. pneumoniae*, *Ps. aeruginosa* και *E. coli*). Παρατηρήθηκε ότι κανένα από τα εξεταζόμενα κλινικά στελέχη γένους *Streptomyces* δεν ανέστειλε τα θετικά και αρνητικά κατά Gram κλινικά βακτήρια.

Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν δισκία αντιβιοτικών. Για το *St. epidermidis* και το MRSA η ριφαμπικίνη (RA5) συγκέντρωσης 5 μg με διάμετρο ζώνης αναστολής 36 mm και 8 mm αντίστοιχα ενώ για το *St. aureus* η λινεζολίδα (LZD) συγκέντρωσης 30 μg με διάμετρο ζώνης αναστολής 24 mm. Για τα κλινικά στελέχη γένους *Enterococcus* χρησιμοποιήθηκε πάλι η λινεζολίδα και οι διάμετροι ζωνών αναστολής ήταν 23 mm για το *Enterococcus sp*, 22 mm για το *E. faecalis*, 31 mm για το *E. faecium* και 26 mm για το VRE.

Για τα κλινικά στελέχη *Pr. mirabilis*, *E.coli* και *Ps. aeruginosa* χρησιμοποιήθηκε η σιπροφλοξασίνη (CIP5) οι διάμετροι ζωνών αναστολής ανάπτυξης ήταν 26 mm, 24 mm και 22 mm αντίστοιχα ενώ για το κλινικό στέλεχος *Kl. pneumoniae* η γενταμυκίνη (GM10) με διάμετρο ζώνης αναστολής 16 mm.

3.13 Σύγκριση δράσης βιοενεργών ουσιών με αντιβιοτικά του εμπορίου

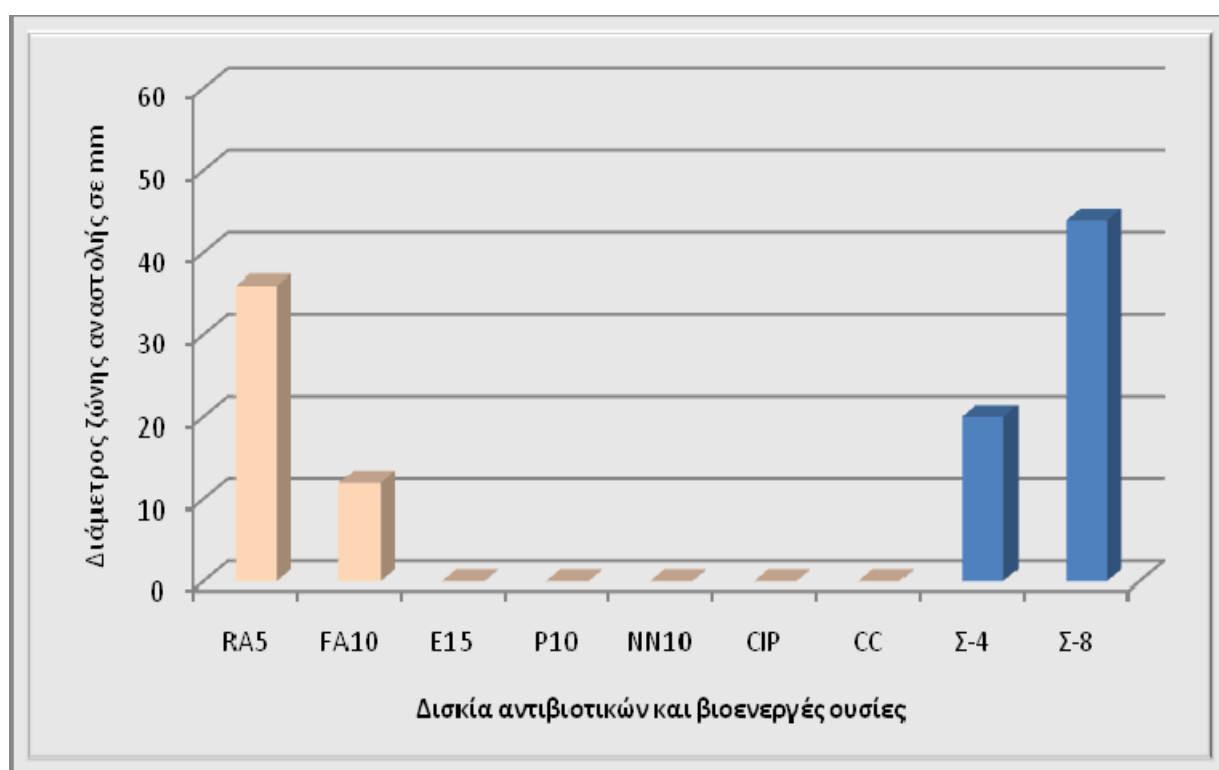
Ύστερα από τον ποιοτικό έλεγχο δράσης βιοενεργών ουσιών των ενδογενών εδαφικών στελεχών γένους *Streptomyces* και του πρότυπου στελέχους *S. chrestomyceticus* DSM 40545, ακολούθησε σύγκριση δραστηριότητας των ουσιών με τα τυποποιημένα αντιβιοτικά. Η σύγκριση αφορούσε τη διάμετρο ζώνης αναστολής των βιοενεργών ενώσεων με τις ζώνες αναστολής των χρησιμοποιούμενων αντιβιοτικών. Για τη σύγκριση πραγματοποιήθηκε εξέταση ευαισθησίας στα κλινικά στελέχη που παρουσίασαν αναστολή ανάπτυξης από τη δράση των βιοενεργών ουσιών. Η εξέταση ευαισθησίας έγινε με τη Μέθοδο Διάχυσης Αντιβιοτικού σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (Kirby-Bauer method, παράγραφος 2.8).

Με δεδομένο ότι δεν γνωρίζουμε ούτε το είδος της παραγόμενης βιοενεργής ουσίας ούτε τη συγκέντρωσή της, για καλύτερη σύγκριση δραστηριότητας, τα τυποποιημένα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν ομαδοποιήθηκαν σε εκείνα με συγκέντρωση αντιβιοτικού (x) μικρότερη των 15 μg δισκίο⁻¹ (ομάδα Α με $x < 15 \mu\text{g δισκίο}^{-1}$) και σε εκείνα με συγκέντρωση αντιβιοτικού μεγαλύτερη των 15 μg δισκίο⁻¹ και μικρότερης των 30 μg δισκίο⁻¹ (ομάδα Β με $15 < x < 30$).

Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται για την εξέταση ευαισθησίας κλινικών στελεχών γένους *Staphylococcus* στο Γ.Ν.Α. Σισμανόγλειο είναι λινεζολίδα (LZD

συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹), πενικιλίνη (P συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹), τετρακυκλίνη (TE 30 μg δισκίο⁻¹), οφλοξασίνη (FOX 30 μg δισκίο⁻¹), αμικασίνη (AN 30 μg δισκίο⁻¹), σουλφομεθοξαζόλη-τριμεθοπρινή (STX 23.75/1.25 μg δισκίο⁻¹), τομπραμυκίνη (NN 10 μg δισκίο⁻¹), φουσιδικό οξύ (FA 10 μg δισκίο⁻¹), βανκομυκίνη (VA 30 μg δισκίο⁻¹), χλωραμφαινικόλη (C 30 μg δισκίο⁻¹) και γενταμυκίνη (GM 10 μg δισκίο⁻¹). Η εξέταση ευαισθησίας πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.8.

Στις Εικόνες 3.5 και 3.6 αποδίδεται η εξέταση ευαισθησίας για το κλινικό στέλεχος *St. aureus*.

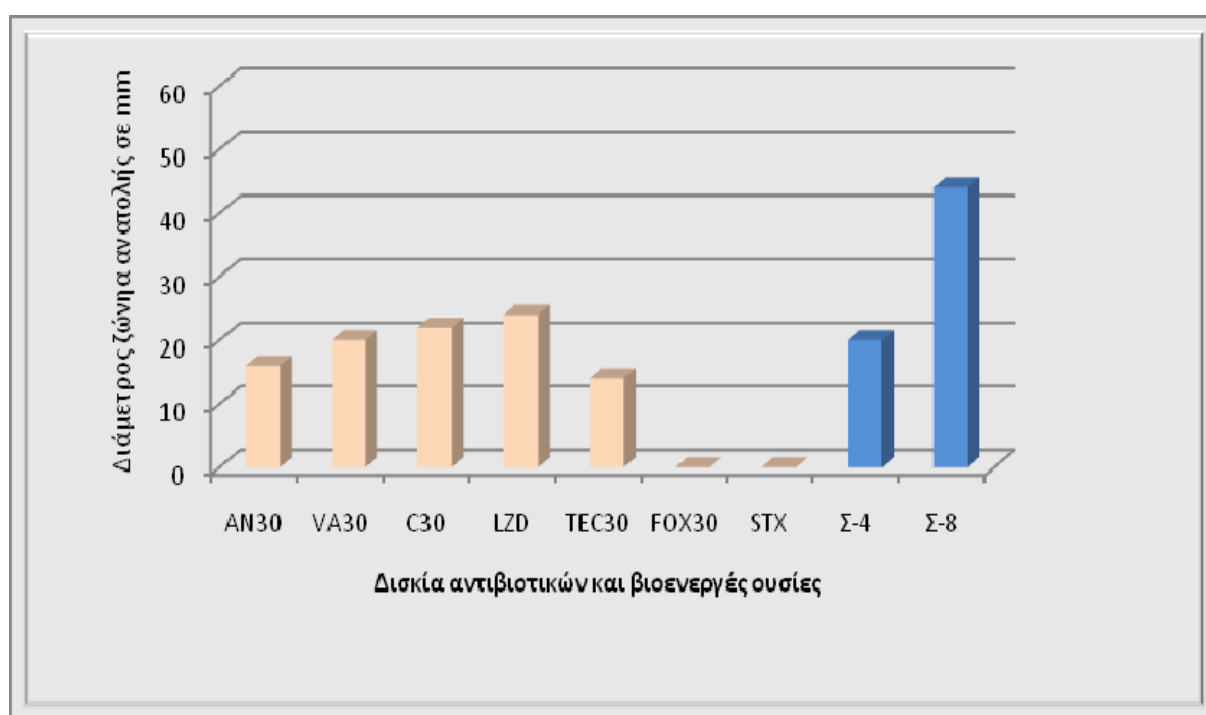


Εικόνα 3.5 Σύγκριση δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών *Streptomyces* με ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (ομάδα Α) για το κλινικό στέλεχος *St. aureus* (■ RA5: ριφαμυκίνη συγκέντρωσης 5 μg δισκίο⁻¹, ■ FA10: φουσιδικό οξύ συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, ■ E15: ερυθρομυκίνη συγκέντρωσης 15 μg δισκίο⁻¹, ■ P10: πενικιλίνη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, ■ NN10: τομπραμυκίνη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, ■ CIP5 συγκέντρωσης 5 μg δισκίο⁻¹, ■ CC2: κλινδαμυκίνη συγκέντρωσης 2 μg δισκίο⁻¹, ■ *Streptomyces* M33 (Σ-4), ■ *Streptomyces* M5 (Σ-8))

Στα ίδια διαγράμματα αποδίδεται και η διάμετρος της αναστολής ανάπτυξης του στελέχους *St. aureus* από τη δράση των βιοενεργών ουσιών των ενδογενών εδαφικών στελεχών γένους *Streptomyces*. Στην Εικόνα 3.5 εξετάστηκαν τα αντιβιοτικά με συγκέντρωση μικρότερη των 15 μg δισκίο⁻¹ ενώ στην Εικόνα 3.6 με συγκέντρωση μεγαλύτερη των 15 μg δισκίο⁻¹ και μικρότερη των 30 μg δισκίο⁻¹. Παρατηρήθηκε ότι

δυο ενδογενή εδαφικά στελέχη, τα *Streptomyces* M33 (Σ-4) και *Streptomyces* M5 (Σ-8), προκάλεσαν αναστολή ανάπτυξης του κλινικού στελέχους και ότι οι διάμετροι των ζωνών αναστολής ανάπτυξης από τη δράση των βιοενεργών ουσιών ήταν μεγαλύτερες και για τις δυο ομάδες αντιβιοτικών.

Αναλυτικότερα, στην ομάδα Α, η μεγαλύτερη αναστολή δημιουργήθηκε από το το δισκίο αντιβιοτικού λινεζολίδης με συγκέντρωση 24 μg δισκίο⁻¹ ενώ οι διαμετροι από τις βιοενεργές ουσίες των *Streptomyces* M33 (Σ-4) και *Streptomyces* M5 (Σ-8) ήταν 20 mm και 44 mm αντίστοιχα. Στην ομάδα Β η μεγαλύτερη ζώνη αναστολής ήταν γύρω από το δισκίο ριφαμπικίνης (RA5 συγκέντρωσης 5 μg δισκίο⁻¹).

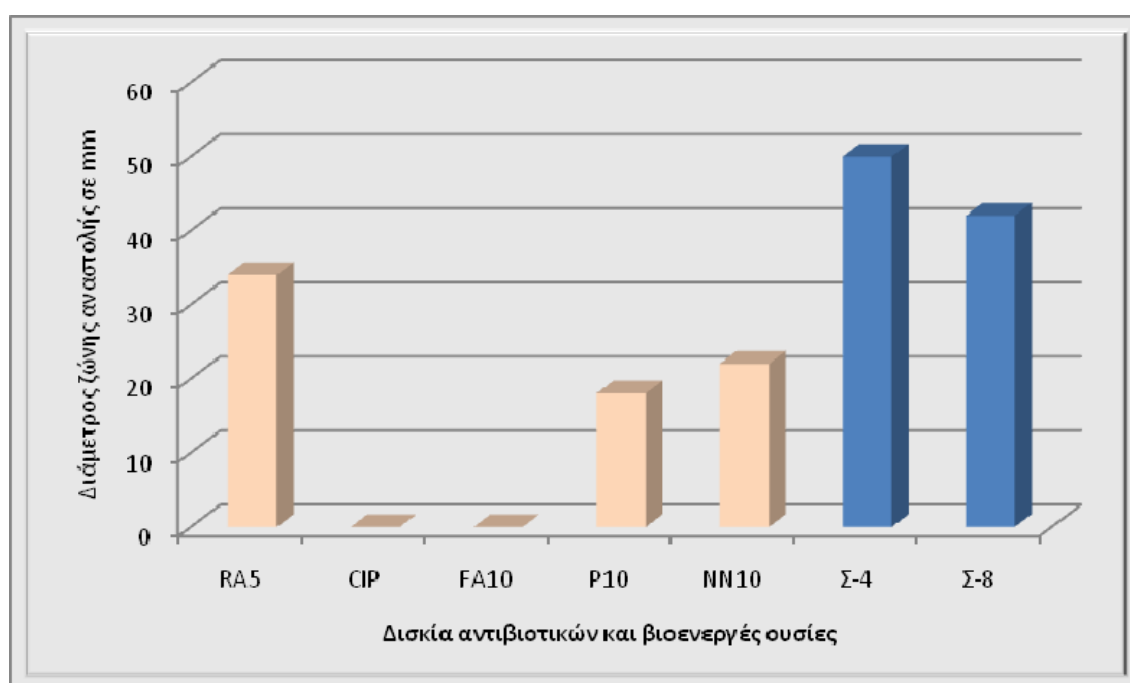


Εικόνα 3.6 Σύγκριση δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών *Streptomyces* με ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (ομάδα Β) για το κλινικό στέλεχος *St. aureus* (■ AN30: αμικασίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ VA30: βανκομυκίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ C30: χλωραμφαινικόλη συγκέντρωσης 2 μg δισκίο⁻¹, ■ LZD: λινεζολίδη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ TEC30: τετρακυκλίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ FOX30: κεφοξιτίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ STX: σουλφομεθοξαζολη-τριμεθοπρινή συγκέντρωσης 23.75/1.25 μg δισκίο⁻¹, ■ *Streptomyces* M33 (Σ-4), ■ *Streptomyces* M5 (Σ-8)

Στις Εικόνες 3.7 και 3.8 αποδίδεται η εξέταση ευαισθησίας για το κλινικό στέλεχος *St. epidermidis*. Στα ίδια διαγράμματα αποδίδεται και η διάμετρος της αναστολής ανάπτυξης του στελέχους *St. epidermidis* από τη δράση των βιοενεργών ουσιών των ενδογενών εδαφικών στελεχών γένους *Streptomyces*. Στην Εικόνα 3.7 εξετάστηκαν

τα αντιβιοτικά με συγκέντρωση μικρότερη των 15 μg δισκίο⁻¹ ενώ στην Εικόνα 3.8 με συγκέντρωση μεγαλύτερη των 15 μg δισκίο⁻¹ και μικρότερη των 30 μg δισκίο⁻¹.

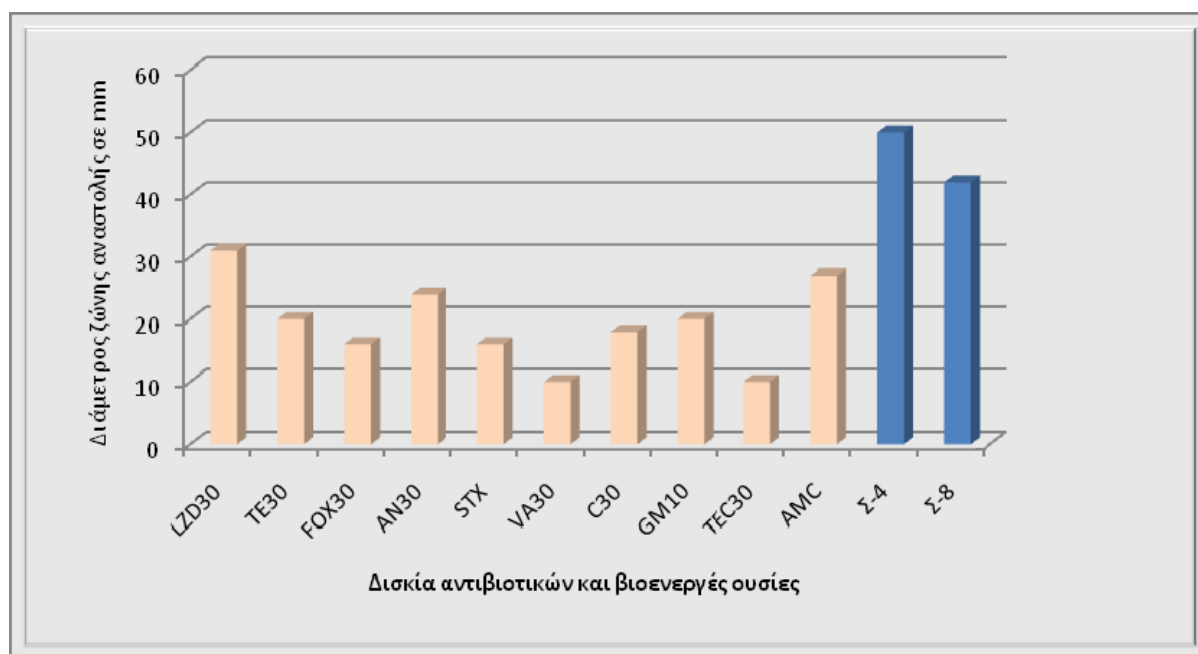
Αναστολή ανάπτυξης παρατηρήθηκε από τα ενδογενή εδαφικά στελέχη *Streptomyces* M33 και *Streptomyces* M5 και οι διάμετροι των ζωνών αναστολής ήταν 50 mm και 42 mm αντίστοιχα. Η μεγαλύτερη ζώνη αναστολή από την ομάδα Α αντιβιοτικών ήταν από τη λινεζολίδα με διάμετρο 34 mm ενώ από τη Β από τη ριφαμπικίνη με διάμετρο 34 mm. Όπως και στην περίπτωση του κλινικού στελέχους *St. aureus*, η δράση των βιοενεργών ουσιών ήταν μεγαλύτερη από εκείνη των αντιβιοτικών και των δυο ομάδων.



Εικόνα 3.7 Σύγκριση δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών *Streptomyces* με ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (ομάδα Α) για το κλινικό στέλεχος *St. epidermidis* (■ RA5: ριφαμπικίνη συγκέντρωσης 5 μg δισκίο⁻¹, ■ CIP5 συγκέντρωσης 5 μg δισκίο⁻¹, ■ FA10: φουσιδικό οξύ συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, ■ P10: πενικιλίνη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, ■ NN10: τομπραμυκίνη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, ■ *Streptomyces* M33 (Σ-4), ■ *Streptomyces* M5 (Σ-8))

Τα αντιβιοτικά για την εξέταση ευαισθησίας κλινικών στελεχών γένους *Nocardia* και *Mycobacterium* που προτείνει το Πρότυπο του Συμβουλίου Κλινικών Εργαστηρίων, Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) είναι ερυθρομικίνη (E15 συγκέντρωσης 15 μg δισκίο⁻¹), κεφτριαξονη (CRO 30 μg δισκίο⁻¹), κεφεπίνη (FEP 30 μg δισκίο⁻¹), κεφοταξίνη (CTX 30 μg δισκίο⁻¹), αμοξυκιλίνη-κλαβουλανικό (AMC 30 μg δισκίο⁻¹), μινοκυκλίνη (MI 30 μg δισκίο⁻¹), σουλφομεθοξαζολη-τριμεθοπρινή (STX 23.75/1.25 μg δισκίο⁻¹), γενταμυκίνη (GM 1023.75/1.25 μg δισκίο⁻¹), αμικασίνη (AN

3023.75/1.25 μg δισκίο⁻¹), τομπραμυκίνη (NN 10 μg δισκίο⁻¹), ριφαμπικίνη (RA5 συγκέντρωσης 5 μg δισκίο⁻¹), ιμιπενέμη (IMP 10 μg δισκίο⁻¹), λινεζολίδα (LZD 30 μg δισκίο⁻¹), σιπροφλοξασίνη (CIP5 συγκέντρωσης 5 μg δισκίο⁻¹) και βανκομυκίνη (VA 30 μg δισκίο⁻¹).

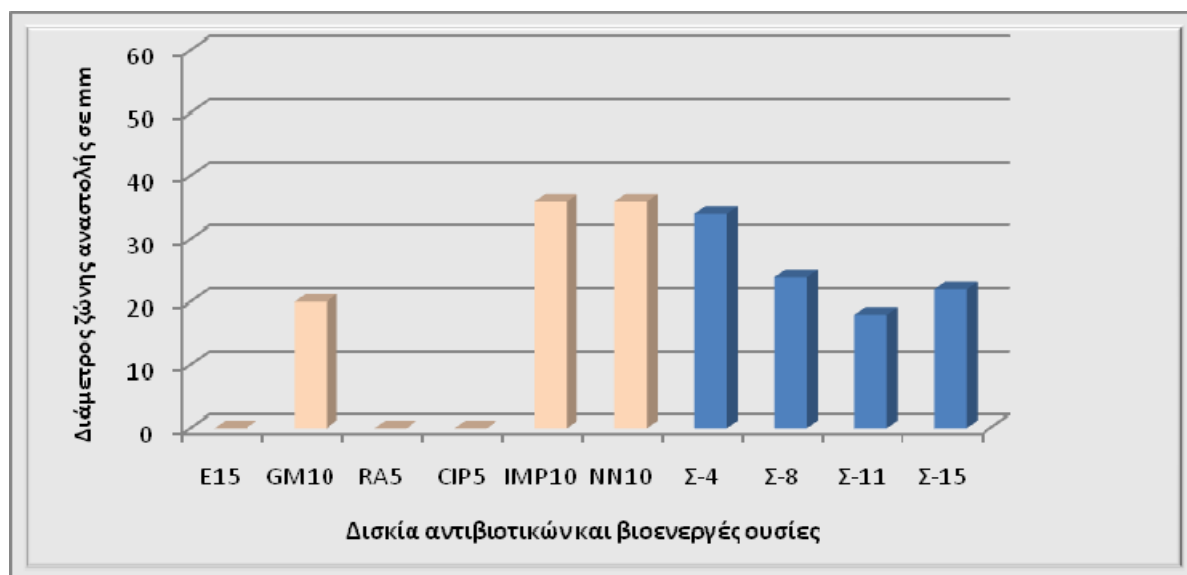


Εικόνα 3.8 Σύγκριση δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών *Streptomyces* με ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (ομάδα B) για το κλινικό στέλεχος *St. epidermidis* (■ AN30: αμικασίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ VA30: βανκομυκίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ C30: χλωραμφαινικόλη συγκέντρωσης 2 μg δισκίο⁻¹, ■ LZD: λινεζολίδα συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ TE30: τετρακυκλίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ FOX30: κεφοξιτίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ STX: σουλφομεθοξαζολη-τριμεθοπρινή συγκέντρωσης 23.75/1.25 μg δισκίο⁻¹, ■ *Streptomyces* M33 (Σ-4), ■ *Streptomyces* M5 (Σ-8)

Στις Εικόνες 3.9 και 3.10 αποδίδεται η εξέταση ευαισθησίας για το κλινικό στέλεχος γένους *Nocardia* (Noc1). Ο έλεγχος ευαισθησίας έγινε πάλι με τη μέθοδο Kirby Bauer (Wallace και συνεργάτες 1983, Boiron και Brovosk 1990, Khan και συνεργάτες 2000, Isik και Ozdemir-Kocak 2009). Στα ίδια διαγράμματα αποδίδεται και η διάμετρος της αναστολής ανάπτυξης του στελέχους γένους *Nocardia* από τη δράση των βιοενεργών ουσιών των ενδογενών εδαφικών στελεχών γένους *Streptomyces*. Στην Εικόνα 3.9 εξετάστηκαν τα αντιβιοτικά με συγκέντρωση μικρότερη των 15 μg δισκίο⁻¹ ενώ στην Εικόνα 3.10 με συγκέντρωση μεγαλύτερη των 15 μg δισκίο⁻¹ και μικρότερη των 30 μg δισκίο⁻¹. Αναστολή ανάπτυξης παρατηρήθηκε από τα ενδογενή εδαφικά στελέχη *Streptomyces*, *Streptomyces* M33 (Σ-4), *Streptomyces* M5 (Σ-8), *Streptomyces* CAG 9/2 (Σ-11) και *Streptomyces* Vol 3 (Σ-15).

Η μεγαλύτερη ζώνη αναστολής δημιουργήθηκε από το περιβαλλοντικό στέλεχος *Streptomyces* M33 (Σ-4) με διάμετρο 34 mm.

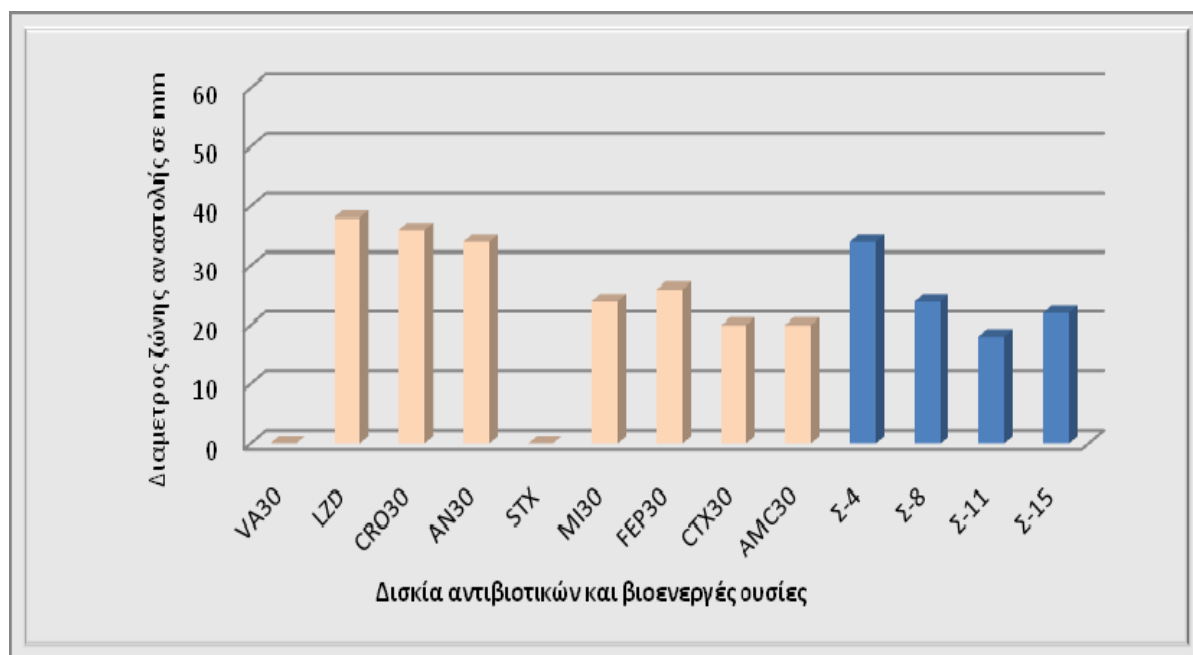
Η δράση των βιοενεργών ουσιών και των τεσσάρων ενδογενών στελεχών ήταν συγκρίσιμη με εκείνη των αντιβιοτικών της ομάδας B ενώ από τη A ομάδα μόνο η βιοενεργή ουσία του *Streptomyces* M33 (Σ-4) με διάμετρο ζώνης αναστολής 34 mm ήταν συγκρίσιμη με εκείνη των αντιβιοτικών IMP10 (36 mm) και NN10 (36 mm). Από τη B ομάδα η δράση του *Streptomyces* M33 (Σ-4) ήταν αντίστοιχου μεγέθους με τις διαμέτρους αναστολής της CRO30 και δραστικότερη των MI30, FEP30, CTX30 και AMC30 και της GM10 από την B ομάδα. Καμία αναστολή ανάστροφης δεν παρατηρήθηκε από τα αντιβιοτικά E15, RA5, CIP5 της ομάδας A και VA30, STX της ομάδας B.



