

ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΙΓΙΝΗΤΕΙΟΥ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ
Διευθύντρια: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Χ. Νικολάου

ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΚΑΙ ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ
ΛΟΙΜΟΓΟΝΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΕ ΣΤΕΛΕΧΗ
***Yersinia enterocolitica* ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΑΠΟ**
ΚΛΙΝΙΚΑ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΑ

Αννα Κυράτσα
Ιατρός Βιοπαθολόγος - Μικροβιολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΑΘΗΝΑ 2013

Ἱπποκράτειος Ὀρκος

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, Ἱστορας ποιεύμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν ὄρκον τόνδε καὶ ξυγγραφὴν τήνδε. ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωύτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρῃεσι, καὶ διδάξῃν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ξυγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἰοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοισί τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλω δὲ οὐδενί. Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξειν. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. ὁμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἄγνωῶς δὲ καὶ ὁσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε. Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίας, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπείης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρῃετα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὀρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ ξυγχέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιορκοῦντι, τάναντία τουτέων.

Ιπποκράτειος Όρκος (Απόδοση στη Νέα Ελληνική)

Ορκίζομαι στον Απόλλωνα τον Ιατρό και στον Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και σ' όλους τους Θεούς και τις Θεές επικαλούμενος την μαρτυρία τους, να τηρήσω πιστά κατά τη δύναμη και την κρίση μου αυτό τον όρκο και το συμβόλαιό μου αυτό. Να θεωρώ αυτόν που μου δίδαξε αυτή την τέχνη ίσο με τους γονείς μου και να μοιραστώ μαζί του τα υπάρχοντά μου και τα χρήματά μου αν έχει ανάγκη φροντίδας. Να θεωρώ τους απογόνους του ίσους με τ' αδέρφια μου και να τους διδάξω την τέχνη αυτή αν θέλουν να τη μάθουν, χωρίς αμοιβή και συμβόλαιο και να μεταδώσω με παραγγελίες, οδηγίες και συμβουλές όλη την υπόλοιπη γνώση μου και στα παιδιά μου και στα παιδιά εκείνου με δίδαξε και στους άλλους μαθητές που έχουν κάνει γραπτή συμφωνία μαζί μου και σ' αυτούς που έχουν ορκισθεί στον ιατρικό νόμο και σε κανέναν άλλο και να θεραπεύω τους πάσχοντες κατά τη δύναμή μου και την κρίση μου χωρίς ποτέ, εκουσίως, να τους βλάψω ή να τους αδικήσω. Και να μη δώσω ποτέ σε κανένα, έστω κι αν μου το ζητήσει, θανατηφόρο φάρμακο, ούτε να δώσω ποτέ τέτοια συμβουλή. Ομοίως να μη δώσω ποτέ σε γυναίκα φάρμακο για ν' αποβάλει. Να διατηρήσω δε τη ζωή μου και την τέχνη μου καθαρή και αγνή. Και να μη χειρουργήσω πάσχοντες από λίθους αλλά ν' αφήσω την πράξη αυτή για τους ειδικούς. Και σ' όποια σπίτια κι αν μπω, να μπω για την ωφέλεια των πασχόντων αποφεύγοντας κάθε εκούσια αδικία και βλάβη και κάθε γενετήσια πράξη και με γυναίκες και με άνδρες, ελεύθερους και δούλους. Και ό,τι δω ή ακούσω κατά την άσκηση του επαγγέλματός μου, ή κι εκτός, για τη ζωή των ανθρώπων, που δεν πρέπει ποτέ να κοινοποιηθεί, να σιωπήσω και να το τηρήσω μυστικό. Αν τον όρκο μου αυτό τηρήσω πιστά και δεν τον αθετήσω, είτε ν' απολαύσω για πάντα την εκτίμηση όλων των ανθρώπων για τη ζωή μου και για την τέχνη μου, αν όμως παραβώ και αθετήσω τον όρκο μου να υποστώ τα αντίθετα από αυτά.

Μέλη τριμελούς επιτροπής: Καθηγητής Κος Ν. Ι. Λεγάκης
Αν. Καθηγήτρια Κα Χ. Νικολάου
Αν. Καθηγητής Κος Σ. Χατζηπαναγιώτου (Επιβλέπων)

Ημερομηνία αίτησης: 13/05/2004

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς επιτροπής: 21/05/2004

Ημερομηνία κατάθεσης πρωτοκόλλου: 13/05/2004

Ημερομηνία κατάθεσης πρώτης έκθεσης προόδου: 25/05/2012

Ημερομηνία κατάθεσης δεύτερης έκθεσης προόδου: 21/09/2012

Ημερομηνία κατάθεσης τρίτης έκθεσης προόδου: 21/12/2012

Ημερομηνία κατάθεσης διατριβής:

Ημερομηνία κρίσης διατριβής:

Μέλη επταμελούς επιτροπής: Καθηγητής Κος Ν. Ι. Λεγάκης
Αν. Καθηγήτρια Κα Χ. Νικολάου
Αν. Καθηγητής Κος Σ. Χατζηπαναγιώτου
.....
.....
.....
.....

Βαθμός διδακτορικής διατριβής:

Αφιερώνεται στη γιαγιά μου, στη μητέρα μου και στη θεία μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	9
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	12
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	13
1. ΙΣΤΟΡΙΑ – ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ	14
2. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ	14
2.1. Μορφολογία	14
2.2. Καλλιέργεια	15
2.3. Φυσιολογία - Μεταβολισμός - Ταυτοποίηση	16
2.4. Βιοτυπία	17
2.5. Αντιγόνα – Οροτυπία	18
2.6. Μοριακή τυποποίηση	19
2.7. Οικολογία – Γεωγραφική κατανομή	20
3. Η <i>Y. enterocolitica</i> ΩΣ ΠΑΘΟΓΟΝΟ	22
3.1. Μετάδοση	22
3.1.1. Τροφιμογενής μετάδοση	22
3.1.2. Μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο	22
3.1.3. Μετάδοση από ζώα	23
3.1.4. Άμεση μετάδοση από περιβαλλοντικές πηγές	23
3.1.5. Μετάδοση μετά από μετάγγιση αίματος	23
3.2. Λοιμώξεις και ανοσοπαθολογικές επιπλοκές	24
3.2.1. Λοιμώξεις	24
3.2.2. Ανοσοπαθολογικές επιπλοκές	25
3.2.2.i. Αντιδραστική αρθρίτιδα	26
3.2.2.ii. Οζώδες ερύθημα	26
3.2.2.iii. Άλλες πιθανές επιπλοκές	26
3.2.3. Προδιαθεσικοί παράγοντες	28
3.2.4. Διάγνωση υερσινιώσεων	29
3.2.5. Ευαισθησία στα αντιβιοτικά – Θεραπευτική αντιμετώπιση	30
4. <i>Yersinia enterocolitica</i> : ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ	30

4.1. Παράγοντες παθογένειας	30
4.2. Λοιμογόνος δράση	35
4.3. Διαδικασία προσαρμογής	35
4.4. Προσκόλληση	36
4.5. Μηχανισμοί προσβολής των επιθηλιακών κυττάρων	37
4.6. Τοπική και συστηματική διασπορά	38
5. ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΕΣ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΕΣ	41
5.1. Βιομεμβράνες στο γένος <i>Yersinia</i>	43
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	45
1. ΣΚΟΠΟΣ	46
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	47
2.1. Σύντομη έκθεση της πειραματικής πορείας	47
2.2. Συλλογή κλινικών στελεχών - Ασθενείς	47
2.3. Καλλιέργεια και απομόνωση στελεχών <i>Y. enterocolitica</i>	50
2.4. Ταυτοποίηση	50
2.4.1. Βιοχημική ταυτοποίηση	50
2.4.2. Μοριακή ταυτοποίηση με τη μέθοδο του 16S rDNA	51
2.5. Οροτυπία	53
2.6. Βιοτυπία	53
2.7. Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά	53
2.7.1. Αντιβιογράμμα	53
2.7.2. Προσδιορισμός MIC με τη μέθοδο των μικροαραιώσεων	55
2.8. Αξιολόγηση φαινοτυπικών χαρακτηριστικών σχετιζόμενων με τη λοιμογόνο ικανότητα της <i>Y. enterocolitica</i>	55
2.8.1. Καλλιέργεια σε BHIMOX άγαρ	55
2.9. Μοριακή τυποποίηση στελεχών <i>Yersinia enterocolitica</i> με ηλεκτροφόρηση θραυσμάτων DNA σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE)	56
2.10. Χαρακτηρισμός πλασμιδιακού DNA	60
2.10.1. Καθαρισμός του πλασμιδίου pYV	60
2.10.2. Ηλεκτροφόρηση πλασμιδιακού DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	61
2.11. Απομόνωση χρωμοσωματικού DNA	62
2.12. Ανίχνευση των γονιδίων <i>yadA</i> , <i>virF</i> και <i>yst</i> με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	62

2.13. Διερεύνηση παραγωγής βιομεμβράνης	67
2.14. Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά	68
2.15. Ανίχνευση του γονιδίου <i>waaE</i>	68
2.16. <i>hms</i> -Ομόλογες αλληλουχίες στην <i>Y. enterocolitica</i> : Αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων	70
2.17. Στατιστική ανάλυση	70
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	71
3.1. Βιοχημικά χαρακτηριστικά, ορότυποι και βιότυποι <i>Y. enterocolitica</i>	71
3.2. Φαινότυποι αντοχής στελεχών <i>Y. Enterocolitica</i>	74
3.3. Αποτελέσματα μοριακής τυποποίησης στελεχών <i>Yersinia enterocolitica</i> με PFGE	77
3.4. Φαινοτυπική ανίχνευση του πλασμιδίου pYV	78
3.5. Ανίχνευση του pYV πλασμιδιακού DNA	80
3.6. Ανίχνευση του πλασμιδιακού γονιδίου <i>yadA</i> με PCR	81
3.7. Ανίχνευση του πλασμιδιακού γονιδίου <i>virF</i> με PCR	83
3.8. Ανίχνευση του χρωμοσωματικού γονιδίου παθογένειας <i>yst</i>	88
3.9. Αποτελέσματα δοκιμασιών παραγωγής βιομεμβράνης	89
3.10. Αποτελέσματα PCR για το γονίδιο <i>waaE</i>	98
3.11. Ανεύρεση <i>hms</i> -ομόλογων αλληλουχιών σε βάσεις δεδομένων	98
3.12. Στατιστική ανάλυση	100
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	103
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	109

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Α. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Επώνυμο	: Κυράτσα
Όνομα	: Άννα
Όνομα πατρός	: Αντώνιος
Όνομα Μητρός	: Παναγιούλα
Έτος Γεννήσεως	: 02/03/1976
Τόπος Γεννήσεως	: Αθήνα
Οικογενειακή Κατάσταση	: Έγγαμη, με δύο παιδιά
Διεύθυνση Κατοικίας	: Εθνικής Παλαιοκαστρίτσας, Κέρκυρα, 49100 2661039003
Email	anna.kyratsa@gmail.com
Β. ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ	Μιλώ και γράφω Αγγλικά, Γαλλικά και Τσέχικα
Γ. ΑΛΛΑ	Χρήση Η/Υ

Δ. ΣΠΟΥΔΕΣ-ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

- 1. 1993** Απόφοιτος Πειραματικού Λυκείου Πειραιώς «Ζάννειος Πρότυπος Σχολή»
- 2. 1993-1994** Παρακολούθηση προιατρικού τμήματος και επιτυχής εισαγωγή στο πρώτο έτος της Ιατρικής σχολής του «Charles University of Prague»
- 3. 2000** Απόφοιτος της Ιατρικής σχολής του «Charles' University of Prague»
- 4. 2000-2001** Αναγνώριση του τίτλου σπουδών από το ΔΙ.ΚΑ.ΤΣΑ (λίαν καλώς, Μ.Ο: 8)
- 5. 2001** Απόκτηση άδειας ασκήσεως ιατρικού επαγγέλματος (Νομαρχία Αττικής)
- 6. 14/01/2002-14/05/2003** Αγροτικός ιατρός στο σταθμό αιμοδοσίας του Γ.Ν.Κέρκυρας

7. 24/06/2003- Ειδικευόμενη ιατρικής βιοπαθολογίας στο
30/05/2005 βιοχημικό και μικροβιολογικό εργαστήριο του Γ.Ν.Ελευσίνας
«Θριάσιο».
- 31/05/2005- Συμπλήρωση ειδικότητας Ιατρικής
17/08/2008 Βιοπαθολογίας στο Γ.Ν.Αθηνών «Γ.Γεννηματάς»
8. 12/03/2009 Απόκτηση τίτλου ειδικότητας: Ιατρική Βιοπαθολογία
9. 28/04/09 έως Επικουρική ιατρός στο Μικροβιολογικό
27/04/10 εργαστήριο του Γ.Ν.Αθηνών «Γ.Γεννηματάς»
10. 31/08/10 έως Επικουρική ιατρός στο Μικροβιολογικό
06/06/2011 εργαστήριο του Γ.Ν.Αθηνών «Θριάσιο»
11. 14/06/11 έως Επιμελήτρια Β' του Γ.Ν.Κέρκυρας
σήμερα

Ε. ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

1) Δημοσιεύσεις στον Ελληνικό Ιατρικό Τύπο:

1. Γιαννοπούλου Π, **Κυράτσα Α**, Χαραλαμπίκη Ν, Καλογεροπούλου Ε., Σάλεμ Ζ., Τρίκκα – Γραφάκου Ε. Αυτόματη περιτονίτιδα από *Neisseria gonorrhoeae* σε νεαρά ασθενή. Εφαρ Κλιν Μικροβιολ Εργ Διαγν 2006,περίοδος Β,11(3):144-149.
2. Γιαννοπούλου Π, **Κυράτσα Α**, Γκαντέρης Γ, Τρίκκα – Γραφάκου Ε, Μαλάμου – Λαδά Ε. Κλωστηριδιακή μυνονέκρωση:Περιγραφή δύο περιπτώσεων. Ανασκόπηση Διεθνούς βιβλιογραφίας. Δελτ. Ελλην. Μικροβιολ. Εταιρ. 2007, 52(4): 224-230.
3. Μάμαλη Β, **Κυράτσα Α**, Πανουτσόπουλος Γ,Τρίκκα-Γραφάκου Ε. Αυτόματη βακτηριακή περιτονίτιδα,από οξυγονοάντοχο *C.tertium*,σε κίρρωτικό ασθενή και ανασκόπηση της βιβλιογραφίας. Εφαρ Κλιν Μικροβιολ Εργ Διαγν 2008,περίοδος Β,13(2):47-52.

4. Γιαννοπούλου Π, **Κυράτσα Α**, Χαραλαμπίκη Ν, Κατσογιάννη Α, Αραμπατζής Α, Βελεγράκη Α, Τρίκκα-Γραφάκου Ε. Θανατηφόρος περίπτωση δερματικής ζυγομύκωσης σε ανοσοκατασταλμένο ασθενή και ανασκόπηση της βιβλιογραφίας. Δελτ. Ελλην. Μικροβ. Εταιρ. 2008, 53(4): 230-235.
5. Καλογεροπούλου Ε., Χαραλαμπίκη Ν., **Κυράτσα Α.**, Σάλεμ Ζ., Τρίκκα-Γραφάκου Ε. *Haemophilus influenzae*: Μία ασυνήθης περίπτωση σηψαιμίας σε ενήλικα. Δελτ. Ελλην. Μικροβ. Εταιρ 2009, 54 τεύχος 2, σελ 98-101.
6. Γιαννοπούλου Π., **Κυράτσα Α.**, Χαραλαμπίκη Ν., Βελεγράκη Α., Κλούβα-Μολυβδα Φ., Τρίκκα-Γραφάκου Ε. Θανατηφόρος περίπτωση ζυγομύκωσης από *Saksenaee vasiformis* με ανασκόπηση της Διεθνούς βιβλιογραφίας. Εφαρ. Κλιν Μικροβιολ Εργ Διαγν 2010, περίοδος Α, 15(1)-231-236. **Πρώτη απομόνωση στην Ελλάδα.**
7. Χαραλαμπίκη Νικολέτα, Τσιβεριώτης Κωνσταντίνος, Ζάμπου Αικατερίνη, Γιαννοπούλου Παναγιώτα, Κυράτσα Άννα, Υφαντής Ευστάθιος, Αντωνίου Μαρία, Τρίκκα-Γραφάκου Ελευθερία. ΣΠΛΑΧΝΙΚΗ ΛΕΪΣΜΑΝΙΑΣΗ: ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ. Δελτ. Ελλην. Μικροβ. Εταιρ 2012, 57 τεύχος 2

2) Ανακοινώσεις σε ελληνικά συνέδρια: 32

3) Ανακοινώσεις σε διεθνή συνέδρια: 23

Ζ. ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

- Συμμετοχή και παρακολούθηση σεμιναρίων, συμποσίων, μετεκπαιδευτικών μαθημάτων που οργανώθηκαν από επιστημονικούς φορείς
- Συμμετοχή και παρακολούθηση ελληνικών και διεθνών συνεδρίων

Η. Συμμετοχή σε Επιστημονικούς Συλλόγους

2001 εως σήμερα: Μέλος του Ιατρικού Συλλόγου Αθηνών

2003 έως σήμερα: Μέλος της Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρίας

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η *Yersinia enterocolitica* θεωρείται μετά τις σαλμονέλλες και τα καμπυλοβακτηρίδια ως το τρίτο συχνότερο αίτιο βακτηριακής εντερίτιδας στον ευρωπαϊκό χώρο. Οι συστηματικές μελέτες για την επίπτωση των τροφιμογενών υερσινιώσεων που έχουν διεξαχθεί μέχρι σήμερα στη χώρα μας, είναι λίγες. Παρ'όλα αυτά, η σημασία του είδους *Yersinia enterocolitica* στη Δημόσια Υγεία είχε αναγνωριστεί ήδη από τη δεκαετία του 1970 δεδομένης της ύπαρξης σχετικά μεγάλου αριθμού πολυμεταγγιζομένων ατόμων με μεσογειακή αναιμία (προδιαθεσικός παράγοντας για λοίμωξη από τον μικροοργανισμό).

Μέχρι σήμερα η εργαστηριακή διερεύνηση των σποραδικών κρουσμάτων υερσινιώσεων στην Ελλάδα βασίζεται σε συμβατικές μεθόδους στο κλινικό εργαστήριο.

Στόχος της παρούσας διατριβής ήταν ο φαινοτυπικός και γονοτυπικός χαρακτηρισμός των αναγνωρισμένων λοιμογόνων παραγόντων κλινικών στελεχών *Y. enterocolitica* που είχαν απομονωθεί κατά την χρονική περίοδο 2006-2011 κυρίως από θαλασσαιμικά παιδιά. Επιπρόσθετα, έγινε προσπάθεια σύνδεσης του λοιμογόνου δυναμικού των στελεχών αυτών με την ικανότητά τους να σχηματίζουν βιομεμβράνες (biofilms).

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν προσφέρουν μία καταγραφή των ιδιοτήτων των στελεχών *Y. enterocolitica* που ενδημούν στον Ελληνικό χώρο και μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για περαιτέρω μελέτες επί των επιδημιολογικών και λοιμογόνων ιδιοτήτων αυτού του ενδιαφέροντος μικροοργανισμού μεταξύ των οποίων και η ικανότητά του να σχηματίζει βιομεμβράνες.

Το μεγαλύτερο μέρος των πειραματικών διαδικασιών της διατριβής διεξήχθη στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Αιγινήτειου Νοσοκομείου υπό την άμεση καθοδήγηση του Αναπληρωτή Καθηγητή Κου Χατζηπαναγιώτου και της Διευθύντριας του εργαστηρίου Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Κας Χ. Νικολάου.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στους επιβλέποντες Καθηγητές καθώς και στους υπόλοιπους συναδέλφους του εργαστηρίου αυτού για την πολύτιμη βοήθεια που μου πρόσφεραν καθ'όλη τη διάρκεια της εκπόνησεως της διατριβής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον επιβλέποντα Καθηγητή Κο Χατζηπαναγιώτου καθώς και στα υπόλοιπα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής Κα Χ. Νικολάου και Κο Ν.Ι. Λεγάκη για την ανάθεση του θέματος και τις πολύτιμες συμβουλές τους τόσο κατά την εκτέλεση των πειραμάτων όσο και κατά τη συγγραφή του παρόντος.

Τέλος θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου για την υποστήριξη και την ενθάρρυνση που μου παρείχε.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΙΣΤΟΡΙΑ – ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ

Η *Yersinia enterocolitica* θεωρείται μετά τις σαλμονέλλες και τα καμπυλοβακτηρίδια ως το τρίτο συχνότερο αίτιο βακτηριακής εντερίτιδας στον ευρωπαϊκό χώρο. Η πρώτη ιστορικά βεβαιωμένη βιβλιογραφική αναφορά στη *Y. enterocolitica* έγινε το 1934 στις Η.Π.Α από τους McIver και Pike (1934) οι οποίοι περιέγραψαν, ως *Flavobacterium pseudomallei*, Gram αρνητικό κοκκοβάκιλλο που παρατήρησαν, μάλλον τυχαία, όχι σε κόπρανα αλλά σε αποστήματα ενήλικα ασθενή με κλινικές εκδηλώσεις παρόμοιες με αυτές της λοίμωξης από *Burkholderia mallei* (μάλις) (!). Το στέλεχος επανεξετάστηκε παράλληλα με άλλα που παρουσίαζαν παρόμοιες βιοχημικές ιδιότητες στο κεντρικό εργαστήριο υγείας της Νέας Υόρκης. Θεωρήθηκε ότι τα στελέχη ανήκαν σε νέο είδος (*Bacterium enterocoliticum*) (Schleifstein and Coleman, 1939). Αν και μικροοργανισμοί φερόμενοι ως “Yersinia-like” είχαν περιγραφεί ήδη από το 1944 αμέσως μετά την αναγνώριση της *Y. pestis*, οι ονοματολογικές “περιπέτειες” συνεχίστηκαν μέχρι το 1964 (π.χ. *Pasteurella X*, *P. pseudotuberculosis* κλπ.) όταν ο Frederiksen (1964) εισηγήθηκε την κατάταξη στο νέο είδος *Y. enterocolitica*. Το είδος περιλήφθηκε στο Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology στην έκδοση του 1974 (Οικογένεια *Enterobacteriaceae*, Γένος *Yersinia*, Είδος *Y. enterocolitica*). Σήμερα, στο γένος *Yersinia* περιλαμβάνονται συνολικά 11 είδη μεταξύ των οποίων τα *Y. pestis*, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii* και *Y. ruckeri*). Από κλινική άποψη, τα σημαντικότερα είναι τα τρία πρώτα από τα προαναφερθέντα είδη. Τα υπόλοιπα είδη θεωρούνται βιότυποι της *Y. enterocolitica*. Όλα τα είδη έχουν απομονωθεί από κλινικά δείγματα εκτός από την *Y. ruckeri* (παθογόνο για ορισμένα είδη ψαριών). Η *Y. enterocolitica*, εκτός της σημασίας της για τη δημόσια υγεία, έχει αποτελέσει το αντικείμενο πολλών ερευνητικών προσπαθειών λόγω των ιδιαίτερα εξελιγμένων και περίπλοκων μηχανισμών παθογένειας που διαθέτει.

2. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ

2.1. Μορφολογία

Η *Y. enterocolitica* είναι Gram αρνητικό μη σπορογόνο κοκκοβακτηρίδιο σχετικά μικρού μεγέθους (0,5 – 3 μm) με αποστρογγυλωμένα άκρα (Εικόνα 1). Δεν διαθέτει έλυτρο. Φέρει περίτριχες βλεφαρίδες (2 – 15 ανά κύτταρο) και παρουσιάζει έντονη κυματοειδή κίνηση. Διατάσσεται μεμονωμένα ή σε μικρές αλυσίδες ή σε σωρούς. Χαρακτηρίζεται από έντονο πολυμορφισμό ιδιαίτερα όταν προέρχεται από παλιές καλλιέργειες και η επώαση γίνεται στους 37° C σε εκλεκτικά θρεπτικά υλικά. Επίσης, μπορεί να παρατηρηθεί απώλεια των βλεφαρίδων και της ικανότητας κίνησης μετά από παρατεταμένη επώαση στις παραπάνω

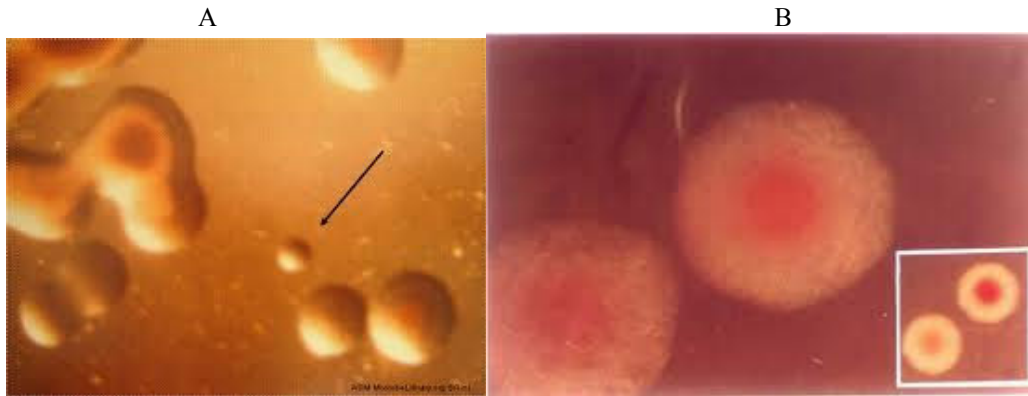
συνθήκες. Αντίθετα, σε νεαρά καλλιεργήματα στους 22° - 25° C ο πολυμορφισμός είναι περιορισμένος (κυριαρχούν οι κοκκοειδείς μορφές) και η κινητικότητα διατηρείται.



Εικόνα 1. Ηλεκτρονική μικροσκόπηση κυττάρων *Y. enterocolitica* (Πηγή: www.wadsworth.org).

2.2. Καλλιέργεια

Η *Y. enterocolitica* αναπτύσσεται σε κοινά και ειδικά θρεπτικά υλικά. Ο ρυθμός ανάπτυξης είναι βραδύς. Ο σχηματισμός αποικιών σε στερεά υλικά απαιτεί τουλάχιστον 48ωρη επώαση ιδιαίτερα όταν καλλιεργούνται κλινικά δείγματα που περιέχουν μικτή συνοδό χλωρίδα. Στο θρεπτικό άγαρ και στο McConkey άγαρ αναπτύσσονται στρογγυλές ημιδιαφανείς αποικίες μεγέθους 2-3 mm μετά από επώαση 48 ωρών σε θερμοκρασία 25°C (Εικόνα 2A). Οι αποικίες στο SS άγαρ είναι παρόμοιες με αυτές που παρατηρούνται στο McConkey αλλά μικρότερες. Για την απομόνωση της *Y. enterocolitica* από μικροβιοβριθή κλινικά ή περιβαλλοντικά υλικά (κόπρανα, νερό) μπορούν να χρησιμοποιηθούν υλικά εμπλουτισμένα με αμινοξέα που διευκολύνουν την αναγνώριση των αποικιών του είδους όπως το CAL (Cellobiose-Arginine-Lysine) άγαρ (Dudley and Shotts 1979) και το LIA (Lysine-Iron Agar) (Weissfeld and Sonnenwirth 1981). Από τα διάφορα εκλεκτικά υλικά που έχουν κατά καιρούς προταθεί, το πλέον αποτελεσματικό θεωρείται το CIN (Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin) άγαρ (Schiemann 1979a). Οι αποικίες της *Y. enterocolitica* στο CIN άγαρ αναπτύσσονται μετά από επώαση 18-24 ωρών σε θερμοκρασία 25°C. Είναι στρογγυλές, μικρές (περίπου 1 mm) με σαφή όρια και με χαρακτηριστική κόκκινη απόχρωση στο κέντρο (Εικόνα 2B). Η ανίχνευση *Y. enterocolitica* σε μη κλινικά υλικά όπως διάφορα τρόφιμα (κυρίως κρέας ή σκευάσματα κρέατος) και νερό που περιέχουν μικρό αριθμό μικροβιακών κυττάρων, απαιτεί τη χρήση ειδικών εμπλουτιστικών υλικών (Johnson, 1998). Εφαρμόζονται επίσης σύγχρονες μοριακές τεχνικές (PCR, υβριδισμός κλπ.) που θεωρούνται περισσότερο ευαίσθητες από τις συμβατικές μεθόδους καλλιέργειας (Fredriksson and Korkeala, 2003).



Εικόνα 2. (A) Αποικίες *Y. enterocolitica* σε άγαρ McConkey (A) και CIN (B). Πηγή: Αρχείο J. S. Viridi (Microbial Pathogenicity Laboratory, University of Delhi, INDIA; www.ooo.org/virdi_dusc/).

2.3. Φυσιολογία - Μεταβολισμός - Ταυτοποίηση

Η *Y. enterocolitica* αναπτύσσεται αεροβίως και προαιρετικά αναεροβίως. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 25°C (εύρος θερμοκρασιών ανάπτυξης 4 - 42°C). Το είδος είναι καταλάση-θετικό και οξειδάση-αρνητικό. Χαρακτηρίζεται από βραδεία ανάπτυξη. Για το σχηματισμό αποικιών απαιτείται επώαση 48 ωρών. Η *Y. enterocolitica* ανήκει στα εντεροβακτηριακά που δεν ζυμώνουν τη λακτόζη. Σύνοψη των βιοχημικών χαρακτηριστικών του είδους παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Βιοχημικοί χαρακτήρες του είδους *Y. enterocolitica* (οι σχετικές δοκιμές απαιτούν 48 ώρες)

Ουρία	+	Ινδόλη	V*	NO ₃ →NO ₂	V
M.R. (28°C)	+	M.R. (37°C)	+	H ₂ S	-
VP (28°C)	+	VP (37°C)	-	Μαλονικά	-
Κιτρικά (Simmons 28°C)	-	Καταλάση	+	Οξειδάση	-
Κιτρικά (Simmons 37°C)	-	Ζύμωση Γλυκόζης	+	Αέριο από γλυκόζη	-
Κιτρικά (Christensen)	V	Τετραθειονική ρεδοουκτάση	V	Λιπάση	V
Ζελατινάση	-	DNase	V	PNPX	-
TDA	-	LDC	-	ODC	V
ONPG	V	ADH	-		
		<u>Παραγωγή οξέος από:</u>			
Γλυκόζη	+	Γαλακτόζη	+	Λακτόζη	-
Αραβινόζη	+	Ξυλόζη	V	Φρουκτόζη	+
Γλυκερόλη	+	Αδονιτόλη	-	Μαννόζη	+
Σορβόζη	+	Ραμνόζη	-	Δουλοσιτόλη	-
Κελλοβιόζη	+	Μαλτόζη	+	Μελλιβιόζη	-
Σακχαρόζη	V	Τρεαλόζη	V	Ραφφινόζη	-
Ινοσιτόλη	+**	Σορβιτόλη	+	Μαννιτόλη	+

* : Ποικίλλει - **: Απαιτούνται 3 έως 5 24-ωρα

Η προκαταρκτική ταυτοποίηση της *Y. enterocolitica* γίνεται με δοκιμασίες ψυχοφιλίας (κινητικότητα στους 37°C [-] και 22°C [+], αντίδραση VP στους 37°C [-] και 22°C [+] σε συνδυασμό με περιορισμένο αριθμό άλλων δοκιμασιών (κυρίως ουρίας, ορνιθίνης, λακτόζης και λυσίνης [βλ. Πίνακα 1]). Η οριστική ταυτοποίηση απαιτεί την εκτέλεση περισσότερων δοκιμασιών περιλαμβανομένων και των σακχαρολυτικών.

2.4. Βιοτυπία

Τα στελέχη *Y. enterocolitica* παρουσιάζουν ετερογένεια στις βιοχημικές τους ιδιότητες (βλ. Πίνακα 1). Με βάση τις διαφορές αυτές, τα στελέχη ταξινομούνται σε 5 βιοτύπους (1A, 1B, 2, 3, 4 και 5). Παθογόνα για τον άνθρωπο θεωρούνται τα στελέχη *Y. enterocolitica* που ανήκουν στους βιοτύπους 1B, 2, 3, 4 και 5. Έτσι, ο προσδιορισμός του βιότυπου έχει σημασία στην κλινική διαγνωστική. Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι στελέχη του βιότυπου 1A αναγνωρίστηκαν πρόσφατα ως αίτια λοιμώξεων με κλινικές εκδηλώσεις παρόμοιες με εκείνες που προκαλούν οι παθογόνοι βιοτύποι. Πιθανολογείται ότι τα στελέχη αυτά συγκροτούν ένα διακριτό κλώνο (Batzilla et al. 2011, Bhagat and Virdi 2011).

Εχουν προταθεί διάφορα σχήματα βιοτυπίας. Ενδεικτικά, στον Πίνακα 2, περιγράφεται το σχήμα των Wauters και συν. (1987).