Εικόνα 3.9 Σύγκριση δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών *Streptomyces* με ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (ομάδα A) για το κλινικό στέλεχος γένους *Nocardia* (Noc1) ■ E15: ερυθρομυκίνη συγκέντρωσης 15 μg δισκίο⁻¹, ■ GM10: γενταμυκίνη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, ■ RA5: ριφαμυκίνη συγκέντρωσης 5 μg δισκίο⁻¹, ■ CIP5 συγκέντρωσης 5 μg δισκίο⁻¹, ■ IMP10: ιμιπενέμη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, ■ NN10: τομπραμυκίνη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, ■ *Streptomyces* M33 (Σ-4), ■ *Streptomyces* M5 (Σ-8), ■ *Streptomyces* CAG 9/2 (Σ-11) και ■ *Streptomyces* Vol 3 (Σ-15)

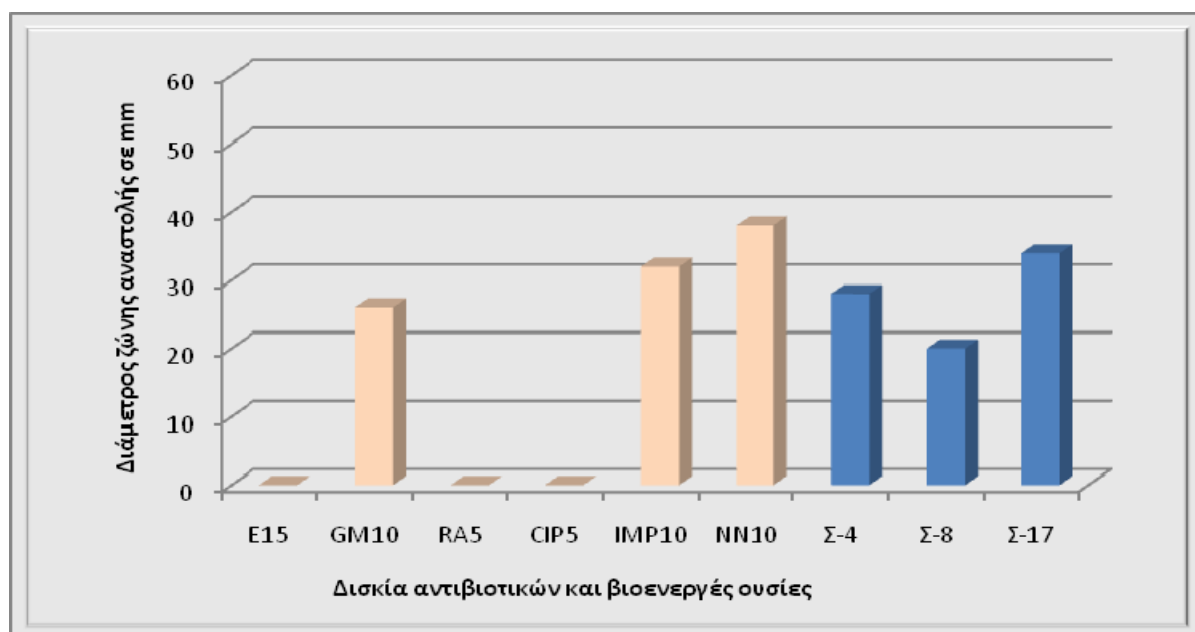
Στις Εικόνες 3.11 και 3.12 αποδίδεται η εξέταση ευαισθησίας για το κλινικό στέλεχος γένους *Nocardia* (Noc2). Στα ίδια διαγράμματα αποδίδεται και η διάμετρος της αναστολής ανάπτυξης του στελέχους γένους *Nocardia* από τη δράση των βιοενεργών ουσιών των ενδογενών εδαφικών στελεχών γένους *Streptomyces* και του πρότυπου στελέχους *S. chrestomyceticus* DSM 40545. Στην Εικόνα 3.11 εξετάστηκαν τα

αντιβιοτικά με συγκέντρωση μικρότερη των 15 μg δισκίο⁻¹ ενώ στην Εικόνα 3.12 με συγκέντρωση μεγαλύτερη των 15 μg δισκίο⁻¹ και μικρότερη των 30 μg δισκίο⁻¹.

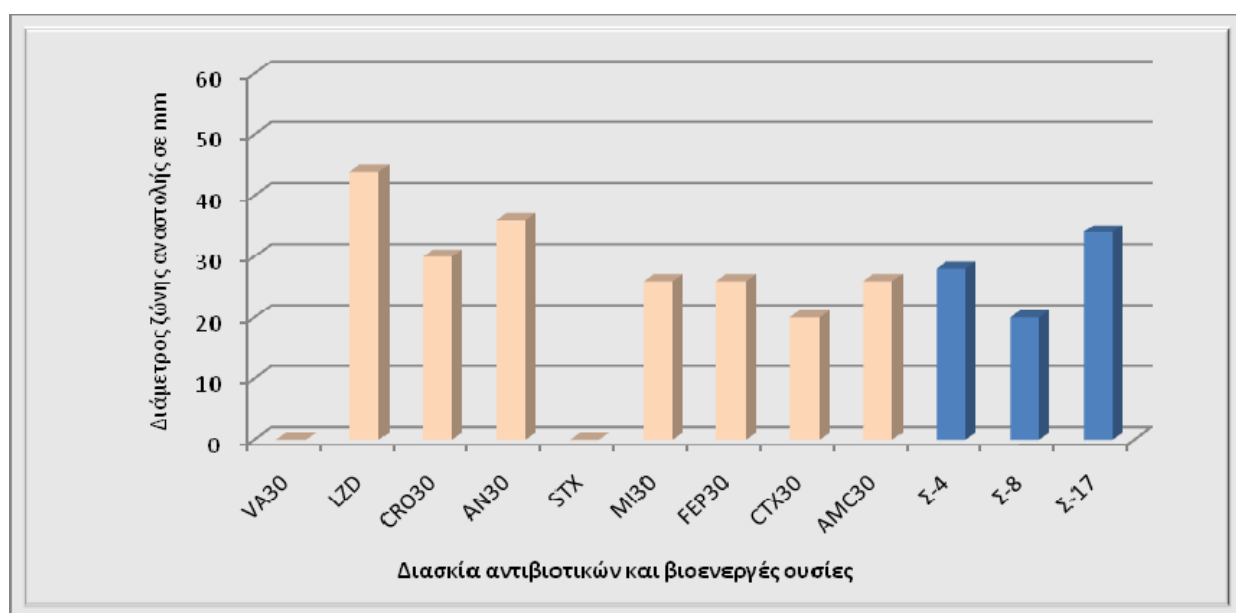


Εικόνα 3.10 Σύγκριση δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών *Streptomyces* με ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (ομάδα Β) για το κλινικό στέλεχος γένους *Nocardia* (Noc1) ■ VA30: βανκομυκίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ LZD: λινεζολίδη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ CRO30: χλωραμφαινικόλη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ AN30: αμικασίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ STX: σουλφομεθοξαζολη-τριμεθοπρινή συγκέντρωσης 23.75/1.25 μg δισκίο⁻¹, ■ MI30: μινोकυκλίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ FEP30: κεφεπίμη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ CTX30: κεφοταξίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ AMC30: αμοξικιλίνη-κλαβουλανικό συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ *Streptomyces* M33 (Σ-4), ■ *Streptomyces* M5 (Σ-8), ■ *Streptomyces* CAG 9/2 (Σ-11) και ■ *Streptomyces* Vol 3 (Σ-15)

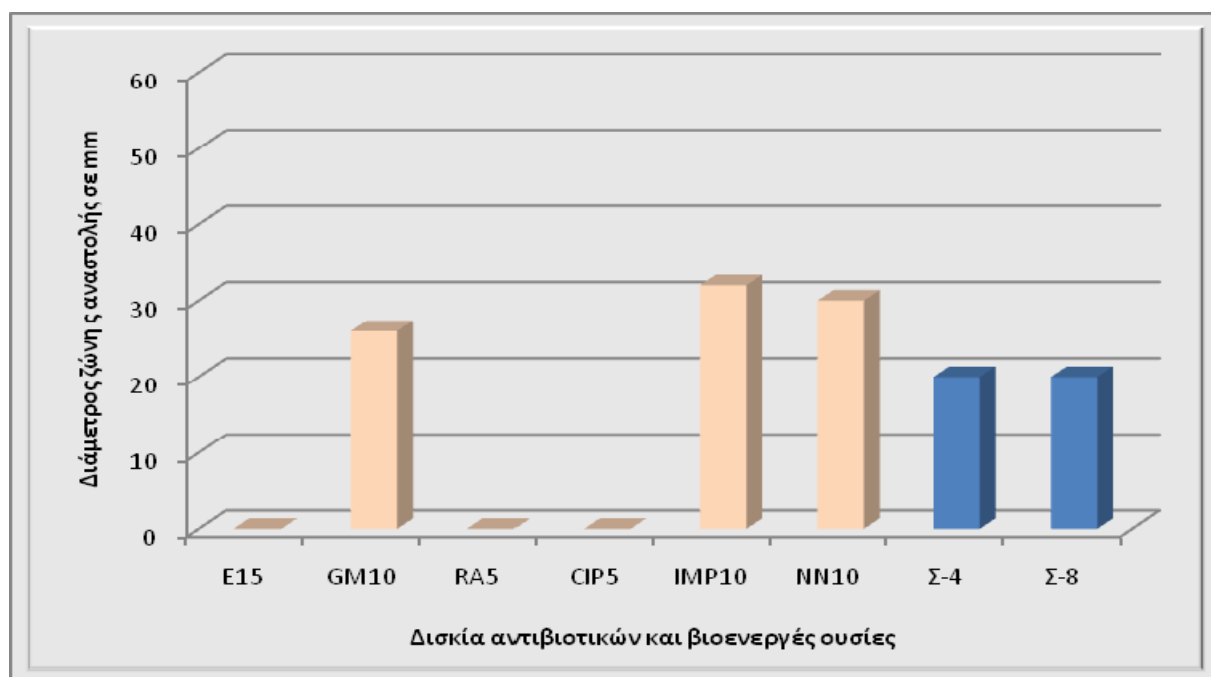
Αναστολή ανάπτυξης παρατηρήθηκε από τα ενδογενή εδαφικά στελέχη *Streptomyces* M33 (Σ-4), *Streptomyces* M5 (Σ-8) και το πρότυπο στέλεχος *S. chrestomyceticus* DSM 40545 (Σ-17). Η μεγαλύτερη ζώνη αναστολής δημιουργήθηκε από το *Streptomyces* M33 (Σ-4) με διάμετρο 28 mm. Η δράση των βιοενεργών ουσιών ήταν συγκρίσιμη με τη δράση της CRO30 (ζώνη αναστολής 30 mm) και μεγαλύτερη από εκείνη των αντιβιοτικών MI30, FEP30, CTX30 και AMC30 (αντιβιοτικά ομάδας Β). Από την ομάδα Α, καμία αναστολή δεν παρατηρήθηκε από τα αντιβιοτικά E15, RA5, CIP5 ενώ η διάμετρος αναστολής ανάπτυξης από το αντιβιοτικό GM10 ήταν μικρότερη από εκείνη της βιοενεργής ουσίας του *Streptomyces* M33 (Σ-4).



Εικόνα 3.11 Σύγκριση δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών *Streptomyces* με ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (ομάδα A) για το κλινικό στέλεχος γένους *Nocardia* (Noc2)
 ■ E15: ερυθρομυκίνη συγκέντρωσης 15 μg δισκίο⁻¹, ■ GM10: γενταμυκίνη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, ■ RA5: ριφαμυκίνη συγκέντρωσης 5 μg δισκίο⁻¹, ■ CIP5 συγκέντρωσης 5 μg δισκίο⁻¹, ■ IMP10: ιμιπενέμη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, ■ NN10: τομπραμυκίνη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, ■ *Streptomyces* M33 (Σ-4), ■ *Streptomyces* M5 (Σ-8) και ■ *Streptomyces chrestomyceticus* DSM 40545 3 (Σ-17)



Εικόνα 3.12 Σύγκριση δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών *Streptomyces* με ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (ομάδα B) για το κλινικό στέλεχος γένους *Nocardia* (Noc2)
 ■ VA30: βανκομυκίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ LZD: λινεζολίδη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ CRO30: χλωραμφαινικόλη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ AN30: αμικασίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ STX: σουλφομεθοξαζολη-τριμεθοπρινή συγκέντρωσης 23.75/1.25 μg δισκίο⁻¹, ■ MI30: μινोकυκλίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ FEP30: κεφεπίμη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ CTX30: κεφοταξίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ AMC30: αμοξυκιλίνη-κλαβουλανικό συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ *Streptomyces* M33 (Σ-4), ■ *Streptomyces* M5 (Σ-8) και ■ *Streptomyces chrestomyceticus* DSM 40545 3 (Σ-17)

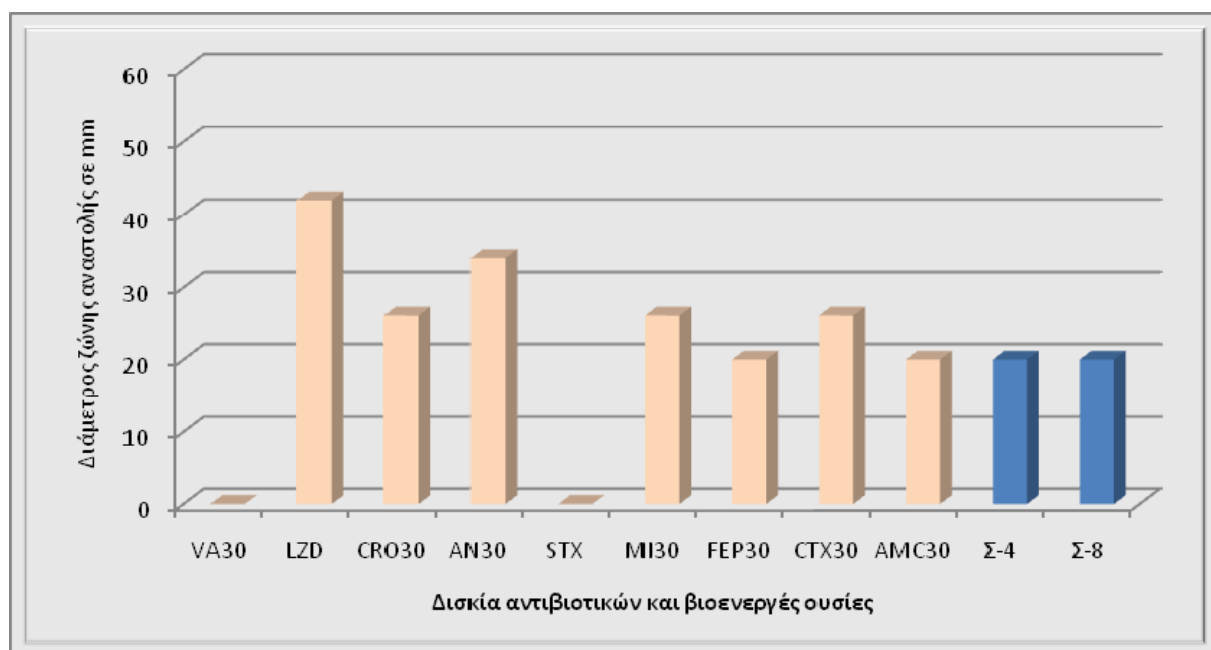


Εικόνα 3.13 Σύγκριση δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών *Streptomyces* με ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (ομάδα Α) για το κλινικό στέλεχος γένους *Nocardia* (Noc3)

■ E15: ερυθρομυκίνη συγκέντρωσης 15 μg δισκίο⁻¹, ■ GM10: γενταμυκίνη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, ■ RA5: ριφαμυκίνη συγκέντρωσης 5 μg δισκίο⁻¹, ■ CIP5 συγκέντρωσης 5 μg δισκίο⁻¹, ■ IMP10: ιμιπενέμη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, ■ NN10: τομπραμυκίνη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, ■ *Streptomyces* M33 (Σ-4), ■ *Streptomyces* M5 (Σ-8)

Στις Εικόνες 3.13 και 3.14 αποδίδεται η εξέταση ευαισθησίας για το κλινικό στέλεχος γένους *Nocardia* (Noc3). Στα ίδια διαγράμματα αποδίδεται και η διάμετρος της αναστολής ανάπτυξης του στελέχους γένους *Nocardia* από τη δράση των βιοενεργών ουσιών των ενδογενών εδαφικών στελεχών γένους *Streptomyces*. Στην Εικόνα 3.13 εξετάστηκαν τα αντιβιοτικά με συγκέντρωση μικρότερη των 15 μg δισκίο⁻¹ ενώ στην Εικόνα 3.14 με συγκέντρωση μεγαλύτερη των 15 μg δισκίο⁻¹ και μικρότερη των 30 μg δισκίο⁻¹.

Αναστολή ανάπτυξης παρατηρήθηκε από τα ενδογενή εδαφικά στελέχη *Streptomyces* M33 (Σ-4) και *Streptomyces* M5 (Σ-8) με διάμετρο ζώνης αναστολής ανάπτυξης 20 mm. Από τα αντιβιοτικά της ομάδας Α τα E15, RA5, CIP5 δεν προκάλεσαν αναστολή του κλινικού στελέχους ενώ η διάμετρος της βιοενεργής ουσίας ήταν 20 mm. Από τα αντιβιοτικά της ομάδας Β, η μεγαλύτερη ζώνη αναστολής (42 mm) σχηματίστηκε από το δισκίο της LZD, διπλάσια της διαμέτρου των βιοενεργών ουσιών οι οποίες όμως ήταν συγκρίσιμες με τη δράση των FEP30 και CTX30.

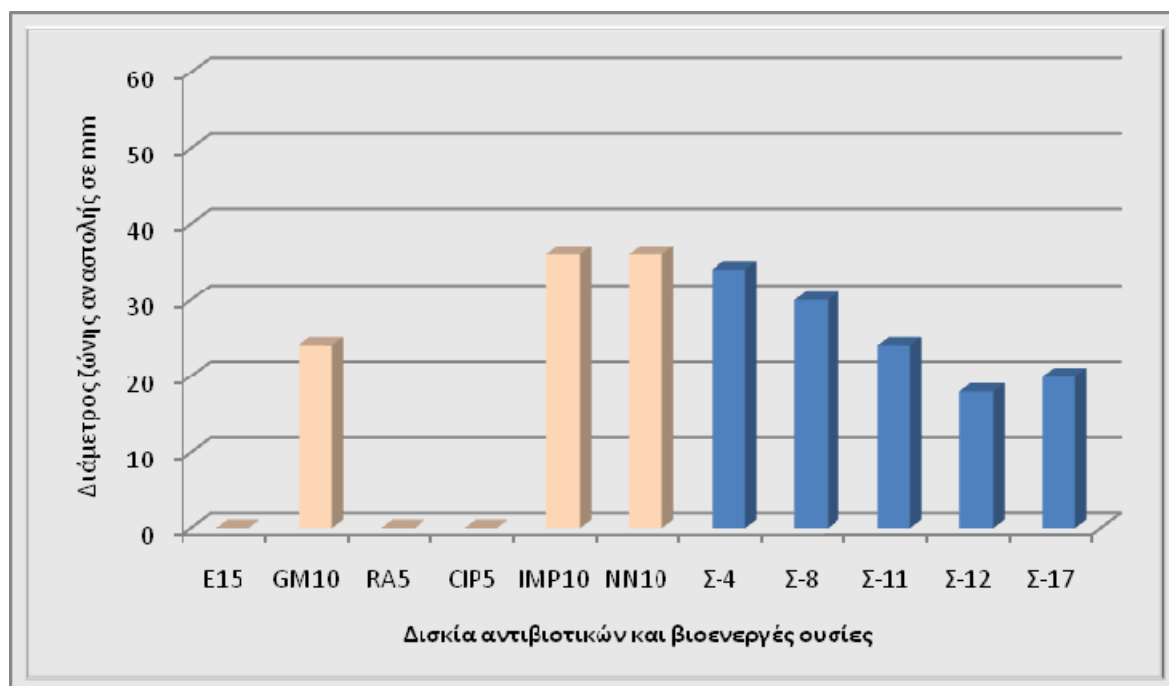


Εικόνα 3.14 Σύγκριση δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών *Streptomyces* με ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (ομάδα Β) για το κλινικό στέλεχος γένους *Nocardia* (Noc3)

■ VA30: βανκομυκίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ LZD: λινεζολίδη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ CRO30: χλωραμφαινικόλη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ AN30: αμικασίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ STX: σουλφομεθοξαζολη-τριμεθοπρινή συγκέντρωσης 23.75/1.25 μg δισκίο⁻¹, ■ MI30: μινोकυκλίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ FEP30: κεφεπίμη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ CTX30: κεφοταξίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ AMC30: αμοξικιλίνη-κλαβουλανικό συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ *Streptomyces* M33 (Σ-4), ■ *Streptomyces* M5 (Σ-8)

Στις Εικόνες 3.15 και 3.16 αποδίδεται η εξέταση ευαισθησίας για το κλινικό στέλεχος γένους *Nocardia* (Noc4). Στα ίδια διαγράμματα αποδίδεται και η διάμετρος της αναστολής ανάπτυξης του στελέχους γένους *Nocardia* από τη δράση των βιοενεργών ουσιών των ενδογενών εδαφικών στελεχών γένους *Streptomyces* και του πρότυπου στελέχους *S. chrestomyceticus* DSM 40545. Στην Εικόνα 3.15 εξετάστηκαν τα αντιβιοτικά με συγκέντρωση μικρότερη των 15 μg δισκίο⁻¹ ενώ στην Εικόνα 3.16 με συγκέντρωση μεγαλύτερη των 15 μg δισκίο⁻¹ και μικρότερη των 30 μg δισκίο⁻¹. Αναστολή ανάπτυξης παρατηρήθηκε από τα ενδογενή εδαφικά στελέχη *Streptomyces* M33 (Σ-4), *Streptomyces* M5 (Σ-8), *Streptomyces* CAG 9/2 (Σ-11), *Streptomyces* CAG 13/2 (Σ-12) και το προτυπο στέλεχος *S. chrestomyceticus* DSM 40545 (Σ-17). Η μεγαλύτερη ζώνη αναστολής δημιουργήθηκε από το περιβαλλοντικό *Streptomyces* M33 (Σ-4) με διάμετρο 34 mm. Από τα αντιβιοτικά της ομάδας Α η μεγαλύτερη διάμετρος αναστολής ανάπτυξης δημιουργήθηκε από τα δισκία IMP10, NN10 (36 mm) ενώ η βιοενεργές ουσίες δημιούργησαν διαμέτρους 34 mm. Από τα αντιβιοτικά της ομάδας Β, η μεγαλύτερη ζώνη αναστολής (46 mm) σχηματίστηκε από το δισκίο της LZD. Παρατηρήθηκε ότι η δράση της βιοενεργής ένωσης του *Streptomyces* M33

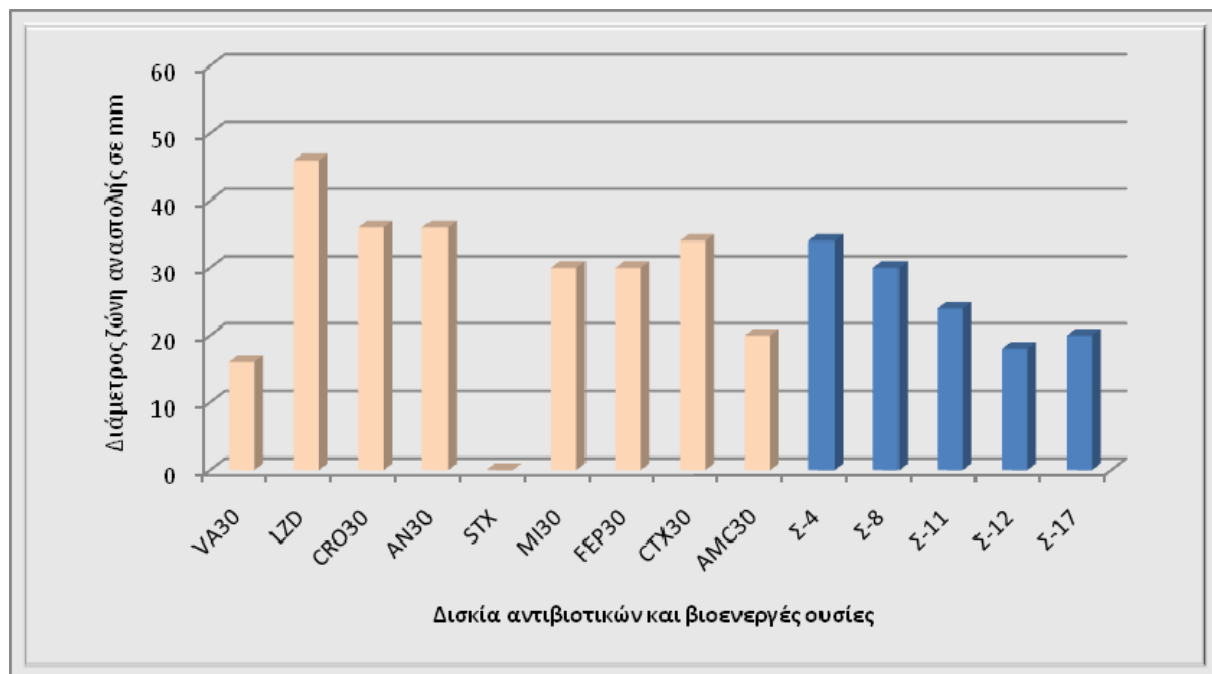
(Σ-4) ήταν συγκρίσιμη με τη δράση της CRO30 και AN30 και μεγαλύτερη από εκείνη των αντιβιοτικών VA30, MI30, FEP30 και AMC30.