Πίνακας 2. Βιότυποι της *Y. enterocolitica*.

Δοκιμασία	Βιότυπος					
	1A	1B	2	3	4	5
Λιπάση (υδρόλυση Tween)	+	+	-	-	-	-
Υδρόλυση εσκουλίνης	V*	-	-	-	-	-
Παραγωγή ινδόλης	+	+	+**	-	-	-
Ζύμωση ξυλόζης	+	+	+	+	-	V
Αντίδραση VP	+	+	+	+	+	+**
Ζύμωση τρεαλόζης	+	+	+	+	+	-
NO ₃ →NO ₂	+	+	+	+	+	-
Πυραζιναμιδάση	+	-	-	-	-	-
β-D-Γλυκοσιδάση	+	-	-	-	-	-
Πεπτιδάση προλίνης	V	-	-	-	-	-

*: Ποικίλλει - **: Απαιτείται παρατεταμένη επώαση

Στην κλινική διαγνωστική είναι σύνηθες να χρησιμοποιούνται απλούστερα σχήματα βιοτυπίας με λιγότερες αντιδράσεις όπως, για παράδειγμα, το προταθέν από τους Brenner και συν. (1980).

2.5. Αντιγόνα – Οροτυπία

Η *Y. enterocolitica* διαθέτει σωματικά -O- αντιγόνα (πολυσακχαριδικές δομές των ΛΠΣ) και βλεφαριδικά -H- αντιγόνα (πρωτεϊνικές δομές). Μερικά στελέχη παράγουν επίσης καψιδιακό -K- αντιγόνο. Εχουν μέχρι τώρα αναγνωρισθεί περισσότεροι από 50 ορότυποι που καθορίζονται από τη διαφοροποίηση των σωματικών αντιγόνων (O). Το πρώτο σχήμα οροτυπίας περιλάμβανε οκτώ O- οροτύπους: O:1,2,3 - O:2,3 - O:3 - O:4 - O:5 - O:6 - O:7 και O:8,8 (Winblad et al. 1967). Ακολούθησαν αναθεωρήσεις του αρχικού σχήματος στις οποίες προστέθηκαν νέοι ορότυποι (Wauters 1971, Aleksic and Bockemuhl 1984). Ο κλινικά σημαντικότερος ορότυπος είναι ο O:3 ακολουθούμενος από τους O:8 και O:9. Η ορολογική τυποποίηση των βλεφαριδικών -H- αντιγονικών ποικιλιών προσφέρει περισσότερες δυνατότητες διάκρισης των στελεχών (Aleksic and Bockemuhl 1987).

Υπάρχει σαφής συσχέτιση μεταξύ των βιοτύπων και των οροτύπων της *Y. enterocolitica* (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Κατανομή οροτύπων *Y. enterocolitica* κατά βιότυπο. Οι παθογόνοι ορότυποι υποδεικνύονται με πλάγιους έντονους χαρακτήρες (Προσαρμογή από Tennant et al. 2003).

Βιότυπος Ορότυποι

1A	<i>O:4 - O:5 - O:6,30 - O6,31 - O:7,8 - O:7,13 - O:10 - O:14 - O:16 - O:21 - O:22 - O:25 - O:37 - O:41,42 - O:46 - O:47 - O:57 - NT*</i>
1B	<i>O:4,32 - O:8 - O:13a,13b - O:16 - O:18 - O:20 - O:21 - O:25 - O:41,42 - NT</i>
2	<i>O:5,27 - O:9 - O:27</i>
3	<i>O:1,2,3 - O:3 - O:5,27</i>
4	<i>O:3</i>
5	<i>O:2,3</i>

*NT, Not Typable (οι βιότυποι 1A και 1B περιλαμβάνουν στελέχη που δεν τυποποιούνται με τους διαθέσιμους αντιορούς).

Στην κλινική πράξη, ο προσδιορισμός βιοτύπου και οροτύπου θεωρείται τυποποιητικά επαρκής. Στη βιβλιογραφία έχει επικρατήσει ο όρος “βιο-ορότυπος” (bio-serotype) για τον χαρακτηρισμό των κλινικών στελεχών *Y. enterocolitica* (π.χ. βιο-ορότυπος 4/O:3, 1B/O:8 κ.ο.κ.). Ο προσδιορισμός των -H- αντιγονικών ποικιλιών γίνεται σε εργαστήρια αναφοράς. Μεταξύ των “συμβατικών” μεθόδων τυποποίησης, εκτός της οροτυπίας – βιοτυπίας, περιλαμβάνεται και η λυσιτυπία (ευαισθησία στους βακτηριοφάγους που έχουν απομονωθεί από στελέχη *Y. enterocolitica*). Η μέθοδος αναπτύχθηκε κυρίως στο κέντρο αναφοράς εντεροπαθογόνων του Ινστιτούτου Pasteur (Calvo et al. 1981, Mollaret and Nicolle, 1965). Πρόκειται για απαιτητική διαδικασία γι’αυτό περιορίστηκε σε εργαστήρια αναφοράς. Σήμερα, ιδιαίτερα μετά την ανάπτυξη μοριακών μεθόδων τυποποίησης, χρησιμοποιείται σπάνια. Αξίζει όμως να σημειωθεί ότι με τη λυσιτυπία επιτεύχθηκε η τυποποίηση κλώνων διαφόρων βιο-οροτύπων όπως, για παράδειγμα, η διάκριση μεταξύ των στελεχών του βιο-ορότυπου 4/O:3 που επικρατούν στην Αμερική (λυσίτυπος IXb) και αυτών που απομονώνονται στην Ευρώπη και την Ασία (λυσίτυπος VIII) (Mollaret et al. 1979).

2.6. Μοριακή τυποποίηση

Εχουν περιγραφεί αρκετές μέθοδοι τυποποίησης της *Y. enterocolitica* βασισμένες στην ανάλυση του γενετικού υλικού του μικροοργανισμού. Με εξαίρεση τις απλές μεθόδους υβριδισμού οι οποίες έχουν εγκαταληφθεί ως μη αποδοτικές (Lan and Reeves 2001), πολλές από τις μοριακές μεθόδους όπως η ανάλυση του πολυμορφισμού του χρωμοσωμικού DNA με

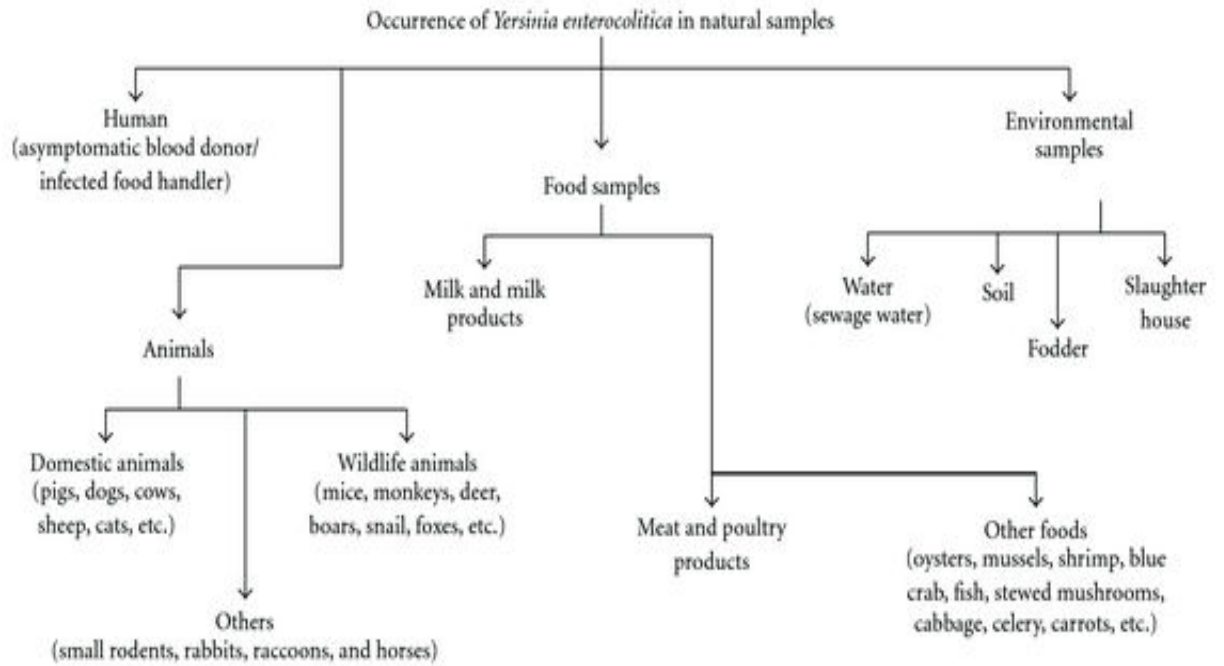
χρήση ενδονουκλεασών (RFLP), η ανάλυση του πλασμιδιακού περιεχομένου, ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του γονιδίου για το 16S RNA, η ριβοτυπία και ο διαχωρισμός θραυσμάτων χρωμοσωματικού DNA με ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο πεδίο (PFGE), έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την επιδημιολογική διερεύνηση κρουσμάτων υερσινιώσης (Blumberg et al. 1991, Garcia et al. 1998, Ibrahim 1995, Lobato et al. 1998, Najdenski et al. 1994). Από τις μεθόδους αυτές μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα φαίνεται να έχει η PFGE (Iteman et al. 1996). Για τη φυλογενετική ανάλυση των ειδών *Yersinia* και τη διάκριση των κλώνων έχει προταθεί ο προσδιορισμός της αλληλουχίας πολλαπλών γενετικών τόπων (Multilocus Sequence Typing – MLST) που περιλαμβάνει τα γονίδια 16S rDNA, *glnA*, *gyrB*, *recA* και Y-HSP60 (Kotetishvili et al. 2005).

2.7. Οικολογία – Γεωγραφική κατανομή

Η *Y. enterocolitica* έχει μια ευρεία διασπορά στο περιβάλλον (έδαφος, νερό ποταμών και λιμνών). Αυτό οφείλεται στην αξιοσημείωτη ικανότητα του είδους να αναπτύσσεται σε ακραίες συνθήκες. Ο μικροοργανισμός έχει απομονωθεί από τα κόπρανα και το έντερο μεγάλης ποικιλίας οικόσιτων (χοίροι, βοοειδή, αιγοπρόβατα) και άγριων ζώων (Sabina et al. 2011). Υπάρχουν σαφείς ενδείξεις ότι οι χοίροι είναι η σημαντικότερη δεξαμενή στελεχών *Y. enterocolitica* που προκαλούν λοιμώξεις στον άνθρωπο (Horisaka et al. 2004, Jones 2003, Rasmussen et al. 1995).

Η *Y. enterocolitica* είναι άριστα προσαρμοσμένη στις σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες των εύκρατων ζωνών και στα μικροαερόφιλα υδάτινα περιβάλλοντα, γεγονός που καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την παρατηρούμενη γεωγραφική κατανομή. Πράγματι, υερσινιώσεις παρατηρούνται κυρίως σε χώρες του βορείου ημισφαιρίου. Επικρατούν κατά τόπους διακριτοί κλώνοι του είδους όπως φαίνεται από τη συχνότητα των ορότυπων. Στις Η.Π.Α ο συχνότερος ορότυπος μεταξύ των στελεχών που προκαλούν λοιμώξεις στον άνθρωπο είναι ο O:8 ακολουθούμενος από τους O:3 και O:5 (Bottone 1997, Kwaga et al. 1992). Ο ορότυπος O:8 είναι επίσης ο επικρατέστερος στην Ιαπωνία (Sakai et al. 2005). Στην Αυστραλία, τον Καναδά, την Κίνα και στις περισσότερες Ευρωπαϊκές χώρες επικρατεί ο ορότυπος O:3 αν και στις Σκανδιναβικές χώρες παρατηρείται αυξημένη συχνότητα του O:9 (Grahek-Ogden et al. 2007, O'Loughlin et al. 1990, Sabina et al. 2011, Wang et al. 2008).

Εικόνα 3. Οικολογία-πηγές *Y. enterocolitica*. Προσαρμογή από Rahman και συν. (2011).



3. Η *Y. enterocolitica* ΩΣ ΠΑΘΟΓΟΝΟ

3.1. Μετάδοση

3.1.1 Τροφιμογενής μετάδοση

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι κυριότερες δεξαμενές παθογόνων βιο-οροτύπων *Y. enterocolitica* φαίνεται να είναι τα ζώα, κυρίως οι χοίροι. Όπως για τα κυριότερα εντεροπαθογόνα, η μετάδοση στον άνθρωπο γίνεται κυρίως μέσω τροφίμων, ποτών ή νερού που είχαν μολυνθεί από πάσχον ζώο. Αυτός ο τρόπος μετάδοσης ευνοείται και από την ικανότητα του μικροβίου να αναπτύσσεται στις συνήθεις θερμοκρασίες συντήρησης των τροφίμων ακόμα και όταν τα άλλα εντεροπαθογόνα έχουν καταστραφεί (Black et al. 1978). Πράγματι, στις αναπτυγμένες χώρες η *Y. enterocolitica* έχει απομονωθεί από ποικιλία τροφίμων μεταξύ των οποίων κρέας και σκευάσματα κρέατος, κυρίως χοιρινού και βοδινού αλλά και πουλερικών, γάλα, τυρί και άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα, ψάρια και άλλα θαλασσινά καθώς και από τρόφιμα φυτικής προέλευσης όπως όσπρια, σόγια και παρασκευάσματα σόγιας (Cover and Aber 1989, Sabina et al. 2011). Η επίπτωση των υερσινιώσεων φαίνεται ότι είναι συχνότερη στις Ευρωπαϊκές χώρες από ότι στις Η.Π.Α (Bottone 1997, Cover and Aber 1989). Παρά την ευρεία διασπορά και τη σχετικά υψηλή συχνότητα απομόνωσης του μικροοργανισμού από τα τρόφιμα, οι λοιμώξεις από *Y. enterocolitica* εμφανίζονται στην πλειονότητά τους ως σποραδικά κρούσματα. Έχουν ωστόσο περιγραφεί πολλές, κυρίως τροφιμογενείς, επιδημίες σε αναπτυγμένες χώρες (Black et al. 1978, Grahek-Ogden et al. 2007, Sakai et al. 2005). Η χαρακτηριστικότερη των τροφιμογενών επιδημιών υερσινιώσης περιγράφηκε στη Νέα Υόρκη το 1978. Κατά την επιδημία αυτή νόσησαν περί τους 200 μαθητές σχολείου μετά από κατανάλωση σοκολατούχου γάλακτος που είχε μολυνθεί από *Y. enterocolitica* του βιο-οροτύπου 1B/O:8 (Black et al. 1978). Λίγα είναι γνωστά για την επίπτωση των υερσινιώσεων στις αναπτυσσόμενες χώρες κυρίως λόγω της απουσίας συστημάτων επιδημιολογικής επιτήρησης. Πάντως, οι έρευνες που έχουν γίνει, αν και περιστασιακές, υποδεικνύουν ότι οι υερσινιώσεις αποτελούν πρόβλημα δημόσιας υγείας τουλάχιστον σε χώρες της Ασίας (Butler et al. 1984, Kanan and Abdulla 2009).

3.1.2. Μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, σε ορισμένες περιπτώσεις, η εμπλοκή των μολυσμένων από *Y. enterocolitica* τροφίμων στην πρόκληση μικροεπιδημιών εντερικής υερσινιώσης είναι έμμεση. Χαρακτηριστική περίπτωση έμμεσης μετάδοσης έχει αναφερθεί σε παιδικό σταθμό των Η.Π.Α. όπου παρατηρήθηκε επιδημία εντεροκολίτιδας στα παιδιά οφειλόμενη σε *Y.*

enterocolitica που ανήκε στον βιο-ορότυπο 4/O:3. Ο ίδιος μικροοργανισμός ανιχνεύθηκε σε νωπό παρασκεύασμα χοιρινού κρέατος που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή φαγητού. Όμως, ο τρόπος παρασκευής περιλάμβανε έκθεση του νωπού τροφίμου σε σχετικά υψηλή και παρατεταμένη θερμοκρασία. Έτσι, αποκλείστηκε η τροφιμογενής μετάδοση του μικροοργανισμού και ως πιθανότερος τρόπος μετάδοσης θεωρήθηκε η μετάδοση μέσω των χεριών του προσωπικού του παιδικού σταθμού (Lee et al. 1990).

Η μετάδοση της *Y. enterocolitica* από άνθρωπο σε άνθρωπο έχει τεκμηριωθεί και σε μερικές άλλες περιπτώσεις. Τον Ιούλιο του 2006 στην Ιαπωνία περιγράφηκε για πρώτη φορά οικογενής διασπορά υερσινίωσης οφειλόμενη στο βιο-ορότυπο 2/O:9. Η πιθανή πηγή ήταν μέλος της οικογένειας που είχε μολυνθεί με το συγκεκριμένο μικροοργανισμό (Moriki et al. 2010). Έχουν επίσης αναθερθεί περιπτώσεις ενδονοσοκομειακής μετάδοσης στελεχών *Y. enterocolitica* τα οποία προφανώς μεταδόθηκαν ανθρωπογενώς (Toivanen et al. 1973, Kist et al. 1980, Ratnam et al. 1982).

3.1.3. Μετάδοση από ζώα

Πρόκειται για σχετικά σπάνιο τροπο μετάδοσης της *Y. enterocolitica* στον άνθρωπο. Η μετάδοση μπορεί να γίνει από άμεση επαφή με ζώα-φορείς του μικροοργανισμού ή έμμεσα (π.χ. επαφή με κόπρανα μολυσμένων ζώων, νερό κ.λ.π.). Έχουν αναθερθεί περιστατικά άμεσης μετάδοσης κυρίως σε κτηνοτρόφους ή απασχολούμενους στην παραγωγή ζωικών τροφίμων (Chin 2000, Wang et al. 2010).

3.1.4. Άμεση μετάδοση από περιβαλλοντικές πηγές

Σε περιπτώσεις πρωτοπαθούς εξωεντερικής εντόπισης της υερσινίωσης, η άμεση μετάδοση από περιβαλλοντικές πηγές θεωρείται πιθανή (Menzies 2010). Οι περιπτώσεις αυτές είναι σπάνιες. Έχουν περιγραφεί δύο χαρακτηριστικές περιπτώσεις κατά τις οποίες ο μικροοργανισμός προκάλεσε αποστήματα μετά από άμεση ενοφθάλμιση που ακολούθησε τραυματισμό των άνω άκρων (Kelesidis et al. 2008, Menzies 2010).

3.1.5. Μετάδοση μετά από μετάγγιση αίματος

Η *Y. enterocolitica* μπορεί να μεταδοθεί μέσω μολυσμένου αίματος. Ο μικροοργανισμός είναι από τα πρώτα αναγνωρισμένα αίτια σήψης μετά από μετάγγιση αίματος και περιγράφηκε το 1975 στην Ολλανδία (Bruining and De Wilde 1975). Από τότε έχει περιγραφεί στη διεθνή βιβλιογραφία πληθώρα αντίστοιχων περιστατικών (περισσότερα από 60). Η *Y. enterocolitica* ανιχνεύεται περιστασιακά σε αίμα δοτών. Σε μεγαλύτερη συχνότητα βρίσκεται σε αίμα από δότες που έχουν αναφέρει, την περίοδο της αιμοληψίας, κοιλιακές διαταραχές και διάρροια. Η μετάγγιση με αίμα μολυσμένο με το μικροοργανισμό

μπορεί να αποβεί θανατηφόρος (Jacobs et al. 1989). Η θνητότητα από σήψη οφειλόμενη σε βακτήρια μετά από μετάγγιση μολυσμένου αίματος θεωρείται γενικά χαμηλή. Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις ότι η θνητότητα μπορεί να είναι σημαντικά υψηλότερη όταν το αίμα είναι μολυσμένο με *Y. enterocolitica* (Jacobs et al. 1989, Tipple et al. 1990). Χαρακτηριστικά αναφέρεται περίπτωση μετάγγισης σε ασθενή 71 ετών με αναιμία με αίμα μολυσμένο από *Y. enterocolitica* του ορο-βιοτύπου O:3/4 με κατάληξη το θάνατο του ασθενούς. Στον ορό του δότη ανιχνεύθηκαν, ένα μήνα μετά τη λήψη αίματος, υψηλοί τίτλοι αντισωμάτων κατά της *Y. enterocolitica* αν και δεν υπήρχαν χαρακτηριστικά συμπτώματα εντερικής υερσινιώσης (Leclercq et al. 2005).

3.2. Λοιμώξεις και ανοσοπαθολογικές επιπλοκές

Η *Yersinia enterocolitica* θεωρείται μετά τις σαλμονέλλες και τα καμπυλοβακτηρίδια ως το τρίτο συχνότερο αίτιο βακτηριακής εντερίτιδας στον ευρωπαϊκό χώρο. Ως παθογόνος μικροοργανισμός, η *Y. enterocolitica* σχετίζεται με ένα ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων. Οι τελευταίες μπορούν, αδρά, να διακριθούν σε τρεις κατηγορίες:

- Εντερικές υερσινιώσεις. Πρόκειται για το συχνότερο τύπο λοιμώξεων από *Y. enterocolitica* και απαντάται κυρίως σε παιδιά και νεαρά άτομα.

- Εξωμεσεντερικές λοιμώξεις από *Y. enterocolitica*. Αυτές εκδηλώνονται περίπου στο 20 % των περιπτώσεων λοίμωξης από το μικροοργανισμό, συνήθως σε ενήλικες. Μεταξύ των εξωμεσεντερικών υερσινιώσεων περιλαμβάνονται διάφορες εστιακές λοιμώξεις, λεμφαδενίτιδα και σήψη ως επακόλουθο βακτηραιμίας.

- Επακόλουθες παθήσεις. Πρόκειται για ανοσοπαθολογικές επιπλοκές. Μπορεί να εμφανιστούν 1 – 6 εβδομάδες μετά την έναρξη της εντερικής συμπτωματολογίας σε σχετικά μικρό ποσοστό των οξέως νοσούντων. Οι συχνότερες είναι η αντιδραστική αρθρίτιδα και το οξώδες ερύθημα.

3.2.1. Λοιμώξεις

Το συχνότερο κλινικό σύνδρομο που προκαλεί η *Y. enterocolitica* είναι η εντεροκολίτιδα (60 – 70 % των λοιμώξεων).

Η εντεροκολίτιδα χαρακτηρίζεται από διαρροϊκές κενώσεις οι οποίες αποτελούν και το επικρατέστερο σύμπτωμα. Οι κενώσεις είναι υδαρείς ή πολτώδεις και πολλές φορές αναμεμιγμένες με βλέννη ή πύον και σπάνια αιματηρές. Μπορεί να είναι λίγες ή πολλές (περισσότερες από 15 την ημέρα) οπότε παρατηρείται σοβαρή απώλεια ύδατος και ηλεκτρολυτών. Συνήα, η διάρροια συνοδεύεται από πόνους στην κοιλιακή χώρα και

μετεωρισμό. Εμετοι παρατηρούνται στο 15 - 40 % των περιπτώσεων εντερικής υερσινιώσης. Η θερμοκρασία μπορεί να ανέλθει μέχρι και 39°C. Η νόσος, αν παραμείνει χωρίς θεραπεία, μπορεί να διαρκέσει 12 – 15 ημέρες. Αντίθετα, η χορήγηση αντιβιοτικών προκαλεί ταχεία υποχώρηση των συμπτωμάτων ακόμα και εντος ενός 24-ώρου (βλ. Θεραπεία).

Δεδομένου ότι η κύρια πύλη εισόδου του μικροοργανισμού είναι το πεπτικό σύστημα, οι συχνότερες υερσινιώσεις είναι εντερικές άρα είναι και οι πρωτογενείς εντοπίσεις από τις οποίες ξεκινούν οι άλλες μορφές λοίμωξης. Η εντόπιση του μικροοργανισμού στο γαστρεντερικό σύστημα αφορά τον ειλεό, τη σκωλικοειδή απόφυση, τα μεσεντέρια λεμφογάγγλια, το ήπαρ και τον σπλήνα. Σε λίγες περιπτώσεις, η εντεροκολίτιδα από *Y. enterocolitica* μπορεί να εξελιχθεί σε βαρύτερες εντερικές μορφές (μεσεντερική αδενίτιδα, μεσεντερική ειλεΐτιδα και οξεία σκωληκοειδίτιδα. Μπορεί να παρατηρηθεί εξέλκωση του εντέρου, τελική ειλεΐτιδα, διάτρηση και περιτονίτιδα. Οι εκδηλώσεις αυτές κατά κανόνα συνοδεύονται από πυρετό, έντονο κοιλιακό άλγος, ναυτία, εμέτους, διάρροια, έλκη στο βλενογόνο του στόματος και λευκοκυττάρωση. Είναι δυνατόν τα συμπτώματα να ομοιάζουν με αυτά της οξείας σκωληκοειδίτιδας (ψευδο-Crohn) κυρίως σε άτομα νεαρής ηλικίας με αποτέλεσμα οι ασθενείς να οδηγούνται στο χειρουργείο. Πιστεύεται ότι αρκετοί ασθενείς, κυρίως σε χώρες με σχετικά υψηλή επίπτωση τροφιμογενούς υερσινιώσης έχουν υποστεί εκτομή της σκωλικοειδούς απόφυσης λόγω της αδυναμίας διαφορικής διάγνωσης της υερσινιώσης (περίπου 5 % στις Σκανδιναβικές χώρες – ως και 10 % στις Η.Π.Α). Σηψαιμία μετά από εντερική υερσινιώση μπορεί να παρατηρηθεί σε άτομα με μειωμένη άμυνα ή κάποιο βαθμό ανοσοανεπάρκειας.

Εκτός των ανοσοπαθολογικών επιπλοκών που είναι απότοκες της λοίμωξης από *Y. enterocolitica* και δεν απαιτούν τη σύγχρονη παρουσία του παθογόνου αιτίου, ο μικροοργανισμός μπορεί ακόμα να προκαλέσει ένα ευρύ φάσμα εξωμεσεντερικών εκδηλώσεων μεταξύ των οποίων ενδοκοιλιακά αποστήματα, φαρυγγοαμυγδαλίτιδα, οστεομυελίτιδα, πνευμονικά αποστήματα, διαπύηση τραυμάτων και εγκαυμάτων, πυώδη επιπεφυκίτιδα, ηπατίτιδα, μυοκαρδίτιδα, περικαρδίτιδα κ.α. (Rabson et al. 1972, Bisset 1976, Kohl et al. 1976, Sebes et al. 1976, Chrichton 1978, Ahvonen 1972, Gutman et al. 1973, Larsen 1979, Baier and Puppel 1979).

3.2.2. Ανοσοπαθολογικές επιπλοκές

Οι σημαντικότερες ανοσοπαθολογικές επιπλοκές της εντερικής λοίμωξης από *Y. enterocolitica* είναι η αντιδραστική αρθρίτιδα και το οζώδες ερύθημα.

3.2.2.i. Αντιδραστική αρθρίτιδα

Ως **αντιδραστική αρθρίτιδα** (Reactive Arthritis - ReA) χαρακτηρίζεται η οξεία φλεγμονή των αρθρώσεων η οποία ακολουθεί λοιμώξεις αναπτυσσόμενες σε οποιαδήποτε περιοχή του σώματος και στην οποία λοιμώδεις μικρο-οργανισμοί δεν απομονώνονται στο αρθρικό υγρό. Η αντιδραστική αρθρίτιδα ή πολυαρθρίτιδα (παλαιότερη ονομασία: σύνδρομο Reiter) κατατάσσεται στην ομάδα των σπονδυλαρθροπαθειών. Η αντιδραστική αρθρίτιδα προσβάλλει συχνά την σπονδυλική στήλη (σπονδυλίτιδα), τις ιερολαγόνιες (ιερολαγονίτιδα) και τις περιφερικές αρθρώσεις. Είναι πιθανόν να εμφανιστεί 2 – 6 εβδομάδες μετά την έναρξη της εντερικής νόσου. Αυτή η ανοσοπαθολογική εκδήλωση παρατηρείται συχνότερα σε άτομα που φέρουν το αντιγόνο ιστοσυμβατότητας HLA-B27 το οποίο εμφανίζει σημαντικές ομοιότητες με αντιγόνα της *Y. enterocolitica* (Aho et al. 1974). Παρά την μεγάλη του συχνότητα σε ασθενείς με ReA, ο ρόλος του HLA-B27 στην παθογένεση της αντιδραστικής αρθρίτιδας δεν έχει προσδιορισθεί (Wordsworth 1998, Ikeda and Yu 1998). Το HLA-B27 δεν προδιαθέτει στην ανάπτυξη λοίμωξης ή αντιδραστικής αρθρίτιδας, αλλά συνδέεται με μεγάλο κίνδυνο ανάπτυξης βαριάς και μακροχρόνιας ReA (Aho et al. 1973). Οι ασθενείς με το αλληλίο αυτό έχουν μειωμένη ικανότητα εξόντωσης των βακτηριδίων και πιθανώς αυξημένη ενδοκυττάρια επιβίωση των παθογόνων μικρο-οργανισμών (Sigal 2001). Οι ασθενείς με αντιδραστική αρθρίτιδα από υερσίνια και θετικό HLA-B27 παρουσιάζουν μεγαλύτερη απόκριση σε χημειοτακτικό ερέθισμα από HLA-B27-αρνητικούς ασθενείς (Leirisalo et al. 1980), η οποία πιθανώς συμβάλλει στα εντονότερα φλεγμονώδη συμπτώματα στους φορείς του αλληλίου αυτού.

3.2.2.ii. Οζώδες ερύθημα

Το οζώδες ερύθημα είναι μία δερματοπάθεια που χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση επώδυνων οζιδίων που εμφανίζονται συνήθως στην πρόσθια επιφάνεια των κάτω άκρων ιδίως των κνημών. Μερικές φορές εμφανίζεται πυρετός, κακουχία και αρθραλγία. Το οζώδες ερύθημα υποχωρεί αυτόματα μέσα σε 6 εβδομάδες. Η νόσος αυτή εμφανίζεται στις ηλικίες 15-30 αλλά εμφανίζεται και σε άλλες ηλικίες ανάλογα με την αιτιολογία. Το οζώδες ερύθημα θεωρείται κοινή νόσος. Οι γυναίκες εμφανίζουν την νόσο συχνότερα από τους άνδρες. Η νόσος φαίνεται ότι είναι ανοσολογική αντίδραση σε αρκετά αντιγόνα. Μεταξύ των κυριότερων αιτιών οζώδους ερυθήματος είναι και η λοίμωξη από *Y. enterocolitica* (Jalava et al. 2006, Yotsu et al. 2010).

Πίνακας 4. Σύνοψη των λοιμώξεων από *Y. enterocolitica* και των επιπτώσεών τους.

Λοιμώξεις

Εντεροκολίτιδα (κυρίως σε παιδιά – συχνά σύγχρονη βακτηριαίμια)

Ψεδοσκωλικοειδίτιδα (παιδιά < 5 ετών και νέοι)

Οξεία μεσεντερική λεμφαδενίτιδα

Τελική ιλεΐτιδα

Βακτηριαίμια

Μεταστατικές λοιμώξεις

Αποστήματα (ήπαρ, νεφροί, σπλήνας, πνεύμονες)

Δερματικές εκδηλώσεις (κυτταρίτιδα, πυομυοσίτιδα, πεμφυγοειδείς βλάβες)

Πνευμονία

Μηνιγγίτιδα

Πανοφθαλμίτιδα

Ενδοκαρδίτιδα

Οστεομυελίτιδα

Ανοσοπαθολογικές επιπλοκές

Αντιδραστική αρθρίτιδα (σύνδρομο Reiter)

Μυοκαρδίτιδα

Σπειραματονεφρίτιδα

Οζώδες ερύθημα

Φαρυγγίτιδα

3.2.2.iii. Άλλες πιθανές επιπλοκές

Η *Y. enterocolitica* έχει επίσης συσχετιστεί με τη νόσο Graves (αυτοάνοσος θυρεοειδίτιδα) (Tomer and Davies 1993). Η συσχέτιση αυτή έχει βασιστεί σε έμμεσες ενδείξεις όπως οι ομοιότητες μεταξύ αντιγονικών δομών του μικροβίου και των αυτοαντιγόνων του θυρεοειδούς (Benvenega et al. 2006). Αν και η πιθανότητα κάποιας έμμεσης εμπλοκής των λοιμώξεων από *Y. enterocolitica* στην εμφάνιση της νόσου Graves σε άτομα με γενετική προδιάθεση δεν έχει αποκλειστεί (Toivanen and Toivanen 1994), σε

μεταγενέστερες επιδημιολογικές μελέτες η συσχέτιση αυτή δεν τεκμηριώθηκε (Strieder et al. 2003, Hansen et al. 2006).

3.2.3. Προδιαθεσικοί παράγοντες

Προδιαθεσικοί παράγοντες για λοίμωξη από *Y. enterocolitica* είναι κυρίως η μικρή ηλικία καθώς και η καθ'οιονδήποτε τρόπο μείωση της άμυνας του ξενιστή. Οι πλέον συχνοί από αυτούς τους παράγοντες για την εμφάνιση υερσινίωσης και ειδικότερα βακτηριαμίας – σήψης είναι η κίρρωση του ήπατος (η θνητότητα από σήψη οφειλόμενη σε *Y. enterocolitica* σε κίρρωτικούς ασθενείς είναι ιδιαίτερα υψηλή [$>60\%$]), η παρουσία του HLA-B27 αντιγόνου ιστοσυμβατότητας, η αύξηση του σιδήρου στο αίμα και στους ιστούς και οι θαλασσαιμίες (κυρίως Μεσογειακή αναιμία). Επίσης η συχνότητα λοιμώξεων από *Y. enterocolitica* φαίνεται να είναι αυξημένη σε ασθενείς με λευχαιμία, απλαστική αναιμία, αιμοχρωμάτωση και σακχαρώδη διαβήτη.

Η Μεσογειακή αναιμία έχει αναγνωριστεί ως σημαντικός προδιαθεσικός παράγοντας γενικευμένης υερσινίωσης από τη δεκαετία του 1970. Εκτός της σηψαιμίας, που είναι η συχνότερη εκδήλωση, έχουν ακόμα περιγραφεί περιπτώσεις αρθρίτιδας και οστεομυελίτιδας. Στην Ελλάδα, η πλειονότητα των περιπτώσεων βακτηριαμίας – σήψης από *Y. enterocolitica* αφορά πολυμεταγγιζόμενα παιδιά με Μεσογειακή αναιμία. Αν και ο υποκείμενος μηχανισμός πρόκλησης γενικευμένης υερσινίωσης στους ασθενείς αυτούς δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, φαίνεται ότι ο κύριος προδιαθεσικός παράγοντας είναι η υπερσιδηραμία (το πλεόνασμα ιόντων σιδήρου ευνοεί την ανάπτυξη του μικροοργανισμού). Άλλος προδιαθεσικός παράγοντας που θα μπορούσε να ευνοήσει τη λοίμωξη από *Y. enterocolitica* στους ασθενείς με Μεσογειακή αναιμία είναι η σπληνεκτομή. Επίσης, η αρχόμενη ηπατική βλάβη και η κίρρωση στους ασθενείς αυτούς θα μπορούσαν να παιξουν ρόλο στην ανάπτυξη υερσινίωσης. Στις περιπτώσεις αυτές τα μικροβιακά κύτταρα μπορούν να παρακάμψουν, έστω μερικώς, το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα του ήπατος και να διασπαρούν στο περιφερικό αίμα. Ανεξάρτητα του υποκείμενου μηχανισμού, κάθε περίπτωση λοίμωξης του γαστρεντερικού από *Y. enterocolitica* σε θαλασσαιμικούς ασθενείς ενέχει τον κίνδυνο γενικευμένης θανατηφόρου λοίμωξης. Επιβάλλεται έτσι η όσον το δυνατόν ταχύτερη αναγνώριση της λοίμωξης στην αρχική της εντερική μορφή που θα επιτρέψει την έγκαιρη χρήση αντιβιοτικών.

3.2.4. Διάγνωση υερσινιώσεων

Η διάγνωση των λοιμώξεων από *Y. enterocolitica* βασίζεται στην καλλιέργεια του υπόπτου υλικού (κόπρανα, αίμα, υγρόλεμφαδένων, πύον αποστημάτων ή άλλο ύποπτο υλικό). Η καλλιέργεια του αρθρικού υγρού αποβαίνει αρνητική διότι η αντιδραστική αρθρίτιδα καθορίζεται από ανοσολογικούς παράγοντες.

Για την απομόνωση της *Y. enterocolitica*, αν δεν πρόκειται για καλλιέργεια κοπράνων ασθενούς που βρίσκεται στην οξεία φάση της εντερικής λοίμωξης, χρησιμοποιείται η μέθοδος του ψυχρού εμπλουτισμού σε ζυμό Rappaport ή ζυμό με σελενίτη και νοβοβοκίνη ή σε απλό ζυμό με σελενίτη ή σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων παρουσία μαννιτόλης. Ακολουθεί ανακαλλιέργεια σε Mac Conkey άγαρ ή σε στερεό υλικό CIN. Στη συνέχεια γίνεται ταυτοποίηση της *Y. enterocolitica* και η τυποποίησή της (συνήθως οροτυπία και βιοτυπία όπως περιγράφηκε προηγουμένως). Ο προσδιορισμός του πλασμιδιακού περιεχομένου καθώς και διάφορες γονοτυπικές μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν επιβεβαιωτικά.

Στη διάγνωση των υερσινιώσεων μπορούν ακόμα να χρησιμοποιηθούν οι ορολογικές εξετάσεις, η ειδική δερμοαντίδραση καθώς και η βιοψία.

Οι ορολογικές δοκιμασίες για τη διάγνωση των υερσινιώσεων έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως, κυρίως στις Ευρωπαϊκές χώρες. Έχει αναφερθεί σημαντική αύξηση των τίτλων αντισωμάτων (από 80 σε >20.000) εντός 2 έως 7 ημερών από την οξεία εκδήλωση της εντερικής υερσινίωσης (Ahvonen 1972). Επίσης η ανάπτυξη ανοσοπαθολογικών επιπλοκών συνήθως συνοδεύεται από αύξηση αντισωμάτων (Winblad 1975). Οι τίτλοι αντισωμάτων μπορεί να παραμείνουν αυξημένοι για χρόνια. Προβλήματα ειδικότητας μπορεί να προκύψουν λόγω διασταυρούμενων αντιδράσεων των χρησιμοποιούμενων αντιορών κυρίως με αντιγόνα της *Brucella abortus* (Corbel 1979). Ψευδώς θετικές αντιδράσεις, ιδιαίτερα για τον ορότυπο O:3, είναι πιθανόν να προκύψουν και ασθενής με νοσήματα του θυρεοειδούς οι οποίοι δεν έχουν έρθει σε επαφή με *Y. enterocolitica* (Shenkman et al. 1976).

Η τεχνική ELISA έχει σήμερα σε μεγάλο βαθμό αντικαταστήσει τις συγγολητινο-αντιδράσεις από τις οποίες εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία για τον προσδιορισμό αντισωμάτων IgG and IgA. Έχουν ωστόσο παρατηρηθεί προβλήματα ειδικότητας (ψευδώς θετικά αποτελέσματα) καθώς και διασταυρούμενες αντιδράσεις (Vesikari et al. 1980). Η τεχνική του ανοσοφθορισμού (immunofluorescence [IF]) για τη διάγνωση λοιμώξεων από *Y. enterocolitica* χρησιμοποιείται για την εξέταση κλινικών δειγμάτων όπως υλικά από βιοψίες εντέρου και λεμφαδένων (Hoogkamp-Korstanje et al. 1986).

3.2.5. Ευαισθησία στα αντιβιοτικά – Θεραπευτική αντιμετώπιση

Τα στελέχη *Y. enterocolitica* είναι, στην πλειονότητά τους, ευαίσθητα σε διάφορα αντιβιοτικά μεταξύ των οποίων οι αμινογλυκοσίδες, οι τετρακυκλίνες, οι φθοριομένες κινολόνες, η γλωραφαινικόλη και οι σουλφοναμίδες. Οι πενικιλίνες και οι παλαιότερες κεφαλοσπορίνες είναι αδρανείς κατά της *Y. enterocolitica* λόγω της ιδιοσυστασιακής για το είδος παραγωγής δύο τύπων β-λακταμασών (β-λακταμάσες Α και Β) κυρίως μεταξύ των στελεχών των οροτύπων Ο:3 και Ο:9. Η β-λακταμάση Α υδρολύει πενικιλίνες και κεφαλοσπορίνες. Η β-λακταμάση Β εκδηλώνει ισχυρή δράση κεφαλοσπορινάσης. Στα ένζυμα αυτά οφείλεται η αντοχή των αντιστοιχών στελεχών των προαναφερθέντων οροτύπων στα αντιβιοτικά πενικιλίνη, αμπικιλίνη, κεφαλοθίνη και καρβενικιλίνη (Cornelis 1975). Ο φαινότυπος αντοχής στα β-λακταμικά αντιβιοτικά δεν είναι ίδιος για όλους τους ορότυπους. Για παράδειγμα τα στελέχη του οροτύπου Ο:5,27 παράγουν μόνο τη β-λακταμάση Β (Matthew et al. 1977). Ανεξάρτητα από τις διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται μεταξύ των διαφόρων οροτύπων, όλα τα παθογόνα στελέχη *Y. enterocolitica* είναι ευαίσθητα στα νεότερα β-λακταμικά αντιβιοτικά.

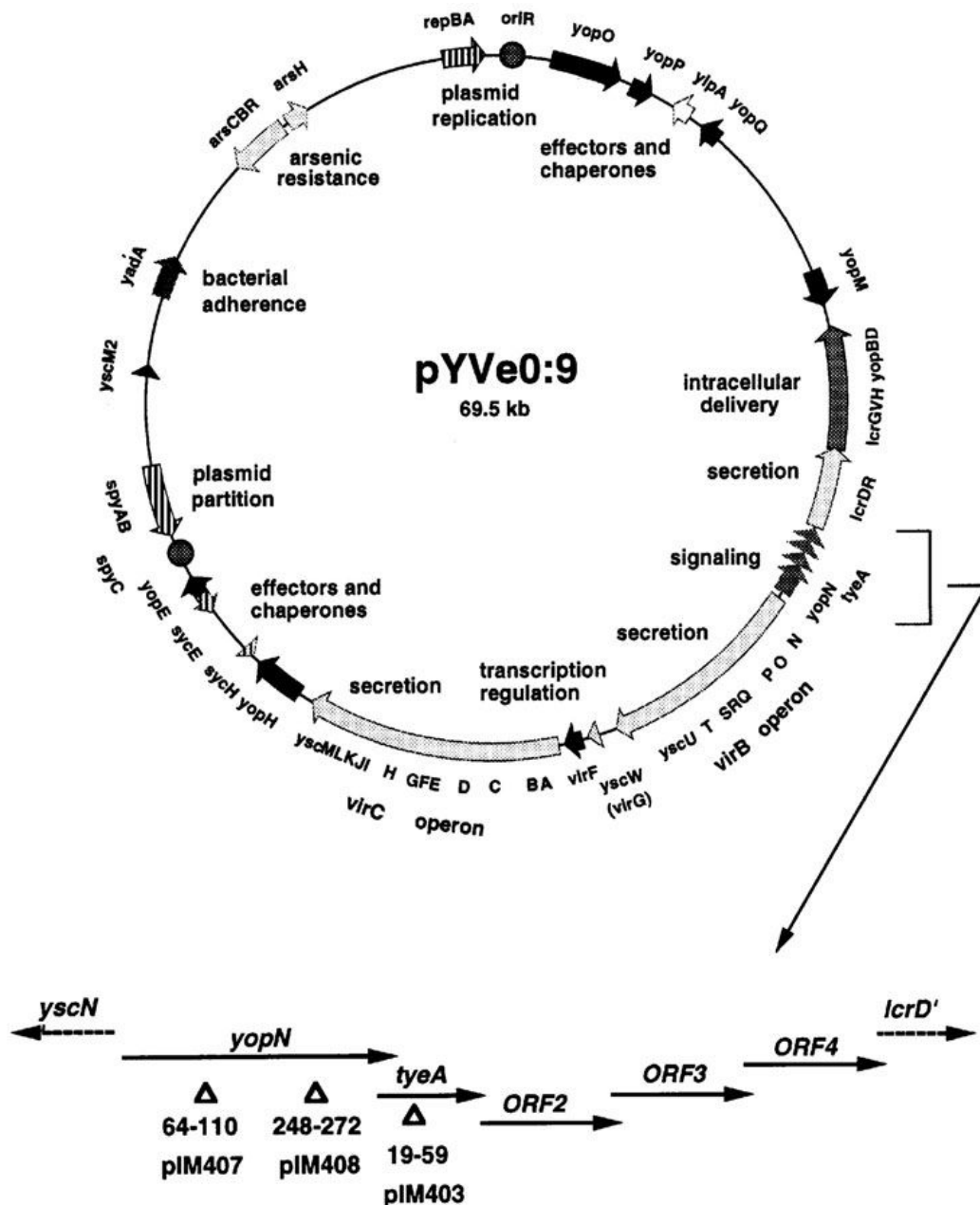
Η κλινική χρήση ευρέος φάσματος κεφαλοσπορινών σε συνδυασμό με αμινογλυκοσίδες θεωρείται αποτελεσματική στην αντιμετώπιση εξωεντερικών λοιμώξεων από *Y. enterocolitica* (π.χ. βακτηριαμία) (Gayraud et al. 1993). Επίσης, οι κινολόνες έχουν αποδειχτεί αποτελεσματικές στη θεραπεία των εξωεντερικών λοιμώξεων από *Y. enterocolitica* (Hoogkamp-Korstanje 1987). Στις περιπτώσεις επιπεπλεγμένης εντεροκολίτιδας καθώς και εξωεντερικών εστιακών λοιμώξεων έχει προταθεί η χρήση τετρακυκλινών ή συνδυασμού τριμεθοπρίμης-σουλφοναμιδών (Cover and Aber 1989).

4. *Yersinia enterocolitica*: Παθογένεια

4.1. Παράγοντες παθογένειας

Το είδος *Y. enterocolitica* μπορεί να θεωρηθεί ως ένα σύνολο που περιλαμβάνει ετερογενείς ως προς τις ιδιότητες μικροοργανισμούς όπως υποδεικνύεται από τους 6 διακριτούς βιότυπους και, κυρίως, από τους περισσότερους από 50 ορότυπους που αντανακλούν την ποικιλομορφία των Ο σωματικών αντιγόνων (λιποπολυσακχαριτών). Η λοιμογόνος ικανότητα ορισμένων ορο-βιοτύπων (π.χ. Ο:3/4, Ο:8/1B, Ο:9/2, Ο:18/1B κ.λ.π. – βλ. Πίνακα Χ) οφείλεται στο γεγονός ότι τα στελέχη των συγκεκριμένων τύπων διαθέτουν το πλασμίδιο παθογονικότητας pYV (plasmid for Yersinia Virulence) που κωδικοποιεί, μεταξύ

άλλων, διάφορους παθογενετικούς παράγοντες όπως την προσκολλητίνη A της υερσίνας (YadA) και το Ysc-Yop τύπου III σύστημα απέκκρισης (TTSS) (Εικόνα 4). Επίσης, τα στελέχη των λοιμογόνων ορο-βιοτύπων διαθέτουν χρωμοσωματικά γονίδια όπως τα *ail*, *myfA*, *ystA*, *ysa* που κωδικοποιούν επιπρόσθετους παθογονικούς παράγοντες καθώς και τη νησίδα υψηλής παθογονικής ικανότητας (high pathogenicity island- [HPI-]) η οποία σχετίζεται με την απόκτηση ιόντων σιδήρου από τον ξενιστή (Cornelis et al. 1998, Bhagat et al. 2007)



Εικόνα 4. Χάρτης του πλασμιδίου παθογένειας pYV της *Y. enterocolitica*. Προσαρμογή από Iriarte και συν. (1998).

Πίνακας 5. Κατανομή του πλασμιδίου παθογονικότητας pYV της *Y. enterocolitica* κατά βióτυπο και ορότυπο. Προσαρμογή από Tennant και συν. 2003.

Βióτυπος	Ορότυπος
1A	O:4; O:5; O:6,30; O6,31; O:7,8; O:7,13; O:10; O:14; O:16; O:21; O:22; O:25; O:37; O:41,42; O:46; O:47; O:57; NT
1B	<u>O:4,32*</u> ; <u>O:8</u> ; <u>O:13a,13b</u> ; O:16; <u>O:18</u> ; <u>O:20</u> ; <u>O:21</u> ; O:25; O:41,42; NT
2	<u>O:5,27</u> ; <u>O:9</u> ; O:27
3	<u>O:1,2,3</u> ; <u>O:3</u> ; <u>O:5,27</u>
4	<u>O:3</u>
5	<u>O:2,3</u>

*Οι **έντονοι** και υπογραμμισμένοι χαρακτήρες υποδεικνύουν τους ορότυπους που φέρουν το πλασμίδιο παθογονικότητας pYV.

Ο σημαντικότερος ρόλος του πλασμιδίου παθογονικότητας pYV είναι να λειτουργεί κατά του ξενιστή σε πολλαπλά επίπεδα. Τα προϊόντα που κωδικοποιούνται από τα πλασμιδιακά γονίδια προσφέρουν στα pYV-θετικά στελέχη *Y. enterocolitica* αντοχή στο βακτηριοκτόνο σύστημα του ορού καθώς και στη φαγοκυττάρωση επιτρέποντας έτσι την απρόσκοπτη εξωκυττάρια ανάπτυξη τους στους ιστούς που έχουν προσβληθεί.

Το πλασμίδιο pYV κωδικοποιεί, μεταξύ άλλων, την YadA, μια πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης η οποία λειτουργεί ως προσκολλητίνη. Κωδικοποιεί επίσης και το Ysc-Yop τύπου III σύστημα απέκκρισης (TTSS) το οποίο είναι υπεύθυνο για την ενεργητική είσοδο πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα των ευαίσθητων κυττάρων του ξενιστή (Cornelis et al. 1998). Η συμμετοχή των παραγόντων που κωδικοποιούνται από το πλασμίδιο pYV (κυρίως των YadA και Yop) στην πρόκληση λοίμωξης από την *Y. enterocolitica*, έχει τεκμηριωθεί σε μεγάλο αριθμό πειραματικών μελετών. Στελέχη *Y. enterocolitica* που δεν διαθέτουν το πλασμίδιο pYV είναι ευαίσθητα στη βακτηριοκτόνο δράση του συμπληρώματος και στα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα. Θα πρέπει πάντως να σημειωθεί ότι τέτοιου είδους βακτηριακά κύτταρα φαίνεται να διαθέτουν μιά περιορισμένη ικανότητα επιβίωσης εντός των

μακροφάγων. Επίσης, είναι δυνατόν να προκαλέσουν, για μικρό χρονικό διάστημα, ελαφράς μορφής εντερική λοίμωξη χωρίς την ένταση των συμπτωμάτων που προκαλεί η τυπική υερσινίωση (Brubaker 1991).

Εκτός της συμμετοχής των ‘προϊόντων’ του πλασμιδίου pYV, για την εμφάνιση πλήρους λοιμογόνου δράσης από τα pYV-θετικά στελέχη *Y. enterocolitica*, απαιτείται και η σύγχρονη έκφραση παραγόντων που κωδικοποιούνται από έναν αριθμό γονιδίων του χρωμοσώματος. Σημειώνεται ότι ορισμένα από τα χρωμοσωματικά γονίδια παθογονικότητας της *Y. enterocolitica* δεν περιορίζονται στα pYV-θετικά στελέχη αλλά μπρούν να ανιχνευθούν και σε στελέχη που δεν διαθέτουν το πλασμίδιο pYV.

Στα χρωμοσωματικά γονίδια παθογονικότητας της *Y. enterocolitica* που βρίσκονται αποκλειστικά σε pYV-θετικά στελέχη περιλαμβάνονται τα παρακάτω:

inv: κωδικοποιεί την ινβασίνη, μία πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης του μικροοργανισμού η συμμετοχή της οποίας είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική μετάθεση της *Y. enterocolitica* μέσω του εντερικού επιθήλιου (Pepe et al. 1993).

ail: κωδικοποιεί μία ‘πολλαπλών καθηκόντων’ πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης του μικροοργανισμού η οποία συμμετέχει στη προσκόλληση του μικροοργανισμού στο εντερικό επιθήλιο και στη μετάθεση του βακτηριδίου). Υπάρχουν ακόμα σαφείς ενδείξεις ότι η πρωτεΐνη Ail ενισχύει την ικανότητα επιβίωσης της *Y. enterocolitica* στον ορό του ξενιστή [αντοχή στη βακτηριοκτόνο δράση του συμπληρώματος] (Miller et al. 1988).

yst: κωδικοποιεί μία θερμοανθεκτική τοξίνη η οποία πιθανόν συμμετέχει στο μηχανισμό πρόκλησης διάρροιας στις οξείες εντερικές μορφές της λοίμωξης από *Y. enterocolitica*. Ο ακριβής μηχανισμός δράσης της Yst δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί (Delor and Cornelis 1992, Robins-Browne et al. 1979).

myf: κωδικοποιεί ινιδικό αντιγόνο που, πιθανώς, λειτουργεί ως προσκολλητίνη (Iriarte et al. 1993).

Επιπροσθέτως, τα στελέχη *Y. enterocolitica* του βιοτύπου 1B τα οποία θεωρούνται ως τα πλέον λοιμογόνα για τον άνθρωπο, φέρουν νησίδα υψηλής παθογονικής ικανότητας (high pathogenicity island- [HPI-]) η οποία σχετίζεται με την απόκτηση ιόντων σιδήρου από τον ξενιστή και έτσι διευκολύνει την ανάπτυξη της *Y. enterocolitica* στις συνθήκες ένδειας σιδήρου που παρατηρείται στην επιφάνεια των βλεννογόνων και στους ιστούς (Carniel 1999).

Πίνακας 6. Γονίδια σχετιζόμενα με την λοιμογόνο δράση της *Y. enterocolitica*.

Γονίδια Προϊόν γονιδίου / λειτουργία	Βιβλιογραφία
<i>Inv</i> ^C Ινβασίνη (πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης απαραίτητη για τη μετάθεση μέσω του εντερικού επιθηλίου)	Bhagat and Viridi 2007
<i>ail</i> ^C Προσκολλητίνη (πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης απαραίτητη για την προσβολή του βλεννογόνου και την αντοχή στο συμπλήρωμα)	Bhaduri et al. 1997
<i>virF</i> ^P Μεταγραφικός παράγοντας	Bhaduri et al. 1997
<i>myfA</i> ^C Πιθανή προσκολλητίνη (Mucoid <i>Yersinia</i> factor)	Kot et al 2004
<i>ystA</i> ^C Εντεροτοξίνη (<i>Yersinia</i> stable heat-stable toxin)	Thoerner et al. 2003
<i>ystB</i> ^C Εντεροτοξίνη (<i>Yersinia</i> stable heat-stable toxin)	Thoerner et al. 2003
<i>ystC</i> ^C Εντεροτοξίνη (<i>Yersinia</i> stable heat-stable toxin)	Huang et al. 1997
<i>fepA</i> Υποδοχέας εντεροχελίνης	Schubert et al. 1999
<i>fedD</i> Υποδοχέας εντεροχελίνης	Schubert et al. 1999
<i>Fes</i> Εστεράση εντεροχελίνης	Schubert et al. 1999
<i>tccC</i> ^P Πρωτεάση (Insecticidal toxin-like)	Bhagat and Viridi 2007
<i>ymoA</i> <i>Yersinia</i> modulator	Grant et al. 1998
<i>hreP</i> Προτεάση	Bhagat and Viridi 2007
<i>Sat</i> Ακετυλο-τρανσφεράση	Bhagat and Viridi 2007
<i>yadA</i> ^P Προσκολλητίνη A	Cornelis et al. 1998
<i>ysa</i> ^P Εκκριτικό σύστημα (<i>Yersinia</i> secretion apparatus)	Cornelis et al. 1998

^CΧρωμοσωματικά γονίδια

^PΠλασμιδιακά γονίδια

4.2. Λοιμογόνος δράση

Οι παθογενετικοί μηχανισμοί της *Yersinia enterocolitica* δεν έχουν μέχρι σήμερα διευκρινιστεί πλήρως. Τα περισσότερα στελέχη *Y. enterocolitica* διαθέτουν μία ή και δύο ιδιότητες άμεσα συνδεδεμένες με τη λοιμογόνο ικανότητά τους. Η πρώτη ιδιότητα είναι η δυνατότητα διείσδυσης μέσω του εντερικού τοιχώματος. Η ιδιότητα αυτή βρίσκεται υπό τον έλεγχο του πλασμιδίου παθογένειας pYV (70-kb). Τα μη λοιμογόνα στελέχη *Y. enterocolitica* δεν διαθέτουν αυτό το πλασμίδιο. Δεύτερη ιδιότητα είναι η παραγωγή θερμοανθεκτικής εντεροτοξίνης. Η παραγωγή της θερμοανθεκτικής εντεροτοξίνης βρίσκεται υπό τον έλεγχο των χρωμοσωματικών γονιδίων *ystA*, *ystB* και *ystC* (Robins-Browne et al. 1979).

4.3. Διαδικασία προσαρμογής

Η κύρια πηγή στελεχών *Y. enterocolitica* είναι τα τρόφιμα τα οποία κατά κανόνα βρίσκονται σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες. Έτσι, ο μικροοργανισμός, μετά την είσοδό του στο γαστρεντερικό σωλήνα θα πρέπει να προσαρμοστεί στις νέες 'περιβαλλοντικές' συνθήκες. Μία από τις πρώτες αποκρίσεις προσαρμογής είναι και η αλλαγή των επιφανειακών αντιγονικών δομών. Η αλλαγή προσαρμογής, τουλάχιστον στα πρώτα στάδια, επάγεται από τη διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ του περιβάλλοντος και του ξενιστή. Αυτό συνήθως επιτυγχάνεται, ως ένα βαθμό, λόγω της παρουσίας του πλασμιδίου παθογένειας pYV (70-kb). Ορισμένα γονίδια του πλασμιδίου pYV κωδικοποιούν πολυπεπτίδια της εξωτερικής μεμβράνης τα οποία εκφράζονται στους 37°C αλλά όχι στους 25°C (βλ. Πίνακα 7) (Bottone 1997).

Πίνακας 7. Επίδραση της θερμοκρασίας στα χαρακτηριστικά και στη έκφραση λοιμογόνων παραγόντων στο είδος *Y. enterocolitica* (Προσαρμογή από Bottone 1997).

	37°C	25°C
<u>Χρωμοσωματικό χαρακτηριστικό</u>		
Λιποπολυσακχαρίτες (LPS)	Rough	Smooth
Κυτταρική μορφολογία	Πλειομορφική	Κοκκοειδής
Προσκόλληση στα φαγοκύτταρα	Ασθενής	Ισχυρή
Παρουσία μαστιγίου	Όχι	Ναι
Ινβασίνη	Όχι	Ναι
Παραγωγή εντεροτοξίνης	Όχι	Ναι
Υερσινιαβακτίνη	Ναι	Όχι
<u>Πλασμιδιακό χαρακτηριστικό</u>		
Πρωτεΐνες εξωτερικής μεμβράνης	Ναι	Όχι
Υδροφοβικότητα κυτταρικής επιφάνειας	Ναι	Όχι
Αντοχή στον ορό	Ναι	Όχι
Εξάρτηση από ασβέστιο	Ναι	Όχι
Αυτοσυγκόλληση	Ναι	Όχι
Αντοχή στη φαγοκυττάρωση	Ναι	Όχι
Αντοχή στην ενδοκυττ. θανάτωση (μακροφάγα)	Υψηλή	Αμελητέα

4.4. Προσκόλληση

Προσκόλληση παθογόνων στελεχών *Y. enterocolitica* (παθογόνοι βιότυποι 1B, 2, 3, 4 και 5) που φέρουν το πλασμίδιο pYV σε καλλιέργειες κυττάρων HeLa και HEp-2 (ευκαρυωτικές κυτταρικές σειρές) έχει περιγραφεί σε πολλές μελέτες (O' EV et al. 1990, Mors and Pai 1980, Vesikari et al 1981). Ωστόσο, η ικανότητα προσκόλλησης σε κυτταρικές σειρές HeLa δεν απαιτεί την παρουσία του pYV. Πράγματι, έχει αποδειχθεί ότι κύτταρα στελέχους *Y. enterocolitica* από τα οποία είχε αφαιρεθεί το πλασμίδιο pYV, διατηρούν, έστω και μειωμένη, την ικανότητα προσκόλλησης στην επιφάνεια των κυττάρων HeLa (Schiemann et al. 1982). Φαίνεται ότι αυτή καθ'αυτή η παρουσία του pYV δεν είναι επαρκής για να προσδώσει πλήρη προσκολλητική ικανότητα στα λοιμογόνα στελέχη *Y. enterocolitica*. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει το ρόλο των περιβαλλοντικών συνθηκών στην εκδήλωση της ικανότητας προσκόλλησης. Μετά από καλλιέργεια στελέχους που περιείχε το πλασμίδιο παθογένειας pYV σε θερμοκρασία 26°C σε θρεπτικά υλικά εμπλουτισμένα με ασβέστιο, τα βακτηριακά κύτταρα εμφάνιζαν ισχυρή προσκόλληση σε κύτταρα HeLa και HEp-2. Αντίθετα, η ικανότητα προσκόλλησης σε κύτταρα HeLa και HEp-2 όταν το στέλεχος επωάστηκε στους 37°C στο ίδιο υλικό που περιείχε ιόντα ασβεστίου, εμφανίστηκε σημαντικά μειωμένη (Bolin et al. 1988).

Χρησιμοποιώντας την τεχνική αδρανοποίησης των γονιδίων του πλασμιδίου παθογένειας pYV, οι Kapperud και συν (1987) ταυτοποίησαν τέσσερα (4) πλασμιδιακά εξαρτώμενα και επαγώγιμα από τη θερμοκρασία χαρακτηριστικά της εξωτερικής μεμβράνης τα οποία σχετίζονται με την προσκόλληση στα επιθηλιακά κύτταρα: (i) ένα 'στρώμα' ινιδίων το οποίο καλύπτει την εξωτερική μεμβράνη, (ii) την πρωτεΐνη YOP1 της εξωτερικής μεμβράνης (πρόκειται για τη δομική μονάδα των προαναφερθέντων ινιδίων), (iii) αυτόματη αυτοσυγκόλληση σχετιζόμενη με την ύπαρξη ινιδίων στη κυτταρική επιφάνεια και (iv) τη μαννόζη – ανθεκτική αιμοσυγκόλληση ερυθρών αιμοσφαιρίων ινδικών χοιριδίων (Kapperud et al. 1987).

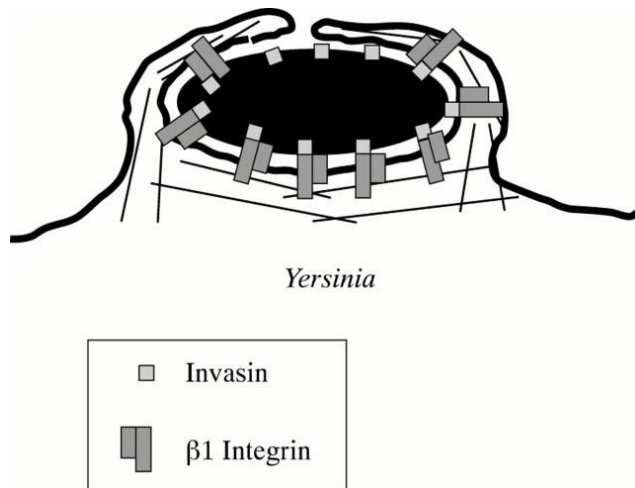
Αν και τα στελέχη *Y. enterocolitica* που ανήκουν στο βιότυπο 1A δεν φέρουν το πλασμίδιο παθογένειας pYV, διάφοροι τύποι ινιδίων έχουν παρατηρηθεί στο βιότυπο αυτό. Ένας από τους τύπους αυτών των ινιδίων, ο MR/Y-HA, έχει διάμετρο 8 nm, προκαλεί συγκόλληση ερυθρών αιμοσφαιρίων ποικίλης προέλευσης παρουσία μαννόζης και εκφράζεται in vitro σε χαμηλές θερμοκρασίες (< 25°C) αλλά όχι στους 37°C (Old et al. 1984). Ένας δεύτερος τύπος ινιδίων, ο MR/K-like HA, είναι 4 nm σε διάμετρο και προκαλεί επίσης συγκόλληση ενός μικρότερου εύρους ερυθρών αιμοσφαιρίων παρουσία μαννόζης (Old et al. 1984). Η in vitro έκφραση των προαναφερθέντων ινιδίων επιτυγχάνεται μετά από διαδοχικές ανακαλλιέργειες για τουλάχιστον 7 24-ωρα. Τα ινίδια αυτά δεν φαίνεται να

προσφέρουν δυνατότητες προσκόλλησης σε εργαστηριακές καλλιέργειες επιθηλιακών κυττάρων (Isberg 1991). Έτσι, ο πιθανός ρόλος τους στις λοιμώξεις που προκαλούνται από στελέχη *Y. enterocolitica* του βιοτύπου 1A δεν έχει διευκρινιστεί (Tennant et al. 2003).