Εικόνα 3.15 Σύγκριση δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών *Streptomyces* με ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (ομάδα Α) για το κλινικό στέλεχος γένους *Nocardia* (Noc4) ■ E15: ερυθρομυκίνη συγκέντρωσης 15 μg δισκίο⁻¹, ■ GM10: γενταμυκίνη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, ■ RA5: ριφαμυκίνη συγκέντρωσης 5 μg δισκίο⁻¹, ■ CIP5 συγκέντρωσης 5 μg δισκίο⁻¹, ■ IMP10: ιμιπενέμη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, ■ NN10: τομπραμυκίνη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, ■ *Streptomyces* M33 (Σ-4), ■ *Streptomyces* M5 (Σ-8), ■ *Streptomyces* CAG 9/2 (Σ-11), ■ *Streptomyces* CAG 13/2 (Σ-12) ■ *S. chrestomyceticus* DSM 40545 (Σ-17)

Στις Εικόνες 3.17 και 3.18 αποδίδεται η εξέταση ευαισθησίας για το κλινικό στέλεχος γένους *Nocardia* (Noc5). Στα ίδια διαγράμματα αποδίδεται και η διάμετρος της αναστολής ανάπτυξης του στελέχους γένους *Nocardia* από τη δράση των βιοενεργών ουσιών των ενδογενών εδαφικών στελεχών γένους *Streptomyces*. Στην Εικόνα 3.17 εξετάστηκαν τα αντιβιοτικά με συγκέντρωση μικρότερη των 15 μg δισκίο⁻¹ ενώ στην Εικόνα 3.18 με συγκέντρωση μεγαλύτερη των 15 μg δισκίο⁻¹ και μικρότερη των 30 μg δισκίο⁻¹. Αναστολή ανάπτυξης παρατηρήθηκε από τα ενδογενή εδαφικά στελέχη *Streptomyces* M33 (Σ-4), *Streptomyces* M5 (Σ-8), *Streptomyces* CAG 13/2 (Σ-12) και *Streptomyces* M56 (Σ-16). Η μεγαλύτερη ζώνη αναστολής δημιουργήθηκε από το περιβαλλοντικό *Streptomyces* M33 (Σ-8) με διάμετρο 28 mm. Από τα αντιβιοτικά της ομάδας Α, η μεγαλύτερη διάμετρος αναστολής ανάπτυξης δημιουργήθηκε από τα δισκία αντιβιοτικών IMP10, NN10 (36 mm) ενώ η διάμετρος της βιοενεργής ουσίας ήταν 28 mm. Τα E15, RA5, CIP5 δεν προκάλεσαν καμία αναστολή ανάπτυξης. Από

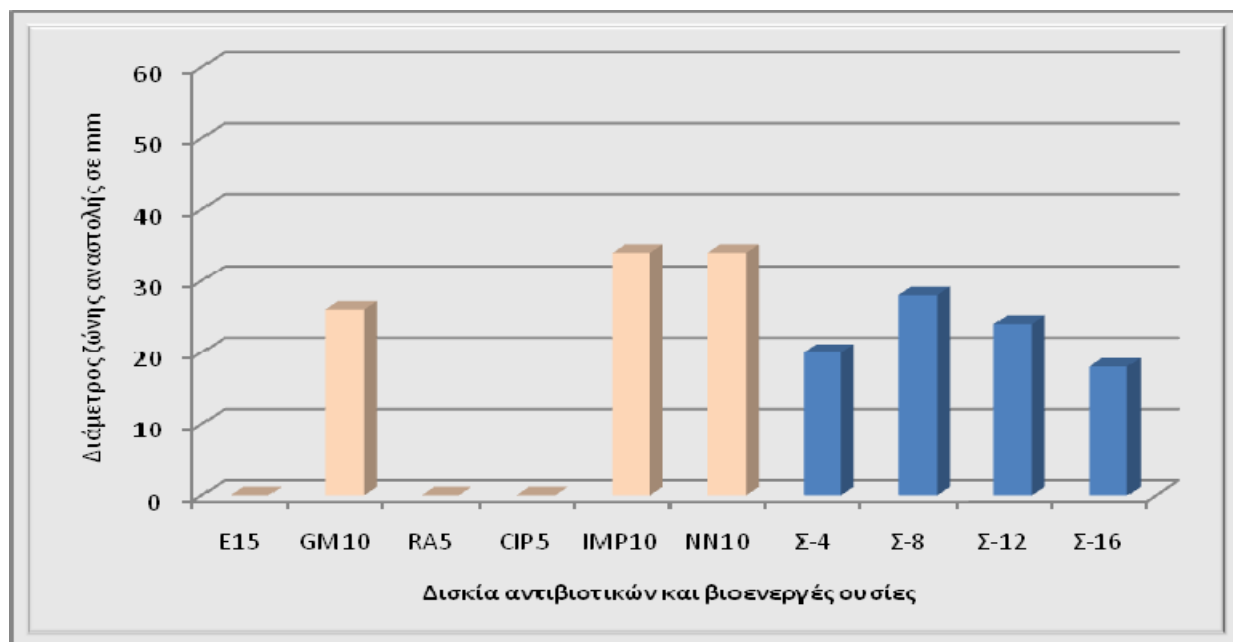
τα αντιβιοτικά της ομάδας Β, η μεγαλύτερη ζώνη αναστολής (40 mm) σχηματίστηκε από τα δισκία της LZD και CTX30. Η δράση της βιοενεργής ουσίας ήταν μεγαλύτερη από εκείνη των VA30, MI30, FEP30 και AMC30 της ομάδας Β.



Εικόνα 3.16 Σύγκριση δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών *Streptomyces* με ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (ομάδα Β) για το κλινικό στέλεχος γένους *Nocardia* (Noc4)

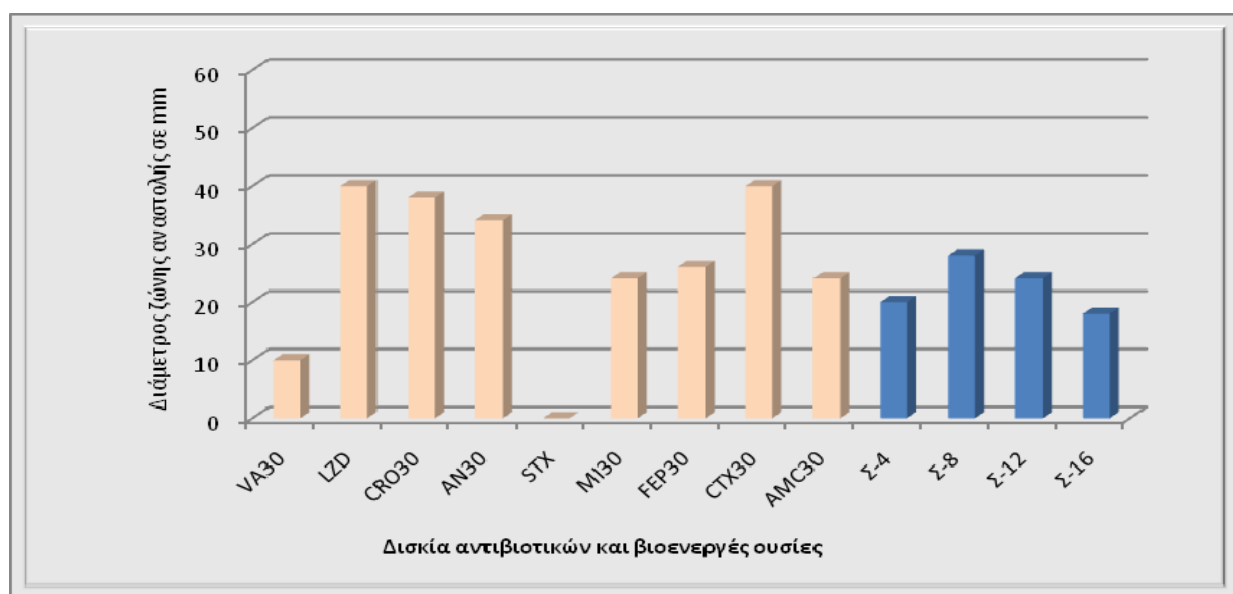
■ VA30: βανκομυκίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ LZD: λινεζολίδη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ CRO30: χλωραμφαινικόλη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ AN30: αμικασίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ STX: σουλφομεθοξαζολη-τριμεθοπρινή συγκέντρωσης 23.75/1.25 μg δισκίο⁻¹, ■ MI30: μινोकυκλίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ FEP30: κεφεπίμη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ CTX30: κεφοταξίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ AMC30: αμοξυκιλίνη-κλαβουλανικό συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ *Streptomyces* M33 (Σ-4), ■ *Streptomyces* M5 (Σ-8), ■ *Streptomyces* CAG 9/2 (Σ-11), ■ *Streptomyces* CAG 13/2 (Σ-12) ■ *S. chrestomyceticus* DSM 40545 (Σ-17)

Στις Εικόνες 3.19 και 3.20 αποδίδεται η εξέταση ευαισθησίας για το κλινικό στέλεχος γένους *Nocardia* (1KAT). Στα ίδια διαγράμματα αποδίδεται και η διάμετρος της αναστολής ανάπτυξης του στελέχους γένους *Nocardia* από τη δράση των βιοενεργών ουσιών των ενδογενών εδαφικών στελεχών γένους *Streptomyces* και το πρότυπο στέλεχος *S. chrestomyceticus* DSM 40545.



Εικόνα 3.17 Σύγκριση δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών *Streptomyces* με ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (ομάδα Α) για το κλινικό στέλεχος γένους *Nocardia* (Noc5)

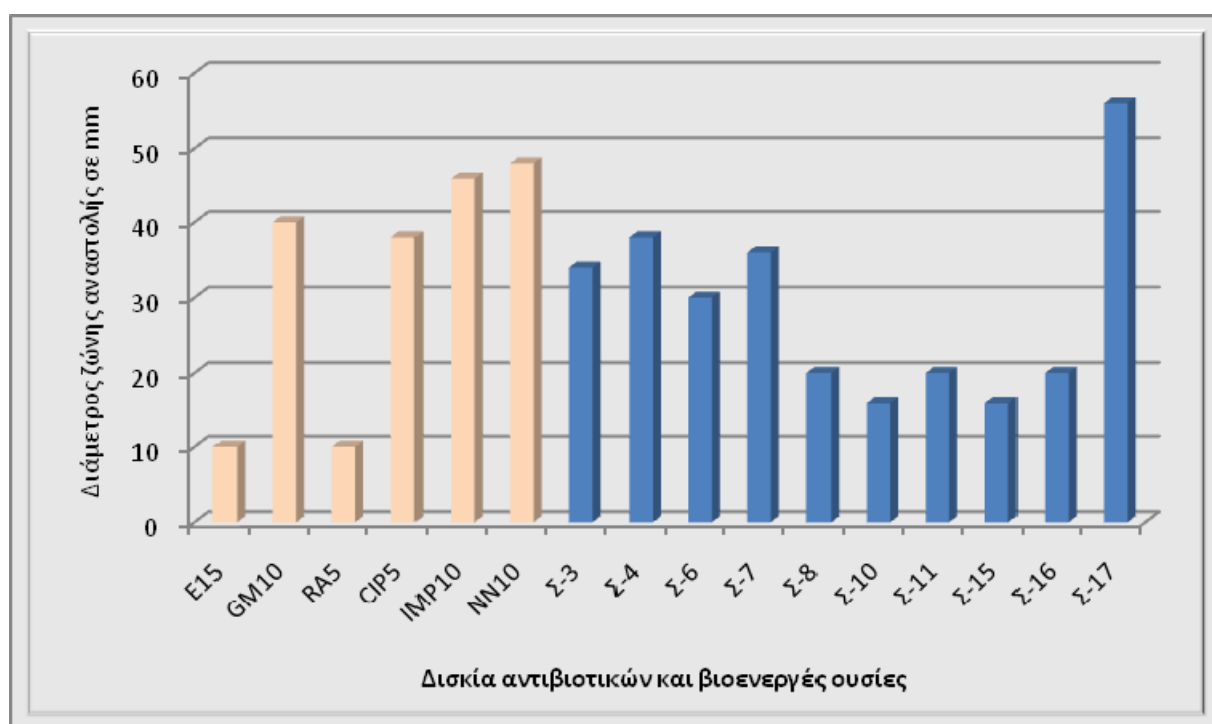
■ E15: ερυθρομυκίνη συγκέντρωσης 15 μg δισκίο⁻¹, ■ GM10: γενταμυκίνη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, ■ RA5: ριφαμυκίνη συγκέντρωσης 5 μg δισκίο⁻¹, ■ CIP5 συγκέντρωσης 5 μg δισκίο⁻¹, ■ IMP10: μιπενέμη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, ■ NN10: τομπραμυκίνη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, ■ *Streptomyces* M33 (Σ-4), ■ *Streptomyces* M5 (Σ-8), ■ *Streptomyces* CAG 13/2 (Σ-12) και ■ *Streptomyces* M56 (Σ-16)



Εικόνα 3.18 Σύγκριση δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών *Streptomyces* με ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (ομάδα Β) για το κλινικό στέλεχος γένους *Nocardia* (Noc5)

■ VA30: βανκομυκίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ LZD: λινεζολίδα συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ CRO30: χλωραμφαινικόλη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ AN30: αμικασίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ STX: σουλφομεθοξαζολη-τριμεθοπρινή συγκέντρωσης 23.75/1.25 μg δισκίο⁻¹, ■ MI30: μινοκυκλίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ FEP30: κεφεπίμη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ CTX30: κεφοταξίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ AMC30: αμοξυκλίνη-κλαβουλανικό συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ *Streptomyces* M33 (Σ-4), ■ *Streptomyces* M5 (Σ-8), ■ *Streptomyces* CAG 13/2 (Σ-12) και ■ *Streptomyces* M56 (Σ-16)

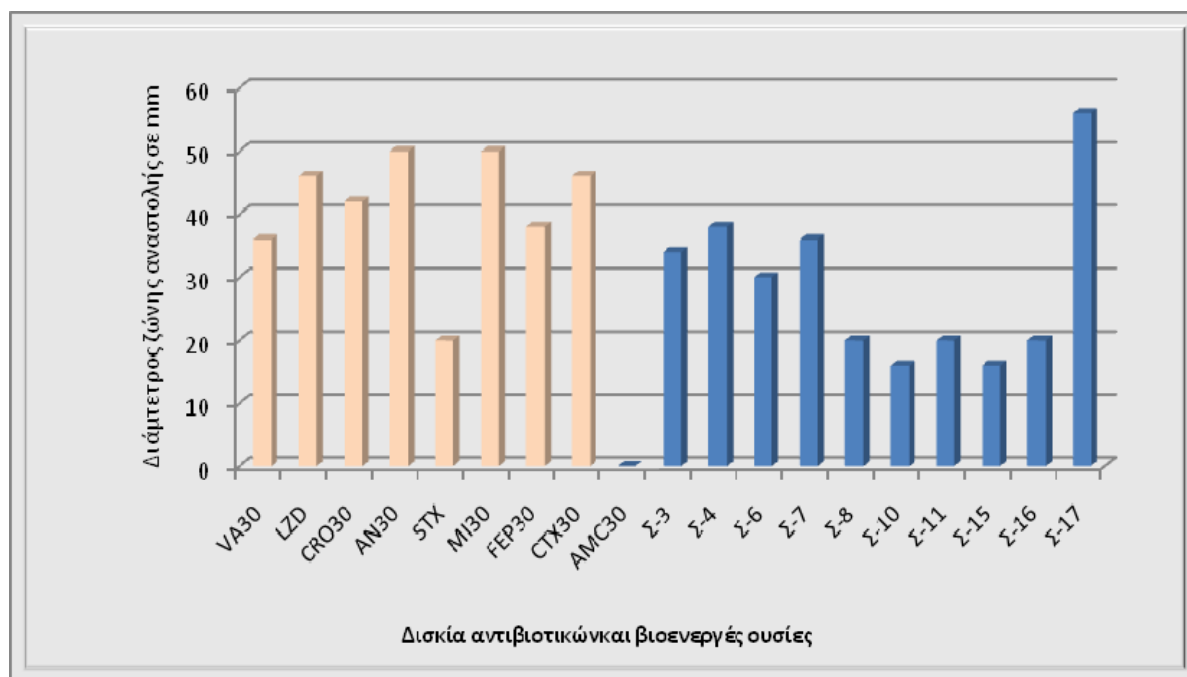
Στην Εικόνα 3.19 εξετάστηκαν τα αντιβιοτικά με συγκέντρωση μικρότερη των 15 μg δισκίο⁻¹ ενώ στην Εικόνα 3.20 με συγκέντρωση μεγαλύτερη των 15 μg δισκίο⁻¹ και μικρότερη των 30 μg δισκίο⁻¹. Αναστολή ανάπτυξης παρατηρήθηκε από τα ενδογενή εδαφικά στελέχη *Streptomyces* M53 (Σ-3), *Streptomyces* M33 (Σ-4), *Streptomyces* M17 (Σ-6), *Streptomyces* M16 (Σ-7), *Streptomyces* M5 (Σ-8), *Streptomyces* CAG 9 (Σ-10), *Streptomyces* CAG 9/2 (Σ-11), *Streptomyces* Vol 3 (Σ-15), *Streptomyces* M56 (Σ-16) και το πρότυπο στέλεχος *Streptomyces chrestomyceticus* DSM 40545 (Σ-17).



Εικόνα 3.19 Σύγκριση δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών *Streptomyces* με ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (ομάδα Α) για το κλινικό στέλεχος γένους *Nocardia* (1KAT) ■ E15: ερυθρομυκίνη συγκέντρωσης 15 μg δισκίο⁻¹, ■ GM10: γενταμυκίνη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, ■ RA5: ριφαμυκίνη συγκέντρωσης 5 μg δισκίο⁻¹, ■ CIP5 συγκέντρωσης 5 μg δισκίο⁻¹, ■ IMP10: ιμιπενέμη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, ■ NN10: τομπραμυκίνη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, ■ *Streptomyces* M53 (Σ-3), ■ *Streptomyces* M33 (Σ-4), ■ *Streptomyces* M17 (Σ-6), ■ *Streptomyces* M16 (Σ-7), ■ *Streptomyces* M5 (Σ-8), ■ *Streptomyces* CAG 9 (Σ-10), ■ *Streptomyces* CAG 9/2 (Σ-11), ■ *Streptomyces* Vol 3 (Σ-15), ■ *Streptomyces* M56 (Σ-16) ■ *Streptomyces chrestomyceticus* DSM 40545 (Σ-17)

Οι μεγαλύτερες ζώνες αναστολής δημιουργήθηκαν από τα στελέχη *S. chrestomyceticus* DSM 40545 (Σ-17) με διάμετρο 56 mm και το *Streptomyces* M33 (Σ-4) με διάμετρο 38 mm. Από τα αντιβιοτικά της ομάδας Α, η μεγαλύτερη διάμετρος σημειώθηκε από το δισκίο αντιβιοτικού NN10 (48 mm) ενώ η δράση των βιοενεργών ουσιών ήταν συγκρίσιμη με εκείνη των GM10 και IMP10 και μεγαλύτερη των E15,

CIP5. Από τις δυο ομάδες αντιβιοτικών, η δράση των βιοενεργών ουσιών ήταν συγκρίσιμη με εκείνη της ομάδας Α.

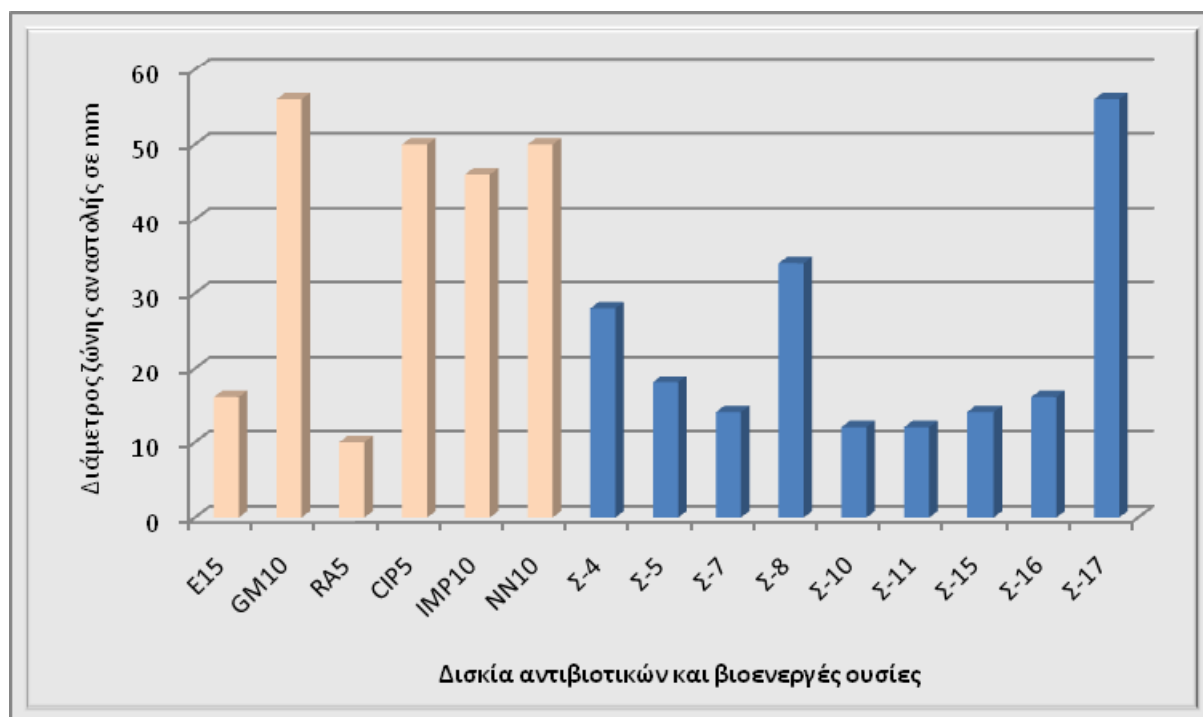


Εικόνα 3.20 Σύγκριση δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών *Streptomyces* με ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (ομάδα Β) για το κλινικό στέλεχος γένους *Nocardia* (1KAT)
 ■ VA30: βανκομυκίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ LZD: λινεζολίδα συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ CRO30: χλωραμφαινικόλη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ AN30: αμικασίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ STX: σουλφομεθοξαζολη-τριμεθοπρινή συγκέντρωσης 23.75/1.25 μg δισκίο⁻¹, ■ MI30: μινोकυκλίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ FEP30: κεφεπίμη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ CTX30: κεφοταξίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ AMC30: αμοξικιλίνη-κλαβουλανικό συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹ ■ *Streptomyces* M53 (Σ-3), ■ *Streptomyces* M33 (Σ-4), ■ *Streptomyces* M17 (Σ-6), ■ *Streptomyces* M16 (Σ-7), ■ *Streptomyces* M5 (Σ-8), ■ *Streptomyces* CAG 9 (Σ-10), ■ *Streptomyces* CAG 9/2 (Σ-11), ■ *Streptomyces* Vol 3 (Σ-15), ■ *Streptomyces* M56 (Σ-16) ■ *Streptomyces chrestomyceticus* DSM 40545 (Σ-17)

Στις Εικόνες 3.21 και 3.22 αποδίδεται η εξέταση ευαισθησίας για το κλινικό στέλεχος γένους *Nocardia* (4KAT). Στα ίδια διαγράμματα αποδίδεται και η διάμετρος της αναστολής ανάπτυξης του στελέχους γένους *Nocardia* από τη δράση των βιοενεργών ουσιών των ενδογενών εδαφικών στελεχών γένους *Streptomyces* και το πρότυπο στέλεχος *S. chrestomyceticus* DSM 40545. Στην Εικόνα 3.21 εξετάστηκαν τα αντιβιοτικά με συγκέντρωση μικρότερη των 15 μg δισκίο⁻¹ ενώ στην Εικόνα 3.22 με συγκέντρωση μεγαλύτερη των 15 μg δισκίο⁻¹ και μικρότερη των 30 μg δισκίο⁻¹.

Αναστολή ανάπτυξης παρατηρήθηκε από τα ενδογενή εδαφικά στελέχη *Streptomyces* M33 (Σ-4), *Streptomyces* sp M 24 (Σ-5), *Streptomyces* M16 (Σ-7), *Streptomyces* M5 (Σ-8), *Streptomyces* CAG 9 (Σ-10), *Streptomyces* CAG 9/2 (Σ-11), *Streptomyces* Vol

3 (Σ-15), *Streptomyces* M56 (Σ-16) και το πρότυπο στέλεχος *S. chrestomyceticus* DSM 40545 (Σ-17).



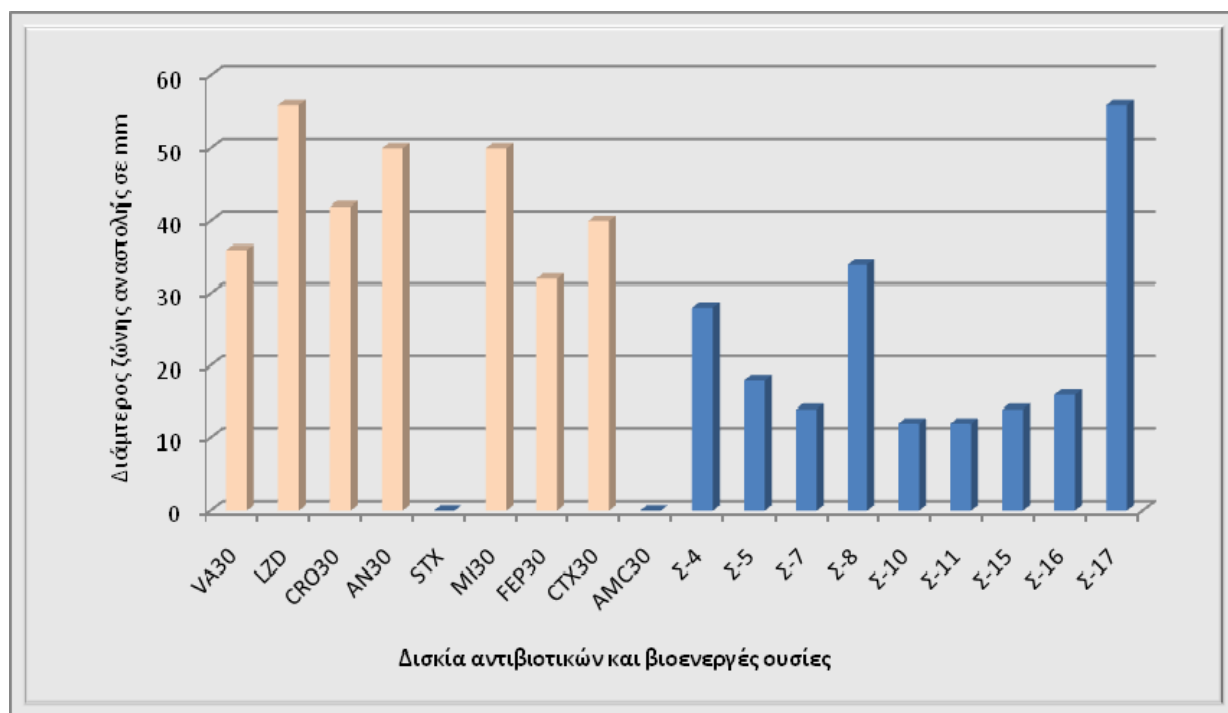
Εικόνα 3.21 Σύγκριση δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών *Streptomyces* με ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (ομάδα Α) για το κλινικό στέλεχος γένους *Nocardia* (4KAT)

■ E15: ερυθρομυκίνη συγκέντρωσης 15 μg δισκίο⁻¹, ■ GM10: γενταμυκίνη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, ■ RA5: ριφαμυκίνη συγκέντρωσης 5 μg δισκίο⁻¹, ■ CIP5 συγκέντρωσης 5 μg δισκίο⁻¹, ■ IMP10: ιμιπενέμη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, ■ NN10: τομπραμυκίνη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹ ■ *Streptomyces* M33 (Σ-4), ■ *Streptomyces* sp M 24 (Σ-5), ■ *Streptomyces* M16 (Σ-7), *Streptomyces* M5 (Σ-8), ■ *Streptomyces* CAG 9 (Σ-10), ■ *Streptomyces* CAG 9/2 (Σ-11), ■ *Streptomyces* Vol 3 (Σ-15), ■ *Streptomyces* M56 (Σ-16) ■ *S. chrestomyceticus* DSM 40545 (Σ-17)

Οι μεγαλύτερες ζώνες αναστολής δημιουργήθηκαν από τα στελέχη *S. chrestomyceticus* DSM 40545 (Σ-17) με διάμετρο 56 mm και το *Streptomyces* M5 (Σ-8) με διάμετρο 34 mm. Από τα αντιβιοτικά της ομάδας Α, η μεγαλύτερη διάμετρος σημειώθηκε από το δισκίο αντιβιοτικού GM10 με διάμετρο ζώνης αναστολής ανάπτυξης 34 mm. Η δράση των βιοενεργών ουσιών ήταν μεγαλύτερη από εκείνη των E15 και RA5 της ομάδας Α.

Στις Εικόνες 3.23 και 3.24 αποδίδεται η εξέταση ευαισθησίας για το κλινικό στέλεχος γένους *Nocardia* (5KAT). Στα ίδια διαγράμματα αποδίδεται και η διάμετρος της αναστολής ανάπτυξης του στελέχους γένους *Nocardia* από τη δράση των βιοενεργών ουσιών των ενδογενών εδαφικών στελεχών γένους *Streptomyces* και του πρότυπο στέλεχος *S. chrestomyceticus* DSM 40545. Στην Εικόνα 3.23 εξετάστηκαν τα

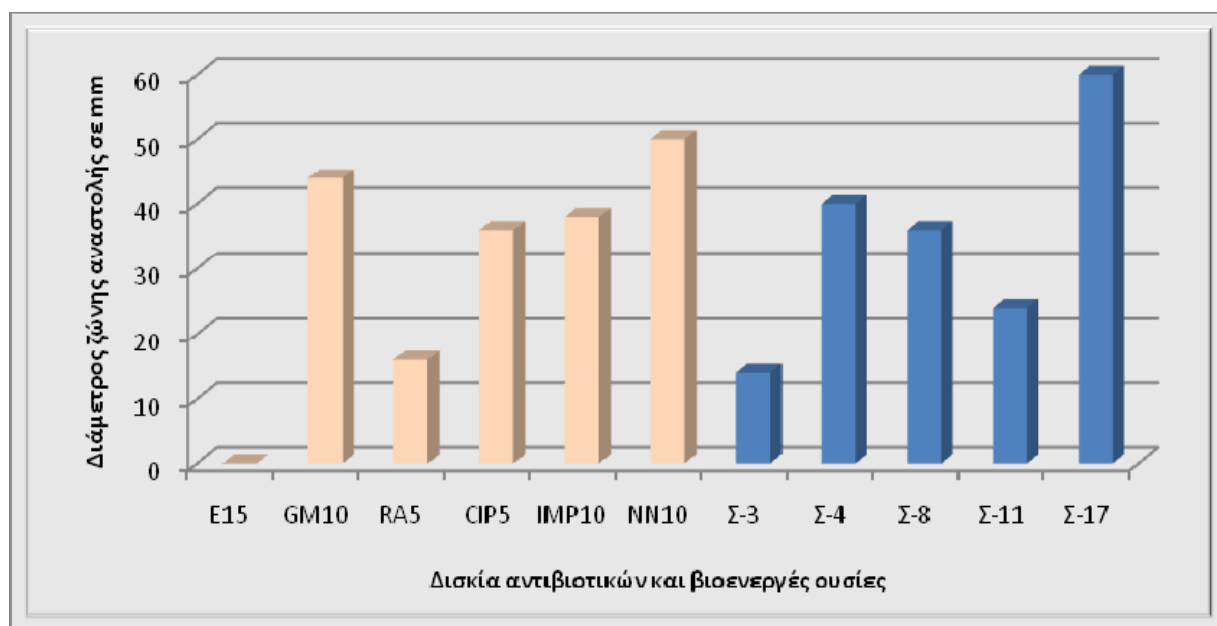
αντιβιοτικά με συγκέντρωση μικρότερη των 15 μg δισκίο⁻¹ ενώ στην Εικόνα 3.24 με συγκέντρωση μεγαλύτερη των 15 μg δισκίο⁻¹ και μικρότερη των 30 μg δισκίο⁻¹.