Ορισμένα στελέχη *Y. enterocolitica* παράγουν την ινιδιακή προσκολλητίνη Myf (*Mucoid Yersinia fibrillae*). Η παραγωγή και έκφραση της δομής αυτής συνδέεται με την ανάπτυξη βλενωδών αποικιών μετά από καλλιέργεια σε κοινά θρεπτικά υλικά. Τα Myf είναι λεπτά ευκίνητα ινίδια που εμφανίζουν σημαντικές ομοιότητες με το CS3. Το τελευταίο θεωρείται απαραίτητος παράγοντας αποικισμού σε ορισμένα εντεροτοξινογόνα στελέχη *Escherichia coli* (Tennant et al. 2003). Ο ρόλος του Myf στον αποικισμό του εντερικού βλεννογόνου από την *Y. enterocolitica* δεν είναι γνωστός.

4.5. Μηχανισμοί προσβολής των επιθηλιακών κυττάρων

Η είσοδος των εντεροπαθογόνων βακτηριδίων στα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου είναι το σημαντικότερο βήμα για την εκδήλωση της παθογόνου δράσης. Έτσι, η ικανότητα της *Y. enterocolitica* να προσβάλλει τα επιθηλιακά κύτταρα σχετίζεται άμεσα με τη λοιμογόνο δράση του μικροοργανισμού (Miller et al. 1989). Η προσβολή του επιθηλίου από εντεροπαθογόνα βακτηρίδια όπως η *Y. enterocolitica* απαιτεί την ενεργοποίηση διαδικασιών οι οποίες θα επιτρέψουν στο μικροοργανισμό να ξεπεράσει το φράγμα του βλεννογόνου, να εισέλθει σε κύτταρο που δεν διαθέτει φαγοκυτταρικές ικανότητες και έτσι να αποδιοργανώσει και να ξεπεράσει τον εντερικό φραγμό. Για να επιτύχουν την είσοδό τους στα επιθηλιακά κύτταρα, τα κύτταρα της *Y. enterocolitica* συνδέονται ισχυρά, μέσω της βακτηριακής ινβασίνης (Inv – προϊόν του γονιδίου *inv*) με τις ιντεγκρίνες της οικογένειας $\beta 1$ οι οποίες εντιπίζονται στην επιφάνεια του ευκαρυωτικού κυττάρου (διαδικασία “zippering”) (Εικόνα 5) (Isberg 1991, Isberg and Barnes 2001). Θα πρέπει πάντως να σημειωθεί ότι σε μερικά λοιμογόνα στελέχη που φέρουν το πλασμίδιο pYV, η διαδικασία προσβολής των κυττάρων του επιθηλίου προχωρεί με σχετικά αργό ρυθμό πιθανόν λόγω των επιδράσεων των Yops στις πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού (Cornelis et al. 1998).



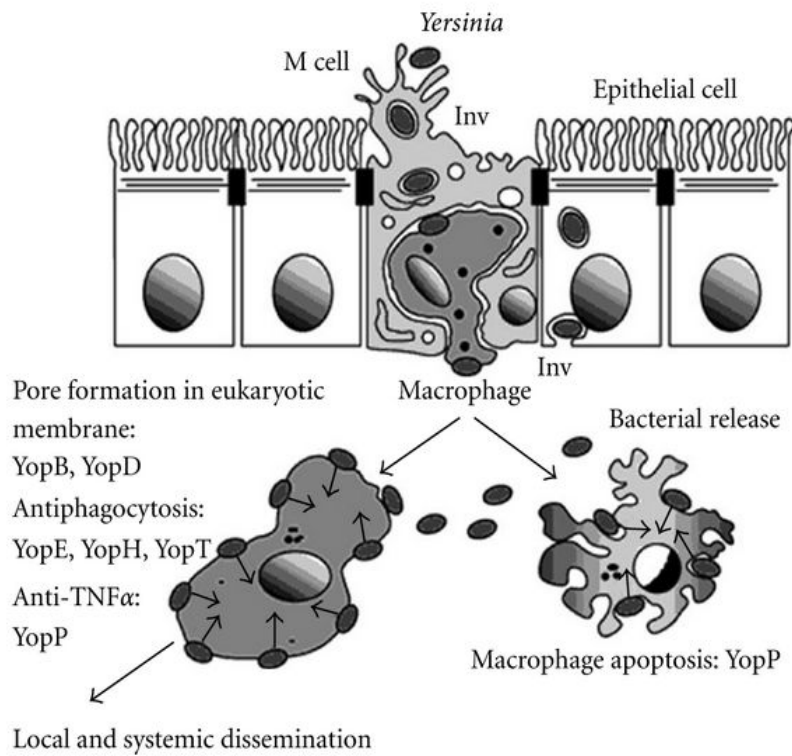
Εικόνα 5. Σύνδεση της βακτηριακής Ινβασίνης με τις β1 ιντεγκρίνες του ευκαρυωτικού κυττάρου (διαδικασία “zippering”). Προσαρμογή από Sansonetti (2002).

4.6. Τοπική και συστηματική διασπορά

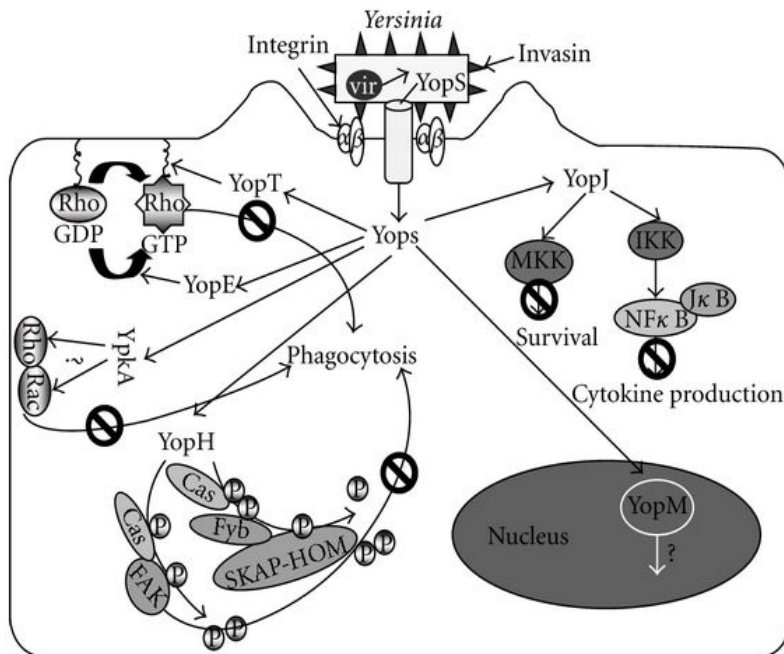
Εκτός της εντεροκολίτιδας, τα λοιμογόνα στελέχη *Y. enterocolitica* μπορούν να διασπαρούν και να προκαλέσουν γενικευμένες λοιμώξεις. Τα βακτηριακά κύτταρα διαπερνούν το εντερικό επιθήλιο στις πλάκες Peyer του ειλεού (Grutzkau et al. 1990). Η σύνδεση της βακτηριακής Ινβασίνης (πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης της *Y. enterocolitica* με μοριακό βάρος 103kDa) με τις β1 ιντεγκρίνες των κυττάρων M είναι κεντρικής σημασίας για την εγκατάσταση και τη τοπική διασπορά του μικροοργανισμού. Μεταλλαγμένα στελέχη που αδυνατούν να παράγουν την πρωτεΐνη Iny διατηρούν κάποια ικανότητα να προσδένονται και να προσβάλλουν τα κύτταρα M, αλλά σε πολύ μικρότερο βαθμό από τα λοιμογόνα στελέχη και η ικανότητά τους να αποικίζουν τις πλάκες Peyer είναι σημαντικά μειωμένη (Clark et al. 1998). Άλλες πρωτεΐνες που εντοπίζονται στην επιφάνεια των κυττάρων της *Y. enterocolitica*, όπως οι Ail, PsaA and YadA πιθανόν να συμμετέχουν στον μικρής έκτασης αποικισμό των πλακών Peyer που μπορεί να παρατηρηθεί με στελέχη που δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη Iny (Marra et al. 1997).

Μετά τη διαδικασία προσβολής, τα κύτταρα της *Y. enterocolitica* ‘αμύνονται’ κατά των συρρεόντων τοπικών μακροφάγων. Η αντίσταση αυτή βασίζεται στην παραγωγή των πλασμιδιακών πρωτεϊνών YopH, YopT και YopE οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να αποδιοργανώνουν τον κυτταροσκελετό των μακροφάγων και να αναστέλλουν τη φαγοκυττάρωση (Fällman et al. 1997, Cornelis 1998). Έτσι, τα βακτηριακά κύτταρα διατηρούν την εξωκυττάρια εντόπισή τους στις πλάκες Peyer καθώς και στους μεσεντέριους

λεμφαδένες γεγονός που τους παρέχει τη δυνατότητα να διασπαρούν και να προκαλέσουν εστιακές ή και γενικευμένες λοιμώξεις (Εικόνα 6α).



(a)



(b)

Εικόνα 6. Συνοπτική-σχηματική παρουσίαση της παθογενετικής δράσης της *Y. enterocolitica*. Προσαρμογή από Sansonetti (2002).

Οι πρωτεΐνες Yops παραλαμβάνονται από τα κύτταρα του ξενιστή μέσω του εκκριτικού συστήματος III. Η YopH, μία φωσφατάση της τυροσίνης, αποφωσφορυλιώνει διάφορες κινάσες του ξενιστή οι οποίες εμπλέκονται στη φαγοκυττάρωση (Persson et al. 1997). Η YopT προκαλεί επανακατανομή των GTPασών της οικογένειας Rho (Zumbihl et al. 1999). Η YopE απενεργοποιεί τις GTPάσες της οικογένειας Rho που εμπλέκονται στη φαγοκυττάρωση (Black et al. 2000). Η YpkA συνδέεται με τις Rac και Rho (άγνωστης λειτουργίας). Αυτές οι τέσσερις Yops αλλάζουν και αποδιοργανώνουν τη ακτίνη του κυτταροσκελετού παρεμποδίζοντας έτσι τη διαδικασία φαγοκυττάρωσης. Η YopJ μειώνει την ενεργοποίηση των MAPKKs και NF- κ B με αποτέλεσμα την επιβράδυνση της διαδικασίας απόπτωσης και την αναστολή της παραγωγής κυτταροκινών. Τέλος, η πρωτεΐνη YopM μεταναστεύει στον πυρήνα (η σημασία της τελευταίας διαδικασίας είναι άγνωστη) (Εικόνα 6b).

5. ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΕΣ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΕΣ

Οι μικροβιακές βιομεμβράνες (biofilms) (εφεξής βιομεμβράνες) είναι δομές που μπορούν να σχηματίσουν πολλά είδη βακτηρίων μετά τη σταθερή προσκόλλησή τους σε ποικιλία επιφανειών, περιλαμβανομένων και των επιθηλιακών επιφανειών. Τα βακτηριακά κύτταρα, μετά τη προσκόλλησή τους, περιβάλλονται από πολυμερείς ουσίες, κυρίως πολυσακχαρίτες (Donlan and Costerton 2002). Έτσι, τα βασικά συστατικά που συγκροτούν μία βιομεμβράνη είναι η α) επιφάνεια προσκόλλησης (μπορεί να είναι είτε έμβια ή η επιφάνεια κάποιου αδρανούς υλικού), β) τα μικροβιακά κύτταρα και γ) το εξωκυττάριο πολυμερές (αναφέρεται και ως γλυκοκάλυκας). Απουσία οποιουδήποτε εκ των τριών παραπάνω συστατικών καθιστά αδύνατη τη συγκρότηση βιομεμβράνης (Dunne 2002).

Υπό τις κατάλληλες συνθήκες, τα περισσότερα είδη βακτηρίων έχουν τη δυνατότητα σχηματισμού βιομεμβρανών (Dunne 2002). Ουσιαστικά, μεγάλο μέρος της μικροβιακής βιομάζας υφίσταται με τη μορφή βιομεμβρανών. Επίσης, πολλά από τα παθογόνα καθώς και ευκαιριακά παθογόνα βακτήρια προκαλούν λοιμώξεις -συχνά χρόνιες- μετά το σχηματισμό βιομεμβράνης ο οποίος θεωρείται σημαντικός λοιμογόνος παράγοντας.

Υπάρχει ευρεία διαβάθμιση στην ικανότητα των διαφόρων μικροοργανισμών να σχηματίζουν βιομεμβράνες. Ορισμένα βακτηριακά είδη εμφανίζουν συγκριτικά αυξημένες δυνατότητες συγκρότησης βιομεμβρανών. Σε αυτά περιλαμβάνονται διάφορα είδη σταφυλοκόκκων (*Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus* και *S. mutans*), εντερόκοκκοι, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Legionella pneumophila*, *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis* (Christensen et al 1982, Donlan and Costerton 2002, Βαμβακοπούλου και συν. 2003).

Από την άποψη της συντήρησης, της λοιμογόνου δράσης και της επιβίωσης ενός μικροοργανισμού στη βιομεμβράνη, η ποσότητα και οι φυσικοχημικές ιδιότητες του γλυκοκάλυκα κατέχουν κεντρικό ρόλο. Γενικά, το στρώμα του γλυκοκάλυκα αποτελείται α) από ένα πολυσακχαριδικό σύμπλεγμα το οποίο παράγεται από τα ίδια τα βακτηριακά κύτταρα (γλυκοζάμινο-γλυκάνες στον *S. epidermidis*, αλγινικά στην *P. aeruginosa* και κολανικό στην *E. coli*), β) από εξωγενείς ουσίες απαραίτητες για το μεταβολισμό των βακτηριακών κυττάρων, όπως ολιγο- και πολυπεπίδια, νουκλεϊκά οξέα, ιχνοστοιχεία κ.λ.π. και γ) από υψηλό ποσοστό νερού (>90 %) (Donlan and Costerton 2002, Sutherland 2001, Wilson 2001).

Η δημιουργία της βιομεμβράνης γίνεται σταδιακά. Προηγείται η προσέγγιση του βακτηριακού κυττάρου στην επιφάνεια. Λόγω της προσέγγισης αναπτύσσονται διάφορες ελκτικές και απωστικές δυνάμεις. Η προσκόλληση συμβαίνει όταν επικρατήσουν οι πρώτες. Στο στάδιο αυτό, ο σημαντικότερος παράγοντας συνάφειας είναι ο βαθμός υδροφοβικότητας

της βακτηριακής επιφάνειας και της επιφάνειας προσκόλλησης (Dunne 2002, Vuong & Otto, 2002). Στο σημείο αυτό η προσκόλληση είναι αντιστρεπτή. Ακολούθως η προσκόλληση ισχυροποιείται παύοντας να είναι αντιστρεπτή λόγω της αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνικών δομών (κυρίως φιμπρίων) της βακτηριακής επιφάνειας και μακρομορίων της επιφάνειας προσκόλλησης (ινωδογόνο, φμπρονεκτίνη, λαμινίνη, κολλαγόνο, γλυκάνες, παράγοντες συμπληρώματος κ.λ.π.) (O’Gara & Humphreys 2001).

Μετά τη σταθερή προσκόλληση, η δραστική αλλαγή των περιβαλλοντικών συνθηκών αναγκάζει τα βακτηριακά κύτταρα να προσαρμόσουν το μεταβολισμό τους αυξομειώνοντας τη μεταγραφή σειράς γονιδίων. Υπολογίζεται ότι υπό τις περιβαλλοντικές συνθήκες που δημιουργεί η βιομεμβράνη, τροποποιείται η μεταγραφή περίπου του 40 % των βακτηριακών γονιδίων (Pringet-Combaret et al 1999). Οι βασικές μεταβολικές τροποποιήσεις αφορούν στην αναπνοή, τη μεταφορά ηλεκτρονίων, τη παραγωγή θερμότητας, το ρυθμό ανάπτυξης και την παραγωγή εξωκυττάρων πολυμερών (Wilson 2001). Ακολουθεί ο (συνήθως βραδύς) πολλαπλασιασμός των βακτηριακών κυττάρων και η συσσώρευσή τους σε μικροαποικίες η οποία ευνοεί την επικοινωνία και το μεταβολικό συντονισμό τους μέσω ειδικών μορίων quorum-sensing (Watnick and Kolter 2002). Κατά το στάδιο αυτό (στάδιο ωρίμανσης της βιομεμβράνης) παρατηρείται αυξημένη παραγωγή εξωκυττάρων πολυσακχαριτών οι οποίοι, συνδυαζόμενοι με οργανικά και ανόργανα μόρια του άμεσου περιβάλλοντος, σχηματίζουν το γλυκοκάλυκα (Wilson 2001, Donlan 2002). Με την πάροδο του χρόνου, η βιομεμβράνη γίνεται πυκνότερη και πιο περίπλοκη με αποτέλεσμα την επιβράδυνση της εισόδου θρεπτικών συστατικών, την αναστολή του πολλαπλασιασμού και το θάνατο των μικροβιακών κυττάρων της κατώτερης στιβάδας. Παράλληλα, παρατηρείται συγκέντρωση τοξικών μικροβιακών μεταβολιτών. Ιδιαίτερη σημασία έχει το γεγονός ότι στο στάδιο της ώριμης βιομεμβράνης τα μικροβιακά κύτταρα εμφανίζουν υψηλού επιπέδου αντοχή στα περισσότερα αντιβιοτικά. Οι κυριότεροι λόγοι είναι α) η αδυναμία διείσδυσης του αντιβιοτικού μέσα από το πυκνό πλέγμα του γλυκοκάλυκα, β) η υψηλή συγκέντρωση ενζύμων που αδρανοποιούν τα αντιβιοτικά, γ) ο χαμηλός ρυθμός μεταβολισμού των μικροβίων ο οποίος μειώνει τη δραστικότητα αντιβακτηριακών όπως τα β-λακταμικά και δ) το όξινο pH και η μείωση της τάσης οξυγόνου, συνθήκες που δεν ευνοούν τη δράση διαφόρων αντιβιοτικών όπως οι αμινογλυκοσίδες (Poole 2012).

Το φαινόμενο της υψηλής αντοχής των μικροβίων στις βιομεμβράνες έχει ιδιαίτερη κλινική σημασία δεδομένου ότι περίπου το 65 % των λοιμώξεων στον άνθρωπο οφείλεται σε βακτήρια που εκδηλώνουν την παθογόνο δράση τους μέσω των βιομεμβρανών. Οι συχνότερες από τις λοιμώξεις στις οποίες εμπλέκονται βιομεμβράνες είναι οι παρακάτω:

α) Μέση πυώδης ωτίτιδα. Οφείλεται στη δημιουργία πολυμικροβιακών βιομεμβρανών. Τα παθογόνα που ανιχνεύονται συχνότερα είναι ο *Streptococcus pneumoniae*,

H. influenzae, *M. catarrhalis*, β-αιμολυτικοί στρεπτόκοκκοι, σταφυλόκοκκοι και *P. aeruginosa*.

β) Ενδοκαρδίτιδα φυσικών βαλβίδων. Η βιομεμβράνη σχηματίζεται στην επιφάνεια του ενδοθηλίου των βαλβίδων. Τα μικρόβια που ενέχονται στη λοίμωξη αυτή είναι κυρίως στρεπτόκοκκοι και σταφυλόκοκκοι.

γ) Χρόνια βακτηριακή προστατίτιδα. Οφείλεται στο σχηματισμό βιομεμβράνης κυρίως από *E. coli* και άλλα εντεροβακτηριοειδή.

δ) Λοιμώξεις σχετιζόμενες με βιοϊατρικά υλικά. Οι λοιμώξεις αυτές οφείλονται σε ποικιλία Gram θετικών και αρνητικών ειδών. Οι βιομεμβράνες σχηματίζονται στην επιφάνεια των πολυμερών υλικών που χρησιμοποιούνται για τη κατασκευή τεχνητών βαλβίδων, καθετήρων, τεχνητών αρθρώσεων, φακών επαφής κ.λ.π. (Donlan and Costerton 2002).

ε) Λοίμωξη του αναπνευστικού σε ασθενείς με κυστική ίνωση. Πρόκειται για χρόνια λοίμωξη οφειλόμενη στην εγκατάσταση βιομεμβρανών *P. aeruginosa* στο επιθήλιο του κατώτερου αναπνευστικού.

5.1. Βιομεμβράνες στο γένος *Yersinia*

Μεταξύ των υερσινιών, συγκρότηση μικροβιακής βιομεμβράνης με έμμεση κλινική σημασία έχει μέχρι σήμερα αποδειχθεί μόνο στο είδος *Y. pestis*.

Η *Y. pestis* είναι το αίτιο της πανώλης, νόσου με πολύ υψηλή θνητότητα. Η πανώλη εμφανίζεται με τρεις μορφές: τη βουβωνική (ή αδενική), την πνευμονική και τη σηψαιμική μορφή. Από τους δύο επιδημιολογικούς τύπους, την «αστική» πανώλη και τη πανώλη των δασών, ο πρώτος έχει πρακτικά εξαφανιστεί ενώ ο δεύτερος διατηρείται με τη μορφή επιζωοτίας κυρίως μεταξύ των τρωκτικών και περιστασιακά προσβάλλει ανθρώπους μετά από επαφή με μολυσμένα ζώα. Η μεταφορά στον άνθρωπο από νοσούντες ποντικούς ή άλλα τρωκτικά γίνεται μέσω δύο ειδών ψύλλων: α) τον *Xenopsylla cheopis* και β) τον *Ceratophyllus fasciatus*. Ο ψύλλος αναρροφά το μολυσμένο αίμα από το πάσχον ζώο και το εγκαταλείπει όταν αυτό πεθάνει. Η *Y. pestis* πολλαπλασιάζεται μέσα στο πεπτικό σύστημα του ψύλλου και με αναγωγή ενοφθαλμίζεται σε ένα νέο ξενιστή, συνήθως ένα άλλο τρωκτικό και σπάνια στον άνθρωπο.

Η δυνατότητα μετάδοσης της *Y. pestis* από τα αρθρόποδα-φορείς εξαρτάται από την παρουσία πυκνών συσσωματώσεων του μικροοργανισμού στην προκοιλιακή βαλβίδα του πεπτικού συστήματος του εντόμου και την απόφραξη της (Hinnebusch et al. 1996, Jarrett et al. 2004). Αυτό επιτυγχάνεται με την δημιουργία μικροβιακής βιομεμβράνης στη συγκεκριμένη ανατομική θέση. Η σύσταση του γλυκοκάλυκα είναι παρόμοια με αυτή που παρατηρείται στις βιομεμβράνες που σχηματίζουν τα κολοβακτηρίδια (πολυμερές της 1,6-N-

ακετυλ-D-γλυκοζαμίνης) (Wang et al. 2004, Itoh et al. 2005, Bobrov et al. 2008). Στη δημιουργία βιομεμβράνης από την *Y. pestis* εμπλέκονται συνολικά 6 *hms* (hemin storage) γονίδια: *hmsH*, *hmsF*, *hmsR*, *hmsS*, *hmsT* και *hmsP*. Τα τέσσερα πρώτα γονίδια συγκροτούν ένα πολυσιστρονικό οπερόνιο (*hmsHFRS*). Από τα προϊόντα των αντίστοιχων γονιδίων, οι HmsH και HmsF είναι πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης με δράση απακετυλάσης ενώ οι πρωτεΐνες HmsR και HmsS βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και δρουν ως γλυκοσυλ-τρανσφεράσες. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι υπεύθυνες για την παραγωγή του πολυμερούς του γλυκοκάλυκα (Fetherston et al. 1992, Lillard et al. 1997, Perry et al. 2004). Τα προϊόντα των γονιδίων *hmsT* και *hmsP* (HmsT και HmsP) είναι πρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης με ενζυμική δράση κυκλάσης και φωσφοδιεστεράσης, αντίστοιχα. Τα ένζυμα αυτά ρυθμίζουν την παραγωγή της βιομεμβράνης (Kirillina et al. 2004, Bobrov et al. 2005, Simm et al. 2005).

Η ικανότητα δημιουργίας βιομεμβρανών από τα άλλα είδη του γένους *Yersinia* δεν έχει μελετηθεί συστηματικά αν και υπάρχουν ενδείξεις, βασισμένες σε πειράματα σε περιορισμένο αριθμό στελεχών, ότι τα είδη *Y. enterocolitica* και *Y. pseudotuberculosis* μπορούν υπό ειδικές συνθήκες να συγκροτούν βιομεμβράνες σε μη έμβιες επιφάνειες. Μέρος της παρούσας μελέτης ήταν η φαινοτυπική διερεύνηση της δυνατότητας του είδους *Y. enterocolitica* να παράγει βιομεμβράνη υπό ελεγχόμενες *in vitro* συνθήκες καθώς και οι αξιολόγηση των σχετικών πειραματικών μεθοδολογιών.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν :

1. Η συλλογή αντιπροσωπευτικού δείγματος στελεχών *Yersinia enterocolitica* από ασθενείς με υερσινίωση κατά την περίοδο 2006-2011
2. Η τυποποίηση των στελεχών με συμβατικές (οροτυπία – βιοτυπία) και μοριακές μεθόδους (PFGE)
3. Ο προσδιορισμός των φαινοτύπων αντοχής στα αντιβιοτικά
4. Η ανίχνευση του πλασμιδίου παθογένειας pYV καθώς και πλασμιδιακών και χρωμοσωματικών γονιδίων που σχετίζονται με τη λοιμογόνο δράση του μικροοργανισμού
5. Η διερεύνηση της ικανότητας των στελεχών να συγκροτούν βιομεμβράνη (biofilm) υπό ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες.
6. Η αξιολόγηση της επίδρασης της βιομεμβράνης στην ευαισθησία των στελεχών στους αντιμικροβιακούς παράγοντες.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Σύντομη έκθεση της πειραματικής πορείας

- Καλλιέργεια και απομόνωση στελεχών *Y. enterocolitica* από κόπρανα ή/και αίμα θαλασσαιμικών κυρίως παιδιών.
- Ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους με εξέταση των καλλιεργητικών χαρακτηριστικών και των βιοχημικών ιδιοτήτων των στελεχών.
- Προσδιορισμός οροτύπων με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμων αντιορών.
- Προσδιορισμός βιοτύπων με τις κατάλληλες βιοχημικές δοκιμασίες.
- Προσδιορισμός της ευαισθησίας των στελεχών σε ευρύ φάσμα αντιμικροβιακών παραγόντων.
- Φαινοτυπικός έλεγχος της εξάρτησης των στελεχών *Y. enterocolitica* από ασβέστιο.
- Έλεγχος παραγωγής της πρωτεΐνης YadA.
- Μοριακή τυποποίηση των στελεχών με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE) μετά από πέψη του γενομικού DNA με την ενδονουκλεάση XbaI.
- Απομόνωση και χαρακτηρισμός πλασμιδιακού DNA.
- Ανίχνευση γονιδίων σχετιζόμενων με τη λοιμογόνο ικανότητα της *Y. enterocolitica* με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)
- Ποιοτική και ποσοτική διερεύνηση της ικανότητας των στελεχών *Y. enterocolitica* να σχηματίζουν βιομεμβράνες.
- Ανίχνευση του γονιδίου waaE, σχετιζόμενο με την ικανότητα της *Y. enterocolitica* να σχηματίζει βιομεμβράνη, με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)
- Προσδιορισμός των επιπέδων ευαισθησίας στους αντιμικροβιακούς παράγοντες παρουσία βιομεμβράνης.

2.2. Σύλλογή κλινικών στελεχών - Ασθενείς

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε συλλογή 60 στελεχών *Y. enterocolitica* ή πλειονότητα των οποίων προερχόταν από θαλασσαιμικά κυρίως παιδιά με γαστρεντερίτιδα ή/και σηψαιμία (εύρος ηλικιών 6 μηνών - 3 ετών). Τα στελέχη προέρχονταν από το Θριάσιο Γενικό Νοσοκομείο Ελευσίνας και απομονώθηκαν κατά τη χρονική περίοδο 2006-2011. Το

συχνότερο κλινικό υλικό απομόνωσης ήταν τα κόπρανα (N=46). Από καλλιέργειες αίματος απομονώθηκαν 11 στελέχη. Σε τρεις περιπτώσεις, ο μικροοργανισμός απομονώθηκε από τα κόπρανα και το αίμα των ασθενών.

Τα παραπάνω δεδομένα αναφέρονται αναλυτικά στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8. Προέλευση των 60 κλινικών στελεχών *Y. enterocolitica* που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.

A/A	Κωδικός στελέχους	Υποκείμενο νόσημα	Κλινικό υλικό
1	4	Θαλασσαιμία	Κόπρανα
2	47	Θαλασσαιμία	Κόπρανα
3	6	Θαλασσαιμία	Κόπρανα
4	43	Θαλασσαιμία	Αίμα
5	36	Θαλασσαιμία	Αίμα
6	19	Θαλασσαιμία	Κόπρανα
7	70	Θαλασσαιμία	Κόπρανα
8	2	Θαλασσαιμία	Κόπρανα
9	9	Θαλασσαιμία	Κόπρανα
10	21	Θαλασσαιμία	Αίμα
11	24	Θαλασσαιμία	Κόπρανα
12	8	Θαλασσαιμία	Κόπρανα
13	52	Θαλασσαιμία	Κόπρανα
14	14	- ^α	Κόπρανα
15	16	-	Κόπρανα
16	13	-	Κόπρανα
17	20	-	Κόπρανα
18	71	Θαλασσαιμία	Αίμα
19	25	Θαλασσαιμία	Κόπρανα
20	11	Θαλασσαιμία	Κόπρανα
21	29	-	Κόπρανα
22	7	Θαλασσαιμία	Κόπρανα
23	37	-	Αίμα
24	30	-	Κόπρανα
25	72	-	Αίμα
26	26	Θαλασσαιμία	Κόπρανα
27	63	Θαλασσαιμία	Κόπρανα

Πίνακας 8. Προέλευση των 60 κλινικών στελεχών *Y. enterocolitica* που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη. (συνέχεια)

A/A	Κωδικός στελέχους	Υποκείμενο νόσημα	Κλινικό υλικό
28	46	-	κόπρανα
29	56	-	κόπρανα
30	27	Θαλασσαιμία	κόπρανα
31	34	Θαλασσαιμία	κόπρανα
32	17	Θαλασσαιμία	κόπρανα
33	28	-	κόπρανα
34	50	-	κόπρανα
35	49	-	κόπρανα
36	42	-	κόπρανα
37	62	Θαλασσαιμία	κόπρανα
38	22	Θαλασσαιμία	αίμα
39	10	Θαλασσαιμία	κόπρανα
40	48	-	κόπρανα
41	53	-	κόπρανα
42	44	-	κόπρανα
43	55	Θαλασσαιμία	κόπρανα
44	54	-	κόπρανα
45	31	Θαλασσαιμία	αίμα
46	35	Θαλασσαιμία	αίμα/κόπρανα
47	15	Θαλασσαιμία	κόπρανα
48	58	-	κόπρανα
49	33	Θαλασσαιμία	αίμα
50	73	Θαλασσαιμία	κόπρανα
51	32	-	αίμα
52	3	Θαλασσαιμία	κόπρανα
53	60	Θαλασσαιμία	κόπρανα
54	18	Θαλασσαιμία	κόπρανα
55	74	Θαλασσαιμία	αίμα
56	75	Θαλασσαιμία	κόπρανα
57	5	Θαλασσαιμία	αίμα/κόπρανα
58	1	Θαλασσαιμία	αίμα/κόπρανα
59	23	Ελλειψη G6PD	κόπρανα
60	76	-	κόπρανα

^a Δεν αναφέρεται.

2.3. Καλλιέργεια και απομόνωση στελεχών *Y. enterocolitica*

Τα δείγματα κοπράνων καλλιεργούνται άμεσα σε Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin (CIN) άγαρ (Oxoid Ltd.), σε SS άγαρ, καθώς και σε MacConkey άγαρ No. 3 (Oxoid Ltd.). Παράλληλα, μέρος από κάθε δείγμα, ενοφθαλμίστηκε σε ζυμό σεληνίτη, επώαστηκε για 18 ώρες στους 37°C και στη συνέχεια έγινε ανακαλλιέργεια σε SS άγαρ.

Σε περιπτώσεις θετικής αιμοκαλλιέργειας (BACTEC) ποσότητα του θετικού καλλιεργήματος εξεταζόταν όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Μετά από επώαση 48 ωρών οι αποικίες με χαρακτηριστική μορφολογία (μικρές, στρογγυλές, επίπεδες και διαφανείς στο άγαρ MacConkey – μικρές, στρογγυλές με κόκκινο κέντρο στο άγαρ CIN (βλ. Εικόνες 2A και 2B, αντιστοίχως) ελέγχονταν με τις προκαταρκτικές βιοχημικές δοκιμές για τη διάκριση του γένους *Yersinia*. Σ' αυτές περιλαμβάνονταν: δοκιμή καταλάσης (θετική), δοκιμή οξειδάσης (αρνητική), ζύμωση λακτόζης [Kligler] (αρνητική), ζύμωση γλυκόζης [Kligler] (θετική), παραγωγή αερίου από γλυκόζη [Kligler] (αρνητική), παραγωγή H₂S [Kligler] (αρνητική), διάσπαση ουρίας (θετική), απαμίνωση Phe (αρνητική), υδρόλυση ONPG (θετική), κινητικότητα στους 22° C (θετική) και κινητικότητα στους 37° C (αρνητική) (Κούρτη και συν. 1984). Ακολουθούσε η πλήρης βιοχημική ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους.