Εικόνα 3.22 Σύγκριση δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών *Streptomyces* με ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (ομάδα Β) για το κλινικό στέλεχος γένους *Nocardia* (4KAT)

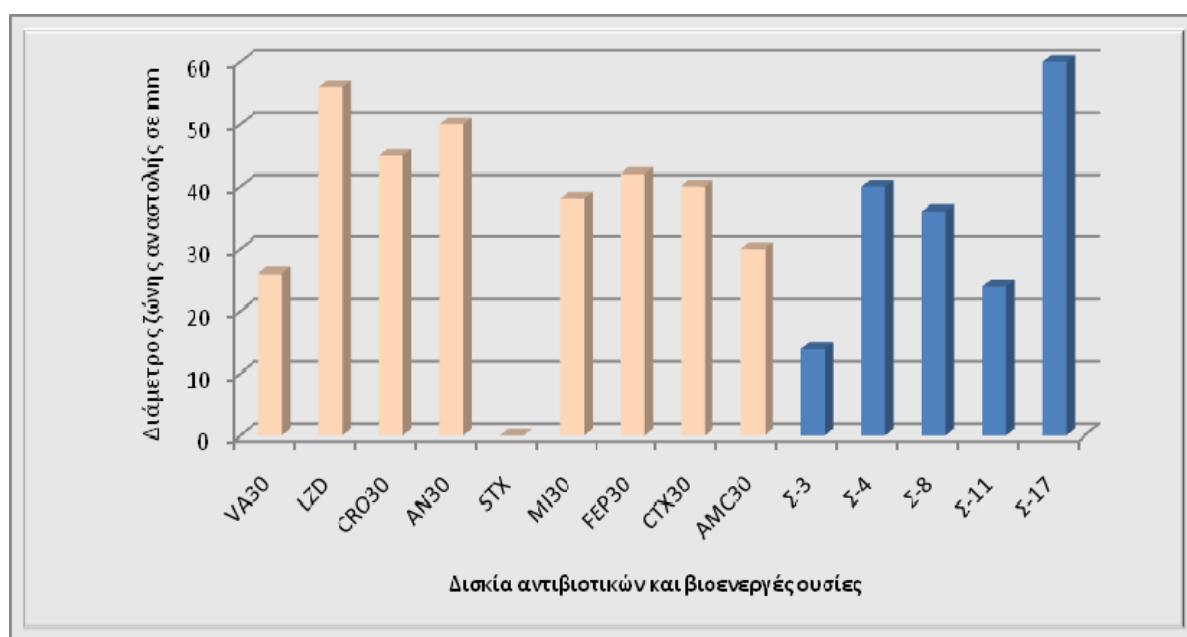
■ VA30: βανκομυκίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ LZD: λινεζολίδη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ CRO30: χλωραμφαινικόλη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ AN30: αμικασίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ STX: σουλφομεθοξαζολη-τριμεθοπρινή συγκέντρωσης 23.75/1.25 μg δισκίο⁻¹, ■ MI30: μινोकυκλίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ FEP30: κεφεπίμη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ CTX30: κεφοταξίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹ ■ AMC30: αμοξυκλίνη-κλαβουλανικό συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹ ■ *Streptomyces* M33 (Σ-4), ■ *Streptomyces* sp M 24 (Σ-5), ■ *Streptomyces* M16 (Σ-7), *Streptomyces* M5 (Σ-8), ■ *Streptomyces* CAG 9 (Σ-10), ■ *Streptomyces* CAG 9/2 (Σ-11), ■ *Streptomyces* Vol 3 (Σ-15), ■ *Streptomyces* M56 (Σ-16) ■ *S. chrestomyceticus* DSM 40545 (Σ-17)

Αναστολή ανάπτυξης παρατηρήθηκε από τα ενδογενή εδαφικά στελέχη *Streptomyces* M53 (Σ-3), *Streptomyces* M33 (Σ-4), *Streptomyces* M5 (Σ-8), *Streptomyces* CAG 9/2 (Σ-11) και το πρότυπο στέλεχος *S. chrestomyceticus* DSM 40545 (Σ-17). Οι μεγαλύτερες ζώνες αναστολής δημιουργήθηκαν από τα στελέχη *S. chrestomyceticus* DSM 40545 (Σ-17) με διάμετρο ζώνης αναστολής ανάπτυξης 60 mm και το *Streptomyces* M33 (Σ-4) με διάμετρο ζώνης αναστολής ανάπτυξης 40 mm. Από τα αντιβιοτικά της ομάδας Α, η μεγαλύτερη διάμετρος σημειώθηκε από το δισκίο αντιβιοτικού NN10 (50 mm) ενώ από τα αντιβιοτικά της ομάδας Β η μεγαλύτερη ζώνη αναστολής δημιουργήθηκε από το αντιβιοτικό LZD (56 mm). Η δράση των βιοενεργών ουσιών ήταν συγκρίσιμη με εκείνη των αντιβιοτικών της ομάδας Β.



Εικόνα 3.23 Σύγκριση δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών *Streptomyces* με ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (ομάδα Α) για το κλινικό στέλεχος γένους *Nocardia* (5KAT)

■ E15: ερυθρομυκίνη συγκέντρωσης 15 μg δισκίο⁻¹, ■ GM10: γενταμυκίνη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, ■ RA5: ριφαμυκίνη συγκέντρωσης 5 μg δισκίο⁻¹, ■ CIP5 συγκέντρωσης 5 μg δισκίο⁻¹, ■ IMP10: ιμιπενέμη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, ■ NN10: τομπραμυκίνη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹ ■ *Streptomyces* M53 (Σ-3), ■ *Streptomyces* M33 (Σ-4), ■ *Streptomyces* M5 (Σ-8), ■ *Streptomyces* CAG 9/2 (Σ-11) ■ *S. chrestomyceticus* DSM 40545 (Σ-17)

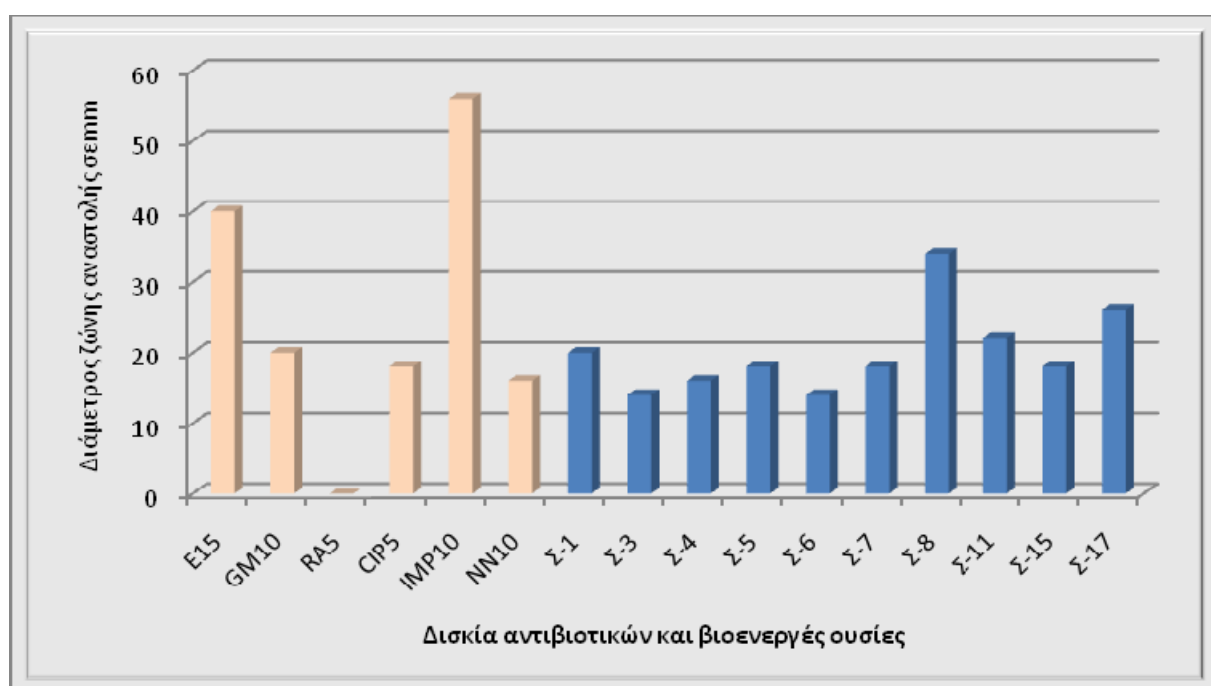


Εικόνα 3.24 Σύγκριση δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών *Streptomyces* με ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (ομάδα Β) για το κλινικό στέλεχος γένους *Nocardia* (5KAT)

■ VA30: βανκομυκίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ LZD: λινεζολίδη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ CRO30: χλωραμφαινικόλη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ AN30: αμικασίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ STX: σουλφομεθοξάζολη-τριμεθοπρινή συγκέντρωσης 23.75/1.25 μg δισκίο⁻¹, ■ MI30: μινοκυκλίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ FEP30: κεφεπίμη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ CTX30: κεφοταξίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ AMC30: αμοξυκλίνη-κλαβουλανικό συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹ ■ *Streptomyces* M53 (Σ-3), ■ *Streptomyces* M33 (Σ-4), ■ *Streptomyces* M5 (Σ-8), ■ *Streptomyces* CAG 9/2 (Σ-11) ■ *S. chrestomyceticus* DSM 40545 (Σ-17)

Στις Εικόνες 3.25 και 3.26 αποδίδεται η εξέταση ευαισθησίας για το κλινικό στέλεχος γένους *Nocardia* (6ΚΑΤ). Στα ίδια διαγράμματα αποδίδεται και η διάμετρος της αναστολής ανάπτυξης του στελέχους γένους *Nocardia* από τη δράση των βιοενεργών ουσιών των ενδογενών εδαφικών στελεχών γένους *Streptomyces* και του πρότυπο στέλεχος *S. chrestomyceticus* DSM 40545.

Στην Εικόνα 3.25 εξετάστηκαν τα αντιβιοτικά με συγκέντρωση μικρότερη των 15 μg δισκίο⁻¹ ενώ στην Εικόνα 3.26 με συγκέντρωση μεγαλύτερη των 15 μg δισκίο⁻¹ και μικρότερη των 30 μg δισκίο⁻¹. Αναστολή ανάπτυξης παρατηρήθηκε από τα ενδογενή εδαφικά στελέχη *Streptomyces* CAG 4/1 (Σ-1), *Streptomyces* M53 (Σ-3), *Streptomyces* M33 (Σ-4), *Streptomyces* M 24 (Σ-5), *Streptomyces* M17 (Σ-6), *Streptomyces* M16 (Σ-7), *Streptomyces* M5 (Σ-8), *Streptomyces* CAG 9/2 (Σ-11), *Streptomyces* Vol 3 (Σ-15) και το πρότυπο στέλεχος *S. chrestomyceticus* DSM 40545 (Σ-17).



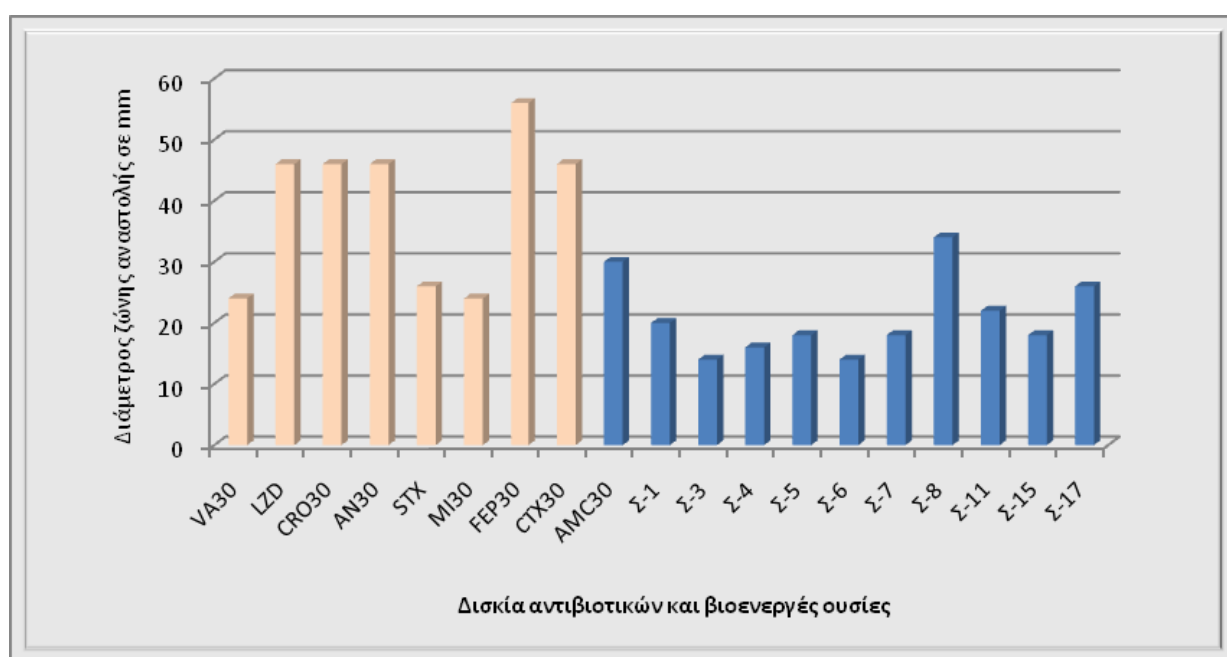
Εικόνα 3.25 Σύγκριση δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών *Streptomyces* με ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (ομάδα Α) για το κλινικό στέλεχος γένους *Nocardia* (6ΚΑΤ)

■ E15: ερυθρομυκίνη συγκέντρωσης 15 μg δισκίο⁻¹, ■ GM10: γενταμυκίνη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, ■ RA5: ριφαμυκίνη συγκέντρωσης 5 μg δισκίο⁻¹, ■ CIP5 συγκέντρωσης 5 μg δισκίο⁻¹, ■ IMP10: ιμιπενέμη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, ■ NN10: τομπραμυκίνη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹ ■ *Streptomyces* CAG 4/1 (Σ-1), ■ *Streptomyces* M53 (Σ-3), ■ *Streptomyces* M33 (Σ-4), ■ *Streptomyces* M 24 (Σ-5), ■ *Streptomyces* M17 (Σ-6), ■ *Streptomyces* M16 (Σ-7), ■ *Streptomyces* M5 (Σ-8), ■ *Streptomyces* CAG 9/2 (Σ-11), ■ *Streptomyces* Vol 3 (Σ-15) ■ *S. chrestomyceticus* DSM 40545 (Σ-17)

Η μεγαλύτερη ζώνη αναστολής δημιουργήθηκε από το στέλεχος *Streptomyces* M5 (Σ-8) με διάμετρο 34 mm.

Από τα αντιβιοτικά της ομάδας A, μεγαλύτερη διάμετρο αναστολής ανάπτυξης δημιουργήθηκε από το δισκίο αντιβιοτικού IMP10 (56 mm) ενώ από τα αντιβιοτικά της ομάδας B η μεγαλύτερη ζώνη αναστολής δημιουργήθηκε από το αντιβιοτικό FEP30 (56 mm). Η δράση των βιοενεργών ουσιών ήταν συγκρίσιμη με εκείνη των αντιβιοτικών της ομάδας A.

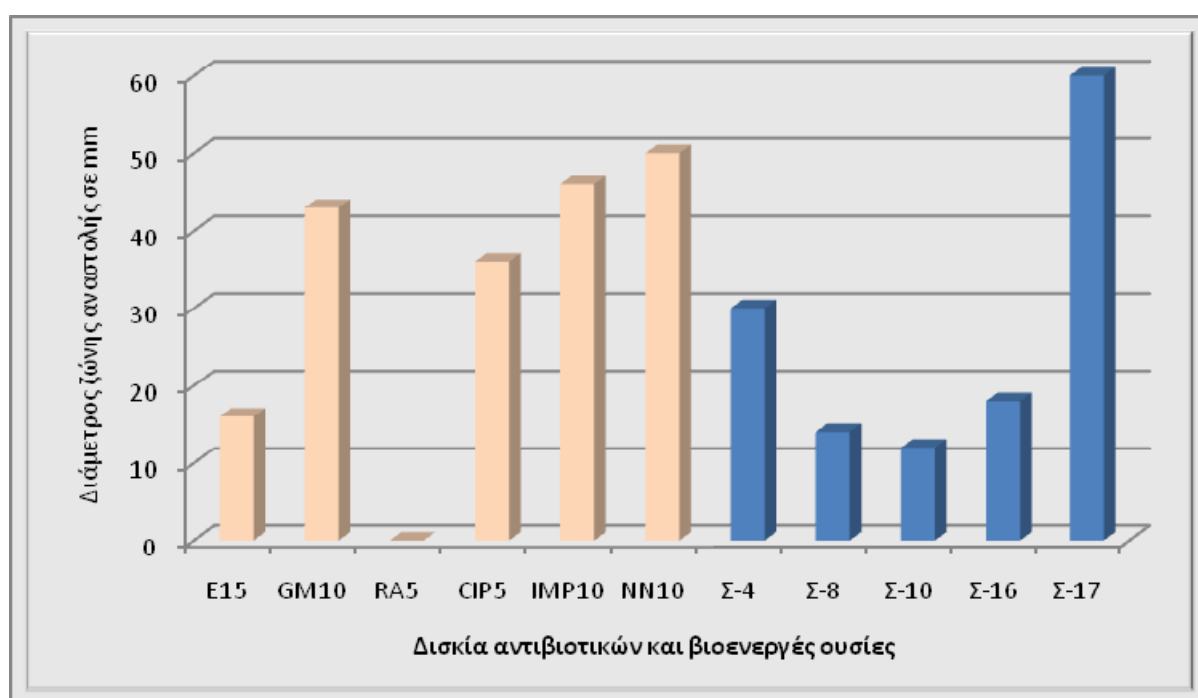
Στις Εικόνες 3.27 και 3.28 αποδίδεται η εξέταση ευαισθησίας για το κλινικό στέλεχος γένους *Nocardia* (3124). Στα ίδια διαγράμματα αποδίδεται και η διάμετρος της αναστολής ανάπτυξης του στελέχους γένους *Nocardia* από τη δράση των βιοενεργών ουσιών των ενδογενών εδαφικών στελεχών γένους *Streptomyces* και του πρότυπο στέλεχος *S. chrestomyceticus* DSM 40545.



Εικόνα 3.26 Σύγκριση δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών *Streptomyces* με ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (ομάδα B) για το κλινικό στέλεχος γένους *Nocardia* (6KAT)

■ VA30: βανκομυκίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ LZD: λινεζολίδα συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ CRO30: χλωραμφαινικόλη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ AN30: αμικασίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ STX: σουλφομεθοξαζολη-τριμεθοπρινή συγκέντρωσης 23.75/1.25 μg δισκίο⁻¹, ■ MI30: μινोकυκλίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ FEP30: κεφεπίμη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ CTX30: κεφοταξίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ AMC30: αμοξυκλίνη-κλαβουλανικό συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹ ■ *Streptomyces* CAG 4/1 (Σ-1), ■ *Streptomyces* M53 (Σ-3), ■ *Streptomyces* M33 (Σ-4), ■ *Streptomyces* M 24 (Σ-5), ■ *Streptomyces* M17 (Σ-6), ■ *Streptomyces* M16 (Σ-7), ■ *Streptomyces* M5 (Σ-8), ■ *Streptomyces* CAG 9/2 (Σ-11), ■ *Streptomyces* Vol 3 (Σ-15) ■ *S. chrestomyceticus* DSM 40545 (Σ-17)

Στην Εικόνα 3.27 εξετάστηκαν τα αντιβιοτικά με συγκέντρωση μικρότερη των 15 μg δισκίο⁻¹ ενώ στην Εικόνα 3.28 με συγκέντρωση μεγαλύτερη των 15 μg δισκίο⁻¹ και μικρότερη των 30 μg δισκίο⁻¹. Αναστολή ανάπτυξης παρατηρήθηκε από τα ενδογενή εδαφικά στελέχη *Streptomyces* M33 (Σ-4), *Streptomyces* M5 (Σ-8), *Streptomyces* CAG 9 (Σ-10), *Streptomyces* M56 (Σ-16) και το πρότυπο στέλεχος *S. chrestomyceticus* DSM 40545 (Σ-17). Οι μεγαλύτερες ζώνες αναστολής δημιουργήθηκαν από τα στελέχη *S. chrestomyceticus* DSM 40545 (Σ-17) με διάμετρο ζώνης αναστολής ανάπτυξης 60 mm και το *Streptomyces* M33 (Σ-4) με διάμετρο ζώνης αναστολής ανάπτυξης 30 mm. Στο συγκεκριμένο κλινικό στέλεχος, παρόλο που πολλά ενδογενή στελέχη προκάλεσαν αναστολή ανάπτυξης του κλινικού στελέχους, η δράση των βιοενεργών ουσιών ήταν μικρότερη από εκείνη των δισκίων αντιβιοτικών των δυο ομάδων.

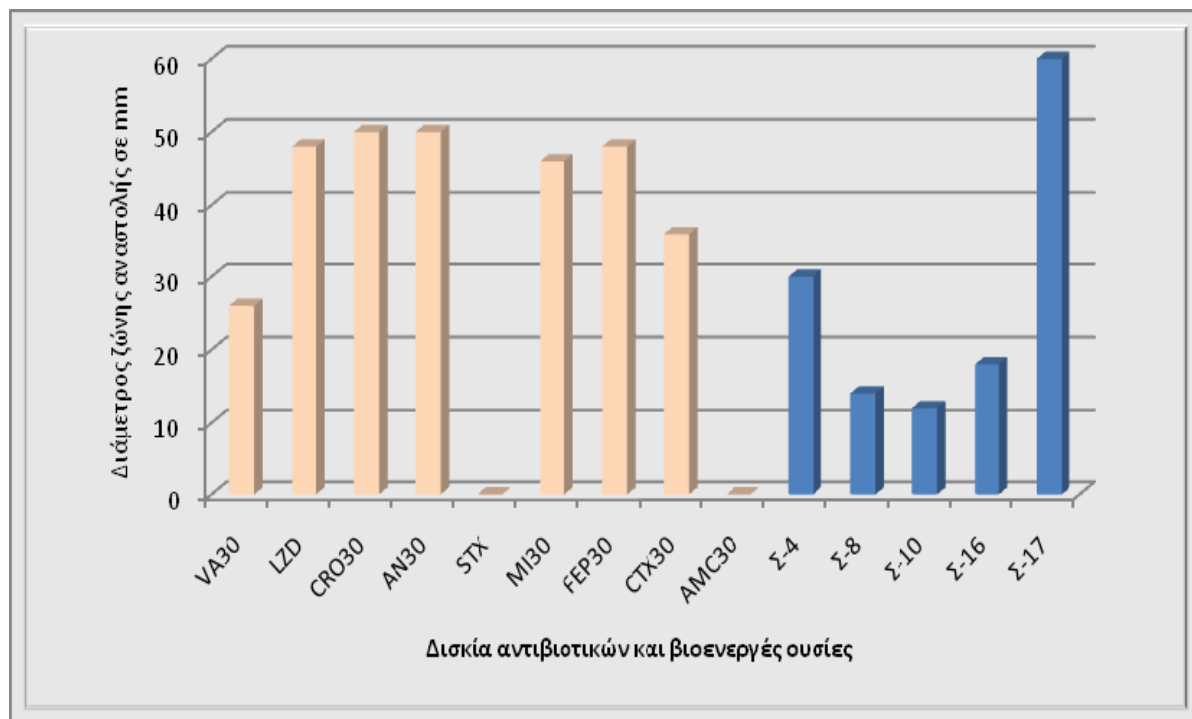


Εικόνα 3.27 Σύγκριση δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών *Streptomyces* με ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (ομάδα Α) για το κλινικό στέλεχος γένους *Nocardia* (3124)

■ E15: ερυθρομυκίνη συγκέντρωσης 15 μg δισκίο⁻¹, ■ GM10: γενταμυκίνη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, ■ RA5: ριφαμυκίνη συγκέντρωσης 5 μg δισκίο⁻¹, ■ CIP5 συγκέντρωσης 5 μg δισκίο⁻¹, ■ IMP10: ιμιπενέμη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, ■ NN10: τομπραμυκίνη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹ ■ *Streptomyces* M33 (Σ-4), ■ *Streptomyces* M5 (Σ-8), ■ *Streptomyces* CAG 9 (Σ-10), ■ *Streptomyces* M56 (Σ-16) ■ *S. chrestomyceticus* DSM 40545 (Σ-17)

Στις Εικόνες 3.29 και 3.30 αποδίδεται η εξέταση ευαισθησίας για το κλινικό στέλεχος γένους *Mycobacterium* – other than - *tuberculosis* (553490). Στα ίδια διαγράμματα αποδίδεται και η διάμετρος της ζώνης αναστολής ανάπτυξης του στελέχους γένους

Mycobacterium – other than – *tuberculosis* από τη δράση των βιοενεργών ουσιών των ενδογενών εδαφικών στελεχών γένους *Streptomyces* M33 (Σ-4) και του προτυπου στέλεχος *S. chrestomyceticus* DSM 40545.

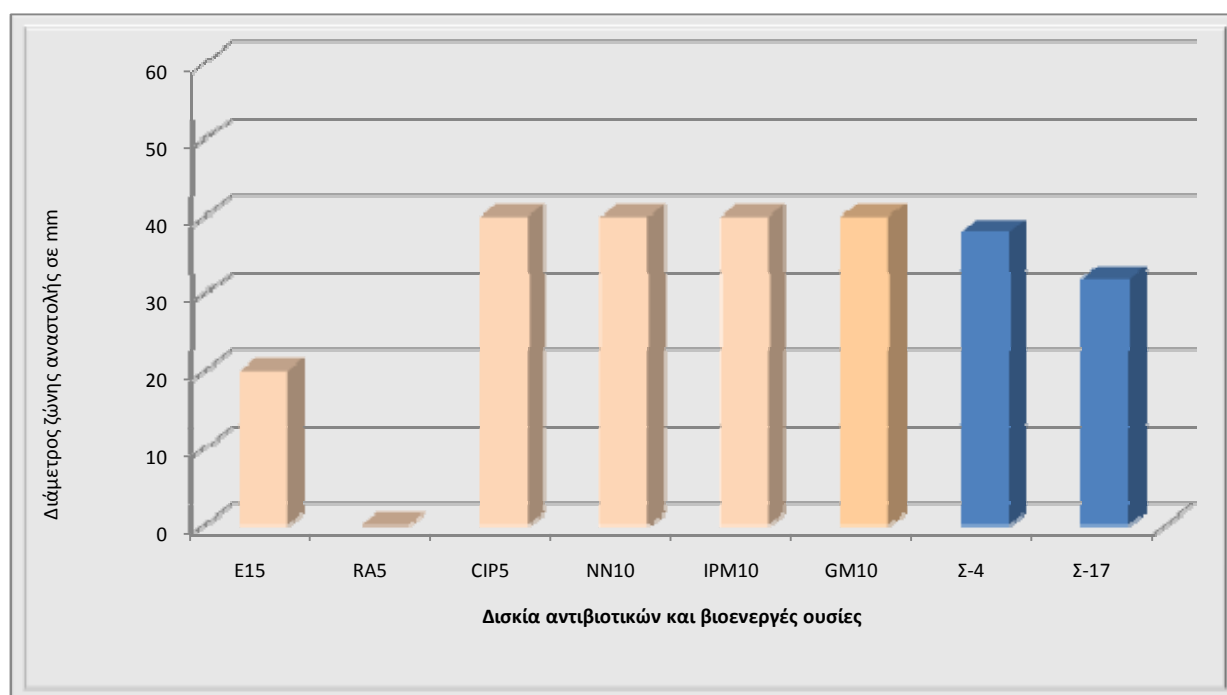


Εικόνα 3.28 Σύγκριση δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών *Streptomyces* με ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (ομάδα Β) για το κλινικό στέλεχος γένους *Nocardia* (3124)

■ VA30: βανκομυκίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ LZD: λινεζολίδη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ CRO30: χλωραμφαινικόλη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ AN30: αμικασίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ STX: σουλφομεθοξαζολη-τριμεθοπρινή συγκέντρωσης 23.75/1.25 μg δισκίο⁻¹, ■ MI30: μινोकυκλίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ FEP30: κεφεπίμη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ CTX30: κεφοταξίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ AMC30: αμοξικιλίνη-κλαβουλανικό συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹ ■ *Streptomyces* M33 (Σ-4), ■ *Streptomyces* M5 (Σ-8), ■ *Streptomyces* CAG 9 (Σ-10), ■ *Streptomyces* M56 (Σ-16) ■ *S. chrestomyceticus* DSM 40545 (Σ-17)

Στην Εικόνα 3.29 εξετάστηκαν τα αντιβιοτικά με συγκέντρωση μικρότερη των 15 μg δισκίο⁻¹ ενώ στην Εικόνα 3.30 με συγκέντρωση μεγαλύτερη των 15 μg δισκίο⁻¹ και μικρότερη των 30 μg δισκίο⁻¹. Αναστολή ανάπτυξης παρατηρήθηκε από τα ενδογενή εδαφικά στελέχη στελέχη *Streptomyces* M33 (Σ-4) και το πρότυπο στέλεχος *S. chrestomyceticus* DSM 40545 (Σ-17). Οι διάμετροι των ζωνών αναστολής ανάπτυξης ήταν 38 mm και 32 mm αντίστοιχα. Σύμφωνα με την εξέταση ευαισθησίας του κλινικού αυτού στελέχους, όλα τα προτεινόμενα αντιβιοτικά του Προτυπου Συμβουσία Κλινικών Εργαστηρίων ανέστειλαν την ανάπτυξή του. Παρόλο που ήταν ένα ιδιαίτερα ευαίσθητο στέλεχος (διάμετροι ζωνών αναστολής > 40 mm), μόνο δυο βακτήρια γένους *Streptomyces* ήταν βιοενεργά. Η δράση των βιοενεργών ουσιών ήταν ίδια και με τις δυο ομάδες αντιβιοτικών.