2.4. Ταυτοποίηση

2.4.1. Βιοχημική ταυτοποίηση

Η ταυτοποίηση των στελεχών έγινε με το σύστημα API20E (BioMerieux,SA,France), το οποίο προσδιορίζει το είδος του κάθε στελέχους με βάση τις βιοχημικές του ιδιότητες. Το σύστημα API20E περιλαμβάνει 20 βιοχημικές δοκιμασίες. Τα αντιδραστήρια, τα οποία βρίσκονται αφυδατωμένα, εμβολιάζονται με εναιώρημα κυττάρων του υπό εξέταση μικροοργανισμού. Οι μικροκαλλιέργειες επωάζονται στους 37°C για 16 ώρες και στη συνέχεια γίνεται παρατήρηση και καταγραφή της αλλαγής του χρώματος. Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων (θετικές ή αρνητικές χρωμογόνες αντιδράσεις) και η τελική ταυτοποίηση του βακτηριακού είδους έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας (BioMerieux,SA,France) με βάση τον αλγόριθμο που παρέχει.

Μετά την πλήρη βιοχημική ταυτοποίηση, πυκνά εναιωρήματα του κάθε στελέχους σε 50 % γλυκερόλη (ο/ο) φυλάσσονταν σε βαθιά κατάψυξη (-70° C).

2.4.2. Μοριακή ταυτοποίηση με τη μέθοδο του 16S rDNA

Πρόκειται για τη μέθοδο αναφοράς για την ταυτοποίηση των προκαρυωτικών οργανισμών. Για τη μοριακή ταυτοποίηση των στελεχών *Y. enterocolitica* έγινε πολλαπλασιασμός (amplification) με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) τμήματος του *16S rDNA* χρωμοσωματικού γονιδίου μεγέθους 330 bp όπως περιγράφηκε από τους Lantz και συν. (1998).

Το χρωμοσωματικό DNA που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα απομονώθηκε από καθαρά καλλιεργήματα χρησιμοποιώντας το Instagene Matrix (BioRad Laboratories) (βλ. περιγραφή της μεθόδου στο κεφάλαιο 2.11). Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές (primers) Ye1 (5'-AATACCGCATAACGTCTTCG-3') και Ye2 (5'-CTTCTTCTGCGAGTAACGTC-3') (Sigma Genosys).

Τα αντιδραστήρια και οι συνθήκες πολλαπλασιασμού με PCR περιγράφονται στον Πίνακα 9.

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 2 % (β/ο). Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE (1X) που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο. Αρχικά, εφαρμόστηκε τάση 50 Volts για 10 min. Ακολούθως η τάση αυξήθηκε στα 80 Volts και η ηλεκτροφορηση συνεχίστηκε για 2 ώρες. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα εκτέθηκε σε UV και φωτογραφήθηκε.

Πίνακας 9. Αντιδραστήρια και συνθήκες PCR για την ανίχνευση του γονιδίου *16S rDNA*.

ANAMENOMENO ΠΡΟΪΟΝ:		
Τμήμα του γονιδίου <i>16S rDNA</i> μήκους 330 bp		
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ		
H ₂ O (σε τελικό όγκο 50 μl)		33,6 μl
Buffer 10X		5 μl
MgCl ₂ (25 mM)		3 μl
dNTPs (10 mM το καθένα)		1 μl
Εκκινητής A: 25 pmol		1 μl
Εκκινητής B: 25 pmol		1 μl
Taq Polymerase 5U/μl		0,4 μl
Χρωμοσωματικό DNA (200-300 ng)		5 μl
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΚΥΚΛΟΠΟΙΗΤΗ		
1	93°C για 2 min	1 κύκλος
2	93°C για 1 min	30 κύκλοι
	57°C για 1,5 min	
	72°C για 1 min	
3	72°C για 5 min	1 κύκλος
4	4°C για ∞	

2.5. Οροτυπία

Οι ορότυποι των στελεχών *Y. enterocolitica* προσδιορίστηκαν με αντίδραση συγκόλλησης των βακτηριακών κυττάρων με ειδικούς αντιορούς. Χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμοι αντιοροί ειδικοί για τους οροτύπους O:3 και O:9 (Diagnostics Pasteur, Marnes la Coquette, France) οι οποίοι θεωρούνται οι πλέον συχνοί στις περισσότερες Ευρωπαϊκές χώρες περιλαμβανόμενης και της Ελλάδας (Kygiazi et al. 2000).

Η διαδικασία είχε ως εξής:

-Παρασκευή εναιωρήματος βακτηριακών κυττάρων (4 – 5 αποικίες από καθαρό καλλιέργημα) σε 0.5 ml φυσιολογικού ορού (ατιγονικό εναιώρημα).

-Τοποθέτηση 30 μl αντιορού σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Προσθήκη αντιγονικού εναιωρήματος (5-10 μl) και ήπια ανάδευση.

- Η αντίδραση θεωρείται θετική σε περίπτωση σχηματισμού ορατών σωματιδίων συγκόλλησης εντός 1 min.

2.6. Βιοτυπία

Ο προσδιορισμός των βιοτύπων των στελεχών *Y. enterocolitica* έγινε σύμφωνα με το αναθεωρημένο σχήμα βιοτυπίας που προτάθηκε από τους Wauters και συν. (1987). Οι δοκιμασίες που περιλαμβάνονται στο σχήμα Wauters όπως περιγράφεται στον Πίνακα 2 του Γενικού Μέρους.

2.7. Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

Ο έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά στο σύνολο των υπό μελέτη στελεχών έγινε με δύο μεθόδους: (α) με αντιβιογράμματα κατά Kirby-Bauer και (β) με προσδιορισμό των ελάχιστων ανασταλτικών συγκεντρώσεων (MIC) των αντιβιοτικών με τη μέθοδο των μικροαραιώσεων σε ζωμό, σύμφωνα με το CLSI.

2.7.1. Αντιβιογράμμα

Η μέθοδος ελέγχου του φαινοτύπου αντοχής με αντιβιογράμμα χρησιμοποιήθηκε για όλα τα κλινικά στελέχη. Βακτηριακό εναιώρημα θολερότητας 0,5 της κλίμακας McFarland σε φυσιολογικό ορό επιστρώθηκε στην επιφάνεια στεγνού τρυβλίου Mueller Hinton άγαρ (Oxoid Ltd.). Κατόπιν, με τη βοήθεια διανομέα, τοποθετήθηκαν οι δίσκοι αντιβιοτικών (BioRad Laboratories). Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37°C για περίπου 18 ώρες (CLSI,

2009a). Τα στελέχη χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικά, μετρίως ανθεκτικά ή ευαίσθητα με κριτήριο τη διάμετρο της άλω αναστολής της ανάπτυξης του βακτηρίου γύρω από τον αντίστοιχο δίσκο, βάσει πρότυπων πινάκων που ισχύουν διεθνώς για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της μεθόδου (CLSI, 2009b). Για τον ποιοτικό έλεγχο των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο στέλεχος *Escehrichia coli* ATCC 25922.

Οι δίσκοι αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν και η περιεκτικότητα σε δραστική ουσία αναφέρονται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10. Δίσκοι αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.

β-Λακταμικά αντιβιοτικά	Περιεκτικότητα δίσκου
Κεφαζιδίμη (CAZ)	30 µg
Κεφεπίμη (FEP)	30 µg
Αμοξικιλίνη/ Κλαβουλανικό οξύ (AMC)	20/10 µg
Αζτρεονάμη (ATM)	30 µg
Ιμιπενέμη (IMP)	10 µg
Κεφοταξίμη (CTX)	30 µg
Κεφαλοθίνη (CEF)	30 µg
Αμπικιλίνη (AM)	10 µg

Αμινογλυκοσίδες-Αμινογλυκιτόλες	Περιεκτικότητα δίσκου
Γενταμικίνη (GM)	10 µg
Τομπραμικίνη (TM)	10 µg
Νετιλμικίνη (NET)	30 µg
Αμικασίνη (AN)	30 µg

Άλλα αντιβιοτικά	Περιεκτικότητα δίσκου
Σιπροφλοξακίνη (CIP)	5 µg
Κοτριμοξαζόλη	200 µg
Χλωραμφαινικόλη (C)	30 µg

2.7.2. Προσδιορισμός MIC με τη μέθοδο των μικροαραιώσεων

Οι τιμές MIC για τα αντιβιοτικά Αμικασίνη, Νετιλμικίνη, Γενταμικίνη, Κοτριμοξαζόλη, Κεφταζιδίμη, Κεφοταξίμη, Κεφεπίμη, Αζτρεονάμη, Σιπροφλοξακίνη προσδιορίστηκαν επίσης με τη μέθοδο των μικροαραιώσεων σε ζωμό (CLSI 2009b). Χρησιμοποιήθηκαν ειδικές πλάκες πολυστυρενίου με βυθίσματα σχήματος U. Το κάθε βύθισμα περιείχε εναιώρημα κυττάρων ($5 \times 10^5 - 10^6$ CFU/ml) του υπό εξέταση στελέχους *Y. enterocolitica* σε ζωμό Mueller-Hinton (Oxoid Ltd.) και την κατάλληλη συγκέντρωση αντιβιοτικού.

Ως ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση ορίστηκε η μικρότερη συγκέντρωση αντιβιοτικού που ανέστειλε την ορατή ανάπτυξη του μικροοργανισμού μετά από 18ωρη αερόβια επώαση στους 37°C. Για τον ποιοτικό έλεγχο των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο στέλεχος *Escherichia coli* ATCC 25922.

2.8. Αξιολόγηση φαινοτυπικών χαρακτηριστικών σχετιζόμενων με τη λοιμογόνο ικανότητα της *Y. enterocolitica*

Η έκφραση διάφορων λοιμογόνων παραγόντων, τα αντίστοιχα γονίδια των οποίων φέρονται από το πλασμίδιο pYV, εξαρτάται από ποικιλία περιβαλλοντικών παραγόντων μεταξύ των οποίων η θερμοκρασία και η συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου είναι από τους σημαντικότερους. Η επαγωγή της έκφρασης των πλασμιδιακά καθοριζόμενων λοιμογόνων παραγόντων λόγω αυξημένης θερμοκρασίας ή/και χαμηλής συγκέντρωσης ασβεστίου συνοδεύεται από αλλαγές στη μορφολογία και τη φυσιολογία των κυττάρων της *Y. enterocolitica* (Bhaduri and Smith 2011). Μεταξύ των αλλαγών αυτών περιλαμβάνεται η αύξηση του ρυθμού πρόσληψης οργανικών χρωστικών όπως του κρυσταλλικού ιώδους (Crystal Violet) και του ερυθρού του Κογκό (Congo Red) καθώς και η διαφορετική μορφολογία των αποικιών. Οι αλλαγές αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση των λοιμογόνων στελεχών *Y. enterocolitica* που φέρουν το πλασμίδιο pYV.

Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η καλλιέργεια σε Brain Heart Infusion Magnesium-Oxalate (BHIMOX) άγαρ.

2.8.1. Καλλιέργεια σε BHIMOX άγαρ

Η καλλιέργεια στο BHIMOX άγαρ στους 37°C και η ανάγνωση των αποτελεσμάτων έγιναν όπως έχει περιγραφεί από τους Pripic και συν. (1985).

2.9. Μοριακή τυποποίηση στελεχών *Yersinia enterocolitica* με ηλεκτροφόρηση θραυσμάτων DNA σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE)

Η κλασική ηλεκτροφόρηση τμημάτων γενωμικού DNA σε αгарόζη είναι αποτελεσματική για το διαχωρισμό τμημάτων με εύρος μοριακού βάρους 50 - 100 kb. Η ηλεκτροφόρηση παλλόμενου πεδίου (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE) δίνει τη δυνατότητα να συγκριθούν λιγότερα και μεγαλύτερα τμήματα DNA. Στη μεθοδολογία αυτή χρησιμοποιούνται περιοριστικά ένζυμα για την πέψη του χρωμοσωματικού DNA, οι θέσεις αναγνώρισης των οποίων στα βακτηριακά χρωμοσώματα είναι σπάνιες (rare cutters). Έτσι παράγεται μικρός αριθμός τμημάτων DNA μεγάλου μοριακού μεγέθους (συνήθως λιγότερα από 30). Ο διαχωρισμός τέτοιων μεγάλων τμημάτων DNA σε αгарόζη είναι δυνατός μόνο με την ηλεκτροφόρηση παλλόμενου πεδίου (το πεδίο μεταβάλλεται κατά τη διεύθυνσή του). Για την ηλεκτροφόρηση PFGE υπάρχουν διάφορες τεχνικές. Στην παρούσα μελέτη η ηλεκτροφόρηση ομοιογενούς ηλεκτρικού πεδίου (Contour-clamped homogenous electric field electrophoresis – CHEF) όπως περιγράφηκε αρχικά από τους Chu και συν. (1986). Η χρήση της μεθόδου PFGE πλεονεκτεί ως μέθοδος τυποποίησης βακτηρίων λόγω του ότι προσφέρει επαναληψιμότητα και ευκρινή σχήματα περιορισμού με καλά διαχωρισμένα τμήματα DNA που αντιπροσωπεύουν το σύνολο του βακτηριακού χρωμοσώματος.

Απομόνωση χρωμοσωματικού DNA

Γιά την απομόνωση χρωμοσωματικού DNA από τα στελέχη *Y. enterocolitica* κατάλληλου για τυποποίηση με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που προτάθηκε από τους Buchrieser και συν. (1994).

Ενσωμάτωση βακτηριακών κυττάρων σε αгарόζη

Φυγοκέντρηση 2,5ml των δειγμάτων σε υπερφυγόκεντρο Sorvall, στις 5000rpm για 20 min στους 4°C.

- Παρασκευή βακτηριακού ελαιώματος σε παγωμένο ρυθμιστικό διάλυμα SE θολερότητας ίσης με το 9 της κλίμακας McFarland, που παρασκευάστηκε ως εξής:
 - 75mM NaCl
 - 25mM EDTA
 - Ρύθμιση του pH στο 7,5
- Δύο εκπλύσεις των ιζημάτων σε ίσο όγκο παγωμένου διαλύματος SE.

- Φυγοκέντρωση στις παραπάνω συνθήκες.
- Αναδιάλυση των ιζημάτων σε 500μl παγωμένου διαλύματος SE.
- Φυγοκέντρωση.
- Αναδιάλυση των ιζημάτων σε 300μl παγωμένου διαλύματος EC που παρασκευάστηκε ως εξής:
 - 6mM Tris/HCl
 - 1M NaCl
 - 100mM EDTA
 - 0,5% Brij58 (Sigma P5884)
 - 0,2% Sodium deoxycholate (Sigma D6750)
 - 0,5% N-lauroyl sarcosine (sarcosyl)
 - Ρύθμιση του pH στο 7,5
 - Αποστείρωση με διήθηση (0,25mm pore filters)
- Προετοιμασία αгарόζης 2% Low Melting Temperature (LMT) με βρασμό σε διάλυμα EC.
- Παρασκευή μείγματος που περιείχε:
 - 15μl λυσοζύμη (25mg/ml)
 - 350μl 2% LMT αгарόζη
 - 150μl βακτηριακού εναιωρήματος σε ρυθμιστικό διάλυμα EC
- Παρασκευή πλακιδίων του παραπάνω μείγματος σε πλαστικά εκμαγεία όγκου περίπου 100μl.
- Επώαση για 10 min στους 4°C.

Λύση βακτηριακών κυττάρων

- Έκπλυση των πλακιδίων στους 37°C για μία ώρα σε 500μl διαλύματος EC για αποδιάταξη του κυτταρικού τοιχώματος.
- Επώαση για 10 min στους 4°C.
- Αντικατάσταση του ρυθμιστικού διαλύματος EC και έκπλυση των πλακιδίων με διάλυμα 0,5M EDTA (pH 9,0).
- Αφαίρεση του διαλύματος EDTA και προσθήκη 500 μl διαλύματος ESP με 500 μg/ml πρωτεΐνάση K που παρασκευάστηκε ως εξής:
 - 0,5M EDTA pH: 9,0-9,5

- 1% Sarcosyl (Sodium lauryl sarcosinate)
- Αποστείρωση (διήθηση με μικροβιοκρατές φίλτρο)
- Αναδιάλυση πρωτεΐνης K σε συγκέντρωση 20 mg/ml σε 1% Sarcosyl και παρασκευή διαλυμάτων συγκέντρωσης 1 mg/ml προς χρήση σε σωληνάρια τύπου erpendorff.
- Αποθήκευση διαλυμάτων πρωτεΐνης K στους -20°C.

Επώαση για 18 ώρες στους 55°C για την ολοκληρωτική πέψη των κυτταρικών πρωτεϊνών.

Πέψη του ενσωματωμένου στη αγαρόζη χρωμοσωματικού DNA με την περιοριστική ενδονουκλεάση XbaI

- Επώαση πλακιδίων για 10 min στους 4°C.
- Αφαίρεση του διαλύματος ESP/πρωτεΐνης K και διαδοχικές εκπλύσεις (τουλάχιστον έξι) των πλακιδίων σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min σε 850 μl διαλύματος TE που παρασκευάστηκε ως εξής:
 - 1mM EDTA
 - 10mM Tris/HCl
 - Ρύθμιση του pH: 7,6.
- Πέψη του DNA με την περιοριστική ενδονουκλεάση XbaI (United States Biochemicals) σε συγκέντρωση 0.04 μονάδων/μl. Το μείγμα περιείχε:
 - 12.5 μl 10X ρυθμιστικού διαλύματος πέψης
 - 2μl XbaI (10 μονάδες)
 - 111 μl αποστειρωμένο H₂O
- Επώαση για 18 ώρες στους 37°C για την ολοκληρωτική πέψη του DNA.

Ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο

Επώαση πλακιδίων για 10 min στους 4°C.

- Αφαίρεση του διαλύματος πέψης και διαδοχικές εκπλύσεις (τουλάχιστον έξι) των πλακιδίων σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min σε 850μl διαλύματος TE.
- Έκπλυση πλακιδίων σε 1000μl διαλύματος TBE 0,5X που παρασκευάστηκε ως εξής:
Για 1 λίτρο διαλύματος 10X:

- 108gr Tris
 - 55gr βορικό οξύ
 - 40ml 0,5M EDTA (pH 8,0)
 - Πλήρωση του όγκου στο 1 λίτρο με απεσταγμένο νερό
- Προετοιμασία 100ml αγαρόζης 1% (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad Laboratories) σε 0,5X διαλύματος TBE.
 - Κατασκευή πηκτώματος αγαρόζης σε κατάλληλο εκμαγείο και ενσωμάτωση τμήματος πλακιδίου αγαρόζης μήκους 0.3mm για το κάθε δείγμα.
 - Ως μάρτυρας ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε ο lambda ladder PFGE marker (CHEF DNA size standard, BioRad Laboratories).
 - Σφράγισμα πηκτώματος LMT αγαρόζης με 1% σε 0.5X ρυθμιστικού διαλύματος TBE
 - Ηλεκτροφόρηση σε 2L 0,5X διαλύματος TBE με τη χρήση της συσκευής CHEF-DRIII (BioRad Laboratories) στις ακόλουθες συνθήκες:
 - 6V/cm
 - Initial Pulse: 5 sec
 - Final Pulse: 15sec
 - Run Time: 18 hrs
 - Angle: 120°
- Το πήκτωμα της αγαρόζης εμβαπτίστηκε σε βρωμιούχο αιθίδιο (1 µg/ml) για 30-45 min.
 - Έγινε αποχρωματισμός του με απεσταγμένο νερό για 30-45min.
 - Το πήκτωμα της αγαρόζης φωτογραφήθηκε σε υπεριώδες φως (Chemi-Doc, BioRad Laboratories).

2.10. Χαρακτηρισμός πλασμιδιακού DNA

2.10.1. Καθαρισμός του πλασμιδίου pYV

Για τη διευκόλυνση της ανίχνευσης και ταυτοποίησης με μοριακές τεχνικές των πλασμιδιακών γονιδίων που σχετίζονται με τη λοιμογόνο ικανότητα, κρίθηκε σκόπιμος ο καθαρισμός του πλασμιδίου pYV.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο UltraClean Mini Plasmid Prep Kit (MO-BIO Laboratories Ltd.).

ΥΛΙΚΑ

- Διάλυμα 1: Ρυθμιστικό διάλυμα εναιώρησης (Tris, EDTA, RNase A).
- Διάλυμα 2: Διάλυμα κυτταρικής λύσης (SDS, NaOH).
- Διάλυμα 3: Ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης (Οξικό Κάλιο).
- Διάλυμα 4: Διάλυμα έκπλυσης (Αιθανόλη, Tris, NaCl).
- Διάλυμα 5: Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (10 mM Tris-HCl).
- Μικροστήλες των 2 ml με φίλτρο ρητίνης.
- Μικροφυγόκεντρος.
- Αναδευτήρας Vortex.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

-Χρησιμοποιήθηκαν 2 σωληνάρια eppendorf και μία μικροστήλη ρητίνης για κάθε στέλεχος.

-Προσθήκη 500 μλ δισαπεσταγμένου νερού και 200 μλ βακτηριακού εναιωρήματος (πυκνότητα 6 -7 της κλίμακας McFarland) σε σωληνάριο eppendorf.

-Φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 2 min.

-Απομάκρυνση του υπερκειμένου υγρού.

-Επανάληψη της διαδικασίας φυγοκέντρησης και απομάκρυνσης του υπερκειμένου.

-Επαναιώρηση του ιζήματος των βακτηριακών κυττάρων σε 50 μλ του Διαλύματος 1. Ισχυρή ανάδευση για 1 min.

-Προσθήκη 100 μλ του Διαλύματος 2 και ήπια ανάδευση (Κυτταρική λύση και αποδιάταξη του χρωμοσωματικού και πλασμιδιακού DNA. Ταυτόχρονη υδρόλυση του RNA).

-Προσθήκη 325 μλ Διαλύματος 3. Πρόκειται για διάλυμα εξουδετέρωσης του αλκαλικού pH. Η προσθήκη του έχει ως αποτέλεσμα την επαναφορά του πλασμιδιακού DNA στην υπερελικωμένη μορφή του. Αντίθετα, το μεγάλο μήκος του χρωμοσωματικού DNA δεν επιτρέπει την επαρκή επαναδιάταξή του. Επίσης, η προσθήκη αλάτων έχει ως αποτέλεσμα

την αύξηση του συντελεστή διαλυτότητας του πλασμιδιακού DNA στο νερό ενώ τα αποδιαταγμένα χρωμοσωματικά τμήματα DNA και οι πρωτεΐνες κατακρημνίζονται.

-Φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 2 min. Αν δεν σχηματιστεί συμπαγές ίζημα, η διαδικασία επαναλαμβάνεται.

-Εφαρμογή του υπερκλειμένου υγρού που περιέχει πλασμιδιακό DNA σε μικροστήλη με φίλτρο ρητίνης.

-Φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 1 min. Το πλασμιδιακό DNA δεσμεύεται στη ρητίνη ενώ οι υπόλοιπες προσμίξεις απομακρύνονται από το σωληνάριο.

-Προσθήκη 300 μλ από το Διάλυμα 4. Η αιθανόλη που περιέχεται στο διάλυμα 4, ενώ δεν επηρεάζει το δεσμευμένο DNA, ολοκληρώνει τον καθαρισμό απομακρύνοντας τις προσμίξεις που έχουν απομείνει από το προηγούμενο στάδιο.

-Φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 1 min.

-Απομάκρυνση του υγρού και προσθήκη Διαλύματος 5. Η δραστική μείωση της συγκέντρωσης αλάτων που προκαλεί το τελευταίο διάλυμα έχει ως αποτέλεσμα την αποδέσμευση του πλασμιδιακού DNA από τη ρητίνη.

-Φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 1 min και συλλογή του καθαρού πλασμιδιακού DNA.

2.10.2. Ηλεκτροφόρηση πλασμιδιακού DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Χρησιμοποιήθηκε η αγαρόζη Molecular Biology Certified Agarose (BioRad Laboratories), με συγκέντρωση 0.8% σε διάλυμα TBE. Ηλεκτροφορήθηκαν 15 μl από κάθε δείγμα, σε τάση 30 Volts για 16 ώρες. Το πήκτωμα της αγαρόζης χρωματίστηκε με αιθίδιο του βρωμίου (1 μg/ml) και φωτογραφήθηκε σε υπεριώδες φως.

2.11. Απομόνωση χρωμοσωματικού DNA

Για την ανίχνευση και ταυτοποίηση του χρωμοσωματικού γονιδίου *yst* χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα βακτηριακό DNA που απομονώθηκε από τὰ κύτταρα *Y. enterocolitica* με τη μέθοδο του βρασμού και με τη χρήση του αντιδραστηρίου Instagene Matrix (6 % Polystyrene-di-vinylbenzene-iminodiacetate) (BioRad Laboratories). Η διαδικασία απομόνωσης είχε ως εξής:

- Παρασκευή πυκνών εναιωρημάτων βακτηριακών κυττάρων σε φυσιολογικό ορό.
- Μικροί σχετικά όγκοι εναιωρημάτων (150 – 200 μλ) μεταφέρονται σε σωληνάρια eppendorf των 2 ml.
- Φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 2 min και απόρριψη του υπερκειμένου υγρού (διαδικασία έκπλυσης βακτηριακών κυττάρων).
- Επαναίωση του κυτταρικού ιζήματος σε φυσιολογικό ορό και επανάληψη της διαδικασίας έκπλυσης (φυγοκέντρηση και απόρριψη του υπερκειμένου).
- Προσθήκη σε κάθε σωληνάριο 100 μl του αντιδραστηρίου Instagene Matrix και αναδευση με πιπέτα.
- Τοποθέτηση των σωληναρίων σε thermoblock ρυθμισμένο στους 56°C για 30 min (ανάδευση στο μέσον της περιόδου επώασης).
- Εντονη ανάδευση με χρήση vortex για τουλάχιστον 10 sec.
- Τοποθέτηση των σωληναρίων σε thermoblock ρυθμισμένο στους 100°C για 8 min.
- Εντονη ανάδευση με χρήση vortex για τουλάχιστον 10 sec.
- Φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 3 sec (διαδικασία spin down).
- Μεταφορά του υπερκειμένου που περιέχει το βακτηριακό DNA σε νέα σωληνάρια eppendorf και φύλαξη στους -20 °C.

2.12. Ανίχνευση των γονιδίων *yadA*, *virF* και *yst* με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για την πιστοποίηση της παρουσίας των πλασμιδιακών γονιδίων *yadA* και *virF* καθώς και του χρωμοσωματικού γονιδίου *yst* στα κλινικά στελέχη *Y. enterocolitica*, χρησιμοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι συνθήκες PCR για κάθε γονίδιο περιγράφονται στους Πίνακες 11, 12, 13 και 14.

Πίνακας 11. Εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των γονιδίων *yadA*, *virF* και *yst* με PCR.

Γονίδιο	Εκκινητής	Νουκλεοτιδική αλληλουχία	Χαρακτηριστικά εκκινητή
<i>yadA</i> ¹	YADA forward	5'CTTCAGATACTGGTGTCTGCTGT3'	MW = 6732 Tm = 63,2°C
	YADA reverse	5'ATGCCTTGACTAGAGCGATATCC3'	MW = 6719 Tm = 63,2°C
<i>virF</i> ¹	VIRF forward	5'GGCAGAACAGCAGTCAGACATA3'	MW = 6786 Tm = 64,3°C
	VIRF reverse	5'GGTGAGCATAGAGAATACGTCG3'	MW = 6848 Tm = 62,5°C
<i>yst</i> ²	YST-PR2a forward	5'AATGCTGTCTTCATTTGGAGC3'	MW = 6427 Tm = 63 °C
	YST-PR2a reverse	5'GCAACATACATCACAGCAATC3'	MW = 6532 Tm = 60,6 °C

¹ Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που προτάθηκαν από τους Thoenner και συν. (2003).

² Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που προτάθηκαν από τους Ibrahim και συν. (1992).

Πίνακας 12. Αντιδραστήρια και συνθήκες PCR για την ανίχνευση του γονιδίου *yadA* (Thoerner et al. 2003).

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟ ΠΡΟΪΟΝ:		
Τμήμα του γονιδίου <i>yadA</i> μήκους 849 bp		
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ		
H ₂ O (σε τελικό όγκο 50 μl)		33,6 μl
Buffer 10X		5 μl
MgCl ₂ (25 mM)		3 μl
dNTPs (10 mM το καθένα)		1 μl
Εκκινητής A: 20 pmol		1 μl
Εκκινητής B: 20 pmol		1 μl
Taq Polymerase 5U/μl		0,4 μl
Πλασμιδιακό DNA (200-300 ng)		5 μl
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΚΥΚΛΟΠΟΙΗΤΗ		
1	95°C για 5 min	1 κύκλος
2	95°C για 30 sec	30 κύκλοι
	59°C για 30sec	
	72°C για 30 sec	
3	72°C για 5 min	1 κύκλος
4	4°C για ∞	

Πίνακας 13. Αντιδραστήρια και συνθήκες PCR για την ανίχνευση του γονιδίου *virF* (Thoerner et al. 2003).

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟ ΠΡΟΪΟΝ:		
Τμήμα του γονιδίου <i>virF</i> μήκους 561 bp		
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ		
H ₂ O (σε τελικό όγκο 50 μl)		33,6 μl
Buffer 10X		5 μl
MgCl ₂ (25 mM)		3 μl
dNTPs (10 mM το καθένα)		1 μl
Εκκινητής A: 20 pmol		1 μl
Εκκινητής B: 20 pmol		1 μl
Taq Polymerase 5U/μl		0,4 μl
Πλασμιδιακό DNA (200-300 ng)		5 μl
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΚΥΚΛΟΠΟΙΗΤΗ		
1	95°C για 5 min	1 κύκλος
2	95°C για 30 sec	30 κύκλοι
	59°C για 30sec	
	72°C για 30 sec	
3	72°C για 5 min	1 κύκλος
4	4°C για ∞	

Πίνακας 14. Αντιδραστήρια και συνθήκες PCR για την ανίχνευση του γονιδίου *yst* (Ibrahim et al. 1992).

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟ ΠΡΟΪΟΝ:		
Τμήμα του γονιδίου <i>yst</i> μήκους 163 bp		
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ		
H ₂ O (σε τελικό όγκο 50 μl)		33,6 μl
Buffer 10X		5 μl
MgCl ₂ (25 mM)		3 μl
dNTPs (10 mM το καθένα)		1 μl
Εκκινητής A: 20 pmol		1 μl
Εκκινητής B: 20 pmol		1 μl
Taq Polymerase 5U/μl		0,4 μl
Πλασμιδιακό DNA (200-300 ng)		5 μl
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΚΥΚΛΟΠΟΙΗΤΗ		
1	93°C για 2 min	1 κύκλος
2	93°C για 1 min	35 κύκλοι
	60°C για 1,5 min	
	72°C για 30 sec	
3	72°C για 2 min	1 κύκλος
4	4°C για ∞	

2.13. Διερεύνηση παραγωγής βιομεμβράνης

Η ικανότητα των στελεχών *Y. enterocolitica* να σχηματίζουν βιομεμβράνες διερευνήθηκε φαινοτυπικά με δύο μεθόδους, Α και Β οι οποίες βασίζονται στην προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων σε επιφάνεια σιλικόνης και στον επακόλουθο σχηματισμό γλυκοκάλυκα..

Μέθοδος Α

Η μέθοδος Α βασίστηκε στη διαδικασία που προτάθηκε από τους Chendra και συν. (2001) για το σχηματισμό βιομεμβρανών από κύτταρα *Candida albicans*.

1-Χρησιμοποιήθηκαν δίσκοι σιλικόνης (Folio C6 0,25 mm; Novatech, France) μήκους 4-5 mm και βάρους 25-30 mg.

2-Οι δίσκοι τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια και ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας.

3-Ακολούθησε αποστείρωση με UV ακτινοβολία για 12 ώρες.

4-Στα σωληνάρια προστέθηκε εναιώρημα κυττάρων *Y. enterocolitica* σε ζωμό Trypticase-Soy (TSB, Oxoid Ltd.) συνολικού όγκου 2,5 ml (τα κύτταρα προέρχονταν από πρόσφατη καλλιέργεια του αντίστοιχου στελέχους σε MacConkey άγαρ No. 3 χωρίς αντιβιοτικά).

5-Οι καλλιέργειες επωάζονταν στους 30° C για 96 ώρες.

6-Μετά την απόρριψη του υγρού περιεχομένου γινόταν εκπλύσεις με αποστειρωμένο -απεσταγμένο νερό και απομάκρυνση της υγρασίας μετά από τοποθέτηση των σωληνών σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής για 24 ώρες.

7-Τα σωληνάρια που περιείχαν τους δίσκους σιλικόνης ζυγίζονταν σε ζυγό ακριβείας. Η διαφορά βάρους από την πρώτη ζύγιση αντιστοιχούσε στη βιομεμβράνη που είχε σχηματιστεί από τα προσκολλημένα κύτταρα *Y. enterocolitica*.

Ως θετικό αποτέλεσμα, θεωρήθηκε αύξηση του βάρους ≥ 50 mg. Η τιμή αυτή ορίστηκε μετά από προκαταρκτικά πειράματα αξιολόγησης της επαναληψιμότητας και της αναλυτικής ευαισθησίας της μεθόδου.

Μέθοδος Β

Στη μέθοδο Β χρησιμοποιήθηκαν δίσκοι σιλικόνης μεγαλύτερου μεγέθους (8-10 mm). Αντί της μέτρησης του βάρους, ο σχηματισμός βιομεμβράνης από τα στελέχη *Y. enterocolitica* αξιολογήθηκε ποιοτικά μετά από χρώση των δίσκων με διάλυμα κρυσταλλικού ιώδους (0,4 % β/ο σε μίγμα αιθανόλης-ακετόνης 80:20). Έντονος χρωματισμός του δίσκου, έστω και κατά τόπους, θεωρήθηκε ενδεικτικός της παρουσίας βιομεμβράνης.

2.14. Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

Προσδιορίστηκαν οι ελάχιστες συγκεντρώσεις επιλεγμένων αντιβιοτικών που είχαν την ικανότητα να αναστέλλουν την πλανκτονική ανάπτυξη κυττάρων *Y. enterocolitica* που βρίσκονταν σε ώριμες βιομεμβράνες (Minimal Inhibitory Concentration for Bacterial Regrowth from the biofilm [MICBR]) με τη μέθοδο των μικροαραιώσεων σε ζωμό σύμφωνα με τις οδηγίες του CLSI (CLSI 2009b).

1-Χρησιμοποιήθηκαν δίσκοι σιλκόνης Folio C6 που είχαν επικαλυφθεί με βιομεμβράνες στελεχών *Y. enterocolitica*. Η προετοιμασία των δίσκων έγινε όπως περιγράφηκε στη Μέθοδο Α (Διερεύνηση παραγωγής βιομεμβράνης).

2-Οι επικαλυμμένοι δίσκοι τοποθετήθηκαν στα βυθίσματα μικροπλακών πολυστυρενίου που περιείχαν διαδοχικές υποδιπλάσιες αραιώσεις αντιβιοτικών σε ζωμό Mueller-Hinton.

3-Ακολουθούσε επώαση της καλλιέργειας στους 37 °C για 48 ώρες. Εμφάνιση θολρότητας ήταν ένδειξη ανάπτυξης πλανκτονικών μορφών μικροβιακών κυττάρων. Ως MICBR θεωρήθηκε η μικρότερη αραιώση αντιβιοτικού που προκαλούσε αναστολή της πλανκτονικής ανάπτυξης.

2.15. Ανίχνευση του γονιδίου *waaE*

Το χρωμοσωματικό γονίδιο *waaE* συμμετέχει στη βιοσύνθεση του κορμού των λιποπολυσακχαριτών σε ορισμένα είδη της οικογένειας *Enterobacteriaceae* μεταξύ των οποίων περιλαμβάνεται η *Klebsiella pneumoniae* και η *Serratia marcescens* (Guash et al. 1996, Regue et al. 2001). Από τους Izquiereo και συν. (2002) έχει επίσης αναφερθεί η παρουσία γονιδίου με υψηλού βαθμού ομολογία με το *waaE* σε στέλεχος *Y. enterocolitica* του οροτύπου 8 (O:8). Στην ίδια μελέτη παρουσιάστηκαν ενδείξεις ότι το εν λόγω γονίδιο πιθανόν να εμπλέκεται στο σχηματισμό βιομεμβράνης.

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια ανίχνευσης με PCR του *waaE* σε στελέχη *Y. enterocolitica* που αποδείχθηκαν ικανά, με τις φαινοτυπικές μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν, να σχηματίζουν βιομεμβράνη. Η διαδικασία περιγράφεται στους πίνακες που ακολουθούν.

Πίνακας 15. Εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση του γονιδίου *waaE* με PCR (Izquiereo et al. 2002).

Γονίδιο	Εκκινητής	Νουκλεοτιδική αλληλουχία	Χαρακτηριστικά εκκινητή
<i>waaE</i>	WAAE Y1 forward	5'GTCATGGGATCGAACGTC3'	MW = 5540 T _m = 61,6°C
	WAAE Y2 reverse	5'CTGTTGACCGACGAAGACTA3'	MW = 6126 T _m = 60,5°C

Πίνακας 16. Αντιδραστήρια και συνθήκες PCR για την ανίχνευση του γονιδίου *waaE*.

ANAMENOMENO ΠΡΟΪΟΝ:		
Τμήμα του γονιδίου <i>waaE</i> μήκους 950 bp		
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ		
H ₂ O (σε τελικό όγκο 50 μl)		33,6 μl
Buffer 10X		5 μl
MgCl ₂ (25 mM)		3 μl
dNTPs (10 mM το καθένα)		1 μl
Εκκινητής A: 20 pmol		1 μl
Εκκινητής B: 20 pmol		1 μl
Taq Polymerase 5U/μl		0,4 μl
Ολικό DNA (200-300 ng)		5 μl
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΚΥΚΛΟΠΟΙΗΤΗ		
1	95°C για 5 min	1 κύκλος
2	95°C για 1 min	35 κύκλοι
	60°C για 1 min	
	72°C για 1 min	
3	72°C για 5 min	1 κύκλος
4	4°C για ∞	

2.16. *hms*-Ομόλογες αλληλουχίες στην *Y. enterocolitica*: Αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων

Όπως ήδη αναφέρθηκε στο Γενικό Μέρος (Βιομεμβράνες στο γένος *Yersinia*), τα 6 γονίδια *hms* συγκροτούν το κύριο μέρος του συστήματος παραγωγής βιομεμβράνης στο είδος *Y. pestis*. Χρησιμοποιώντας ως μήτρα το γένωμα του στελέχους *Y. pestis* CO92 (Κωδικός πρόσβασης GenBank: NC_003143) (Parkhill et al. 2001) αναζητήθηκαν ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης ομόλογα των γονιδίων *hms* σε αλληλουχίες στελεχών *Y. enterocolitica* που έχουν κατατεθεί στις βάσεις δεδομένων GenBank και EMBL. Η σύγκριση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών και ο προσδιορισμός των βαθμών ομολογίας έγιναν με τη χρήση του αλγορίθμου BLAST (Altschul et al. 1997).

2.17. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του λογισμικού πακέτου SPSS v.19. Συγκεκριμένα, έγινε στατιστική αξιολόγηση των τιμών MIC των αντιβιοτικών παρουσία και απουσία βιομεμβράνης καθώς και συσχέτιση της παρουσίας του πλασμιδίου παθογένειας pYV με τις τιμές MIC των αντιβιοτικών (παραμετρική μέθοδος διερεύνησης στατιστικής συσχέτισης δύο ποσοτικών χαρακτηριστικών κατά Pearson και t-test).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1.Βιοχημικά χαρακτηριστικά, ορότυποι και βιότυποι *Y. enterocolitica*

Οι κωδικοί αριθμοί API 20E, οι ορότυποι και οι βιότυποι των 60 στελεχών *Y. enterocolitica* που μελετήθηκαν παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 17.

Πίνακας 17. Ταυτοποίηση, οροτυπία και βιοτυπία των στελεχών *Y. enterocolitica*.

A/A	Κωδικός στελέχους	Κωδικός αριθμός API 20E	Ορότυπος	Βιότυπος
1	4	114521	O:3	4
2	47	1014523	O:3	4
3	6	114523	O:3	4
4	43	114921	O:3	4
5	36	1114523	O:3	4
6	19	1114523	O:3	4
7	70	114921	O:3	4
8	2	114721	O:3	4
9	9	114521	O:3	4
10	21	114721	O:3	4
11	24	1114723	O:3	4
12	8	1114521	O:3	4
13	52	1114523	O:3	4
14	14	1114521	O:3	4
15	16	1114723	O:3	4
16	13	114723	O:3	4
17	20	1114121	O:3	4
18	71	1114523	O:3	4
19	25	1114721	O:3	4
20	11	114521	O:3	4
21	29	1014723	O:3	4
22	7	114521	O:3	4
23	37	114721	O:3	4
24	30	14723	O:3	4
25	72	114721	O:3	4
26	26	114721	O:3	4

Πίνακας 17. Ταυτοποίηση, οροτυπία και βιοτυπία των στελεχών *Y. enterocolitica*.(συνέχεια)

A/A	Κωδικός στελέχους	Κωδικός αριθμός API 20E	Ορότυπος	Βιότυπος
27	63	114721	O:3	4
28	46	1114523	O:3	4
29	56	1114523	O:3	4
30	27	1014723	O:3	4
31	34	14521	O:3	4
32	17	1114723	O:3	4
33	28	114723	O:3	4
34	50	1014522	O:3	4
35	49	1154723	O:3	4
36	42	1014723	O:3	4
37	62	14523	O:3	4
38	22	114721	O:3	4
39	10	114521	O:3	4
40	48	1154523	O:9	2
41	53	1114523	O:3	4
42	44	1014521	O:3	4
43	55	14523	O:3	4
44	54	3114523	O:3	4
45	31	1114521	O:3	4
46	35	114721	O:3	4
47	15	1114521	O:3	4
48	58	1154523	O:3	4
49	33	11452	O:3	4
50	73	14521	O:3	4
51	32	114521	O:3	4
52	3	114521	O:3	4
53	60	114523	O:3	4
54	18	1114523	O:3	4
55	74	1114521	O3	4
56	75	1114521	O3	4
57	5	1114721	O3	4
58	1	114521	O3	4
59	23	1114721	O3	4
60	76	1154523	O3	4

Στο σύνολο των 60 στελεχών, 59 (98,3 %) ανήκαν στον παθογόνο βιο-ορότυπο 4/O:3. Ένα στέλεχος ταξινομήθηκε στον παθογόνο βιο-ορότυπο 2/O:9.

Η ταυτοποίηση των 60 στελεχών με τις βιοχημικές δοκιμασίες του συστήματος API 20E δεν παρουσίασε ιδιαίτερα προβλήματα (ή πιθανότητες ορθής ταυτοποίησης για όλα τα στελέχη ήταν >95%). Παρατηρήθηκε πάντως μια, σχετικά μικρού βαθμού, διαφοροποίηση των βιοχημικών ιδιοτήτων μεταξύ των στελεχών του βιο-οροτύπου 4/O:3.

3.2. Φαινότυποι αντοχής στελεχών *Y. enterocolitica*

Πίνακας 18: Ευαισθησία των στελεχών *Y. enterocolitica* όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Kirby-Bauer

Κωδικός στελέχους	AMP	AMPC	CEF	CTX	CAZ	FEP	ATM	IMP	AN	GN	NET	TM	SXT	CHL	CIP
19	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
4	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
9	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
6	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
2	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
43	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
58	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
47	A	E	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
56	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
63	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
33	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
36	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
37	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
44	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
49	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
50	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
52	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E

Πίνακας 18: Ευαισθησία των στελεχών *Y. enterocolitica* όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Kirby-Bauer (συνέχεια)

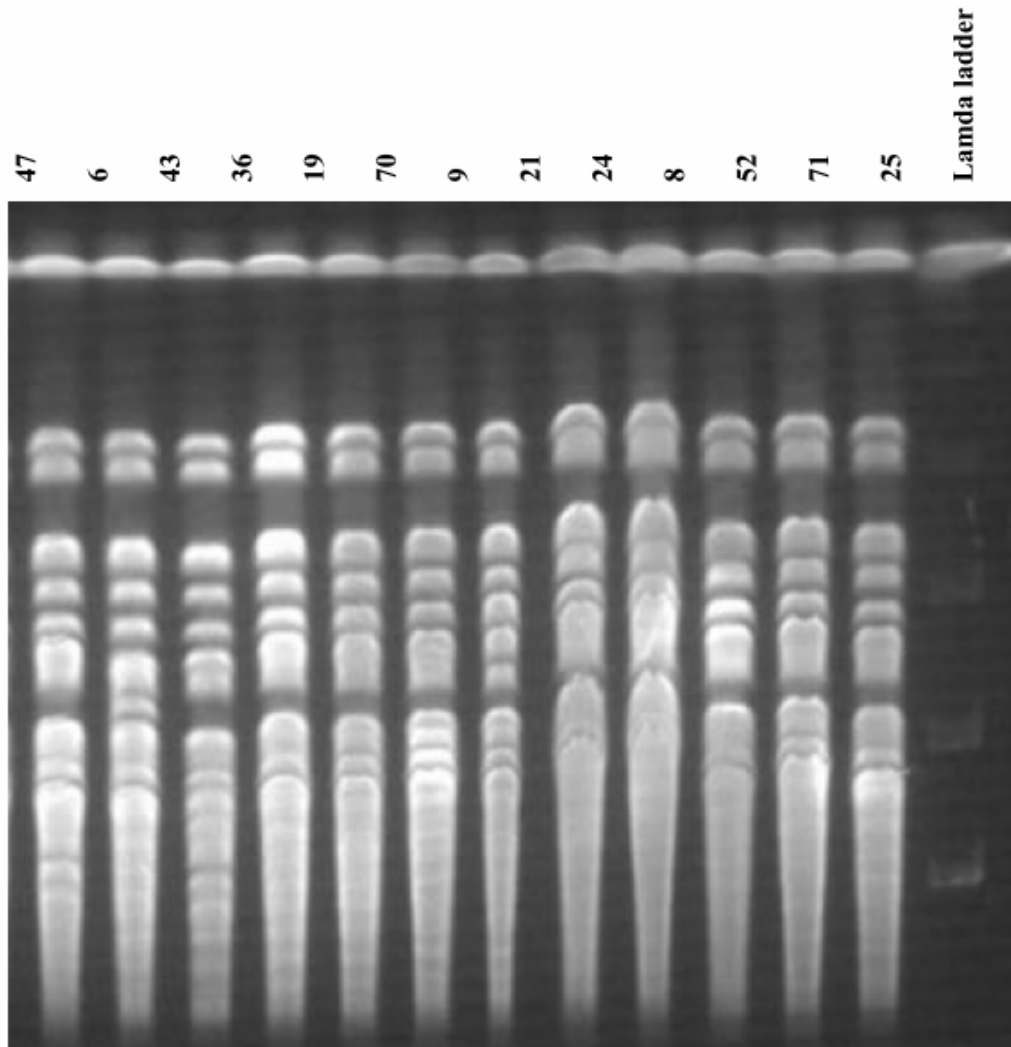
Κωδικός στελέχους	AMP	AMPC	CEF	CTX	CAZ	FEP	ATM	IMP	AN	GN	NET	TM	SXT	CHL	CIP
20	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
22	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
24	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
25	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
27	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
29	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
30	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
31	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
34	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
26	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
3	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
21	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
5	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
42	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
46	A	E	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
13	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
35	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
28	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E

Πίνακας 18: Ευαισθησία των στελεχών *Y. enterocolitica* όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Kirby-Bauer (συνέχεια)

Κωδικός στελέχους	AMP	AMPC	CEF	CTX	CAZ	FEP	ATM	IMP	AN	GN	NET	TM	SXT	CHL	CIP
16	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
15	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
14	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
11	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
7	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
43	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
36	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
37	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
58	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
15	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
31	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
34	A	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E

Όλα τα στελέχη *Y. enterocolitica* ήταν ανθεκτικά στην αμπικιλίνη και την κεφαλοθίνη. Δεν παρατηρήθηκε αντοχή στις αμινογλυκοσίδες που χρησιμοποιήθηκαν (αμικασίνη, γενταμικίνη, νετλμικίνη και τομπραμικίνη) καθώς και στα αντιμικροβιακά κοτριμοξαζόλη, χλωραμφαινικόλη και σιπροφλοξασίνη. Πρέπει να σημειωθεί ότι, πλην ενός, (κωδικός αριθμός: 46), τα υπόλοιπα 69 στελέχη εμφάνιζαν αντοχή στο συνδυασμό αμοξικιλίνης – κλαβουλανικού οξέος γενοτάσιν για το είδος *Y. enterocolitica* (βλ. σχετικά σχόλια στη Συζήτηση).

3.3. Αποτελέσματα μοριακής τυποποίησης στελεχών *Yersinia enterocolitica* με PFGE



Εικόνα 7: Μοριακή τυποποίηση 13 αντιπροσωπευτικών στελεχών *Yersinia enterocolitica* του βιο-οροτύπου 4/O:3 με ανάλυση θραυσμάτων περιορισμού ολικού DNA σε ηλεκτροφόρηση παλλόμενου πεδίου (pulsed field gel electrophoresis, PFGE).

Οι διαφοροποιήσεις στα ηλεκτροφορητικά πρότυπα μεταξύ των στελεχών αφορούσαν 3 ή λιγότερα θράυσματα DNA (Εικόνα 7). Ετσι, σύμφωνα με τα διεθνώς αποδεκτά κριτήρια (Tenover et al. 1995), τα αποτελέσματα της τυποποίησης με PFGE έδειξαν ότι όλα τα στελέχη είχαν μεγάλο βαθμό γενετικής ομοιότητας και πιθανότατα κοινή καταγωγή.

3.4. Φαινοτυπική ανίχνευση του πλασμιδίου pYV

Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 19) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της καλλιέργειας σε υλικό που περιείχε οξαλικό μαγνήσιο (MOX). Η ανάπτυξη μικρών επαρμένων αποικιών θεωρήθηκε ως ένδειξη της παρουσίας του πλασμιδίου παθογένειας pYV.

Σε σύνολο 60 στελεχών, 47 ήταν θετικά. Στα υπόλοιπα 13 είτε δεν εμφανίστηκαν οι χαρακτηριστικές αποικίες είτε η μορφολογία τους ήταν ασαφής.

Πίνακας 19. Φαινοτυπική ανίχνευση του πλασμιδίου pYV.

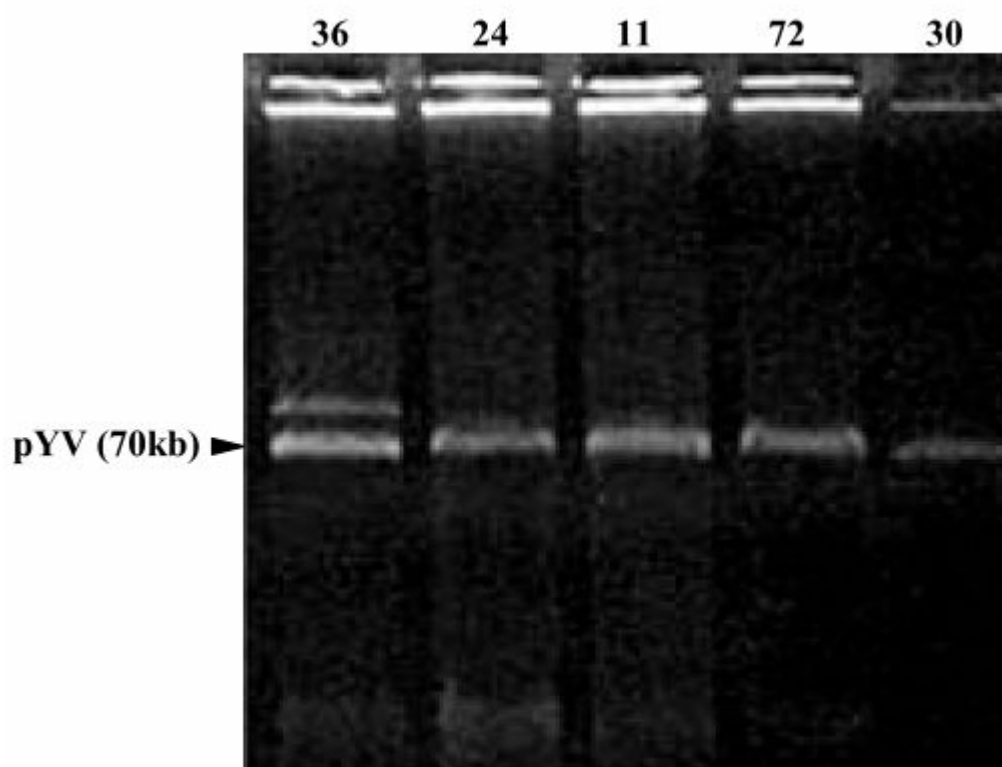
A/A	Κωδικός στελέχους	Καλλιέργεια σε MOX
1	4	+
2	47	+
3	6	+
4	43	+
5	36	+
6	19	+
7	70	+
8	2	-
9	9	+
10	21	-
11	24	-
12	8	-
13	52	+
14	14	-
15	16	-
16	13	-
17	20	-
18	71	+
19	25	+
20	11	+
21	29	+
22	7	+
23	37	+
24	30	+
25	72	+

Πίνακας 19. Φαινοτυπική ανίχνευση του πλασμιδίου P_{γν} (συνέχεια).

A/A	Κωδικός στελέχους	Καλλιέργεια σε MOX
26	26	+
27	63	+
28	46	+
29	56	+
30	27	+
31	34	+
32	17	+
33	28	-
34	50	+
35	49	+
36	42	+
37	62	+
38	22	+
39	10	+
40	48	+
41	53	+
42	44	+
43	55	+
44	54	+
45	31	+
46	35	+
47	15	+
48	58	+
49	33	+
50	73	+
51	32	+
52	3	-
53	60	+
54	18	-
55	74	+
56	75	+
57	5	+
58	1	+
59	23	-
60	76	+

3.5. Ανίχνευση του pYV πλασμιδιακού DNA

Μετά από απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη χρήση του UltraClean Mini Plasmid Prep Kit (MO-BIO Laboratories Ltd.) και ηλεκτροφόρηση των παρασκευασμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης, βρέθηκε ότι 53 από τα 60 στελέχη *Y. enterocolitica* περιείχαν πλασμίδιο μεγέθους \simeq 70 kb που αντιστοιχούσε με το μέγεθος του πλασμιδίου παθογένειας pYV (Εικόνα 8).

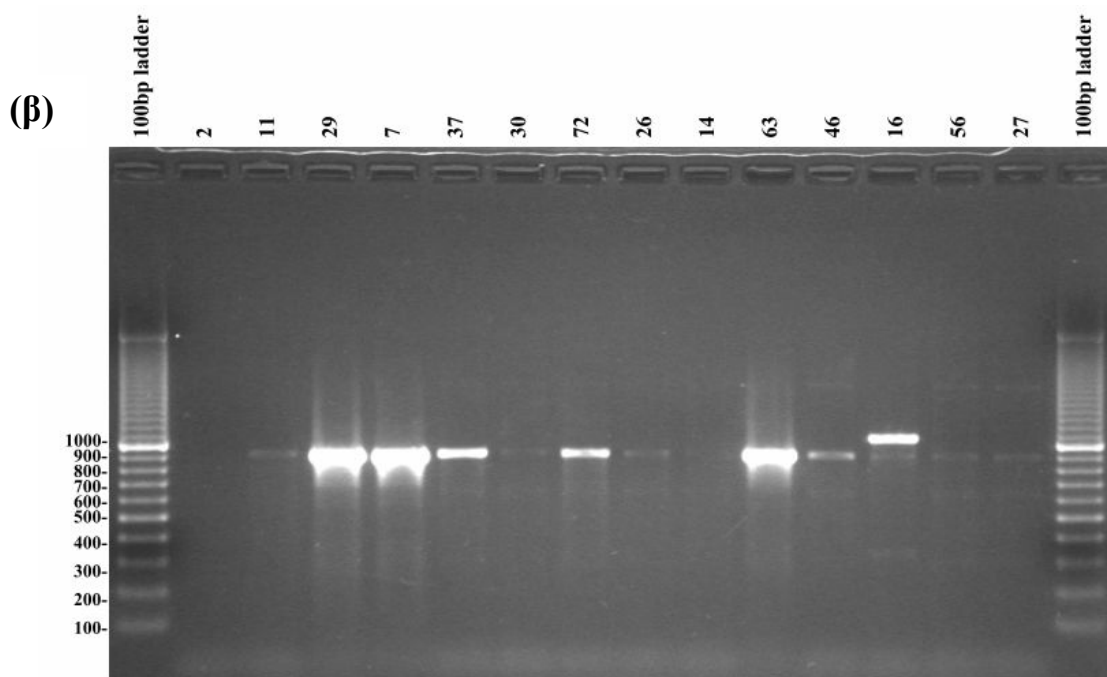
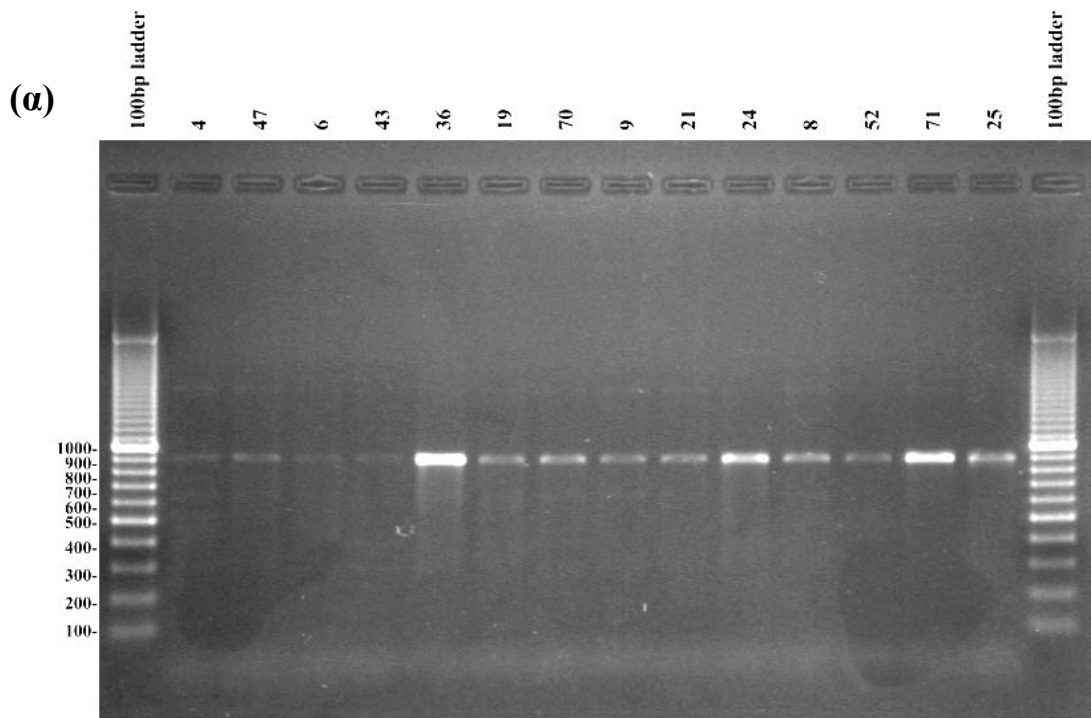


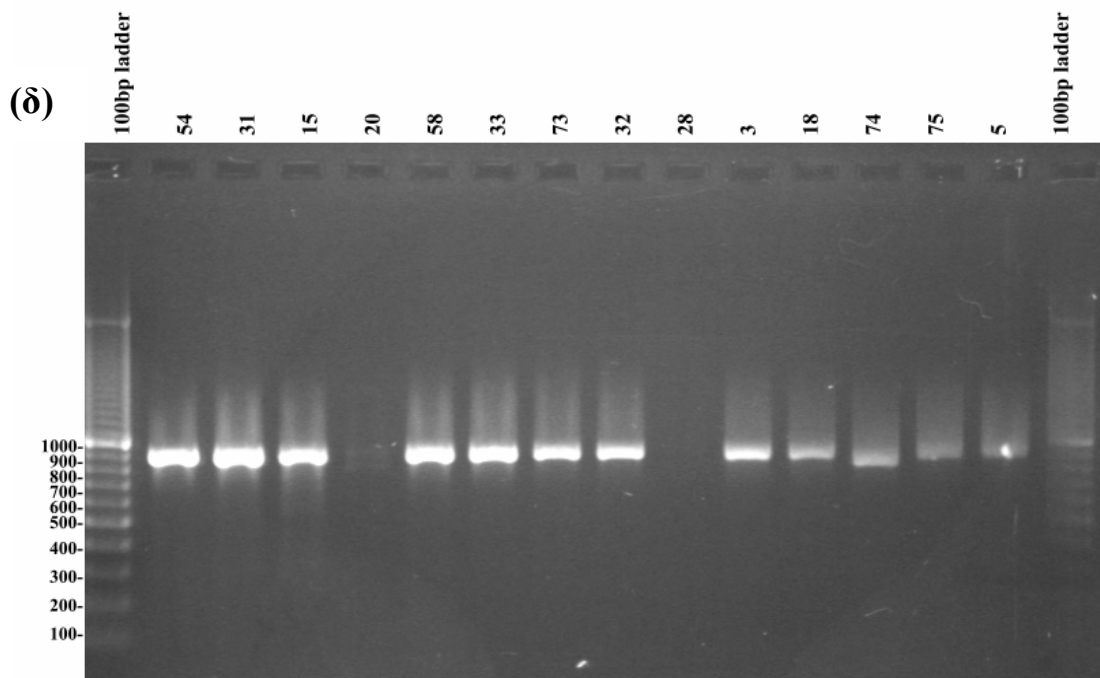
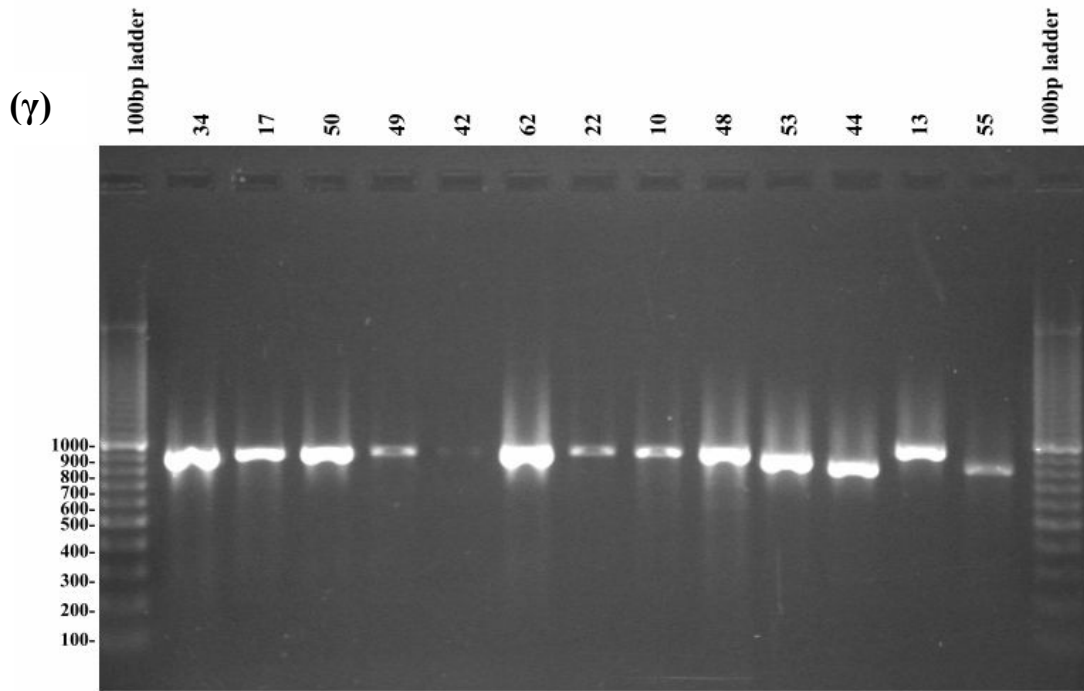
Εικόνα 8. Ηλεκτροφόρηση παρασκευασμάτων DNA από αντιπροσωπευτικά στελέχη *Y. enterocolitica* που περιείχαν το πλασμίδιο παθογένειας pYV (μέγεθος 70 kb).