Στις Εικόνες 3.31 και 3.32 αποδίδεται η εξέταση ευαισθησίας για το κλινικό στέλεχος *M. fortuitum* (532088). Στα ίδια διαγράμματα αποδίδεται και η διάμετρος της αναστολής ανάπτυξης του στελέχους γένους *Mycobacterium* – other than – *tuberculosis* από τη δράση των βιοενεργών ουσιών των ενδογενών εδαφικών στελεχών γένους *Streptomyces* και του προτύπου στέλεχος *S. chrestomyceticus* DSM 40545.



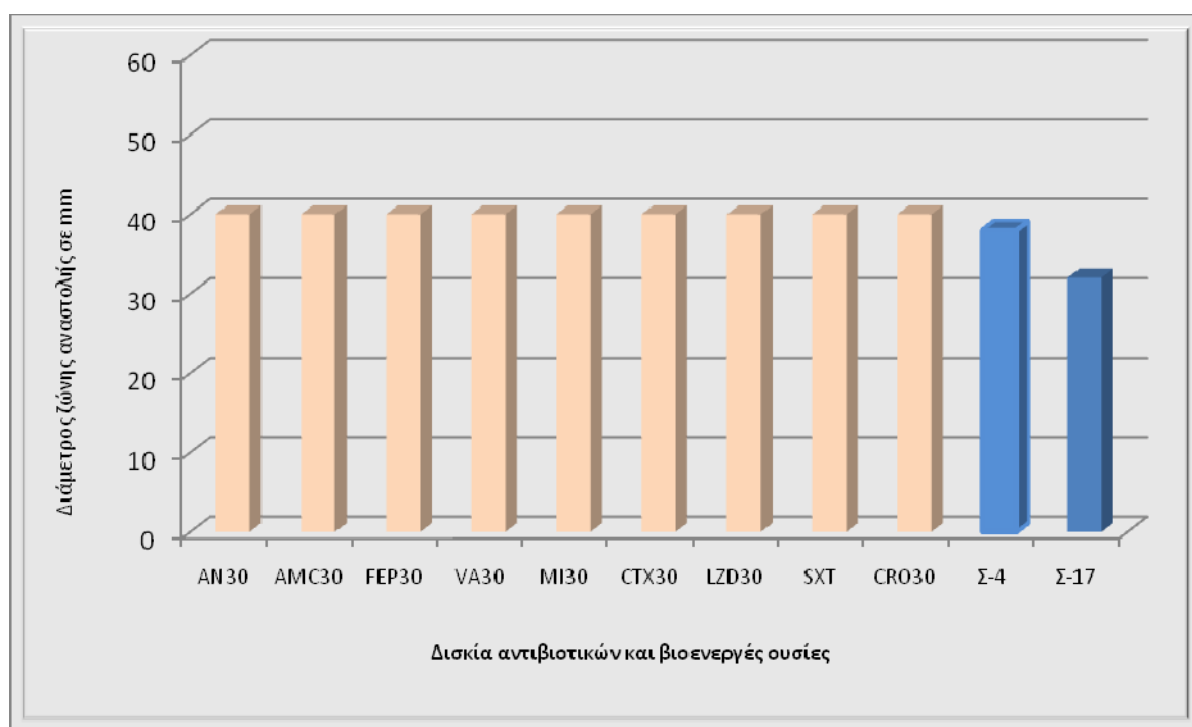
Εικόνα 3.29 Σύγκριση δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών *Streptomyces* με ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (ομάδα Α) για το κλινικό στέλεχος *Mycobacterium* – other than – *tuberculosis* (553490) ■ E15: ερυθρομυκίνη συγκέντρωσης 15 μg δισκίο⁻¹, ■ RA5: ριφαμυκίνη συγκέντρωσης 5 μg δισκίο⁻¹, ■ CIP5 συγκέντρωσης 5 μg δισκίο⁻¹, ■ NN10: τομπραμυκίνη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, ■ IMP10 μιπενέμη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, ■ GM10: γενταμυκίνη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, ■ *Streptomyces* M33 (Σ-4) ■ *S. chrestomyceticus* DSM 40545 (Σ-17)

Στην Εικόνα 3.31 εξετάστηκαν τα αντιβιοτικά με συγκέντρωση μικρότερη των 15 μg δισκίο⁻¹ ενώ στην Εικόνα 3.32 με συγκέντρωση μεγαλύτερη των 15 μg δισκίο⁻¹ και μικρότερη των 30 μg δισκίο⁻¹. Αναστολή ανάπτυξης παρατηρήθηκε από τα ενδογενή εδαφικά στελέχη στελέχη *Streptomyces* M33 (Σ-4), *Streptomyces* M24 (Σ-5), *Streptomyces* CAG 9/2 (Σ-11), *Streptomyces* M63 (Σ-14), *Streptomyces* M56 (Σ-16) και το πρότυπο στέλεχος *S. chrestomyceticus* DSM 40545 (Σ-17).

Οι μεγαλύτερες ζώνες αναστολής δημιουργήθηκαν από τα στελέχη *S. chrestomyceticus* DSM 40545 (Σ-17) με διάμετρο ζώνης αναστολής ανάπτυξης 40 mm και το *Streptomyces* M33 (Σ-4) με διάμετρο ζώνης αναστολής ανάπτυξης 38 mm. Από τα αντιβιοτικά της ομάδας Α, μεγαλύτερη διάμετρο αναστολής ανάπτυξης

δημιουργήθηκε από το δισκίο αντιβιοτικού CIP5 (60 mm) ενώ από τα αντιβιοτικά της ομάδας B η μεγαλύτερη ζώνη αναστολής δημιουργήθηκε από το αντιβιοτικό AN30 (40 mm). Η δράση των βιοενεργών ουσιών ήταν συγκρίσιμη με εκείνη των αντιβιοτικών της ομάδας A ενώ σε σύγκριση με τα αντιβιοτικά της ομάδας B, οι διάμετροι των ζωνών αναστολής από τις βιοενεργές ουσίες ήταν μεγαλύτερες.

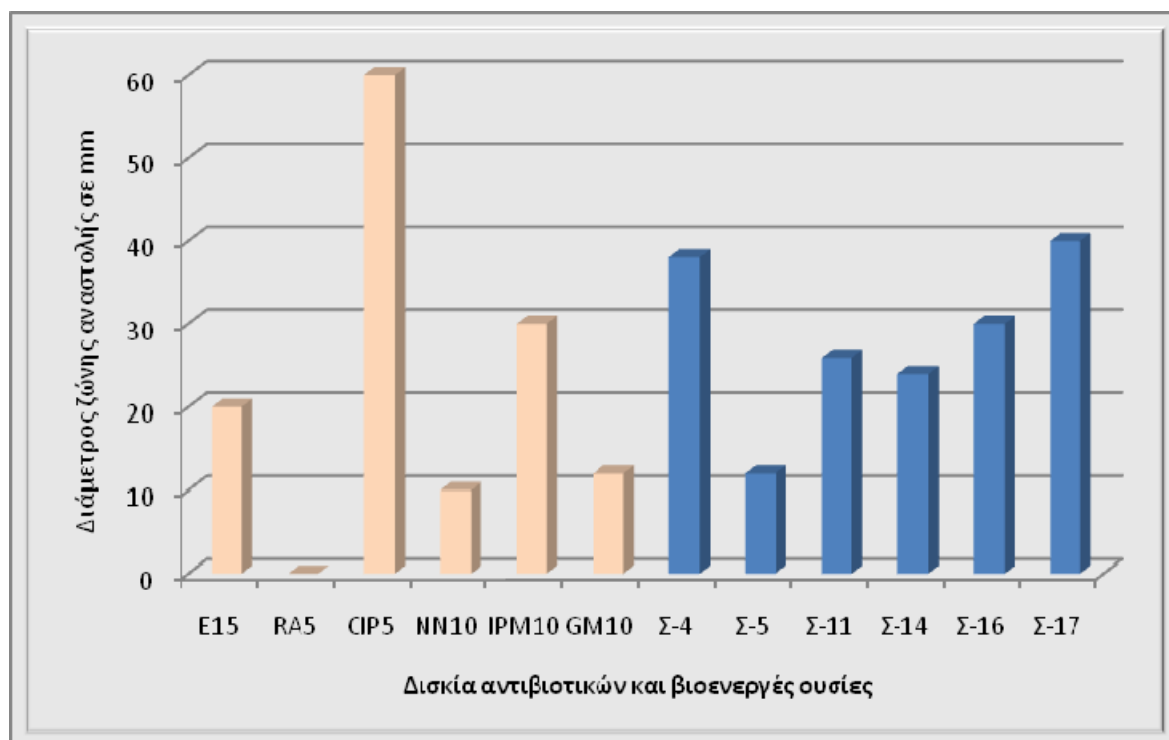
Στις Εικόνες 3.33 και 3.34 αποδίδεται η εξέταση ευαισθησίας για το κλινικό στέλεχος *M. fortuitum* (614751).



Εικόνα 3.30 Σύγκριση δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών *Streptomyces* με ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (ομάδα B) για το κλινικό στέλεχος *Mycobacterium – other than - tuberculosis* (553490) ■ AN30: αμικασίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ AMC30: αμοξυκλίνη-κλαβουλανικό συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ FEP30: κεφεπίμη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ VA30: βανκομυκίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ MI30: μινοκυκλίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ CTX30: κεφοταξίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ LZD: λινεζολίδη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ STX: σουλφομεθοξαζολη-τριμεθοπρινη συγκέντρωσης 23.75/1.25 μg δισκίο⁻¹, ■ CRO30: χλωραμφαινικόλη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ *Streptomyces* M33 (Σ-4), ■ *S.chrestomyceticus* DSM 40545 (Σ-17)

Στα ίδια διαγράμματα αποδίδεται και η διάμετρος της ζώνης αναστολής ανάπτυξης του στελέχους *M. fortuitum* από τη δράση των βιοενεργών ουσιών των ενδογενών εδαφικών στελεχών *Streptomyces* M53 (Σ-3), *Streptomyces* M24 (Σ-5), *Streptomyces* M17 (Σ-6) και του *Streptomyces* M16 (Σ-7). Στην Εικόνα 3.33 εξετάστηκαν τα αντιβιοτικά με συγκέντρωση μικρότερη των 15 μg δισκίο⁻¹ ενώ στην Εικόνα 3.34 με συγκέντρωση μεγαλύτερη των 15 μg δισκίο⁻¹ και μικρότερη των 30 μg δισκίο⁻¹. Η

μεγαλύτερη διάμετρος ζώνης αναστολής ανάπτυξης (44 mm) δημιουργήθηκε από τη βιοενεργή ουσία του στελέχους *Streptomyces* M53 (Σ-3).

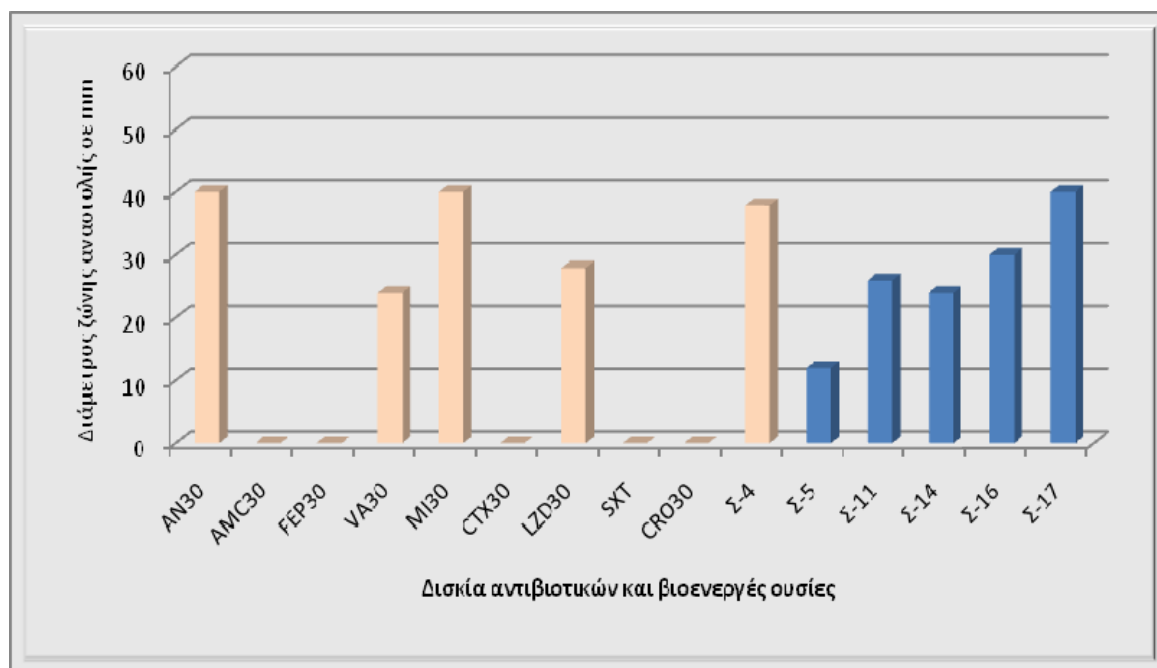


Εικόνα 3.31 Σύγκριση δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών *Streptomyces* με ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (ομάδα Α) για το κλινικό στέλεχος *M. fortuitum* (532088)
 ■ E15: ερυθρομυκίνη συγκέντρωσης 15 μg δισκίο⁻¹, ■ RA5: ριφαμυκίνη συγκέντρωσης 5 μg δισκίο⁻¹,
 ■ CIP5 συγκέντρωσης 5 μg δισκίο⁻¹, ■ NN10: τομπραμυκίνη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, ■ IMP10
 ιμιπενέμη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, ■ GM10: γενταμυκίνη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹,
 ■ *Streptomyces* M33 (Σ-4), ■ *Streptomyces* M24 (Σ-5), *Streptomyces* CAG 9/2 (Σ-11), ■ *Streptomyces*
 M63 (Σ-14), ■ *Streptomyces* M56 (Σ-16) ■ *S. chrestomyceticus* DSM 40545 (Σ-17)

Από τα αντιβιοτικά της ομάδας Α, το δισκίο της CIP5 ήταν το πιο δραστικό (διαμετρος ζώνης αναστολής 65 mm). Από τα αντιβιοτικά της ομάδας Β, το δισκίο της MI30 ήταν το πιο δραστικό (διαμετρος ζώνης αναστολής 50 mm). Παρατηρήθηκε ότι η δράση των βιοενεργών ουσιών ήταν συγκρίσιμη και σε ορισμένες περιπτώσεις καλύτερη από εκείνη των δισκίων αντιβιοτικών.

Στις Εικόνες 3.35 και 3.36 αποδίδεται η εξέταση ευαισθησίας για το κλινικό στέλεχος *M. fortuitum* (624180). Στα ίδια διαγράμματα αποδίδεται και η διάμετρος της ζώνης αναστολής ανάπτυξης του στελέχους γένους *M. fortuitum* από τη δράση των βιοενεργών ουσιών των ενδογενών εδαφικών στελεχών *Streptomyces* CAG 4/1 (Σ-1), *Streptomyces* M53 (Σ-3), *Streptomyces* M16 (Σ-7), *S. collinus* CAG 9 (Σ-10), *Streptomyces* CAG 9/2 (Σ-11), *Streptomyces* CAG 13/2 (Σ-12), *Streptomyces* Vol 3

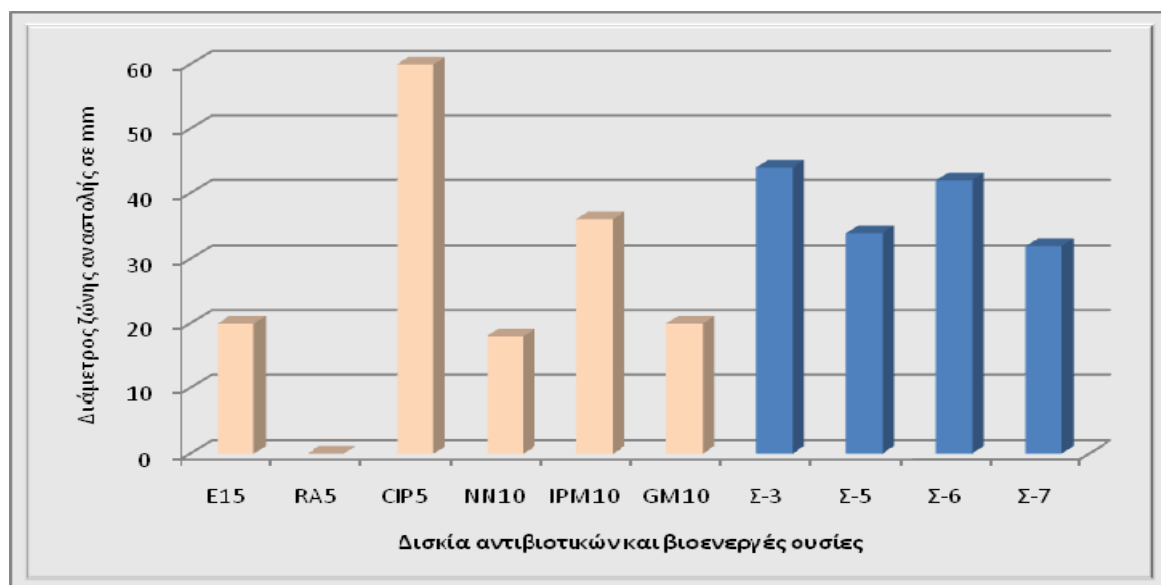
(Σ-15), *Streptomyces* M56 (Σ-16) και του προτυπου στελέχους *S. chrestomyceticus* DSM 40545 (Σ-17).



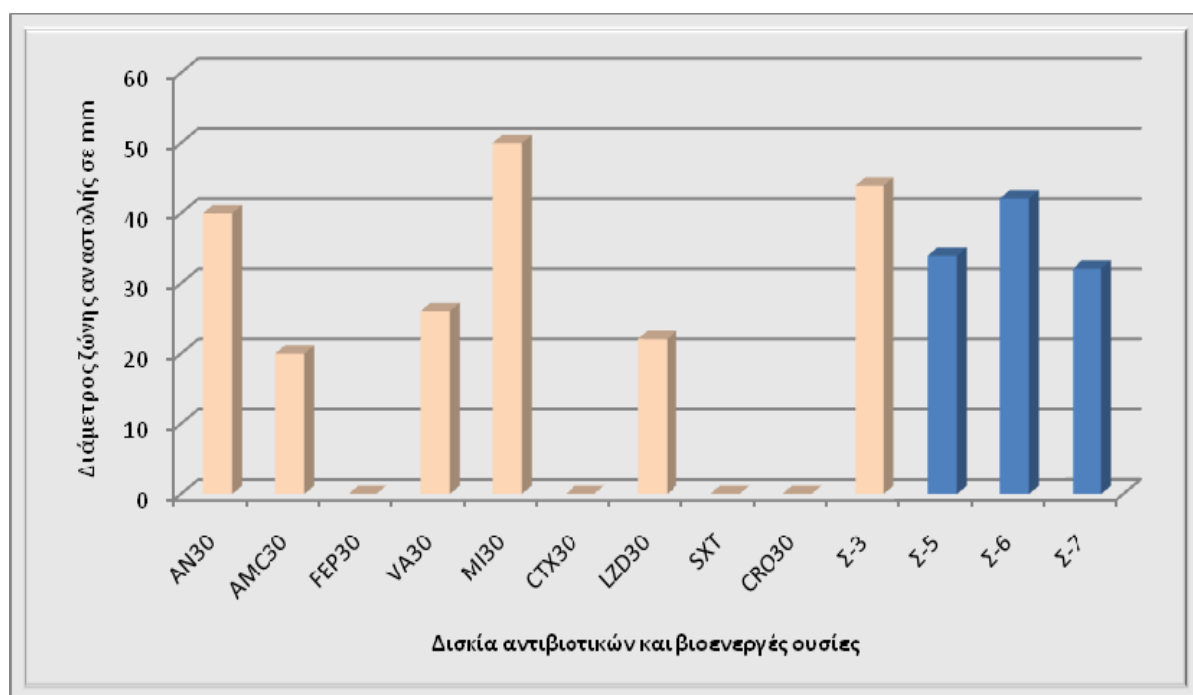
Εικόνα 3.32 Σύγκριση δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών *Streptomyces* με ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (ομάδα Β) για το κλινικό στέλεχος *M. fortuitum* (532088)
 ■ AN30: αμικασίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ AMC30: αμοξικιλίνη-κλαβουλανικό συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ FEP30: κεφεπίμη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ VA30: βανκομυκίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ MI30: μινοκυκλίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ CTX30: κεφοταξίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ LZD: λινεζολίδη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ STX: σουλφομεθοξαζολη-τριμεθοπρινή συγκέντρωσης 23.75/1.25 μg δισκίο⁻¹, ■ CRO30: χλωραμφαινικόλη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ *Streptomyces* M33 (Σ-4), ■ *Streptomyces* M24 (Σ-5), ■ *Streptomyces* CAG 9/2 (Σ-11), ■ *Streptomyces* M63 (Σ-14), ■ *Streptomyces* M56 (Σ-16) ■ *S. chrestomyceticus* DSM 40545 (Σ-17)

Στην Εικόνα 3.35 εξετάστηκαν τα αντιβιοτικά με συγκέντρωση μικρότερη των 15 μg δισκίο⁻¹ ενώ στην Εικόνα 3.36 με συγκέντρωση μεγαλύτερη των 15 μg δισκίο⁻¹ και μικρότερη των 30 μg δισκίο⁻¹. Η μεγαλύτερη διάμετρος ζώνης αναστολής ανάπτυξης (44 mm) δημιουργήθηκε από τη βιοενεργή ουσία του στελέχους *S. collinus* CAG 9 (Σ-10). Από τα αντιβιοτικά της ομάδας Α, το δισκίο της CIP5 ήταν το πιο δραστικό (διάμετρος ζώνης αναστολής 60 mm).

Από τα αντιβιοτικά της ομάδας Β, το δισκίο της MI30 ήταν το πιο δραστικό (διάμετρος ζώνης αναστολής 50 mm). Παρατηρήθηκε ότι η δράση των βιοενεργών ουσιών ήταν συγκρίσιμη και σε ορισμένες περιπτώσεις καλύτερη από εκείνη των δισκίων αντιβιοτικών.

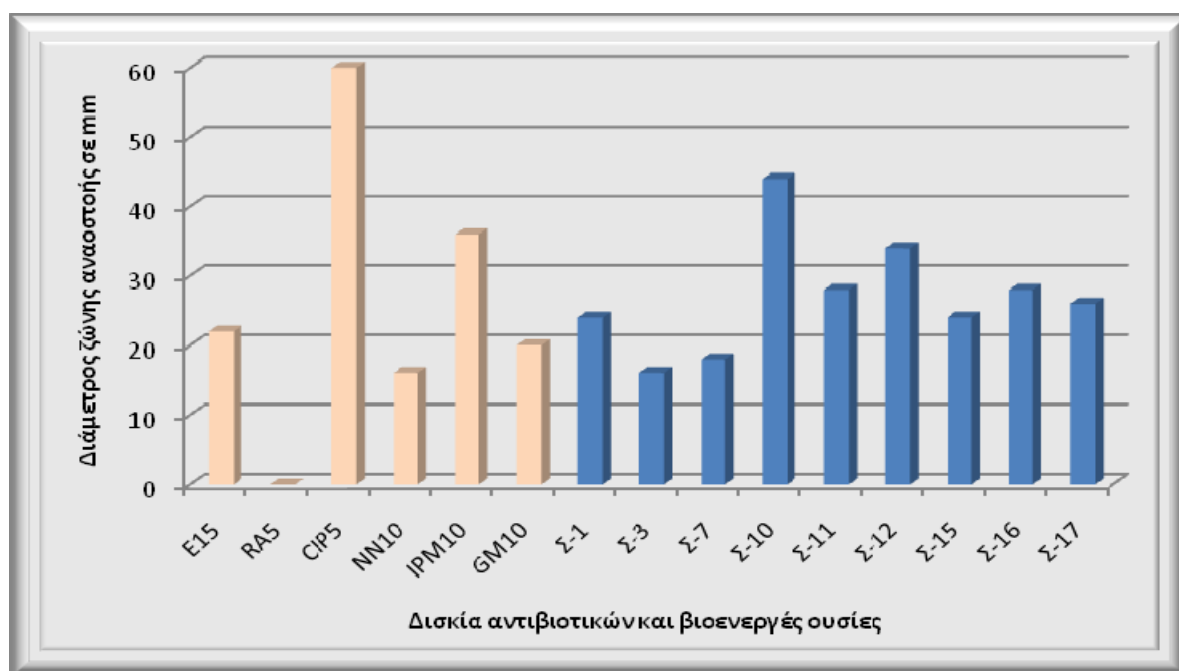


Εικόνα 3.33 Σύγκριση δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών *Streptomyces* με ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (ομάδα A) για το κλινικό στέλεχος *M. fortuitum* (614751)
 E15: ερυθρομυκίνη συγκέντρωσης 15 μg δισκίο⁻¹, RA5: ριφαμπικίνη συγκέντρωσης 5 μg δισκίο⁻¹, CIP5 συγκέντρωσης 5 μg δισκίο⁻¹, NN10: τομπραμυκίνη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, IMP10 ιμιπενέμη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, GM10: γενταμυκίνη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, *Streptomyces* M53 (Σ-3), *Streptomyces* M24 (Σ-5), *Streptomyces* M17 (Σ-6) *Streptomyces* M16 (Σ-7)



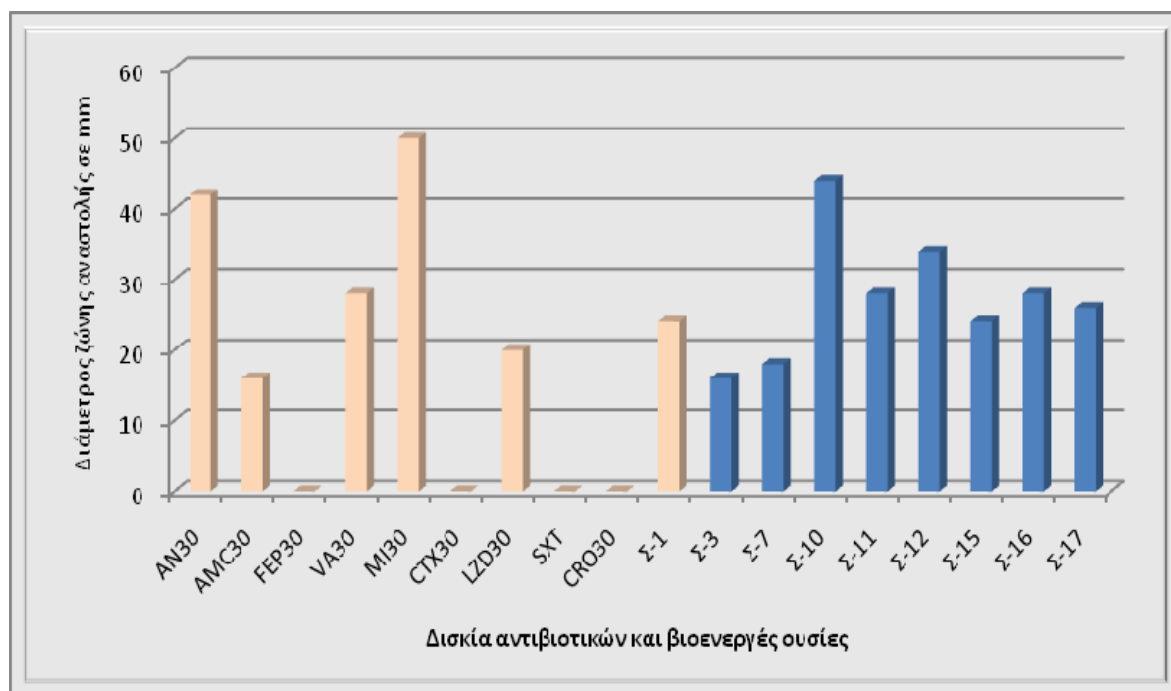
Εικόνα 3.34 Σύγκριση δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών *Streptomyces* με ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (ομάδα B) για το κλινικό στέλεχος *M. fortuitum* (614751)
 AN30: αμικασίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, AMC30: αμοξικιλίνη-κλαβουλανικό συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, FEP30: κεφεπίμη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, VA30: βανκομυκίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, MI30: μινοκυκλίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, CTX30: κεφοταξίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, LZD: λινεζολίδα συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, STX: σουλφομεθοξαζολη-τριμεθοπρινή συγκέντρωσης 23.75/1.25 μg δισκίο⁻¹, CRO30: χλωραμφαινικόλη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, *Streptomyces* M53 (Σ-3), *Streptomyces* M24 (Σ-5), *Streptomyces* M17 (Σ-6) *Streptomyces* M16 (Σ-7)

Παρατηρήθηκε ότι ενδογενή εδαφικά στελέχη του γένους *Streptomyces* σε αντίθεση με τα κλινικά στελέχη των γενών *Nocardia*, *Mycobacterium* και *Streptomyces* παρουσίασαν δράση βιοενεργών ουσιών. Οι βιοενεργές αυτές ουσίες ήταν δραστικές μόνο για τα θετικά κατά Gram κλινικά στελέχη. Ωστόσο, τα ενδογενή εδαφικά στελέχη ήταν βιοενεργά έναντι αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (*E. coli*). Προκειμένου να συγκριθεί η ευαισθησία των αντίστοιχων κλινικών στελεχών με εκείνων των περιβαλλοντικών, πραγματοποιήθηκε εξέταση ευαισθησίας και συγκρίθηκαν οι διάμετροι ζωνών αναστολής.