3.6. Ανίχνευση του πλασμιδιακού γονιδίου *yadA* με PCR

Στις επόμενες εικόνες (9α, 9β, 9γ και 9δ) παρουσιάζονται τα προϊόντα των ειδικών για *yadA* δοκιμασιών PCR μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

yadA



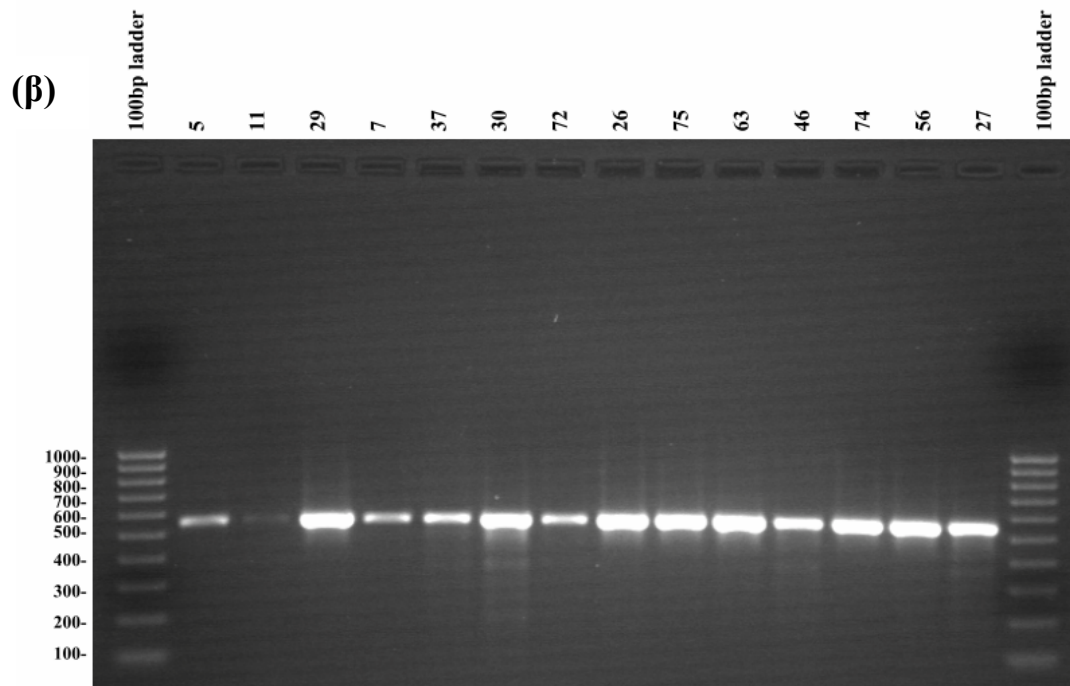
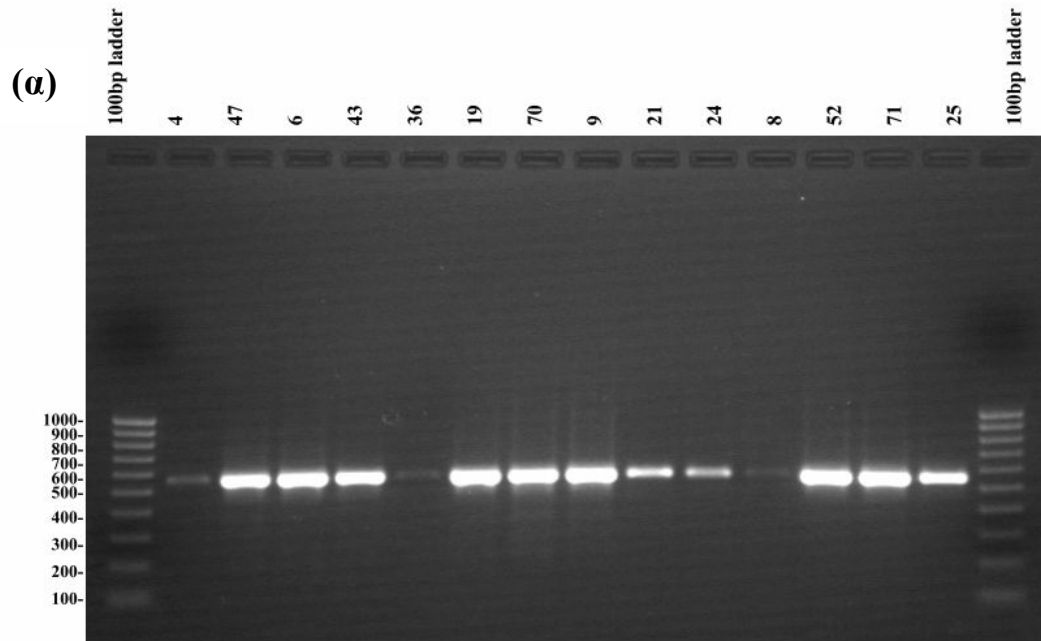


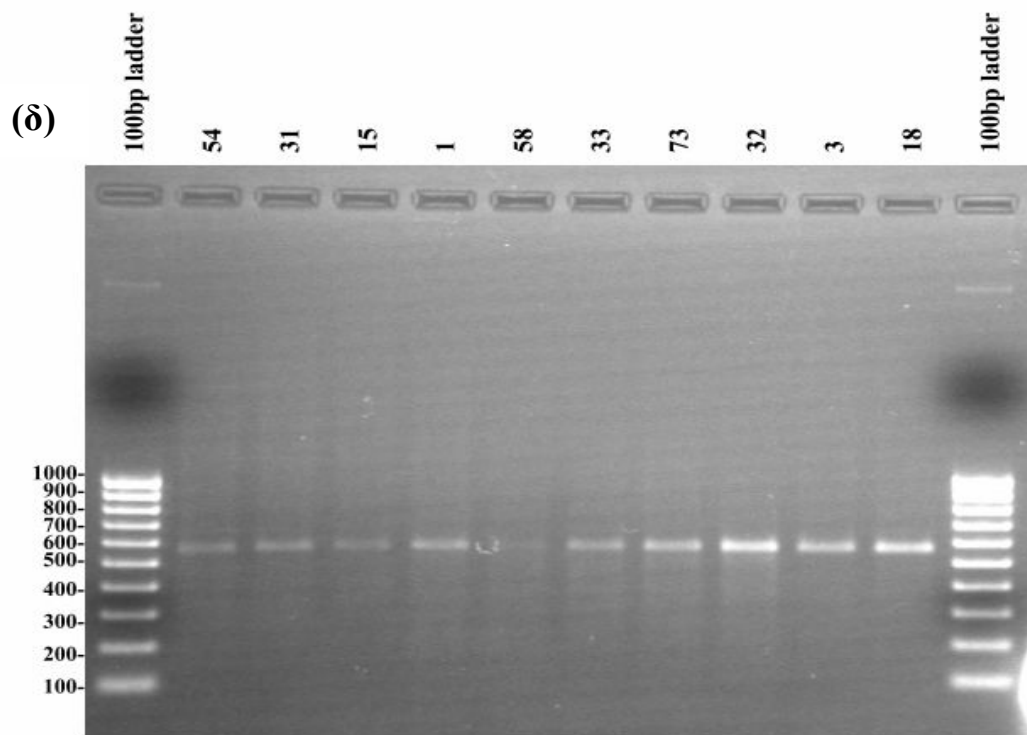
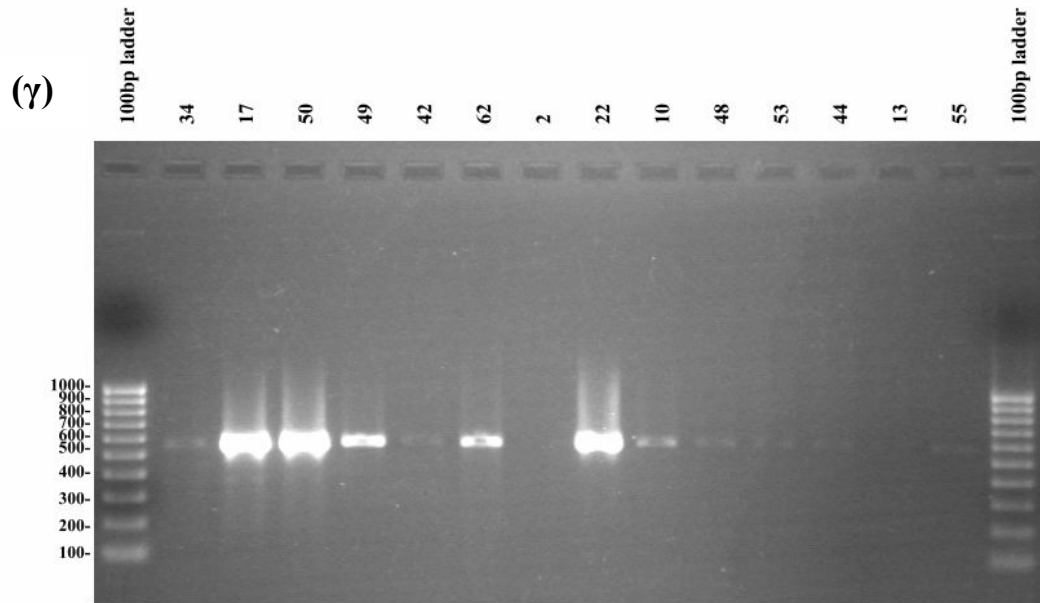
Εικόνες 9α, 9β, 9γ και 9δ. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των *yadA*-ειδικών PCR προϊόντων.

3.7. Ανίχνευση του πλασμιδιακού γονιδίου *virF* με PCR

Στις επόμενες εικόνες (10α, 10β, 10γ και 10δ) παρουσιάζονται τα προϊόντα των ειδικών για *virF* δοκιμασιών PCR μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

virF





Εικόνες 10α, 10β, 10γ και 10δ. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των *virF*-ειδικών PCR προϊόντων.

Πίνακας 20. Ανίχνευση γονιδίων παθογένειας πλασμιδιακής εντόπισης.

A/A	Κωδικός στελέχους	<i>yadA</i>	<i>virF</i>
1	4	+	+
2	47	+	+
3	6	+	+
4	43	+	+
5	36	+	+
6	19	+	+
7	70	+	+
8	2	-	-
9	9	+	+
10	21	+	+
11	24	+	+
12	8	+	+
13	52	+	+
14	14	-	-
15	16	-	-
16	13	-	-
17	20	-	-
18	71	+	+
19	25	+	+
20	11	+	+
21	29	+	+
22	7	+	+
23	37	+	+
24	30	+	+
25	72	+	+
26	26	+	+
27	63	+	+
28	46	+	+
29	56	+	+
30	27	+	+
31	34	+	+

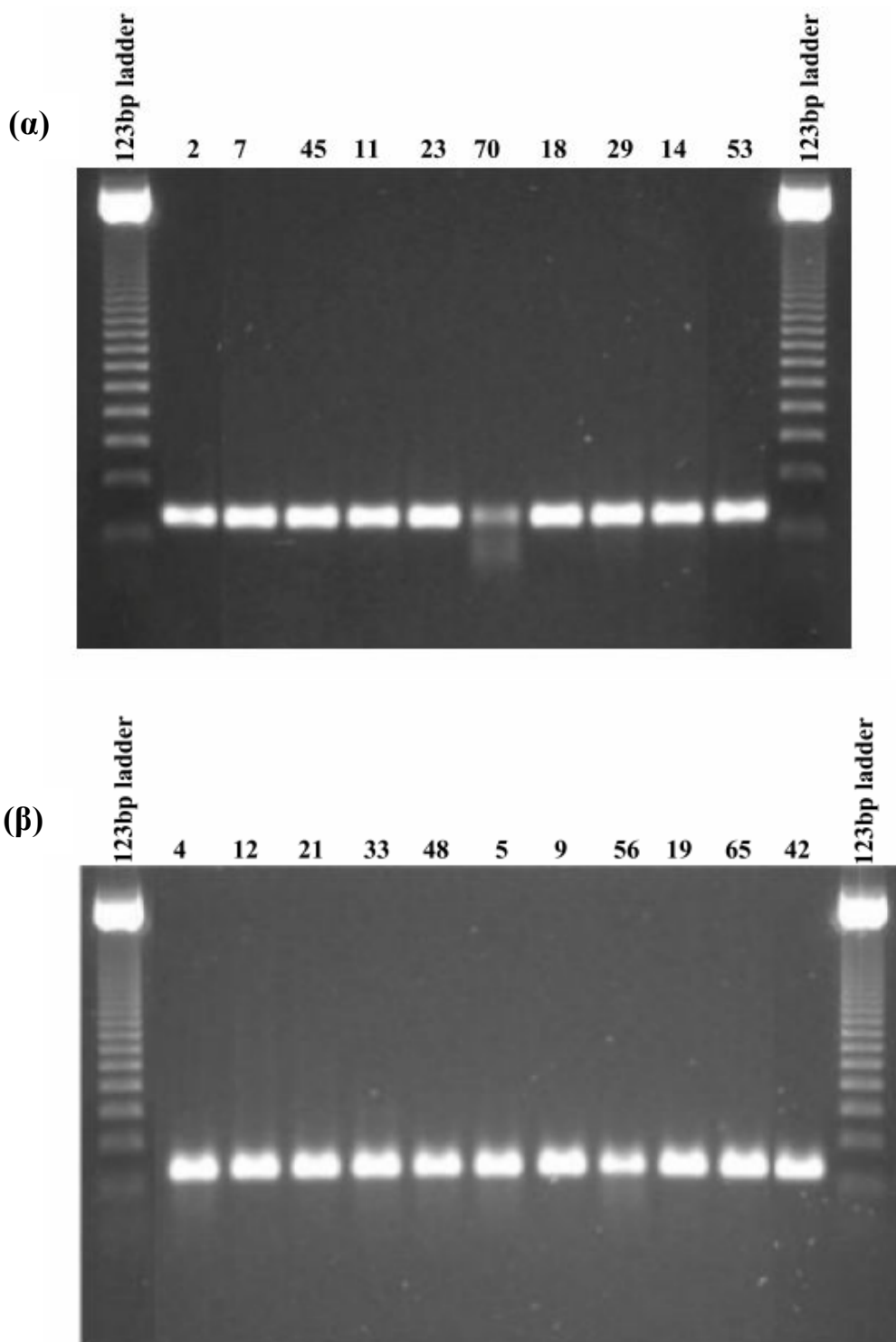
Πίνακας 20. Ανίχνευση γονιδίων παθογένειας πλασμιδιακής εντόπισης (συνέχεια)

A/A	Κωδικός στελέχους	<i>yadA</i>	<i>virF</i>
32	17	+	+
33	28	-	-
34	50	+	+
35	49	+	+
36	42	+	+
37	62	+	+
38	22	+	+
39	10	+	+
40	48	+	+
41	53	+	+
42	44	+	+
43	55	+	+
44	54	+	+
45	31	+	+
46	35	+	+
47	15	+	+
48	58	+	+
49	33	+	+
50	73	+	+
51	32	+	+
52	3	+	+
53	60	+	+
54	18	+	+
55	74	+	+
56	75	+	+
57	5	+	+
58	1	+	+
59	23	-	-
60	76	+	+

Τα αποτελέσματα των δοκιμασιών PCR ήταν σε απόλυτη αντιστοιχία με αυτά της ανάλυσης του πλασμιδιακού περιεχομένου. Από τα 60 στελέχη *Y. enterocolitica*, 54 περιείχαν αμφότερα τα πλασμιδιακά γονίδια *yadA* και *virF*. Τα υπόλοιπα 6 στελέχη ήταν αρνητικά και για τα 2 γονίδια. Τα τελευταία στελέχη περιλαμβάνονταν στα 13 που εμφανίστηκαν ως pVY-αρνητικά με τη φαινοτυπική μέθοδο ανίχνευσης (καλλιέργεια παρουσία οξαλικού μαγνησίου) (7 ψευδώς αρνητικά). Επίσης, με τη φαινοτυπική μέθοδο υπήρξε και μία περίπτωση ψευδώς θετικού αποτελέσματος (κωδικός αριθμός στελέχους: 4) (Πίνακες 19 και 20).

3.8. Ανίχνευση του χρωμοσωματικού γονιδίου παθογένειας *yst*

Όλα τα εξετασθέντα στελέχη *Y. enterocolitica* ήταν θετικά για την παρουσία του χρωμοσωματικού γονιδίου παθογένειας *yst*. Το προϊόν της αντίστοιχης PCR είχε, σε όλες τις περιπτώσεις, το αναμενόμενο μέγεθος (163 bp) (Εικόνες 11α και 11β).



Εικόνες 11α και 11β. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της ειδικής PCR για το γονίδιο *yst*.

3.9. Αποτελέσματα δοκιμασιών παραγωγής βιομεμβράνης

Τα στελέχη *Y. enterocolitica* βρέθηκαν στο σύνολό τους (N=60), θετικά για παραγωγή βιομεμβράνης (η αύξηση του βάρους της βιομάζας ήταν >50 mg). Παρατηρήθηκαν ποσοτικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των στελεχών αλλά οι περισσότερες βρίσκονταν εντός των ορίων του πειραματικού σφάλματος. Για το λόγο αυτό, δεν κρίθηκε σκόπιμη η κατάταξη των στελεχών με κριτήριο το βάρος της παραγόμενης βιομεμβράνης.

Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με τη μέθοδο B (χρώση της μικροβιακής βιομεμβράνης με κρυσταλλικό ιώδες).

Πίνακας 21: MIC (mg/L) στελεχών *Yersinia enterocolitica* (πλαγκτονική μορφή)

Κωδικός στελέχους	Κεφοτάξιμη	Κεφταξιδίμη	Κεφεπίμη	Αζτρεονάμη	Ιμιπενέμη	Αμικασίνη	Νετιμικίνη	Γενταμικίνη	Τομπραμικίνη	Κοτριμοξάζολη	Κιτροφλοξασκίνη
4	1	1	1	1	1	4	1	1	1	20	0,25
47	1	1	1	1	1	16	4	2	4	20	0,25
6	1	1	1	1	1	2	1	1	1	20	0,25
43	1	1	1	1	1	8	2	2	1	20	0,25
36	1	1	1	1	1	2	2	1	1	20	0,25
19	1	1	1	1	1	8	2	2	1	20	0,25
70	1	1	1	1	1	4	2	1	1	20	0,25
2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	20	0,25
9	1	1	1	1	1	4	2	1	1	20	0,25
21	1	1	1	1	1	8	4	1	1	20	0,25
24	1	1	1	1	1	4	4	1	1	20	0,25
8	1	1	1	1	1	8	4	1	1	20	0,25
52	1	1	1	1	1	4	2	1	1	20	0,25
14	1	1	1	1	1	2	1	1	1	20	0,25
16	1	1	1	1	1	2	1	1	1	20	0,25
13	1	1	1	1	1	8	4	1	1	20	0,25
20	1	1	1	1	1	2	1	1	1	20	0,25
71	4	1	1	1	1	64	32	1	1	20	0,25

Πίνακας 21: MIC (mg/L) στελεχών *Yersinia enterocolitica* (παραγοντική μορφή) (συνέχεια)

Κωδικός στελέχους	Κεφοταξίμη	Κεφταξιδίμη	Κεφεπίμη	Αζτρεονάμη	Ιμιπενέμη	Αμικασίνη	Νετιλμικίνη	Γενταμικίνη	Τομπραμικίνη	Κοτριμοξάζολη	Κιτροφλοξασκίνη
25	1	1	1	1	1	8	4	1	1	20	0,25
11	1	1	1	1	1	8	2	1	1	20	0,25
29	1	1	1	1	1	4	2	1	1	20	0,25
7	1	1	1	1	1	2	1	1	1	20	0,25
37	1	1	1	1	1	4	2	1	1	20	0,25
30	1	1	1	1	1	2	1	1	1	20	0,25
72	1	1	1	1	1	2	1	1	1	20	0,25
26	1	1	1	1	1	4	1	1	1	20	0,25
63	1	1	1	1	1	8	2	1	1	20	0,25
46	1	1	1	1	1	16	4	2	1	20	0,25
56	1	1	1	1	1	2	2	1	1	20	0,25
27	1	1	1	1	1	4	2	1	1	20	0,25
34	1	1	1	1	1	4	2	1	1	20	0,25
17	1	1	1	1	1	8	1	1	1	20	0,25
28	1	1	1	1	1	8	4	2	1	20	0,25
50	1	1	1	1	1	2	1	1	1	20	0,25
49	1	1	1	1	1	2	1	1	1	20	0,25
42	1	1	1	1	1	8	4	2	1	20	0,25

Πίνακας 21: MIC (mg/L) στελεχών *Yersinia enterocolitica* (πλαγκτονική μορφή) (συνέχεια)

Κωδικός στελέχους	Κεφοταξίμη	Κεφταξιδίμη	Κεφεπίμη	Αζτρεονάμη	Ιμιπενέμη	Αμικασίνη	Νετιλμικίνη	Γενταμικίνη	Τομπραμικίνη	Κοτριμοξάζολη	Κιτροφλοξασκίνη
62	1	1	1	1	1	8	1	1	1	20	0,25
22	1	1	1	1	1	2	1	1	1	20	0,25
10	1	1	1	1	1	2	1	1	1	20	0,25
48	1	1	1	1	1	4	1	1	1	20	0,25
53	1	1	1	1	1	4	2	1	1	20	0,25
44	1	1	1	1	1	4	1	1	1	20	0,25
55	1	1	1	1	1	4	4	1	1	20	0,25
54	1	1	1	1	1	8	1	1	1	20	0,25
31	1	1	1	1	1	8	1	1	1	20	0,25
35	1	1	1	1	1	8	4	1	1	20	0,25
15	1	1	1	1	1	4	2	1	1	20	0,25
58	1	1	1	1	1	2	0	1	1	20	0,25
33	1	1	1	1	1	8	4	1	1	20	0,25
73	1	1	1	1	1	2	1	2	1	20	0,25
32	1	1	1	1	1	4	1	1	1	20	0,25
3	1	1	1	1	1	4	2	1	1	20	0,25
60	1	1	1	1	1	8	1	1	1	20	0,25
18	1	1	1	1	1	8	4	1	1	20	0,25

Πίνακας 21: MIC (mg/L) στελεχών *Yersinia enterocolitica* (παραγοντική μορφή) (συνέχεια)

Κωδικός στελέχους	Κεφοταξίμη	Κεφταξιδίμη	Κεφεπίμη	Αζτρεονάμη	Ιμιπενέμη	Αμικασίνη	Νετιμικίνη	Γενταμικίνη	Τομπραμικίνη	Κοτριμοξάζολη	Κιτροφλοξασκίνη
74	1	1	1	1	1	8	1	2	1	20	0,25
75	1	1	1	1	1	4	1	2	1	20	0,25
5	1	1	1	1	1	8	4	1	1	20	0,25
1	1	1	1	1	1	4	1	1	1	20	0,25
23	1	1	1	1	1	2	2	1	1	20	0,25
76	1	1	1	1	1	2	4	2	1	20	0,25

Πίνακας 22: MIC (mg/L) στελεχών *Yersinia enterocolitica* σε βιομεβράνες

Κωδικός στελέχους	Κεφοταξίμη	Κεφταξιδίμη	Κεφεπίμη	Αζτρεονάμη	Ιμιπενέμη	Αμικασίνη	Νετιλμικίνη	Γενταμικίνη	Τομπραμικίνη	Κοτριμοξασόλη	Κιτροφλοξασκίνη
4	128	128	128	128	32	64	128	16	32	2560	32
47	128	128	128	128	32	64	16	128	128	2560	32
6	128	128	128	128	128	64	16	128	128	320	3
43	128	128	128	128	64	32	16	128	128	2560	32
36	128	128	128	128	128	128	128	128	128	2560	32
19	128	128	128	128	64	32	32	128	128	160	32
70	128	128	128	128	128	128	64	128	128	1280	32
2	128	128	128	128	128	128	128	128	128	640	32
9	128	128	128	128	128	128	128	128	32	2560	32
21	128	128	128	128	64	128	16	128	128	2560	32
24	128	128	128	128	64	64	64	64	128	2560	32
8	128	128	128	128	128	128	128	128	64	2560	32
52	128	128	128	128	32	128	64	128	32	2560	32
14	64	128	32	128	128	128	8	8	128	640	32
16	128	128	128	128	128	128	128	128	128	2560	32
13	128	128	128	128	32	128	128	32	32	2560	32
20	32	128	32	128	128	128	16	128	128	2560	32
71	128	128	128	128	128	128	64	128	128	2560	32

Πίνακας 22: MIC (mg/L) στελεχών *Yersinia enterocolitica* σε βιομεβράνες (συνέχεια)

Κωδικός στελέχους	Κεφοταξίμη	Κεφταξιδίμη	Κεφεπίμη	Αζτρεονάμη	Ιμιπενέμη	Αμικασίνη	Νετιλμικίνη	Γενταμικίνη	Τομπραμικίνη	Κοστριμοξάσολη	Κιτροφλοξασκίνη
25	128	128	128	128	32	128	32	128	128	2560	32
11	128	128	128	128	128	128	128	128	128	2560	32
29	128	128	128	128	128	128	128	128	128	2560	32
7	128	128	128	128	128	128	32	128	128	2560	32
37	32	128	64	128	1	32	16	128	128	1280	32
30	128	128	128	128	128	128	128	128	128	2560	32
72	128	128	128	128	128	128	128	128	64	2560	32
26	128	128	128	128	128	32	32	128	128	2560	32
63	128	128	128	128	128	32	32	128	128	2560	32
46	128	128	128	128	128	128	128	128	128	2560	32
56	128	128	128	128	128	128	128	128	128	640	32
27	128	128	64	128	128	128	128	128	128	2560	32
34	128	128	128	128	64	32	32	128	128	2560	32
17	128	128	128	128	64	64	32	128	128	2560	32
28	128	128	128	128	128	128	128	16	128	2560	32
50	128	128	128	128	128	128	128	128	128	2560	32
49	128	128	128	128	64	128	128	128	128	2560	32
42	128	128	128	128	64	128	128	128	128	2560	32

Πίνακας 22: MIC (mg/L) στελεχών *Yersinia enterocolitica* σε βιομεβράνες (συνέχεια)

Κωδικός στελέχους	Κεφοταξίμη	Κεφταξιδίμη	Κεφεπίμη	Αζτρεονάμη	Ιμιπενέμη	Αμικασίνη	Νετιλμικίνη	Γενταμικίνη	Τομπραμικίνη	Κοστριμοξάσολη	Κιτροφλοξασκίνη
62	128	128	128	128	128	64	128	128	32	2560	32
22	128	128	128	128	16	128	128	32	128	2560	32
10	128	128	128	128	128	128	128	128	128	2560	32
48	128	128	128	128	128	128	128	128	128	2560	32
53	128	128	128	128	128	32	32	128	128	1280	32
44	128	128	128	128	128	128	128	128	128	2560	32
55	128	128	128	128	128	128	128	128	64	2560	32
54	128	128	128	128	128	128	32	128	32	2560	32
31	128	128	128	128	128	128	64	128	128	2560	16
35	128	128	128	128	128	128	128	128	128	2560	32
15	128	128	128	128	128	128	128	128	128	2560	32
58	128	128	128	128	128	16	8	128	128	2560	8
33	128	128	128	128	32	64	128	128	128	2560	32
73	128	128	128	128	64	8	64	16	128	2560	32
32	128	128	128	128	128	32	8	128	128	2560	32
3	128	128	128	128	64	128	64	128	32	2560	32
60	128	128	128	128	128	64	32	128	128	2560	32
18	128	128	128	128	64	128	16	128	32	2560	32

Πίνακας 22: MIC (mg/L) στελεχών *Yersinia enterocolitica* σε βιομεβράνες (συνέχεια)

Κωδικός στελέχους	Κεφοταξίμη	Κεφταξιδίμη	Κεφεπίμη	Αζτρεονάμη	Ιμιπενέμη	Αμικασίνη	Νετρίμικίνη	Γενταμικίνη	Τομπραμικίνη	Κοστριμοξάζολη	Κιτροφλοξασκίνη
74	128	128	128	128	128	128	128	128	128	1280	32
75	128	128	128	128	64	128	128	128	128	2560	32
5	128	128	128	128	128	16	128	128	128	2560	32
1	128	128	128	128	128	64	32	128	128	1280	32
23	128	128	128	128	64	128	128	128	128	2560	32
76	64	128	128	128	16	16	64	8	16	2560	32

Πίνακας 23. Συνοπτική παρουσίαση της επίδρασης της βιομεμβράνης στην ευαισθησία των στελεχών *Y. enterocolitica* στα αντιβιοτικά.

Αντιβιοτικό	MIC50 ^α	MICBR50 ^β	MIC90 ^α	MICBR90 ^β
Κοτριμοξαζόλη	≤ 20	≥ 2560	≤ 20	≥ 2560
Αμικασίνη	≤ 2	≥ 128	8	≥ 128
Νετιλμικίνη	≤ 1	≥ 32	2	≥ 32
Γενταμικίνη	≤ 1	≥ 128	≤ 1	≥ 128
Τομπραμυκίνη	≤ 1	≥ 128	≤ 1	≥ 128
Ιμιπενέμη	≤ 1	≥ 128	≤ 1	≥ 128
Κεφταζιδίμη	≤ 1	≥ 128	≤ 1	≥ 128
Αζτρεονάμη	≤ 1	≥ 128	≤ 1	≥ 128
Κεφεπίμη	≤ 1	≥ 128	≤ 1	≥ 128
Κεφοταξίμη	≤ 1	≥ 128	≤ 1	≥ 128
Σιπροφλοξακίνη	≤ 0,25	≥ 32	≤ 0,25	≥ 32

^α Τιμές MIC απουσία βιομεμβράνης

^β Τιμές MIC παρουσία βιομεμβράνης

3.10. Αποτελέσματα PCR για το γονίδιο *waaE*

Τα αποτελέσματα της ειδικής PCR για το γονίδιο *waaE* ήταν αρνητικά για όλα τα στελέχη της συλλογής.

3.11. Ανεύρεση *hms*-ομόλογων αλληλουχιών σε βάσεις δεδομένων

Μετά από εξέταση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών *Y. enterocolitica* που έχουν κατατεθεί στις βάσεις δεδομένων GenBank και EMBL, διαπιστώθηκε ότι σημαντικός βαθμός ομολογίας και για τα 6 γονίδια *hms* σε στέλεχος *Y. enterocolitica* που ανήκε στον ορότυπο 9 (O:9) (κωδικός πρόσβασης GenBank: CP002246) (Wang et al. 2011).

Εντοπίστηκαν 6 ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (ORF-1 έως ORF-6) που αντιστοιχούσαν στα γονίδια σχηματισμού βιομεμβράνης στο είδος *Y. pestis*. Παρακάτω παρουσιάζονται συνοπτικά οι ιδιότητες των αντίστοιχων υποθετικών πρωτεϊνών καθώς και ο βαθμός ομολογίας τους με τις πρωτεΐνες Hms.

ORF-1

Συντεταγμένες: 2680907 - 2683375

Πιθανό προϊόν: Πολυπεπτίδιο (822 αμινοξικά κατάλοιπα)

Πιθανή εντόπιση: Εξωτερική μεμβράνη

Πιθανά λειτουργικά χαρακτηριστικά: Δράση ακετυλάσης

Ομόλογη πρωτεΐνη: HmsH (822 αμινοξικά κατάλοιπα)

Ταυτότητα: 87% (714/822 αα)

Ομοιότητα: 93% (771/822 αα)

ORF-2

Συντεταγμένες: 2678871 - 2680853

Πιθανό προϊόν: Πολυπεπτίδιο (660 αμινοξικά κατάλοιπα)

Πιθανή εντόπιση: Εξωτερική μεμβράνη

Πιθανά λειτουργικά χαρακτηριστικά: Δράση ακετυλάσης

Ομόλογη πρωτεΐνη: HmsF (673 αμινοξικά κατάλοιπα)

Ταυτότητα: 89% (586/659)

Ομοιότητα: 94% (623/659)

ORF-3

Συντεταγμένες: 2677547 - 2678881

Πιθανό προϊόν: Πολυπεπτίδιο (444 αμινοξικά κατάλοιπα)

Πιθανή εντόπιση: Κυτταροπλασματική μεμβράνη

Πιθανά λειτουργικά χαρακτηριστικά: Δράση γλυκοσυλτρανσφεράσης

Ομόλογη πρωτεΐνη: HmsR (444 αμινοξικά κατάλοιπα).

Ταυτότητα: 96% (427/443)

Ομοιότητα: 98% (436/443)

ORF-4

Συντεταγμένες: 2677083 - 2677550

Πιθανό προϊόν: Πολυπεπτίδιο (155 αμινοξικά κατάλοιπα)

Πιθανή εντόπιση: Κυτταροπλασματική μεμβράνη

Πιθανά λειτουργικά χαρακτηριστικά: Δράση γλυκοσυλτρανσφεράσης

Ομόλογη πρωτεΐνη: HmsS (155 αμινοξικά κατάλοιπα).

Ταυτότητα: 79% (123/155)

Ομοιότητα: 92% (143/155)

ORF-5

Συντεταγμένες: 674809 - 675909

Πιθανό προϊόν: Πολυπεπτίδιο (366 αμινοξικά κατάλοιπα)

Πιθανή εντόπιση: Ασαφής

Πιθανά λειτουργικά χαρακτηριστικά: Ασαφή

Ομόλογη πρωτεΐνη: HmsT (390 αμινοξικά κατάλοιπα)

Ταυτότητα: 82% (319/390)

Ομοιότητα: 88% (347/390)

ORF-6

Συντεταγμένες: 4366185 - 4367714

Πιθανό προϊόν: Πολυπεπτίδιο (509 αμινοξικά κατάλοιπα)

Πιθανή εντόπιση: Ασαφής

Πιθανά λειτουργικά χαρακτηριστικά: Ασαφή

Ομόλογη πρωτεΐνη: HmsP (728 αμινοξικά κατάλοιπα).