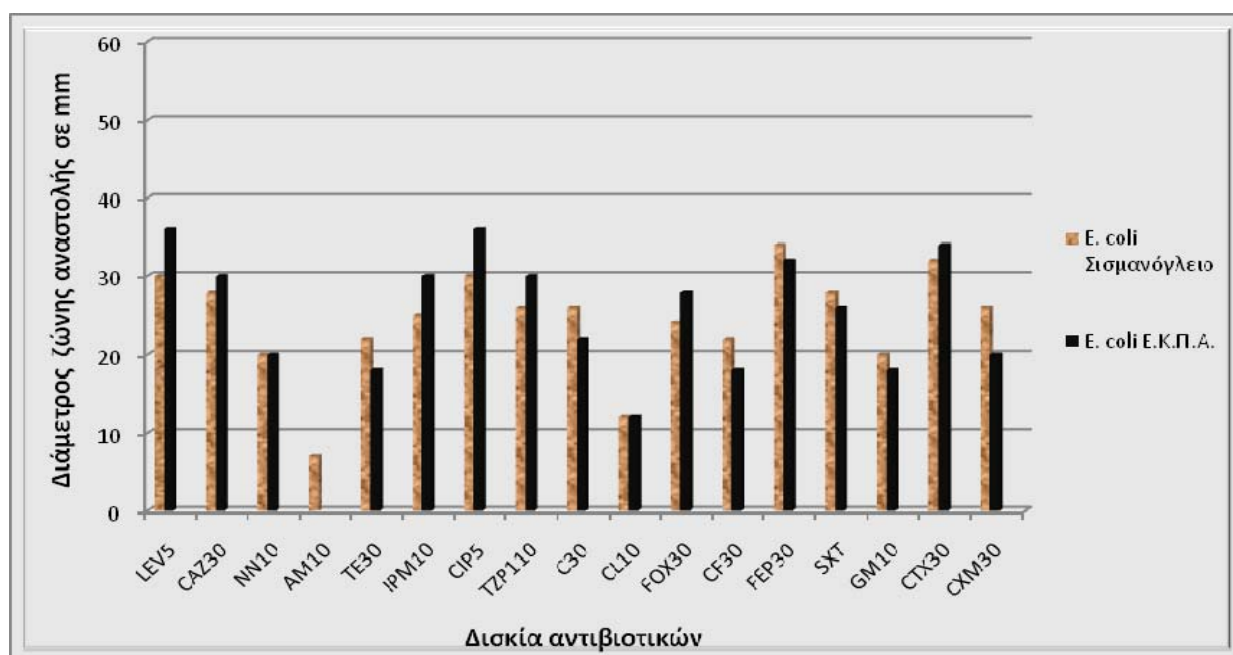


Εικόνα 3.35 Σύγκριση δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών *Streptomyces* με ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (ομάδα A) για το κλινικό στέλεχος *M. fortuitum* (624180)
 E15: ερυθρομυκίνη συγκέντρωσης 15 μg δισκίο⁻¹, RA5: ριφαμυκίνη συγκέντρωσης 5 μg δισκίο⁻¹,
 CIP5 συγκέντρωσης 5 μg δισκίο⁻¹, NN10: τομπραμυκίνη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, IMP10
 ιμιπενέμη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹, GM10: γενταμυκίνη συγκέντρωσης 10 μg δισκίο⁻¹,
 εδαφικών *Streptomyces* CAG 4/1 (Σ-1), *Streptomyces* M53 (Σ-3), *Streptomyces* M16 (Σ-7), *S.*
collinus CAG 9 (Σ-10), *Streptomyces* CAG 9/2 (Σ-11), *Streptomyces* CAG 13/2 (Σ-12),
Streptomyces Vol 3 (Σ-15), *Streptomyces* M56 (Σ-16) *S. chrestomyceticus* DSM 40545 (Σ-17)

Συγκεντρώνοντας τα αποτελέσματα δράσης των βιοενεργών ουσιών των ενδογενών εδαφικών στελεχών έναντι των κλινικών στελεχών, προκύπτει ο Πίνακας 3.19. Στον Πίνακα 3.19 παρουσιάζεται συγκεντρωτικά η βιοενεργότητα των ενδογενών εδαφικών στελεχών *Streptomyces* και του προτυπου στελεχους *S. chrestomyceticus* DSM 40545 έναντι των γενών κλινικών βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο δράσης βιοενεργών ουσιών.



Εικόνα 3.36 Σύγκριση δράσης βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών *Streptomyces* με ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (ομάδα Β) για το κλινικό στέλεχος *M. fortuitum* (624180), ■ AN30: αμικασίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ AMC30: αμοξικιλίνη-κλαβουλανικό συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ FEP30: κεφεπίμη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ VA30: βανκομυκίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ MI30: μινοκυκλίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ CTX30: κεφοταξίνη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ LZD: λινεζολίδα συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ STX: σουλφομεθοξαζολη-τριμεθοπρινή συγκέντρωσης 23.75/1.25 μg δισκίο⁻¹, ■ CRO30: χλωραμφαινικόλη συγκέντρωσης 30 μg δισκίο⁻¹, ■ *Streptomyces* CAG 4/1 (Σ-1), ■ *Streptomyces* M53 (Σ-3), ■ *Streptomyces* M16 (Σ-7), ■ *S. collinus* CAG 9 (Σ-10), ■ *Streptomyces* CAG 9/2 (Σ-11), ■ *Streptomyces* CAG 13/2 (Σ-12), ■ *Streptomyces* Vol 3 (Σ-15), ■ *Streptomyces* M56 (Σ-16) ■ *S. chrestomyceticus* DSM 40545 (Σ-17)



Εικόνα 3. 37 Εξέταση ευαισθησίας για τα κλινικά και εδαφικά στελέχη *E. coli*

Πίνακας 3.19 Ενδογενή εδαφικά στελέχη του γένους *Streptomyces* που παρουσίασαν δράση βιοενεργών ουσιών

α/α	Στελέχη γένους <i>Streptomyces</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>sp</i>	<i>Nocardia</i> <i>sp</i>	<i>Mycobacterium</i> – other than– <i>tuberculosis</i>
1	<i>Streptomyces</i> CAG 4/1	-	✓	✓
2	<i>Streptomyces</i> CAG 13/3	-	-	-
3	<i>Streptomyces</i> M 53	-	✓	✓
4	<i>Streptomyces</i> M 33	✓	✓	✓
5	<i>Streptomyces</i> M 24	-	✓	✓
6	<i>Streptomyces</i> M 17	-	✓	✓
7	<i>Streptomyces</i> M 16	-	✓	✓
8	<i>Streptomyces</i> M 5	✓	✓	✓
9	<i>S. cyaneus</i> ASE 19	-	-	-
10	<i>S. collinus</i> CAG 9	-	✓	✓
11	<i>Streptomyces</i> CAG 9/2	-	✓	✓
12	<i>Streptomyces</i> CAG 13/2	-	✓	✓
13	<i>S. albidoflavus</i> K 3	-	-	-
14	<i>Streptomyces</i> M 63	-	-	✓
15	<i>Streptomyces</i> Vol 3	-	✓	✓
16	<i>Streptomyces</i> M56	-	✓	✓
17	<i>S.chrestomyceticus</i> DSM 40545	-	✓	✓

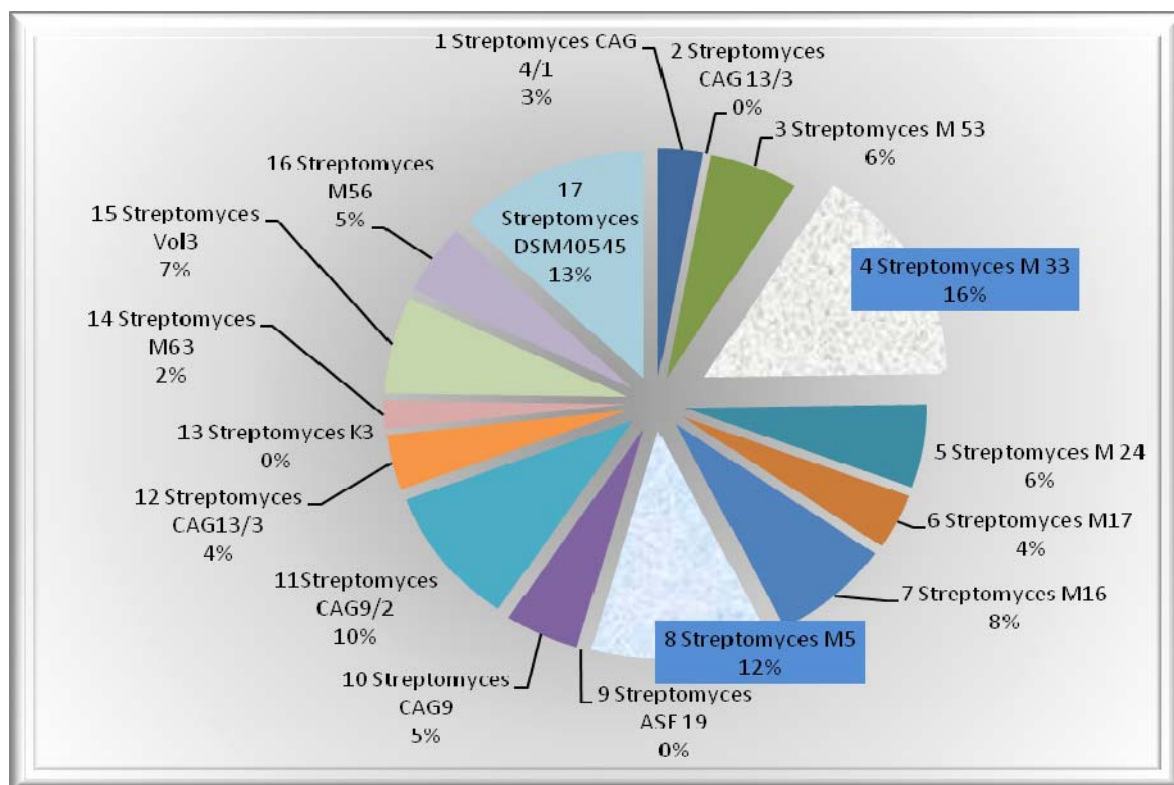
Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.19, από τα δέκα έξι ενδογενή εδαφικά στελέχη *Streptomyces* δύο προκάλεσαν αναστολή ανάπτυξης κλινικών βακτηρίων γένους *Staphylococcus*, δέκα τέσσερα προκάλεσαν αναστολή ανάπτυξης κλινικών βακτηρίων γένους *Nocardia* και δέκα τρία προκάλεσαν αναστολή ανάπτυξης κλινικών βακτηρίων *Mycobacterium* – other than – *tuberculosis*. Παρατηρήθηκε ότι όλα τα περιβαλλοντικά στελέχη του γένους *Streptomyces* που ήταν βιοενεργά για τα κλινικά στελέχη γένους *Nocardia*, ήταν βιοενεργα και για κλινικά στελέχη γένους *Mycobacterium*.

Το στέλεχος που παρουσίασε τις περισσότερες αναστολές ανάπτυξης από τη δράση των βιοενεργών ουσιών ήταν ένα *Mycobacterium* – other than – *tuberculosis* (κωδικός 432527). Δέκα τρία από τα δέκα επτά περιβαλλοντικά στελέχη γένους *Streptomyces* ανέστειλαν την ανάπτυξη του συγκεκριμένου κλινικού στελέχους.

Από τα ενδογενή εδαφικά στελέχη τα πιο βιοενεργά ήταν τα *Streptomyces* M33 (Σ-4) και *Streptomyces* M5 (Σ-8). Τα στελέχη αυτά ήταν και τα μοναδικά που προκάλεσαν αναστολή ανάπτυξης των κλινικών βακτηρίων γένους *Staphylococcus*. Τα στελέχη αυτά παρουσίασαν αυξημένο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον και είναι αναγκαία η περαιτέρω μελέτη τους.

Λαμβάνοντας υπόψη τα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με τη βιοενεργότητα κλινικών στελεχών γένους *Nocardia* (παράγραφος 1.5), διερευνήθηκε η ικανότητα παραγωγής αντιμικροβιακών ουσιών από κλινικά στελέχη του γένους *Nocardia* καθώς και κλινικών στελεχών γενών *Mycobacterium* και *Streptomyces*. Η ικανότητα παραγωγής αντιμικροβιακών ουσιών από κλινικά στελέχη οφείλεται στο γεγονός ότι όταν τα βακτήρια αυτά προσβάλουν έναν οργανισμό, έχουν να αντιμετωπίσουν τα μικρόβια της φυσιολογικής μικροβιακής χλωρίδας για να επιβιώσουν. Αυτά ανταγωνίζονται τα παθογόνα και τα παρεμποδίζουν να εγκατασταθούν (αντίσταση αποικισμού) καταλαμβάνοντας τους υποδοχείς των κυττάρων του μεγαλοοργανισμού και καταναλώνοντας τα θρεπτικά συστατικά που θα χρησιμοποιούσαν τα παθογόνα μικρόβια. Προφανώς, τα παθογόνα παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες που προκαλούν καταστολή των υπολοίπων μικροβίων, καταστολή έκκρισης βακτηριοσινών και εκδήλωση της παθογόνου δράσης τους.

Ανακεφαλαιώνοντας χρησιμοποιήθηκαν σαράντα επτά θετικά κατά Gram κλινικά στελέχη (των γενών *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Nocardia* και *Mycobacterium*) και τέσσερα αρνητικά κατά Gram κλινικά στελέχη (των γενών *Proteus*, *Klebsiella*, *Escherichia* και *Pseudomonas*). Το στέλεχος *Streptomyces* M33 (Σ-4) προκάλεσε αναστολή ανάπτυξης δεκατεσσάρων κλινικών στελεχών από τα 51 που χρησιμοποιήθηκαν (16%) ενώ το *Streptomyces* M5 (Σ-8) προκάλεσε αναστολή ανάπτυξης σε δώδεκα κλινικά στελέχη (12%). Στην Εικόνα 3.37 αποδίδεται διαγραμματικά η δράση βιοενεργών ουσιών των δέκα επτά στελεχών γένους *Streptomyces* (αύξοντας αριθμός 1-17). Η αναστολή ανάπτυξης των κλινικών στελεχών από τη δράση βιοενεργών ουσιών των βακτηρίων γένους *Streptomyces* εκφράστηκε σε εκατοστιαία αναλογία.



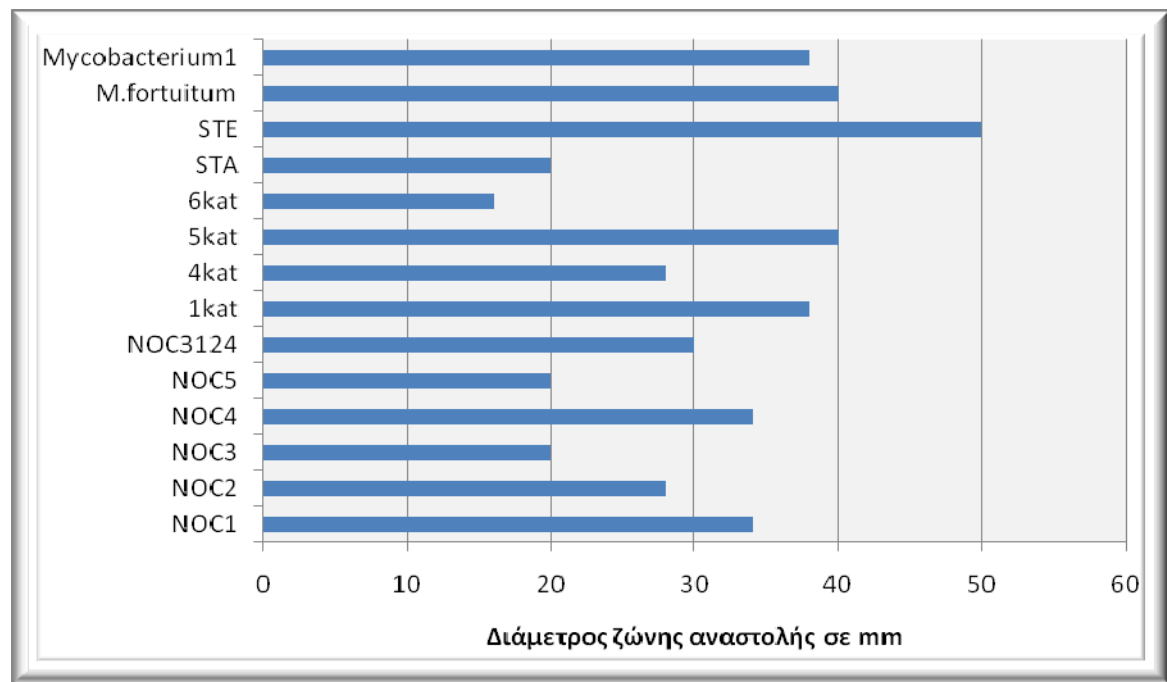
Εικόνα 3.37 Ενδογενή εδαφικά στελέχη του γένους *Streptomyces* και το ποσοστό των κλινικών στελεχών των οποίων η ανάπτυξη αναστάλλει από τη δράση βιοενεργών ουσιών

Από τα περιβαλλοντικά στελέχη, τρία (*Streptomyces* CAG 13/3 (Σ-2), *S. cyaneus* ASE 19 (Σ-9) και *S. albidoflavus* (K3) δεν παρουσίασαν δράση βιοενεργών ουσιών.

Όπως προαναφέρθηκε, το *Streptomyces* M33 (Σ-4), προκάλεσε τις περισσότερες αναστολές ανάπτυξης στους θετικούς κατά Gram μικροοργανισμούς δείκτες. Στην Εικόνα 3.38 φαίνεται η δράση της βιοενεργούς ουσίας του *Streptomyces* M33 (Σ-4) . έναντι των γενών *Staphylococcus*, *Nocardia* και *Mycobacterium*.

Σύμφωνα με αυτό, η βιοενεργή ουσία δημιούργησε τη μεγαλύτερη ζώνη αναστολής στο κλινικό στέλεχος *St. epidermidis*.

Μια πρόταση περαιτέρω μελέτης αφορά αφενός μεν την ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους των προτεινόμενων στελεχών του γένους *Streptomyces* και αφετέρου την απομόνωση και ταυτοποίηση των βιοενεργών ουσιών με σκοπό τον ποσοτικό προσδιορισμό της ένωσης για την αναστολή ανάπτυξης των κλινικών στελεχών (Minimal Inhibitory Concentration-MIC). Ενδιαφέρον θα είχε και η διερεύνηση δραστηριότητας των παραγόμενων ουσιών και έναντι κλινικών στελεχών μυκήτων.



Εικόνα 3.38 Διάμετρος ζώνων αναστολής του *Streptomyces* sp M33 (Σ-4) έναντι βακτηρίων *Nocardia* (NOC1, NOC2, NOC3, NOC4, NOC5, noc3124, 1KAT, 4KAT, 5KAT, 6KAT), *Staphylococcus epidermidis* (STE), *Staphylococcus aureus* (STA), *Mycobacterium* (*Mycobacterium*-other than-*tuberculosis*)

Κεφάλαιο 4^ο Συζήτηση - Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η δράση βιοενεργών ουσιών από ενδογενή εδαφικά στελέχη του γένους *Streptomyces* και κλινικά στελέχη των γενών *Nocardia* και *Mycobacterium* έναντι κλινικών παθογόνων μικροοργανισμών. Εξετάστηκαν δέκα έξι στελέχη του γένους *Streptomyces* από τη Μικροβιακή Τράπεζα στελεχών του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας του Τομέα Βοτανικής, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, και το πρότυπο στέλεχος *Streptomyces chrestomyceticus* (Γερμανική Τράπεζα Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH). Τα στελέχη αυτά επιλέχθηκαν διότι εμφάνισαν αυξημένη βιοενεργότητα έναντι θετικών κατά Gram βακτηρίων (Δέλλιου 2008, Διπλωματική Εργασία). Τα κλινικά στελέχη έναντι των οποίων εξετάστηκαν οι παραγωγείς (βακτήρια γένους *Streptomyces*) βιοενεργών ουσιών απομονώθηκαν από ασθενείς με αναπνευστικά προβλήματα στα πλαίσια καθημερινής τους εξέτασης. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν σαράντα επτά θετικά κατά Gram κλινικά στελέχη των γενών *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Nocardia* και *Mycobacterium* και τέσσερα αρνητικά κατά Gram κλινικά στελέχη των γενών *Proteus*, *Klebsiella*, *Escherichia* και *Pseudomonas*. Η δράση των βιοενεργών ουσιών από τους παραγωγείς εκτιμήθηκε με τη μέτρηση της διαμέτρου ζώνης αναστολής κλινικών παθογόνων στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν ως μικροοργανισμοί δείκτες.

Ο πρώτος στόχος της εργασίας ήταν η απομόνωση κλινικών στελεχών των γενών *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Escherichia* και *Pseudomonas* από κλινικά δείγματα. Για την απομόνωση των στελεχών του γένους *Mycobacterium* τα κλινικά δείγματα επεξεργάστηκαν με την τυποποιημένη μέθοδο N-ακετυλοκυστεΐνη (παράγραφος 2.5.3). Ανάπτυξη βακτηρίων στο θρεπτικό υπόστρωμα Lowenstein Jensen παρατηρήθηκε κατά μέσο όρο την 3^η έως την 5^η εβδομάδα, ενώ στο θρεπτικό υπόστρωμα Middlebrook 7H9 παρατηρήθηκε ανάπτυξη σε 9 έως 12 μέρες κάτω από τις δυσμενείς συνθήκες καλλιέργειας. Σύμφωνα με μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια θρεπτικά υποστρώματα και συνθήκες, η ανάπτυξη των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε στο ίδιο χρονικό διάστημα που παρατηρήθηκε και στην παρούσα μελέτη (Liu και συνεργάτες 1983, Lipsky και συνεργάτες 1984, Chien και συνεργάτες 2000, Pardini και συνεργάτες 2007).

Η απομόνωση βακτηρίων του γένους *Nocardia* έγινε με εμβολιασμό σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα σοκολατόχρωμου άγαρ (Muñoz και συνεργάτες 2007). Σε ορισμένες περιπτώσεις κλινικά στελέχη γένους *Nocardia* απομονώθηκαν στο Εργαστήριο Φυματίωσης ύστερα από επεξεργασία με Ν-ακετυλοκυστεΐνη παρόλο που ο χειρισμός των δειγμάτων με υδροξείδιο του νατρίου είναι καταστρεπτικός για το *Nocardia* (Murray και συνεργάτες 1987, Khardori και συνεργάτες 1993).

Τα στελέχη του γένους *Mycobacterium* ταυτοποιήθηκαν με τις μοριακές μεθόδους Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test (A-MTD) και GenoType[®] Mycobacterium CM/AS της Hain Lifescience. Παρόλο που η A-MTD έχει έγκριση από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration-FDA) για αναπνευστικά δείγματα, μετά από μελέτες (Baharoom 2008, Neonakis και συνεργάτες 2009) βρέθηκε ότι η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για μη αναπνευστικά κλινικά δείγματα. Η ευαισθησία του για αναπνευστικά δείγματα είναι 90,9 – 95,2% ενώ η ειδικότητα φτάνει το 98,8 – 100% (Soini και Musser 2001). Επιπλέον, η μέθοδος A-MTD προτείνεται βιβλιογραφικά από πολλούς ερευνητές (Soini και Musser 2001, Guerra και συνεργάτες 2007, Gamze και συνεργάτες 2008, Baharoom 2008, Neonakis και συνεργάτες 2009).

Ο δεύτερος στόχος της εργασίας αφορούσε στην επιλογή κατάλληλης μεθόδου ανίχνευσης δράσης βιοενεργών ουσιών (παράγραφος 1.6). Μετά από προκαταρκτικές δοκιμές, τα αποτελέσματα των οποίων δεν παρουσιάζονται στην παρούσα Διπλωματική, η μέθοδος που επιλέχθηκε ήταν εκείνη της Διάχυσης Αντιβιοτικής ουσίας σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (παράγραφος 2.9). Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας, του Τομέα Βοτανικής, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών για την ανίχνευση βιοενεργων ουσιών (παράγραφος 2.8) και επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών βιοενεργων στελεχών του φύλου των Ακτινοβακτηρίων σε ένα συγκεκριμένο μικροοργανισμό δείκτη.

Ο τρίτος στόχος της εργασίας ήταν ο έλεγχος δράσης βιοενεργών ουσιών από ενδογενή εδαφικά στελέχη του γένους *Streptomyces* της μικροβιακής τράπεζας του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας, του Τομέα Βοτανικής, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και κλινικών στελεχών του γένους *Streptomyces* της τράπεζας μικροβίων του Γ.Ν.Α. Σισμανογλείου, έναντι κλινικών παθογόνων μικροοργανισμών (στελέχη των γενών *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* και *Proteus*). Μετά από δοκιμές

που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της εργασίας της Δέλλιου (2008) βρέθηκε ότι 16 στελέχη του γένους *Streptomyces* αναστέλλουν θετικά και αρνητικά κατά Gram βακτήρια και για το λόγο αυτό επιλέχθηκαν. Στην παρούσα όμως εργασία τα 16 αυτά στελέχη ήταν βιοενεργα μόνο έναντι των θετικών κατά Gram βακτηρίων και όχι έναντι των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Αυτό ίσως οφείλεται στο ότι οι αρνητικοί κατά Gram μικροβιακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν, προήλθαν από κλινικά δείγματα, ενώ στην περίπτωση της Δέλλιου (2008) όχι. Τα κλινικά στελέχη εμφανίζουν μεγάλη ανθεκτικότητα σχεδόν σε όλα τα αντιβιοτικά, την οποία έχουν αποκτήσει λόγω εξελικτικής πίεσης που προήλθε από τη χρήση θεραπευτικών σχημάτων (Durán και Van Gelgeren 1995, Gomez-Flores και συνεργάτες 2004).

Συνολικά παρατηρήθηκε αναστολή ανάπτυξης από τη δράση βιοενεργών ουσιών έναντι δυο στελεχών του γένους *Staphylococcus* (*Staphylococcus aureus*, *St. epidermidis*), δέκα στελέχη του γένους *Nocardia* και έξι στελέχη του γένους *Mycobacterium* - other than - *tuberculosis*.

Συγκεκριμένα, τα στελέχη *Streptomyces* M 33 (Σ-4) και *Streptomyces* M 5 (Σ-8) ανέστειλαν την ανάπτυξη των βακτηρίων γένους *Staphylococcus*. Η βιοενεργότητα των *Streptomyces* έναντι των βακτηρίων γένους *Staphylococcus* έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες (Omura και συνεργάτες 1976, Zakia και συνεργάτες 2001, Castillo και συνεργάτες 2002, Nurettin 2003, Abdul Alim και συνεργάτες 2006, Yoo και συνεργάτες 2007, Malik και συνεργάτες 2008, Speitling και συνεργάτες 2008). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι, δεν παρατηρήθηκε καμία βιοενεργότητα από τα κλινικά στελέχη *Streptomyces*.

Καμία αναστολή ανάπτυξης δεν παρατηρήθηκε στα κλινικά στελέχη του γένους *Enterococcus*. Ωστόσο, υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές σύμφωνα με τις οποίες έχουν απομονωθεί βιοενεργές ενώσεις από βακτήρια γένους *Streptomyces* έναντι των βακτηρίων *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* και Vancomycin-Resistant *Enterococci* (Rhee και συνεργάτες 2001, Castillo και συνεργάτες 2002).

Όταν για τον έλεγχο δράσης βιοενεργών ουσιών χρησιμοποιήθηκαν κλινικά στελέχη του γένους *Nocardia*, παρατηρήθηκε αναστολή ανάπτυξης σε δέκα από τα δέκα τρία κλινικά στελέχη του γένους *Nocardia*. Έχει παρατηρηθεί και από τους Omura και συνεργάτες (1976) αναστολή των στελεχών του γένους *Nocardia* από μεγάλο αριθμό στελεχών του γένους *Streptomyces*. Η μεγαλύτερη βιοενεργότητα παρατηρήθηκε από τα δύο στελέχη (*Streptomyces* M 33 και *Streptomyces* M 5). Ήταν τα μοναδικά που

ανέστειλαν και την ανάπτυξη κλινικών στελεχών *St. aureus* και *St. epidermidis* (εκτός των βακτηρίων γένους *Mycobacterium* και *Nocardia*).

Εξίσου μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η διαπίστωση ότι τα εδαφικά στελέχη που ήταν βιοενεργά έναντι των κλινικών στελεχών γένους *Nocardia* ήταν βιοενεργά και για τα κλινικά στελέχη του γένους *Mycobacterium* - other than - *tuberculosis*. Αυτό ίσως να οφείλεται στη φυλογενετική συγγένεια ανάμεσα στα δυο γένη (*Mycobacterium* και *Nocardia*). Συγκεκριμένα, στην περίπτωση των *Mycobacterium* - other than - *tuberculosis*, παρατηρήθηκε αναστολή σε έξι από τα δώδεκα κλινικά στελέχη που εξετάστηκαν. Το *Streptomyces* M 33 ήταν ένα από τα στελέχη που ανέστειλε τα περισσότερα *Mycobacterium* - other than - *tuberculosis* και είχε μεγαλύτερες ζώνες αναστολής συγκριτικά με τα υπόλοιπα δέκα έξι στελέχη.

Κανένα στέλεχος δεν προκάλεσε αναστολή ανάπτυξης του κλινικού μικροοργανισμού δείκτη *Mycobacterium tuberculosis* complex. Ωστόσο, σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, ορισμένα περιβαλλοντικά στελέχη γένους *Streptomyces* (*Streptomyces padanus* NRRL 30562) παράγουν αντιφυματικές ουσίες έναντι του *Mycobacterium tuberculosis* complex H37Rv (*Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25618) και των πολυανθεκτικών στελεχών *M. tuberculosis* (Multiple-Drug-Resistant-MDR-P, Castillo και συνεργάτες 2002). Η κατηγορία των MDR-P *Mycobacterium* περιλαμβάνει στελέχη ανθεκτικά στην ισονιαζίδη και στρεπτομυκίνη, τα δυο κύρια αντιφυματικά αντιβιοτικά (Φακίρη και συνεργάτες 2009).

Ο τέταρτος στόχος της εργασίας ήταν ο έλεγχος παραγωγής βιοενεργών ουσιών από κλινικά στελέχη του γένους *Nocardia*, *Mycobacterium* - other than - *tuberculosis*, λαμβάνοντας υπόψη ότι υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές βιοενεργότητας αντίστοιχων κλινικών στελεχών (Tanaka και συνεργάτες 1997, Mikami και συνεργάτες 2000, Usui και συνεργάτες 2006). Σε αντίθεση όμως με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, στην παρούσα εργασία δεν σημειώθηκε αναστολή ανάπτυξης των μικροοργανισμών δεικτών από τα κλινικά στελέχη.

Ο τελευταίος στόχος της Διπλωματικής Εργασίας ήταν η σύγκριση της δραστηρότητας των παραγόμενων βιοενεργών ουσιών με δισκία αντιβιοτικών του εμπορίου που προτείνονται από το Πρότυπο του Συμβουλίου Κλινικών Εργαστηρίων. Πραγματοποιήθηκε εξέταση ευαισθησίας (αντιβιογράμμα) στα κλινικά στελέχη των οποίων ανεστάλη η ανάπτυξη από τη δράση των βιοενεργών ουσιών. Για να συγκριθεί η δράση των βιοενεργών ουσιών από τα ενδογενή εδαφικά στελέχη γένους *Streptomyces* έναντι των κλινικών στελεχών, πραγματοποιήθηκε εξέταση

ευαισθησίας με τη μέθοδο Kirby Bauer (παράγραφος 2.9). Η εξέταση ευαισθησίας στα κλινικά στελέχη *Staphylococcus* έδειξε ευαισθησία στα αντιβιοτικά βανκομυκίνη και αμπικιλίνη. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με εκείνα των Shobha και συνεργατών (Shobha και συνεργάτες 2005). Η εξέταση ευαισθησίας στα δέκα κλινικά στελέχη *Nocardia* έδειξε ότι τα πιο δραστικά αντιβιοτικά ήταν οι αμινογλυκοσίδες (αμικασίνη, γενταμυκίνη, τομπραμυκίνη) και η μινοκυκλίνη από την κατηγορία των τετρακυκλινών. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με εκείνα άλλων ερευνών (Durán και Van Gelgeren 1995, Ambaye και συνεργάτες 1997, Gomez-Flores και συνεργάτες 2004) που ασχολήθηκαν με την αναστολή ανάπτυξης κλινικών στελεχών γένους *Nocardia*. Αντίστοιχες έρευνες με περιβαλλοντικά στελέχη *Nocardia* καταγράφουν μεγαλύτερες ζώνες αναστολής ανάπτυξης (Van Gelderen και Durán 1998). Όσον αφορά στην εξέταση ευαισθησίας για τα κλινικά στελέχη *Mycobacterium – other than – tuberculosis* η ευαισθησία στα αντιβιοτικά αμικασίνη και σιπροφλοξασίνη είναι σύμφωνη με εκείνα της έρευνας των Gayathri και συνεργαστών (2010).

Γενικά συμπεράσματα σχετικά με τη δράση των βιοενεργών ουσιών ενδογενών εδαφικών στελεχών γένους *Streptomyces* σε κλινικά στελέχη

1. Από τα δέκα επτά ενδογενή εδαφικά στελέχη *Streptomyces* που εξετάστηκαν, τα δέκα τέσσερα παρήγαγαν βιοενεργές ουσίες οι οποίες προκάλεσαν αναστολή σε κλινικά μικροβιακά στελέχη.
2. Κανένα στέλεχος *Streptomyces* δεν ανέστειλε τα κλινικά στελέχη *Mycobacterium tuberculosis complex* και *Enterococcus*.
3. Κανένα κλινικό στέλεχος του γένους *Streptomyces* από αυτά που εξετάστηκαν δεν ήταν βιοενεργό.
4. Οι βιοενεργές ουσίες που παράχθηκαν από τα ενδογενή εδαφικά στελέχη *Streptomyces* ανέστειλαν την ανάπτυξη **μόνο** των θετικών κατά Gram βακτηρίων που εξετάστηκαν.
5. Τα πιο βιοενεργά εδαφικά στελέχη (σε μέγεθος διαμέτρου ζώνης αναστολής και συνολικό αριθμό κλινικών στελεχών των οποίων η ανάπτυξη αναστάλη) ήταν τα *Streptomyces* M 33 (Σ-4) και *Streptomyces* M 5 (Σ-8).
6. Η σύγκριση της διαμέτρου των ζωνών αναστολής που δημιουργήθηκαν από τα ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά με εκείνες από τη δράση των

βιοενεργών ουσιών ήταν της ίδιας τάξης και σε ορισμένα κλινικά στελέχη η παραγόμενη βιοενεργή ουσία προκάλεσε μεγαλύτερη διάμετρο αναστολής της ανάπτυξης.

Κεφάλαιο 5ο – Βιβλιογραφικές αναφορές

- 1) Abdul Alim A.M., Abu Sayeed M., Sazedur R. & Ashik M. (2006) Characterization and Antimicrobial Activities of a Phthalic Acid Derivative Produced by *Streptomyces bangladeshiensis* A Novel Species Collected in Bangladesh. *Research Journal of Medicine and Medical Sciences*, **1**, 77-81
- 2) Abou-Zeid A.A., Abou-Zeid A.Z., Shaheen A.B. & el-Dewany A.I. (2007) Fermentative production of puromycin by *Streptomyces alboniger*. *Journal of applied chemistry and biotechnology* **23**, 837 – 845.
- 3) Adekambi T. & Drancourt M. (2004) Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing Mycobacterium species by 16S rRNA, *hsp65*, *sodA*, *recA* and *rpoB* gene. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **54**, 2095 – 2105.
- 4) Agterof M.J., van der Bruggen T., Tersmette M., ter Borg E.J., van den Bosch J.M.M. & Biesma1 D.H. (2007) Nocardiosis: a case series and a mini review of clinical and microbiological features. *The journal of medicine* **65**, 199 - 202.
- 5) Ahmed N., Uzair B., Ayaz S. & Viqar U.A. (2008) Antibacterial activity of marine bacteria from Arabian Sea of Pakistan. *The internet journal of microbiology* **4**, 1-10.
- 6) Al-Bari A., Abdul M., Sayeed M.A., Rahman M.S. & Mossadik M.A. (2006) Characterization and antimicrobial activities of a phthalic acid derivative produced by *Streptomyces bangladeshiensis* A novel species collected in Bangladesh. *Research journal of medicine and medical sciences* **1**, 77 - 81.
- 7) Ambaye A., Kohner P., Wollan P., Roberts K., & FR Cockerill (1997) Comparison of agar dilution, broth microdilution, disk diffusion, E- test, and BACTEC radiometric methods for antimicrobial susceptibility testing of

- clinical isolates of the *Nocardia asteroides* complex *Journal of Clinical Microbiology* **35**, 847-852.
- 8) Anzai Y., Iizaka Y., Li W., Idemoto N., Tsukada S., Koike K., Kinoshita K. & Kato F. **(2009)** Production of rosamicin derivatives in *Micromonospora rosaria* by introduction of D-mycinoase biosynthetic gene with PhiC31-derived integration vector pSET152. *Journal of industrial microbiology and biotechnology* **36**, 1013 - 1021.
- 9) Asagbra A., Abiodun S. & Oyewole O. **(2005)** Solid-state fermentation production of tetracycline by *Streptomyces* strains using some agricultural wastes as substrate *World journal of microbiology and biotechnology* **21**, 107 - 114.
- 10) Baharoom S. **(2008)** Tuberculosis of the breast. *Annal Thoracic Medicine* **3**, 110-114.
- 11) Banskota A.H., Mcalpine J.B., Sørensen D., Ibrahim A., Aouidate M., Pirae M., Alarco A.M., Farnet C.M. & Zazopoulos E. **(2006)** Genomic analyses lead to novel secondary metabolites. Part 3. ECO-0501, a novel antibacterial of a new class. *Journal of antibiotics* **59**, 533 - 542.
- 12) Basilio A., Gonzalez I., Vicente M.F., Gorrochategui J., Cabello A., Gonzalez A. & Genilloud O. **(2003)** Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *Journal of applied microbiology* **95**, 814 - 823.
- 13) Bernadete F.M., Marcio F., Nelson S., Cecvlia B. & Luiz C. **(2007)** Nocardial infections: report of 22 cases. *Reviews of the institute of medicine of st Paulo* **9**, 239 - 246.
- 14) Bhagabati P., Prakash G., Vishwanath PA. **(2004)** Studies on the antibacterial activity of the Actinomycetes isolated from the Khumbu Region of Nepal. M. Sc. thesis. Tribhuvan University (<http://www.aehms.org/pdf/panday%20f.pdf>)

- 15) Bittar F., Stremler N., Audié J.P., Dubus J.C., Sarles J., Raoult D. & Rolain J.M. **(2010)** *Nocardia farcinica* lung infection in a patient with cystic fibrosis: a case report. *Journal of medical case reports* **4**, 84 - 88.
- 16) Blattner F.R., Plunkett G. 3rd., Bloch C.A., Perna N.T., Burland V. & Riley M. **(1997)** The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**, 1453 - 1462.
- 17) Boiron P & Provost F. **(1990)** Characterization of *Nocardia*, *Rhodococcus* and *Gordonia* species by in vitro susceptibility testing, *Zentralbl Bacteriology* **274**, 203-13.
- 18) Brown J.M., & McNeil M.M. **(2003)** *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Actinomadura*, *Streptomyces*, and other aerobic actinomycetes. In: Manual of clinical microbiology, eighth edition. eds. pp. 502-531. American Society for Microbiology, Washington.
- 19) Castillo U.F., Gary A.S., Eugene J.F., Wilford M.H., Heidi P., Jensen J.B., Heather A., Robison R., Margret A.M., Teplow D.B., Dennis S. & Debbie Y. **(2002)** Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*, *Microbiology* **148**, 2675-2685.
- 20) Carey J., Motyl M. & Perlman D.C. **(2001)** Catheter-related bacteremia due to *Streptomyces* in a patient receiving holistic infusions. *Emerging infectious diseases* **7**, 1043 - 1045.
- 21) Casey J.T., O’Cleirigh C., Walsh P.K, O’Shea D.G. **(2004)** Development of a robust microtiter plate-based assay method for assessment of bioactivity. *Journal of microbiological methods* **58**, 327– 334
- 22) Casali N. & Riley L.W. **(2007)** A phylogenomic analysis of the Actinomycetales mce operons. *BMC Genomics* **8**, 1 - 23.

- 23) Chen X., Wei P., Fan L., Yang D., Zhu X., Shen W., Xu Z. & Cen P. **(2009)** Generation of high-yield rapamycin-producing strains through protoplasts-related techniques. *Applied microbiology and biotechnology* **83**, 507 - 512.
- 24) Chien H.P., Yu M.C., Wu M.H., Lin T.P., Luh K.T. **(2000)** Comparison of the BACTEC MGIT 960 with Löwenstein-Jensen medium for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *The international journal of tuberculosis and lung disease*, **4**: 866-870.
- 25) Chitra C. & Prasad C.E. **(2001)** Evaluation of Mycobacteria growth indicator tube (MGIT) for primary isolation of Mycobacteria. *Indian journal of tuberculosis* **48**, 155.
- 26) Choi D. & Cho K. **(2004)** Effect of carbon source consumption rate on lincomycin production from *Streptomyces lincolnensis*. *Journal of microbiology and biotechnology* **14**, 532 - 539.
- 27) Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S.V., Eiglmeier K., Gas S., Barry C.E. 3rd, Tekaia F., Badcock K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R., Devlin K., Feltwell T., Gentles S., Hamlin N., Holroyd S., Hornsby T., Jagels K., Krogh A., McLean J., Moule S., Murphy L., Oliver K., Osborne J., Quail M.A., Rajandream M.A., Rogers J., Rutter S., Seeger K., Skelton J., Squares R., Squares S., Sulston J.E., Taylor K., Whitehead S. & Barrell B.G. **(1998)** Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **6685**, 537 - 544.
- 28) Demain A.L. **(1998)** Induction of microbial secondary metabolism. *International Microbiology* **1**, 259 - 264.
- 29) Desai P.J., Pandit D., Mathur M. & Gogate A. **(2001)** Prevalence, identification and distribution of various species of *Enterococci* isolated from clinical specimens with special reference to urinary tract infection in catheterized patients. *Indian journal of medical microbiology* **19**, 132 - 137.

- 30) Devienne K.F., Raddi M. S. **(2002)** Screening for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer. *Brazilian Journal of Microbiology* **33**, 166-168
- 31) Distler J., Mansouri K. & Piepersberg W. **(2006)** Streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus* II. Adjacent genomic location of biosynthetic genes and one of two streptomycin resistance genes. *FEMS microbiology letters* **30**, 151 - 154.
- 32) Durán EL. & Van Gelderen de Komaid A. **(1995)** Antimicrobial susceptibilities of regional pathogenic strains of *Nocardia* isolated from mycetomas, *Mycopathologia* **131**, 167-172.
- 33) Fadzilah M.N., Ng K.P. & Ngeow Y.F. **(2009)** The manual MGIT system for the detection of *M. tuberculosis* in respiratory specimens: an experience in the University Malaya Medical Centre. *Malaysian journal of pathology* **31**, 93 - 97.
- 34) Farid M., Enshasy H., El-Sayed E. **(2000)** Optimization of the cultivation medium for natamycin production by *Streptomyces natalensis*. *Journal of basic Microbiology* **40**, 157-166.
- 35) Feng-Xu Ma, Jung Hun Kim, Sung Bae Kim, Yang-Gon Seo, Yong Keun Chang, Soon-Kwang Hong & Chang-Joon Kim **(2008)** Medium optimization for enhanced production of Rifamycin B by *Amycolatopsis mediterranei* S699: combining a full factorial design and a statistical approach. *Process biochemistry* **43**, 954 - 960.
- 36) Fjærvik E. & Zotchev S.B. **(2005)** Biosynthesis of the polyene macrolide antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei*. *Applied microbiology and biotechnology* **67**, 436 - 443.

- 37) Gamze S., Kurultay N., Afsar I. **(2008)** Evaluation of the results of *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (MTD) and mycobacterial culture in urine samples *Brazilian journal of microbiology* **39**, 673-675
- 38) Gayathri R., Therese K., Deepa P., Mangai S., Madhavan H.N. (2010) Antibiotic susceptibility pattern of rapidly growing mycobacteria *Journal of Postgrad medicine* **2**, 76-88
- 39) Gomez-Flores A., Welsh O., Said-Fernández S., Lozano-Garza G., Roman E.T. & Vera-Cabrera L. **(2004)** *In vitro* and *in vivo* activities of antimicrobials against *Nocardia brasiliensis*, antimicrobial agents and chemotherapy. *The journal of antibiotics* **48**, 832-837
- 40) Grafel U., Yazawa K. & Mikami Y. **(1997)** Nocardicyclins A and B: new anthracycline antibiotics produced by *Nocardia pseudobvasiliensis*. *The journal of antibiotics* **50**, 822 - 827.
- 41) Guerra R., Hooper N., Baker J., Alborz R., Armstrong D. & Dorman **(2007)** Use of the Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test in a public health laboratory. *Chest* **132**, 946-951
- 42) Hakvåg Sigrid, Espen Fjærvik, Kjell D. Josefsen, Ian Elena, Trond E. Ellingsen & Sergey B. Zotchev **(2008)** Characterization of *Streptomyces* spp. Isolated from the sea surface microlayer in the Trondheim fjord, Norway, *Marine Drugs* **6**, 620 – 635.
- 43) Hillemann D., Richter E. & Rusch-Gerdes S. **(2006)** Use of the BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 Automated System for recovery of mycobacteria from 9,558 extrapulmonary specimens, including urine samples. *Journal of clinical microbiology* **44**, 4014 - 4017.
- 44) Hoshino Y., Mukai A., Yazawa K., Uno J., Ishikawa J., Ando A., Fukai T. & Mikami Y. **(2004)** Transvalencin A, a thiazolidine zinc complex antibiotic produced by a clinical isolate of *Nocardia transvalensis* I. taxonomy,

- fermentation, isolation and biological activities. *Journal of antibiotics* **57**, 797 - 802.
- 45) Ishikawa J., Yamashita A., Mikami Y., Hoshino Y., Kurita H., Hotta K., Shiba T. & Hattori M. **(2004)** The complete genomic sequence of *Nocardia farcinica* IFM 10152. *Proceedings of the national academy of sciences of the USA* **12**, 14925 - 14930.
- 46) Isik K. & Özdemir-Kocak F., **(2009)** Antimicrobial activity screening of some sulfonamide derivatives on some *Nocardia* species and isolates, *Microbiological research* **164**, 49-58
- 47) Izard T. & Ellis J. **(2001)** The crystal structures of chloramphenicol phosphor - transferase reveal a novel inactivation mechanism. *The EMBO journal* **19**, 2690 - 2700.
- 48) Jarzembowski J.A., Young M.B. **(2008)** Nontuberculous Mycobacterial Infections. *Archives of pathology & laboratory medicine* **132**, 1333-1341.
- 49) Jnawali H.N., Subba B., Liou K. & Sohng J.K. **(2009)** Functional characterization of *kanB* by complementing in engineered *Streptomyces fradiae* Deltaneo6::tsr. *Biotechnology letters* **31**, 869 - 875.
- 50) Joshi R. **(2008)** Treatment of actinomycetoma with combination of rifampicin and co-trimoxazole. *Indian journal of dermatology, venereology and leprology* **74**, 166 - 168.
- 51) Kakore C.R., Mahadik K.R., Kadam S.S. & Chopade B.A. **(2004)** Isolation, characterization and antimicrobial activity of marine halophilic *Actinopolyspora* species AH1 from the west coast of India. *Current science* **4**, 593 – 597
- 52) Kapadia M., Rolston K.V. & Han X.Y. **(2007)** Invasive *Streptomyces* infections: six cases and literature review. *Journal of clinical pathology* **127**, 619 - 624.

- 53) Khan Z., Al-Sayer H., Chugh T., Chandy R., Provost F. & Boiron P. **(2000)** Antimicrobial susceptibility profile of soil isolates of *Nocardia asteroides* from Kuwait, *Clinical microbiology infection* **6**, 94-98.
- 54) Khardori N., Shawar R., Gupta P., Rosenbaum B. & Rolston K. (1993) In vitro antimicrobial susceptibilities of *Nocardia* species *Antimicrobial agents chemotherapy* **37**, 882-884
- 55) Kharel M.K., Subba B., Basnet D.B., Woo J.S., Lee H.C., Liou K. & Sohng J.K. **(2004)** A gene cluster for biosynthesis of kanamycin from *Streptomyces kanamyceticus*: comparison with gentamicin biosynthetic gene cluster. *Archives of biochemistry and biophysics* **15**, 204 - 214.
- 56) Khokhlov A.S., Tovarova I.I., Borisova L.N., Pliner S.A., Shevchenko L.N., Kornitskaia E.I., Ivkina N.S. & Rapoport I.A. **(1967)** The A-factor, responsible for streptomycin biosynthesis by mutant strains of *Actinomyces streptomycini*. *Doklady Akademii nauk SSSR* **177**, 232 - 235.
- 57) Kim T.K., Hewavitharana A.K., Shaw P.N. & Fuerst J.A. **(2006)** Discovery of a new source of Rifamycin antibiotics in marine sponge *Actinobacteria* by phylogenetic prediction. *Applied and environmental microbiology* **72**, 2118 - 2125.
- 58) Kingston W. **(2004)** Streptomycin and the balance of credit for discovery. *Journal of the history of medicine and allied sciences* **59**, 441 - 462.
- 59) Lemriss S., Laurent F., Couble A., Casoli E., Lancelin J.M., Saintpierre-Bonaccio D., Rifai S., Fassouane A. & Boiron P. **(2003)** Screening of nonpolyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. *Canadian journal of microbiology* **49**, 669 - 674.
- 60) Lim S.K., Ju J., Zazopoulos E., Jiang H., Seo J.W., Chen Y., Feng Z., Rajski S.R., Farnet C.M. & Shen B. **(2009)** Iso-migrastatin, migrastatin, and dorrigocin production in *Streptomyces platensis* is governed by a single

- biosynthetic machinery featuring an acyltransferase-less type I polyketide synthase. *Journal of biological chemistry* **284**, 29746 - 29756.
- 61) Lipsky B.A., Gates J., Tenover F.C., Plorde J.J. **(1984)** Factors affecting the clinical value of microscopy for acid-fast bacilli. *Reviews of infectious diseases* **6**, 214-222.
- 62) Liu C.M., Hermann T.E., Downey A., Prosser B.L., Schildknecht E., Palleroni N.J., Westley J.W. & Miller P.A. **(1983)** Novel polyether antibiotics X-14868A, B, C, and D produced by a *Nocardia*. Discovery, fermentation, biological as well as ionophore properties and taxonomy of the producing culture. *Journal of antibiotics* **36**, 343 - 350.
- 63) Lu D., Heeren B. & Dunne W.M. **(2002)** Comparison of the Automated Mycobacteria Growth Indicator Tube System (BACTEC 960/MGIT) with Löwenstein-Jensen medium for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *American journal of clinical pathology* **118**, 542 - 545.
- 64) Madigan M.T., Martinko J.M. & Parker J. **(1997)** Prokaryotic diversity: Bacteria. In: *Brock Biology of Microorganisms* eighth edition. eds. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice-Hall International, Inc.
- 65) Maeda A., Yazawa K. & Mikami Y. **(1992)** The producer and biological activities of SO-075R1, a new mutactimycin group antibiotic. *The journal of antibiotics* **45**, 1848 - 1852.
- 66) Malik H., Sur B., Singhal N. & Bijari V. **(2008)** Antimicrobial protein from *Streptomyces fulvissimus* inhibitory to methicillin resistant *Staphylococcus aureus* *Indian journal experimental biology* **46**, 254-257
- 67) Martínez R., Reyes S. & Menéndez R. **(2008)** Pulmonary Nocardiosis: risk factors, clinical features, diagnosis and prognosis. *Current opinion in pulmonary medicine* **14**, 219 - 227.

- 68) McNeil M.M. & Brown J.M. **(1994)** The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clinical microbiology reviews* **7**, 357 - 417.
- 69) McNeil M.M., Brown J.M., Jarvis W.R. & Ajello L. **(1990)** Comparison of species distribution and antimicrobial susceptibility of aerobic actinomycetes from clinical specimens. *Reviews of infectious diseases* **12**, 778 - 783.
- 70) Mikami Y. **(2007)** Biological work on medically important *Nocardia* species. *Actinomycetologica* **21**, 46 - 51.
- 71) Mikami Y., Komaki H. & Imai T. **(2000)** A New antifungal macrolide component, Brasilinolide B, produced by *Nocardia brasiliensis*. *The journal of antibiotics* **53**, 70 - 75.
- 72) Mishra S.K., Gordon R.E. & Barnett D.A. **(1980)** Identification of *Nocardiae* and *Streptomyces* of medical importance. *Journal of clinical microbiology* **11**, 728 - 736.
- 73) Mukai A., Fukai T., Matsumoto Y., Ishikawa J. & Hoshino Y. **(2006)** Transvalencin Z, a new antimicrobial compound with salicylic acid residue from *Nocardia transvalensis* IFM 10065. *Journal of antibiotics* **59**, 366 - 369.
- 74) Muñoz J., Mirelis B., Aragón L.M., Gutiérrez N., Sánchez F., Español M., Esparcia O., Gurguí M., Domingo P. & Coll P. **(2007)** Clinical and microbiological features of nocardiosis 1997–2003. *Medical microbiology* **56**, 545 - 550.
- 75) Muralidhar S. & Srivastava L. **(2004)** Evaluation of three methods to determine the antimicrobial susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian journal of medical reviews* **120**, 463 - 467.
- 76) Murray P., Heeren R. & Niles A. **(1987)** Effect of decontamination procedures on recovery of *Nocardia* spp. *Journal of clinical microbiology* **25**, 210-212

- 77) Nedialkova D. & Naidenova M. **(2005)** Screening the antimicrobial activity of *Actinomycetes* strains isolated from Antarctica. *Journal of culture collections* **4**, 29 - 35.
- 78) Neonakis I.K., Gitti Z., Baritaki S., Petinaki E., Baritaki M. & Spandidos D.A., **(2009)** Evaluation of GenoType Mycobacteria Direct Assay[®] in comparison with Gen-Probe *Mycobacterium tuberculosis* Amplified Direct Test[®] and GenoType MTBDRplus[®] for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples. *Journal of clinical microbiology* **43**, 2601-2603.
- 79) Nurettin P. **(2003)** Investigation of the antimicrobial activity of some *Streptomyces* isolates. *Turkish journal of biology* **27**, 79 - 84.
- 80) Oishi H., Noto T., Sasaki H., Suzuki K., Hayashi T., Okazaki H., Ando K. & Sawada M. **(1982)** Thiolactomycin, a new antibiotic I. Taxonomy of the producing organism, fermentation and biological properties. *Journal of antibiotics* **35**, 391-395.
- 81) Omura S., Kitao C., Tanaka H., Oiwa R. & Takahashi Y. **(1976)** A new antibiotic, asukamycin, produced by *Streptomyces* Journal of Antibiotic (Tokyo), **29**, 876-881.
- 82) Palomino J.C. **(2005)** Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: feasibility and applicability in the field. *European respiratory journal* **26**, 339 - 350.
- 83) Pardini P., Varaine F., Bonnet M., Orefici G., Ogioni M. & Fattorini L. **(2007)** Usefulness of the BACTEC MGIT 960 System for isolation of *Mycobacterium tuberculosis* from Sputa Subjected to Long-Term Storage *Journal of clinical Microbiology* **45**, 575-576
- 84) Parker S., Tsai Y.L. & Palmer C.J. **(1995)** Comparison of PCR-generated fragments of the *mce* gene from *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium*, *M.*

- intracellulare*, and *M. scrofulaceum*. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* **2**, 770 - 775.
- 85) Parungao M.M., Ebner B.G. & Villano F. **(2007)** Screening of antibiotic-producing *Actinomycetes* from marine, brackish and terrestrial sediments of Samal island, Philippines. *Journal of research in science, computing and engineering* **4**, 29 - 38.
- 86) Peres R.L., Maciel E.L., Morais C.G., Ribeiro F.C.K., Vinhas S.A., Pinheiro C., Dietze R., Johnson J.L., Eisenach K. & Palaci M. **(2009)** Comparison of two concentrations of NALC-NaOH for decontamination of sputum for mycobacterial culture. *The international journal of tuberculosis and lung disease* **13**, 1572 - 1575.
- 87) Pucci M.J., Bronson J.J., Barrett J.F., DenBleyker K.L., Discotto L.F., Fung-Tomc J.C. & Ueda Y. **(2004)** Antimicrobial evaluation of nocathiacins, a thiazole peptide class of antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **48**, 3697 - 3701.
- 88) Raquel M., Soledad R. & Menéndez R. **(2008)** *Pulmonary Nocardiosis: risk factors, clinical features, diagnosis and prognosis. Current opinion pulmonary medicine* **14**, 219-227.
- 89) Rhee H., Choi K.H., Kim C.J. **(2001)** Identification of *Streptomyces* sp. AMLK-335 producing antibiotic substance inhibitory to VRE (vancomycin-resistant enterococci). *Journal of microbiology and biotechnology* **11**, 469–474.
- 90) Rishi S., Sinha P., Malhotra B. & Pal N. **(2007)** A comparative study for the detection of mycobacteria by bactec MGIT 960, lowenstein jensen media and direct AFB smear examination. *Indian journal of medical microbiology* **25**, 383 - 386.

- 91) Saubolle M. & Sussland D. **(2003)** Nocardiosis: review of clinical and laboratory experience. *Journal of clinical microbiology* **10**, 4497 - 4501.
- 92) Shantikumar L., Baruah N.C. & Bora T.C. **(2006)** Actinomycetes of Loktak Habitat: isolation and screening for antimicrobial activities. *Biotechnology* **2**, 217 - 221.
- 93) Shahrokhi S., Shahidi B. & Saadoun I. **(2005)** Biological control of potato isolate *Rhizoctonia solani* by *Streptomyces olivaceus* strain 115. *Biotechnology* **4**, 132-138
- 94) Shobha K., Rao P. & Thomas J. **(2005)** Survey of *Staphylococcus* isolates among hospital personnel, environment and their antibiogram with special emphasis on methicillin resistance. *Indian journal of medical microbiology* **23**, 186-188
- 95) Šiširak M., Zvizdić A. & Hukić M. **(2010)** Methicilline Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) as a cause of nosocomial wound infections. *Bosnian journal of basic medical sciences* **10**, 32 - 37.
- 96) Sohng J.K., Yamaguchi T., Seong C.N., Baik K.S., Park S.C., Lee H.J., Jang S.Y., Simkhada J.R. & Yoo J.C. **(2008)** Production, isolation and biological activity of nargenicin from *Nocardia* sp. CS682. *Archives in pharmacal research* **31**, 1339 - 1345.
- 97) Soini H. & Musser J.M. **(2001)** Molecular diagnosis of *Mycobacteria* *Clinical chemistry* **47**, 809 - 814.
- 98) Sorlozano A., Soria I., Roman J., Huertas P., Soto M.J., Piedrola G. & Gutierrez J. **(2009)** Comparative evaluation of three culture methods for the isolation of mycobacteria from clinical samples. *Journal of microbiology and biotechnology* **19**, 1259 - 1264.

- 99) Speitling M., Nattewan P., Yazawa K., Mikami Y & Grun I. **(1998)** Demethyl mutactimycins, new anthracycline antibiotics from *Nocardia* and *Streptomyces* strains. *Journal of antibiotics* **51**, 693 - 698.
- ¹⁰⁰⁾ Tae Kyung K., Hewavitharana A., Shaw N. & Fuerst J. **(2006)** Discovery of a new source of rifamycin antibiotics in marine sponge *Actinobacteria* by phylogenetic prediction. *Applied and environmental microbiology* **72**, 2118-2125
- 101) Tanaka Y., Komaki H., Yazawa K. & Mikami Y. **(1997)** Brasilinolide A, a new macrolide antibiotic produced by *Nocardia brasiliensis*: producing strain, isolation and biological activity. *Research centre for pathogenic fungi and microbial toxicoses* **50**, 1036 - 1041.
- 102) Usui T., Nagumo Y., Watanabe A., Kubota T., Komatsu K., Kobayashi J. & Osada H. **(2006)** Brasilicardin A, a natural immunosuppressant, targets amino acid transport system. *Chemistry and biology* **13**, 1153 - 1160.
- 103) Van Gelderen A. & Durán E.L. **(1998)** Antimicrobial susceptibilities of strains of *Nocardia brasiliensis* isolated from soil of Tucumán. *Mycopathologia* **141**, 115-121.
- 104) Ventura M., Canchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G.F., Chater K.F. & van Sinderen D. **(2007)** Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and molecular biology reviews* **71**, 495 - 548.
- 105) Wallace R., Wiss K., Ron Curvey, Paula H. V. & Steadham J. **(1983)** Differences among *Nocardia* spp. in susceptibility to aminoglycosides and β -Lactam antibiotics and their potential use in taxonomy. *Antimicrobial agents chemotherapy* **23**, 19-21.

- 106) Wallace R. & Steele LC. **(1988)** Susceptibility testing of *Nocardia* species for the clinical laboratory, *Diagnostic microbiology and infectious disease* **9**, 155-166
- 107) Weber J.M., Wierman C.K. & Hutchinson C.R. **(1985)** Genetic analysis of erythromycin production in *Streptomyces erythreus*. *Journal of bacteriology* **164**, 425 - 433.
- 108) Williston E.H., Pari Z-W. & Youmans G. **(1947)** Plate methods for testing antibiotic activity of *Actinomycetes* against virulent human type tubercle Bacille. *Journal of bacteriology* **54**, 563 - 568.
- 109) Yadav J. **(2007)** Biochemical and genetic characterization of a *Streptomyces* sps from Everest region and chemical characterization of antibiotics produced therefrom. *Research laboratory for biotechnology and biochemistry* <http://upendratts.blogspot.com/2007/07/biochemical-and-genetic.html>
- 110) Yang Y.K., Morikawa M., Shimizu H., Shioya S., Suga K., Nihira T. & Yamada Y. **(1996)** Maximum virginiamycin production by optimization of cultivation conditions in batch culture with autoregulator addition. *Biotechnology and bioengineering* **49**, 437 - 444.
- 111) Yasushi T., Hisayuki K., Katsukiyo Y. & Yuzuru M. **(1997)** Brasilinolide A, a new macrolide antibiotic produced by *Nocardia brasiliensis*: producing strain, isolation and biological activity. *Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses* **50**, 1036-1041
- 112) Yoo J.C., Kim J.H., Ha J.W., Park N.S., Sohng J.K., Lee J.W., Park S.C., Kim M.S. & Seong C.N. **(2007)** Production and biological activity of laidlomycin, anti-MRSA/VRE antibiotic from *Streptomyces* sp. CS684. *Journal of microbiology* **45**, 6 - 10.

- 113) Zakia S., Rahman A.A. & Gafur M.A. **(2001)** Identification and *in vitro* antimicrobial activity of a compound isolated from *Streptomyces* species. *Pakistan journal of biological sciences* **12**, 1523 - 1525.
- 114) Zotchev S., Caffrey P. **(2006)** Genetic analysis of nystatin and amphotericin biosynthesis. *Methods in Enzymology*. **459**, 243-58.
- 115) Γερογιάννη Ε., Παπαλά Μ. & Γουργουλιάνης Κ.Ι. **(2008)** *Ανταμυκοβακτηρίδια Επιδημιολογικά και διαγνωστικά κριτήρια και θεραπευτικές προσεγγίσεις. Archives of Hellenic medicine* **25**, 418 - 431.
- 116) Δέλλιου Α-Α. **(2008)** Μελέτη των στελεχών της μικροβιακής συλλογής του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας, του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών, με στόχο τη διερεύνηση παραγωγής βιοενεργών ουσιών. Διπλωματική εργασία, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- 117) Καραγκούνη-Κύρτσου Α.Δ. (2001) Έλεγχος της μικροβιακής αύξησης – αντιμικροβιακοί παράγοντες, Εργαστηριακές ασκήσεις γενικής μικροβιολογίας, Εκδόσεις Σταμούλης Α., σελίδες 59 - 68.
- 118) Κατσίφας Ε.Α. **(1999)** Επίδραση διαφόρων παραγόντων στην επιβίωση και αύξηση στρεπτομυκήτων σε δείγματα εδάφους. Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- 119) Μαμούχα Σ., Βελέντζα Α., Μπασούλης Δ., Μπουζά Κ., Περάκης Γ., Σταμούλος Κ., Παύλου Κ., Παπαφράγκας Ε., Φακίρη Ε. **(2010α)** Εργαστηριακή προσέγγιση λοιμώξεων από μυκοβακτηρίδια σε Τριτοβάθμιο Νοσοκομείο - αποτελέσματα πέντε ετών 2005-2010, Ελληνική Μικροβιακή Εταιρία **55**, 133- 141.

- 120) Μαμούχα Σ., Μπασούλης Δ., Παύλου Κ., Φακίρη Ε. **(2010β)** Προσδιορισμός και διαγνωστική αξία των επιπέδων της απαμινάσης της αδενοσίνης στη φυματίωση, Ελληνική Μικροβιακή Εταιρία **55**, 121- 132.
- 121) Μπουζιά Α. & Χριστοπούλου-Αλετρά Ε. **(2006)** Η φυματίωση σε ελληνικά περιοδικά της περιόδου 1854-1901. *Πνεύμων* **19**, 349 – 356.
- 122) Σαββίδης Αλέξανδρος **(2004)** Μελέτη της φυσιολογίας μεταλλαγμένων στελεχών του βακτηρίου *Zyotomonas mobilis* με βιομηχανικό ενδιαφέρον σε κλειστά και ανοικτό σύστημα καλλιέργειας. Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- 123) Φακίρη Ε., Μπασούλης Δ. & Βελέντζα Α. **(2009)** Συμβολή του εργαστηρίου στην εκτίμηση του πνευμονολογικού ασθενούς. Εκδόσεις Ελληνικής Πνευμονολογικής Εταιρίας, σελίδες 547 - 564.

Ιστοσελίδες

BSAC: British Society for Antimicrobial Chemotherapy (<http://www.bsac.org.uk>).

SRGA : The Swedish Reference Group for Antibiotics www.srga.org

CDC : Centre for Disease Control (Atlanta, USA) www.cdc.gov

WHO : World Health Organisation (Geneva, Switzerland) www.who.int

NCCLS : National Committee for Clinical Laboratory Standards www.nccls.org

NEQAS : National External Quality Assessment Scheme www.ukneqas.org.uk

NCTC : National Collection of Type Cultures www.phls.org.uk

Σημείωση

Οι ελληνικές λέξεις των επιστημονικών όρων μεταφράστηκαν σύμφωνα με τα λεξικά

Παταργιάς Θ.Α., Σέκερης Κ.Ε., Σέκερη-Παταργιά Κ. & Μαργαρίτης Λ.Χ. (1992)
Αγγλοελληνικό Λεξικό Βιολογικών και Ιατρικών Όρων.

Δραΐνας Κ., Κολισης Φ., Λέκκα Μ., Παλαιολόγος Γ., Σταθάκος Δ., Τσελέπης Α. &
Τσίγγανος Κ. (1995) *Αγγλοελληνικό Λεξικό Βιοχημείας, Μοριακής Βιολογίας και
Βιοτεχνολογίας.*

Παράρτημα 1^ο

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΒΙΟΕΝΕΡΓΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ *STREPTOMYCES* ΕΝΑΝΤΙ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Μαμούχα Σ.², Δέλλιου Α. - Α.¹, Σαββίδης Α.¹, Σταμούλος Κ.², Βελέντζα Κ.²,
Δριβαλά Μ.², Φακίρη Ε.², Καραγκούνη - Κύρτσου Α.¹.

¹ Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας
Βοτανικής, Μικροβιολογία, 157 73, Αθήνα, ² Γ.Ν.Α. Σισμανόγλειο, Εργαστήριο
Κλινικής Μικροβιολογίας, Τ.Κ. 151-26, Μαρούσι.

Εισαγωγή: Τα 2/3 των αντιβιοτικών παράγονται από ακτινομύκητες και το 80% αυτών από τους στρεπτομύκητες. Τα αντιβιοτικά αυτά είναι δευτερογενείς μεταβολίτες και περιλαμβάνουν ουσίες όπως αμινογλυκοζίδια, πολυκετίδια, β-λακτάμες κ.α. που έχουν ένα ευρύ φάσμα δράσης.

Σκοπός: Ο σκοπός της εργασίας ήταν η αξιολόγηση της βιοενεργότητας περιβαλλοντικών στελεχών *Streptomyces* έναντι κλινικών στελεχών.

Υλικά και Μέθοδοι: 452 περιβαλλοντικά στελέχη *Streptomyces* ελέχθησαν για την παραγωγή βιοενεργών ουσιών έναντι τριών οργανισμών δεικτών (*E. coli*, *B. subtilis* and *S. cerevisiae*) χρησιμοποιώντας τη Μέθοδο Αραιώσης σύμφωνα με τους Casey et al, 2004. 17 στελέχη επιλέχθηκαν, με βάση την υψηλή βιοενεργότητα που παρουσίαζαν και εξετάστηκαν έναντι κλινικών στελεχών των γενών *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Nocardia*, *Mycobacterium* Other Than Tuberculosis-MOTT, *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Proteus*, *E. coli*, *Klebsiella* και *Pseudomonas*. Η αξιολόγηση της βιοενεργότητας έγινε με τη Μέθοδο Διάχυσης σε Άγαρ σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Mueller-Hinton.

Αποτελέσματα και συμπεράσματα: 363 στελέχη *Streptomyces* ανέστειλλαν την *E. coli*, 331 ήταν βιοενεργά έναντι του *B. subtilis* και 249 έναντι του *S. cerevisiae*. 164 στελέχη ανέστειλλαν και τους 3 οργανισμούς δείκτες, ενώ 21 δεν είχαν κάποια βιοενεργότητα. Από τα επιλεγμένα στελέχη *Streptomyces*, δύο ανέστειλλαν την ανάπτυξη δύο στελεχών *Staphylococcus*, 13 ανέστειλλαν την ανάπτυξη δέκα στελεχών *Nocardia* και 13 ανέστειλλαν έξι στελέχη MOTT. Καμία αναστολή δεν παρατηρήθηκε στο γένος *Enterococcus* και στα κλινικά Gram αρνητικά στελέχη.

Ποστερ στο 5^ο Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Νοσοκομειακών Λοιμώξεων (2011)

**SCREENING FOR ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF NATURAL
PRODUCTS
PRODUCED BY ENVIRONMENTAL STRAINS
OF STREPTOMYCES AGAINST CLINICAL ISOLATES**

Mamouha E. Stavroula (Msc), Delliou Anastasia – Aikaterini (Msc), Savvides L.
Alexander (PhD), Kanterakis Georgios, Skarmoutsou Nikoleta, Dimitriadou Dimitra,
Paulou Konstantina, Fakiri Eleni (PhD), Karagouni D. Amalia
1: National and Kapodistrian University of Athens, Faculty of Biology, Department of
Botany, 15773, Athens, Greece, 2: General Hospital Sismanogleio, Sismanogleiou 1,
Maroussi

General: Actinomycetes produce 2/3 of antibiotics commercially used and 80% of them are produced from *Streptomyces*. These antibiotics are secondary metabolites and include compounds such as aminoglycosides, poliketides, β -lactams etc.

Aim: The purpose of this work was to examine bioactive compounds produced from environmental strains of *Streptomyces* against clinical isolates.

Materials and methods: 452 environmental strains of *Streptomyces* were screened for producing bioactive compounds against test organisms (*E. coli*, *B. subtilis* and *S. cerevisiae*) by the Dilution Method according to Casey et al, 2004. 17 bioactive *Streptomyces* were selected and tested against clinical isolates (*Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Nocardia*, *Mycobacterium* Other Than Tuberculosis-MOTT, *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Proteus*, *E. coli*, *Klebsiella* και *Pseudomonas*) by Agar Diffusion Method on Mueller-Hinton Agar.

Results: 363 *Streptomyces* strains inhibited *E. coli* growth, 331 were bioactive against *B. subtilis* and 249 against *S. cerevisiae*. 164 strains inhibited all 3 test organisms while 21 were not active. From the selected strains 2 inhibited two clinical isolates of *Staphylococcus*, 13 inhibited 10 clinical strains of *Nocardia* and 13 inhibited 6 strains of MOTT. No growth inhibition was noticed on Gram negative bacterium.

Poster presentation at 5th National Conference of Clinical Microbiology and Nosocomial Infections (2011)

Παράρτημα 2^ο

ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΙΟΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *STREPTOMYCES* ΕΝΑΝΤΙ ΓΝΩΣΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

Μαμούχα Σ.², Δέλλιου Α. - Α.¹, Σαββίδης Α.¹, Καντερακης Γ.², Σκαρμούτσου Ν.²,
Δημητριάδου Δ.², Παύλου Κ.², Φακίρη Ε.², Καραγκούνη - Κύρτσου Α.¹.

¹ Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας
Βοτανικής, 15773, Αθήνα, ² Γ.Ν.Α. Σισμανόγλειο, Εργαστήριο Κλινικής
Μικροβιολογίας, Τ.Κ. 151-26, Μαρούσι.

Εισαγωγή: Τα βακτήρια του γένους *Streptomyces* παράγουν μια μεγάλη ποικιλία αντιβιοτικών ουσιών (αμινογλυκοσίδια, β-λακτάμες, πεπτίδια, τετρακυκλίνες κ.α.). Από τα 17 στελέχη του γένους *Streptomyces* που εξετάσθηκαν έναντι κλινικών παθογόνων στελεχών των γενών *Staphylococcus*, *Nocardia* και *Mycobacterium Other Than Tuberculosis-MOTT*, 14 προκάλεσαν αναστολή αύξησης στα κλινικά στελέχη.

Σκοπός: Ο σκοπός της εργασίας ήταν η σύγκριση της βιοενεργότητας των 14 στελεχών σε σχέση με την αναστολή που προκαλείται από αντιβιοτικά προτεινόμενα από τα Πρότυπα του Συμβουλίου Κλινικών Εργαστηρίων και τα οποία χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση λοιμώξεων προκληθέντων από τα ως άνω κλινικά στελέχη.

Υλικά και Μέθοδοι: Πραγματοποιήθηκε εξέταση ευαισθησίας στα παθογόνα κλινικά στελέχη (μικροοργανισμοί δείκτες) που παρουσίασαν αναστολή ανάπτυξης από τις βιοενεργές ουσίες των περιβαλλοντικών στελεχών στρεπτομυκήτων. Χρησιμοποιήθηκαν τα θρεπτικά υποστρώματα Mueller-Hinton και Middlebrook 7H11. Στη συνέχεια έγινε σύγκριση της ζώνης αναστολής που προέκυψε από τα αντιβιοτικά με τη ζώνη αναστολής που προέκυψε από τα περιβαλλοντικά στελέχη του γένους *Streptomyces*.

Αποτελέσματα και συμπεράσματα: Παρατηρήθηκε ότι η βιοενεργότητα των περιβαλλοντικών στελεχών ήταν σε ορισμένες περιπτώσεις συγκρίσιμη με εκείνη των αντιβιοτικών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ορισμένα στελέχη *Streptomyces* προκάλεσαν μεγαλύτερη αναστολή στα κλινικά στελέχη σε σχέση με τα γνωστά αντιβιοτικά.

Δημοσιεύσιμη εργασία στον Τόμο περιλήψεων του 5^{ου} Εθνικού Συνεδρίου Κλινικής Μικροβιολογίας και Νοσοκομειακών Λοιμώξεων (2011)

COMPARING BIOACTIVE COMPOUNDS ACTIVITY FROM STREPTOMYCES STRAINS WITH ANTIBIOTIC DISCS

Mamouha E. Stavroula (Msc), Delliou Anastasia – Aikaterini (Msc), Savvides L. Alexander (PhD), Kanterakis Georgios, Skarmoutsou Nikoleta, Dimitriadou Dimitra, Paulou Konstantina, Fakiri Eleni (PhD), Karagouni D. Amalia
1: National and Kapodistrian University of Athens, Faculty of Biology, Department of Botany, 15773, Athens, Greece, 2: General Hospital Sismanogleio, Sismanogleiou 1, Maroussi

General: *Streptomyces* strains produce a variety of antibiotic compounds (aminoglycosides, β -lactams, peptides, tetracyclines etc). 14 of 17 environmental *Streptomyces* strains tested, inhibited clinical stain's growth (*Staphylococcus*, *Nocardia* και *Mycobacterium* Other Than Tuberculosis-MOTT).

Aim: The purpose of this work was to compare the bioactivity of 14 strains with antibiotic discs suggested by the Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) which are used for the infection of pathogenic bacteria.

Material and methods: Susceptibility test was performed for all the test organisms whose growth was inhibited by bioactive compounds of *Streptomyces*. Mueller-Hinton Agar and Middlebrook 7H11 Agar were used for the Kirby Bauer Method. Diameter zone of inhibition from bioactive compounds was compared with that of antibiotic discs.

Results: Bioactive compounds activity was similar to that of antibiotic used. Some strains made bigger diameter zone of inhibition from the commercially used antibiotics.

Publication at the Abstract Book of 5th National Conference of Clinical Microbiology and Nosocomial Infections (2011)

Παράρτημα 3^ο

Bioactivity of *Streptomyces* strains isolated from specific Greek ecosystems against clinical bacterial strains.

Delliou A.-A.¹, Mamouha S.^{1,2}, Savvidis A.¹, Fakiri E.², Karagouni A.D.¹

¹ National and Kapodistrian University of Athens, Faculty of Biology, Department of Botany, Microbiology Group, 157-01, Panepistimiopolis, Athens, Greece. ² General Hospital of Athens Sismanogleio, Laboratory of Clinical Microbiology, 151-26, Marousi, Greece

Introduction:

Nowadays the emergence of clinical strains resistant in the existent antibiotics, reveals the necessity of finding new ones. Since the discovery of the first antibiotic produced by *Streptomyces antibioticus* in 1940, 6500 antibiotics have been found to be produced by the genus *Streptomyces*. These antibiotics are secondary metabolites and contain substances such as aminoglycosides, polyketides, β -lactams which have a broad spectrum of activity.

Aim:

The aim of this work was the assessment of activity of *Streptomyces* strains from different ecosystems of the Greek environment, against three non-clinical strains and 50 bacterial strains isolated from clinical samples.

Materials and Methods: 448 bacterial isolates assigned to the genus *Streptomyces* on the basis of phenotypic characteristics and isolated from 9 different Greek habitats, were screened *in vitro* for antifungal and antibacterial activity against three test strains (*E. coli*, *B. subtilis* and *S. cerevisiae*), using a dilution method (Casey et al, 2004). 16 strains were selected, according to their high efficacy in inhibiting the growth of the test strains, and were examined for their bioactivity against strains, isolated from clinical samples, of the genus *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* and *E. coli*. using the double agar layer diffusion method, in Mueller-Hinton agar medium. The bioactivity of the selected strains was compared with widely used antibiotics in hospitals using the Kirby-Bauer method. Additionally, the 16 selected *Streptomyces* strains were characterized according to 16s rRNA gene, *M. tuberculosis* complex strains were identified by amplified *M. tuberculosis* direct test and MOTT strains were identified by GenoType Mycobacterium CM/AS.

Results and Discussion: 361 *Streptomyces* strains inhibited the growth of *E. coli*, 328 were bioactive against *B. subtilis* and 245 against *S. cerevisiae*. 163 strains inhibited the growth of all the 3 test strains and 21 didn't have any bioactivity. From the selected *Streptomyces* strains, two were bioactive against two *Staphylococcus* strains, 12 against ten *Nocardia* strains and 13 against ten *Mycobacterium* other than tuberculosis strains. None of the 16 *Streptomyces* strains inhibited the growth of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Enterococcus* and clinical Gram negative strains. Great interest is demonstrated by two strains *Streptomyces rochei* (M5 and M33), as they presented a greater bioactivity against Gram positive bacteria, than the antibiotics routinely used.

Poster Presentation at 11th Conference of Bacterial Genetics and Ecology BAGECO (2011)

Παράρτημα 4^ο

Παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών Ακτινοβακτηρίων έναντι κοινών κλινικών παθογόνων μικροβίων

Σ.Μαμούχα¹, Ε.Κατσίφας², Α.Σαββίδης², Α.Καραγκούνη², Ε.Φακίρη¹
¹ Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Βοτανικής, Μικροβιολογία, 157 73, Αθήνα, ² Γ.Ν.Α. Σισμανόγλειο, Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας, Τ.Κ. 151-26, Μαρούσι.

Εισαγωγή: Τα 2/3 των αντιβιοτικών παράγονται από ακτινομύκητες και το 80% αυτών από τους στρεπτομύκητες.

Σκοπός: Ο σκοπός της εργασίας ήταν η αξιολόγηση της βιοενεργότητας περιβαλλοντικών στελεχών *Streptomyces* έναντι κλινικών στελεχών και η σύγκριση με την αναστολή που προκαλείται από αντιβιοτικά προτεινόμενα από τα Πρότυπα του Συμβουλίου Κλινικών Εργαστηρίων

Υλικά και Μέθοδοι: Επιλέχθηκαν 17 στελέχη, με βάση την υψηλή βιοενεργότητα που παρουσιάζαν και εξετάστηκαν έναντι κλινικών στελεχών των γενών *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Nocardia*, *Mycobacterium* Other Than Tuberculosis-MOTT, *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Proteus*, *E. coli*, *Klebsiella* και *Pseudomonas*. Η αξιολόγηση της βιοενεργότητας έγινε με τη Μέθοδο Διάχυσης σε Άγαρ σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Mueller-Hinton.

Αποτελέσματα και συμπεράσματα: Από τα επιλεγμένα στελέχη *Streptomyces*, δύο ανέστειλλαν την ανάπτυξη δύο στελεχών *Staphylococcus*, 13 ανέστειλλαν την ανάπτυξη δέκα στελεχών *Nocardia* και 13 ανέστειλλαν έξι στελέχη MOTT. Καμία αναστολή δεν παρατηρήθηκε στο γένος *Enterococcus* και στα κλινικά Gram αρνητικά στελέχη. Παρατηρήθηκε ότι η βιοενεργότητα των περιβαλλοντικών στελεχών ήταν σε ορισμένες περιπτώσεις συγκρίσιμη με εκείνη των αντιβιοτικών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ορισμένα στελέχη *Streptomyces* προκάλεσαν μεγαλύτερη αναστολή στα κλινικά στελέχη σε σχέση με τα γνωστά αντιβιοτικά.

Προφορική ανακοίνωση στο 2^ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο Τεχνολόγων Ιατρικών Εργαστηρίων

**SCREENING FOR ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF NATURAL PRODUCTS
PRODUCED BY ENVIRONMENTAL AND CLINICAL ISOLATES OF
ACTINOBACTERIA AGAINST CLINICAL STRAINS**

Mamouha S.^{1,2}, Savvidis A.¹, Katsifas E.¹, Fakiri E.², Karagouni A.D.¹

¹ National and Kapodistrian University of Athens, Faculty of Biology, Department of Botany, Microbiology Group, 157-01, Panepistimiopolis, Athens, Greece. ² General Hospital of Athens Sismanogleio, Laboratory of Clinical Microbiology, 151-26, Marousi, Greece

General: Actinomycetes produce 2/3 of antibiotics commercially used and 80% of them are produced from *Streptomyces*.

Aim: The purpose of this work was to examine bioactive compounds produced from environmental strains of *Streptomyces* against clinical isolates and to compare the bioactivity of 14 strains with antibiotic discs suggested by the Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)

Materials and methods: 17 bioactive *Streptomyces* were selected and tested against clinical isolates (*Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Nocardia*, *Mycobacterium* Other Than Tuberculosis-MOTT, *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Proteus*, *E. coli*, *Klebsiella* και *Pseudomonas*) by Agar Diffusion Method on Mueller-Hinton Agar.

Results: From the selected strains 2 inhibited two clinical isolates of *Staphylococcus*, 13 inhibited 10 clinical strains of *Nocardia* and 13 inhibited 6 strains of MOTT. No growth inhibition was noticed on Gram negative bacterium. Bioactive compounds activity was similar to that of antibiotic used. Some stains made bigger diameter zone of inhibition from the commercially used antibiotics.

Oral presentation at 2nd Annual Panhellenic Conference of Laboratory Technicians