Ταυτότητα: (περιοχή 1) 88% (212/241) (περιοχή 2) 66% (197/297)

Ομοιότητα: (περιοχή 1) 94% (227/241) (περιοχή 2) 79% (235/297)

3.12. Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης παρουσιάζονται στους Πίνακες 24-28. Τεκμηριώνεται στατιστικά η επίδραση της παραγωγής βιομεμβράνης στα επίπεδα αντοχής στα αντιβιοτικά (Πίνακας 24). Εμφανίζεται επίσης μία αρνητική συσχέτιση της παρουσίας του πλασμιδίου pYV με τις τιμές MIC στις αμινογλυκοσίδες αμικασίνη και γενταμικίνη (Πίνακες 25-28). Δεν παρατηρήθηκαν αντίστοιχες συσχετίσεις με τα επίπεδα αντοχής στα άλλα αντιβιοτικά.

Πίνακας 24.

	Μέση τιμή (Mean)	Διαφορές κατά ζεύγη (Paired Differences)					t	Βαθμοί ελευθερίας (df)	Τιμή p (2-tailed)
		Τυπική απόκλιση (Std. Deviation)	Τυπικό Σφάλμα (Std. Error Mean)	95% Ορια αξιοπιστίας (Confidence Interval of the Difference)					
				Κατώτερο	Ανώτερο				
Ζεύγος 1	91,867	43,199	5,577	80,707	103,026	16,473	59	,000	
Ζεύγος 2	2260,000	655,159	84,581	2090,754	2429,246	26,720	59	,000	
Ζεύγος 3	80,267	49,388	6,376	67,508	93,025	12,589	59	,000	
Ζεύγος 4	112,967	36,323	4,689	103,583	122,350	24,090	59	,000	
Ζεύγος 5	97,683	40,796	5,267	87,145	108,222	18,547	59	,000	
Ζεύγος 6	125,950	8,133	1,050	123,849	128,051	119,952	59	,000	
Ζεύγος 8	121,667	20,551	2,653	116,358	126,975	45,859	59	,000	
Ζεύγος 9	121,567	20,531	2,651	116,263	126,870	45,864	59	,000	
Ζεύγος 10	30,850	5,197	,671	29,507	32,193	45,979	59	,000	

Πίνακας 25.

Amikacin	CR-MOX	Αριθμός στελεχών	Μέση τιμή MIC Παρουσία βιομεμβράνης (Mean)	Τυπική Απόκλιση (Std. Deviation)
	-	13	118.15	24.034
	+	47	92.43	45.433

Τιμή p = 0.009

Πίνακας 26.

Amikacin	yad A	Αριθμός στελεχών	Μέση τιμή MIC Παρουσία βιομεμβράνης (Mean)	Τυπική Απόκλιση (Std. Deviation)
	-	7	128.00	0.000
	+	53	94.04	44.179

Τιμή p = 0.000

Πίνακας 27.

Amikacin	vir F	Αριθμός στελεχών	Μέση τιμή MIC Παρουσία βιομεμβράνης (Mean)	Τυπική Απόκλιση (Std. Deviation)
	-	7	128.00	0.000
	+	53	94.04	44.179

Τιμή p = 0.000

Πίνακας 28.

Gentamicin	CR-MOX	Αριθμός στελεχών	Μέση τιμή MIC Παρουσία βιομεμβράνης (Mean)	Τυπική Απόκλιση (Std. Deviation)
	-	13	89.23	52.647
	+	47	121.02	27.135

Τιμή p = 0.054

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της οροτυπίας και της βιοτυπίας, παρά το γεγονός ότι αναφέρονται σε μικρό αριθμό στελεχών *Y. enterocolitica* (N=60) προερχομένων από ασθενείς της περιοχής της Αττικής, δείχνουν σαφώς την κυριαρχία του παθογόνου βιο-οροτύπου 4/O:3 και τη σποραδική παρουσία του βιο-οροτύπου 2/O:9. Πάντως το δείγμα των στελεχών που εξετάστηκαν δεν θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως επιλεγμένο δεδομένου ότι περιλάμβανε όλες τις υερσίνιες που κατέστη δυνατόν να καλλιεργήθηκαν από τους ασθενείς που εισήχθησαν στο νοσοκομείο κατά τη διάρκεια μιάς σχετικά εκτεταμένης χρονικής περιόδου (2006 – 2011). Από τους 60 ασθενείς με υερσινίωση, οι 38 έπασχαν από κάποια μορφή θαλασσαιμίας (κυρίως πολυμεταγγιζόμενοι με μεσογειακή αναιμία). Ο υψηλός επιπολασμός των λοιμώξεων από *Y. enterocolitica* στη συγκεκριμένη ομάδα ασθενών έχει ήδη συζητηθεί στο Γενικό Μέρος (Τρίκκα 1983, Vrubaker 1991, Bottone 1997, Chin 2000) . Η κυριαρχία του βιο-οροτύπου 4/O:3 μεταξύ των νοσούντων απο υερσινίωση στον Ελληνικό χώρο φαίνεται να είναι διαχρονική σύμφωνα και με τα ευρήματα προηγούμενων μελετών (Κεχαγιά 2007, Kyriazi et al. 2000, Τρίκκα 1983). Επίσης, όπως έδειξαν τα αποτελέσματα της PFGE, μιάς τυποποιητικής μεθόδου με μεγάλη διακριτική ικανότητα, τα στελέχη του βιο-οροτύπου 4/O:3 ανήκαν στον ίδιο κλώνο. Αξιοσημείωτη ήταν επίσης και η μεγάλου βαθμού ομοιότητα των ηλεκροφορητικών προτύπων, γεγονός που δείχνει τη γενετική ‘σταθερότητα’ του κλώνου.

Από τα διαθέσιμα επιδημιολογικά και κλινικά δεδομένα, δεν ήταν δυνατόν να προσδιοριστούν με μια σχετική ακρίβεια οι πιθανές πηγές (προφανώς τρόφιμα) των στελεχών που προκάλεσαν λοίμωξη. Ωστόσο, η σημαντικότερη δεξαμενή των στελεχών του βιο-οροτύπου 4/O:3 στη χώρα μας φαίνεται να είναι τα ζώα παραγωγής (κυρίως οι χοίροι και, σε μικρότερο βαθμό, τα πουλερικά) όπως έχουν δείξει σχετικά πρόσφατες μελέτες (Kechagia et al. 2007).

Όπως ήταν αναμενόμενο για στελέχη *Y. enterocolitica* που είχαν προκαλέσει λοίμωξη, η πλειονότητα των μικροοργανισμών που εξετάστηκαν ήταν θετικά για διάφορους χρωμοσωματικά (*yst*) και πλασμιδιακά καθοριζόμενους λοιμογόνους παράγοντες (*yadA* και *virF*). Για την πιστοποίηση της παρουσίας του πλασμιδίου παθογένειας pYV, εκτός από την απομόνωσή του και την ταυτοποίηση των γονιδίων *yadA* και *virF* με PCR, χρησιμοποιήθηκε και η φαινοτυπική μέθοδος της καλλιέργειας παρουσία οξαλικού (δέσμευση ιόντων ασβεστίου με συνεπακόλουθη επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών Yop και αλλαγή της μορφολογίας των αποικιών). Η αξιοπιστία της φαινοτυπικής μεθόδου θα μπορούσε να χαρακτηριστεί μέτρια. Παρουσίαζε προβλήματα ειδικότητας (1 ψευδώς θετικό στέλεχος) και, κυρίως, προβλήματα ευαισθησίας (6 ψευδώς αρνητικά στελέχη) (Prgic et al. 1985). Αν και η φαινοτυπική μέθοδος καλλιέργειας σε MOX παραμένει χρήσιμη, η ευρεία εισαγωγή μοριακών μεθόδων όπως η PCR στο κλινικό εργαστήριο επιτρέπει τη ταχύτερη και

περισσότερο αξιόπιστη αναγνώριση των λοιμογόνων στελεχών *Y. enterocolitica*. Θα πρέπει επίσης να σχολιαστεί το γεγονός ότι 6 από τα στελέχη που είχαν προκαλέσει λοίμωξη δεν περιείχαν το πλασμίδιο παθογένειας pYV. Η πιθανότερη εξήγηση είναι ότι τα εν λόγω στελέχη απώλεσαν το pYV κατά τις ανακαλλιέργειες που ακολούθησαν την πρώτη απομόνωση (αν και είχε ληφθεί μέριμνα να περιοριστούν στο ελάχιστο δυνατό). Πράγματι, οι Li και συν. (1998) αναφέρουν υψηλή συχνότητα απώλειας του πλασμιδίου pYV μετά από ανακαλλιέργειες στελεχών *Y. enterocolitica* που ανήκαν σε διάφορους παθογόνους βιο-οροτύπους. Επιπρόσθετα, αν και pYV-αρνητικά στελέχη έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν εντερική λοίμωξη, αυτή είναι ελαφράς μορφής και μικρής διάρκειας και κατα κανόνα δεν χρήζει νοσοκομειακής περίθαλψης (Brubaker 1991).

Τα στελέχη *Y. enterocolitica* ήταν, στο σύνολό τους, ανθεκτικά στις αμινο-πενικιλίνες (π.χ. αμπικιλίνη) και στις κεφαλοσπορίνες πρώτης γενιάς (αντιπροσωπεύονταν από την κεφαλοθίνη («άγριος» φαινότυπος αντοχής [wild-type resistance phenotype]) (Stock and Wiedemann, 1999). Ενδιαφέρουσα παρατήρηση ήταν ότι, πλην ενός, όλα τα εξετασθέντα στελέχη εμφάνιζαν αντοχή ή μειωμένη ευαισθησία στο συνδυασμό αμοξικιλίνης-κλαβουλανικού οξέος (Πίνακας 18). Ο φαινότυπος αυτός οφείλεται στην παραγωγή δύο β-λακταμασών, των A και B, ειδικών για το είδος *Y. enterocolitica*. Τα αντίστοιχα γονίδια εντοπίζονται στο χρωμόσωμα. Η β-λακταμάση A έχει δράση πενικιλινάσης ενώ το ένζυμο B είναι κεφαλοσπορινάση με άλλοτε άλλη δυνατότητα επαγωγής (induction) (Cornelis 1975). Η αντοχή στο συνδυασμό αμοξικιλίνης- κλαβουλανικού οξέος οφείλεται στη δυνατότητα του αναστολέα να επάγει την παραγωγή σχετικά μεγάλων ποσοτήτων της β-λακταμάσης B σε συνδυασμό με τη σύγχρονη παραγωγή της β-λακταμάσης A (Pham et al. 1991, Pham et al. 1995). Η αντοχή στο συνδυασμό αμοξικιλίνης- κλαβουλανικού οξέος στο βιο-ορότυπο 4/O:3 ποικίλει, με την πλειονότητα των στελεχών να εμφανίζουν χαμηλές τιμές MIC (Stock and Wiedemann, 1999). Ο υψηλός επιπολασμός αντοχής στο συνδυασμό αμοξικιλίνης-κλαβουλανικού οξέος μεταξύ των στελεχών του παθογόνου βιο-οροτύπου 4/O:3 στη χώρα μας, όπως παρατηρήθηκε εδώ, επιβεβαιώνει προηγούμενα ευρήματα σε στελέχη *Y. enterocolitica* 4/O:3 που είχαν απομονωθεί από ζώα και περιβαλλοντικές πηγές (Kechagia et al. 2007, Κεχαγιά 2007). Αυτή η ιδιαιτερότητα των στελεχών 4/O:3 στην Ελλάδα θα μπορούσε να αποτελέσει θέμα περαιτέρω έρευνας.

Δεν ανευρέθηκαν στελέχη με αντοχή, ή έστω αισθητά μειωμένη ευαισθησία, στις κλινικά χρησιμοποιούμενες αμινογλυκοσίδες, στην κοτριμοξαζόλη, στη χλωραμφαινικόλη καθώς και στους νεότερους αντιμικροβιακούς παράγοντες όπως οι κεφαλοσπορίνες τρίτης και τέταρτης γενιάς, οι καρβαπενέμες και οι φθοριομένες κινολόνες (Cornelis 1975, Hoogkamp-Korstanje 1987, Gayraud et al. 1993). Η φαινόμενη απουσία ανθεκτικών πληθυσμών *Y. enterocolitica* στα αντιβιοτικά αυτά τα οποία, σημειωτέον, έχουν σε μεγάλο βαθμό χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία των λοιμώξεων όχι μόνο στους ανθρώπους αλλά και στα ζώα, δεν έχει εξηγηθεί. Θα μπορούσε να υποθεθεί ότι η απουσία αντοχής, τουλάχιστον στις

αμινογλυκοσίδες και στις νεότερες β-λακτάμες, πιθανόν να οφείλεται στην αδυναμία απόκτησης ή/και σταθεροποίησης πλασμιδίων αντοχής σε αντίθεση με τα περισσότερα είδη της οικογένειας *Enterobacteriaceae*.

Το πλέον αξιοσημείωτο εύρημα της παρούσας μελέτης είναι η τεκμηρίωση της ικανότητας στελεχών του είδους *Y. enterocolitica* (τουλάχιστον αυτών που ανήκουν στους παθογόνους βιο-οροτύπους 4/O:3 και 3/O:9) να σχηματίζουν βιομεμβράνη. Πράγματι, όλα τα στελέχη της συλλογής (N=60) εμφάνισαν αυτή τη δυνατότητα. Επιπρόσθετα, για την παραγωγή βιομεμβράνης, απαιτήθηκε μόνο η ύπαρξη ενός υλικού προσκόλλησης ενώ, σε καμία περίπτωση, δεν απαιτήθηκαν ειδικές συνθήκες καλλιέργειας (π.χ. συνθήκες ένδειας άνθρακα, αζώτου, ιόντων σιδήρου κ.λ.π., μειωμένη τάση οξυγόνου ή άλλες συνθήκες που θα προκαλούσαν stress και θα μπορούσαν να επάγουν την παραγωγή πολυσακχαριδικών πολυμερών και το σχηματισμό βιομεμβράνης). Τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα, σε συνδυασμό με ευρήματα προηγούμενων μελετών, υποδεικνύουν ότι η παραγωγή βιομεμβράνης θα μπορούσε να θεωρηθεί εγγενής ιδιότητα του είδους *Y. Enterocolitica* (Wang et al. 2004, Itoh et al. 2005). Παρατηρήθηκαν ποσοτικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των στελεχών στη παραγωγή βιομεμβράνης αλλά οι περισσότερες από αυτές βρίσκονταν εντός των ορίων του πειραματικού σφάλματος. Έτσι, θεωρήθηκε ότι τα εξετασθέντα στελέχη είχαν παρόμοια ικανότητα παραγωγής βιομεμβράνης και δεν κρίθηκε αναγκαία η κατάταξή τους με κριτήριο τη διαφορά βάρους του εξωπολυσακχαρίτη και του νερού που συγκρατεί.

Η χημική σύσταση του γλυκοκάλυκα δεν προσδιορίστηκε. Ωστόσο, η ύπαρξη 4 ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης στην *Y. enterocolitica* με διάταξη πολυκιστρονικού οπερονίου και με υψηλού βαθμού ομολογία με τα γονίδια *hms* (*hemin storage*) *hmsH*, *hmsF*, *hmsR*, *hmsS* τα προϊόντα των οποίων είναι οι γλυκοσυλτρανσφεράσες της *Y. pestis*, υποδεικνύουν ότι ο γλυκοκάλυκας των δύο ειδών είναι παρόμοιος και έχει ως κύριο συστατικό πολυμερές της 1,6-N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνης (Fetherston et al. 1992, Lillard et al. 1997, Perry et al. 2004, Wang et al. 2004, Itoh et al. 2005, Bobrov et al. 2008,). Δεν μπορούν, παρ'όλα αυτά, να διατυπωθούν υποθέσεις σχετικά με τη ρύθμιση της παραγωγής της βιομεμβράνης στο είδος *Y. enterocolitica*. Οι ομόλογες αλληλουχίες με τα ρυθμιστικά γονίδια *hmsT* και *hmsP* ήταν περιορισμένου μήκους. Αν και οι αντίστοιχες υποθετικές πρωτεΐνες περιείχαν τα αμινοξικά κατάλοιπα που είναι απαραίτητα για την εκδήλωση δραστηριότητας κυκλάσης και φωσφοδιεστεράσης, ήταν μικρότερου μήκους από τις HmsT και HmsP, αντιστοίχως (Kirillina et al. 2004, Bobrov et al. 2005, Simm et al. 2005). Έτσι, ούτε η εντόπισή τους στην κτταροπλασματική μεμβράνη ούτε η λειτουργικότητά τους μπορούν να προδικαστούν με ασφάλεια αν και η πιθανότητα να ρυθμίζουν *in trans* τη μεταγραφή του οπερονίου *hmsHFRS* στην *Y. enterocolitica* δεν θα πρέπει να αποκλειστεί.

Το πρόβλημα της ρύθμισης της παραγωγής βιομεμβράνης στην *Y. enterocolitica* περιπλέκεται ακόμα περισσότερο από την απουσία του γονιδίου *waaE* όπως προέκυψε από τα πειράματα ανίχνευσης με PCR. Η κύριος ρόλος του πολυπεπτιδίου WaaE που κωδικοποιείται

από το γονίδιο *waaE* σε διάφορα είδη της οικογένειας *Enterobacteriaceae* (η έκφρασή του έχει αναφερθεί και σε στέλεχος *Y. enterocolitica* του οροτύπου 8) είναι η υποκατάσταση της α-L-γλυκερο-D-επτοκυρανόζης από τη β-D-γλυκοκυρανόζη (δράση γλυκοσυλτρανσφεράσης) κατά τη διαδικασία της βιοσύνθεσης του κορμού του λιποπολυσακχαρίτη. Δευτερευόντως, το ένζυμο WaaE φαίνεται ότι συμμετέχει έμμεσα στη ρύθμιση της παραγωγής βιομεμβράνης (Guash et al. 1996, Regue et al. 2001, Izquiereo et al. 2002). Δύο πιθανές εξηγήσεις του αρνητικού αποτελέσματος για τη παρουσία *waaE* θα μπορούσαν να προταθούν:

α) Το ένζυμο WaaE δεν είναι απαραίτητο για τη βιοσύνθεση του κορμού του λιποπολυσακχαρίτη στους οροτύπους O:3 και O:9 στους οποίους ανήκαν τα στελέχη που εξετάστηκαν και,

β) Τα στελέχη των οροτύπων O:3 και O:9 διαθέτουν αντίστοιχο γονίδιο αλλά με διαφορές στην αλληλουχία από αυτήν του ορθολόγου *waaE* οι οποίες δεν επέτρεψαν τον υβριδισμό των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντίστοιχες περιοχές του βακτηριακού χρωμοσώματος.

Από τη σύγκριση των τιμών MIC των αντιβιοτικών, όπως παρουσιάζεται στους Πίνακες 21, 22 και 23, κατέστη σαφές ότι η παρουσία βιομεμβράνης αυξάνει δραματικά τα επίπεδα αντοχής όλων των στελεχών σε όλες τις τάξεις των αντιβιοτικών που εξετάστηκαν. Αν και οι συνθήκες προσδιορισμού των MIC μικροβιακών κυττάρων σε βιομεμβράνες δεν έχουν προτυποποιηθεί, τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται επιβεβαιώνουν προηγούμενα ευρήματα αναφορικά με την επιδραση των βιομεμβρανών στα επίπεδα αντοχής στις περισσότερες τάξεις αντιβιοτικών (Dunne 2002, Βαμβακοπούλου και συν. 2003). Επιπρόσθετα ενισχύουν τις ενδείξεις ότι, υπό τις πειραματικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν, η παραγωγή εξωπολυσακχαρίτη από την *Y. enterocolitica* είχε ως κατάληξη τη συγκρότηση βιομεμβράνης. Δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες διαφοροποιήσεις στο βαθμό αύξησης των τιμών MIC των οξιμινο-β-λακταμών (νεότερες κεφαλοσπορίνες και αζτρεονάμη). Πρέπει ωστόσο να σημειωθεί ότι η αύξηση των επιπέδων αντοχής στην ιμιπενέμη παρουσία βιομεμβράνης ήταν, σε σχετικά λίγα στελέχη, μικρότερη συγκριτικά με τα άλλα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Το γεγονός αυτό πιθανώς οφείλεται στη δυνατότητα των καρβαπενεμών, περιλαμβανομένης και της ιμιπενέμης, να αναστέλλουν πολλαπλές πενικιλινο-δεσμευτικές πρωτεΐνες (υπεύθυνες για τη βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης) και να ασκούν αντιμικροβιακή δράση κατά κυττάρων που, πρακτικά, βρίσκονται σε μεταβολική στάση (περίπτωση μικροβίων σε ώριμες βιομεμβράνες) (Coquet et al. 1998, Zhanel et al. 2007).

Η αύξηση των τιμών MIC της κοτριμοξαζόλης παρουσία βιομεμβράνης ήταν ιδιαίτερα υψηλή και παρόμοια για όλα τα στελέχη. Με εξαίρεση ένα στέλεχος με χαμηλή MIC, παρόμοιο φαινόμενο σημαντικής αύξησης των επιπέδων αντοχής παρατηρήθηκε και για την σπιροφλοξακίνη. Θεωρητικά, οι νεότερες φθοριομένες κινολόνες μπορούν να αναστείλλουν μικρόβια με χαμηλό ρυθμό μεταβολισμού. Ωστόσο, στις πειραματικές

συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη, οι σχετικές τιμές MIC της σιπροφλοξακίνης για τα 59 από τα 60 στελέχη ήταν ≥ 32 mg/L.

Ειδικής μνείας χρήζουν τα αποτελέσματα των δοκιμασιών ευαισθησίας στις αμινογλυκοσίδες παρουσία βιομεμβράνης. Αν και σε όλα τα στελέχη παρατηρήθηκε αύξηση των σχετικών τιμών MIC, η αύξηση αυτή ήταν σε σημαντικό αριθμό στελεχών μικρότερη (ιδιαίτερα στη νετιλμικίνη) συγκριτικά με αυτήν που παρατηρήθηκε για τους άλλους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Το γεγονός αυτό ήταν μη αναμενόμενο δεδομένου ότι οι συνθήκες που επικρατούν στο περιβάλλον της βιομεμβράνης (κυρίως η χαμηλή τάση οξυγόνου στα στρώματα πλησίον της επιφάνειας προσκόλλησης και η συνεπακόλουθη μείωση της κυτταρικής αναπνοής) καθώς και η ηλεκτροστατικής φύσης παρεμπόδιση της διείσδυσης της αρνητικά φορτισμένης αμινογλυκοσίδης στη βιομεμβράνη, δεν ευνοούν τη δράση αυτής της ομάδας των αντιβιοτικών (Coquet et al. 1998, Βαμβακοπούλου και συν. 2003). Τα διαθέσιμα δεδομένα δεν επιτρέπουν τη διατύπωση κάποιας βάσιμης εξήγησης. Η πιθανή χημική σύσταση του γλυκοκάλυκα που σχηματίζει η *Y. enterocolitica* (πολυμερές της 1,6-N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνης) δεν θα μπορούσε να δικαιολογήσει την παρατηρηθείσα αλληλεπίδραση μικροβίων-αμινογλυκοσιδών.

Η παραγωγή βιομεμβράνης στους περισσότερους παθογόνους μικροοργανισμούς συγκαταλέγεται στους λοιμογόνους παράγοντες και μάλιστα, σε ορισμένες περιπτώσεις (π.χ. *S. epidermidis* και *P. aeruginosa*), από τους πλέον σημαντικούς (Christensen et al 1982, Donlan and Costerton 2002, Dunne 2002). Αναφορικά με την *Y. enterocolitica*, το σύνολο σχεδόν των ερευνητικών προσπαθειών για την κατανόηση της παθογόνου δράσης της έχει εστιαστεί στους περίπλοκους μηχανισμούς προσβολής του εντερικού βλεννογόνου ενώ η πιθανή συμμετοχή του σχηματισμού βιομεμβρανών στη λοίμωξη έχει τύχει λίγης προσοχής. Ένας προφανής λόγος είναι οι τεχνικές δυσκολίες που θα έπρεπε να ξεπεραστούν για την ανάπτυξη αξιόπιστων in vivo μοντέλων για τη μελέτη του πιθανού ρόλου της βιομεμβράνης για ένα εντεροπαθογόνο μικροβιακό είδος. Η ικανότητα της *Y. enterocolitica* να σχηματίζει βιομεμβράνες σε μη έμβιες επιφάνειες είναι αδιαμφισβήτητη όπως έδειξαν και τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Ωστόσο, για την πιθανή συμμετοχή της βιομεμβράνης στην εντερική λοίμωξη θα μπορούσαν να διατυπωθούν σοβαρές ενστάσεις. Υπάρχουν ενδείξεις ότι για το σχηματισμό βιομεμβράνης από την *Y. enterocolitica* απαιτείται η κινητικότητα και η συρροή-συσσωμάτωση των μικροβιακών κυττάρων πάνω σε επιφάνειες (swarming motility). Αυτή η ιδιαίτερου τύπου κινητικότητα εξαρτάται από την έντονη κίνηση των μαστιγίων η έκφραση των οποίων επάγεται σε θερμοκρασίες μικρότερες των 30° C (Kim et al. 2008, Raczowska et al. 2011, Young et al. 1999). Παρ'όλα αυτά, δεν έχει αποδειχτεί ότι αυτού του είδους η κινητικότητα, που οπωσδήποτε δεν θα μπορούσε να συμβεί στο πεπτικό σύστημα του ανθρώπου, είναι η μοναδική ικανή και αναγκαία συνθήκη για τη παραγωγή βιομεμβράνης. Αλλωστε ορισμένες δομικές και λειτουργικές προσαρμογές της *Y. enterocolitica* πριν την έναρξη της προσβολής του εντερικού βλεννογόνου, όπως η αυξημένη

υδροφοβικότητα της κυτταρικής επιφάνειας του βακτηρίου και η αυτοσυγκόλληση (Bottone 1997), θα μπορούσαν να επηρεάσουν την παραγωγή εξωπολυσακχαριτών.

Συμπερασματικά:

Όλα τα στελέχη *Yersinia enterocolitica* που απομονώθηκαν κατά την περίοδο 2006-2011, πλην ενός, ανήκαν στον παθογόνο βιο-ορότυπο 4/O:3, ο οποίος φαίνεται ότι επικρατεί στην Ελλάδα, και παρουσίαζαν γενετική ομοιότητα,. Τα περισσότερα από τα στελέχη έφεραν το πλασμίδιο της παθογένειας pVY της *Yersinia enterocolitica* που κωδικοποιούσε για ποικίλους παράγοντες παθογένειας, καθώς και γονίδια χρωμοσωματικής εντόπισης που σχετίζονται με την λοιμογόνο δράση του μικροοργανισμού. Στην παρούσα μελέτη τεκμηριώθηκε για πρώτη φορά η ικανότητα των στελεχών *Yersinia enterocolitica* να συγκροτούν μικροβιακή βιομεμβράνη, ιδιότητα που είχε αποδειχθεί μόνο για την *Yersinia pestis* μέχρι σήμερα. Η παρουσία της βιομεμβράνης επηρέαζε τα επίπεδα αντοχής σε όλες τις τάξεις των αντιβιοτικών. Η διερεύνηση της δυνατότητας αυτής σε άλλους βιο-ορότυπους *Yersinia enterocolitica* καθώς και σε άλλα είδη *Yersinia* πιθανά θα διευκολύνει στην κατανόηση της παθογένειας καθώς και του κύκλου ζωής του μικροβίου αυτού.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aho K, Ahvonen P, Lassus A, Sievers K, Tiilikainen A. HL-A 27 in reactive arthritis. A study of *Yersinia* arthritis and Reiter's disease. *Arthritis Rheum.* 1974;17(5):521-526.
- Aho K, Ahvonen P, Lassus A, Sievers K, Tiilikainen A. HL-A antigen 27 and reactive arthritis. *Lancet.* 1973;2(7821):157.
- Ahvonen, P.1972. Human yersiniosis in Finland. 1. Bacteriology and serology. *Ann. Clin. Res.* 4:30–38.
- Aleksić S, Bockemühl J. Proposed revision of the Wauters et al. antigenic scheme for serotyping of *Yersinia enterocolitica*. *J. Clin. Microbiol.* 1984 Jul;20(1):99-102.
- Aleksić S, Bockemühl J. 1987. Diagnostic importance of H-antigens in *Yersinia enterocolitica* and other *Yersinia* species. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 9:279-284.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(17):3389-3402.
- Aulisio CC, Mehlman IJ, Sanders AC. 1980. Alkali method for rapid recovery of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from foods. *Appl Environ Microbiol.* 39:135-140.
- Baier R, Puppel H. Infections in man induced by *Yersinia enterocolitica* serovar 09 and 04. *Med Klin.* 1979;74(13):477-80.
- Batzilla J, Heesemann J, Rakin A. The pathogenic potential of *Yersinia enterocolitica* 1A. *Int J Med Microbiol.* 2011 301(7):556-61.
- Benvenga S, Santarpia L, Trimarchi F, Guarneri F (2006). Human thyroid autoantigens and proteins of *Yersinia* and *Borrelia* share amino acid sequence homology that includes binding motifs to HLA-DR molecules and T-cell receptor. *Thyroid* 16 (3): 225–236.
- Bhaduri S, Cottrell B, Pickard AR. Use of a single procedure for selective enrichment, isolation, and identification of plasmid-bearing virulent *Yersinia enterocolitica* of various serotypes from pork samples. *Applied and Environmental Microbiology.* 1997; 63(5):1657–1660.
- Bhaduri S, Smith JL. 2011. Virulence plasmid (pYV)-associated expression of phenotypic virulent determinants in pathogenic *Yersinia* species: a convenient method for monitoring the presence of pYV under culture conditions and its application for isolation/detection of *Yersinia pestis* in food. *Journal of Pathogens*, Art. ID 727313, doi:10.4061/ 2011/727313.
- Bhagat N, Viridi JS. Distribution of virulence-associated genes in *Yersinia enterocolitica* biovar 1A correlates with clonal groups and not the source of isolation. *FEMS Microbiology Letters.* 2007;266(2):177–183.
- Bhagat N, Viridi JS. The enigma of *Yersinia enterocolitica* biovar 1A. *Crit Rev Microbiol.* 2011 Feb;37(1):25-39.

- Bisset ML. 1976. *Yersinia enterocolitica* isolates from humans in California. *J. Clin. Microbiol.* 4:137.
- Black DS, Bliska JB. The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. *Molecular Microbiology.* 2000;37(3):515–527.
- Black RE, Jackson RJ, Tsai T, Medvesky M, Shayegani M, Feeley JC, MacLeod KI, Wakelee AM. Epidemic *Yersinia enterocolitica* infection due to contaminated chocolate milk. *N Engl J Med.* 1978 Jan 12;298(2):76-9.
- Blumberg, H. M., J. A. Kiehlbauch, and I. K. Wachsmuth. 1991. Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* O:3 infections: use of chromosomal DNA restriction fragment length polymorphisms of rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.* 29:2368-2374.
- Bobrov AG, Kirillina O, Forman S, Mack D, Perry RD. Insights into *Yersinia pestis* biofilm development: topology and co-interaction of Hms inner membrane proteins involved in exopolysaccharide production. *Environ. Microbiol.* 2008;108:1419–1432.
- Bobrov AG, Kirillina O, Perry RD. The phosphodiesterase activity of the HmsP EAL domain is required for negative regulation of biofilm formation in *Yersinia pestis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2005; 247:123–130.
- Bolin I, Forsberg A, Norlander L, Skurnik M, Wolf-Watz H. Identification and mapping of the temperature-inducible, plasmid-encoded proteins of *Yersinia spp.* *Infection & Immunity.* 1988;56(2):343–348.
- Bottone EJ. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin Microbiol Rev.* 1997 Apr;10(2):257-76.
- Brenner DJ, Bercovier H, Ursing J, Alonso JM, Carter GP, Mollaret HH. 1980. *Yersinia intermedia*: A new species of *Enterobacteriaceae* (formerly called *Yersinia enterocolitica*-like). *Curr. Microbiol.* 4, 207.
- Brubaker RR. Factors promoting acute and chronic diseases caused by yersiniae. *Clinical Microbiology Reviews.* 1991;4(3):309–324.
- Bruining A, De Wilde-Huizen CCM. A case of contamination of donor blood by *Yersinia enterocolitica* type 9. *Medikon Nederland.* 1975;4:25–26.
- Buchrieser, C, Buchrieser, O, Kristl, A, Kaspar, CW. Clamped homogeneous electric fields (CHEF) gel -electrophoresis of DNA restriction fragments for comparing genomic variations among strains of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia spp.* *Zbl Bakt*1994; 281, 457-70.
- Butler T, Islam M, Islam MR, Azad AK, Huq MI, Speelman P, Roy SK. Isolation of *Yersinia enterocolitica* and *Y. intermedia* from fatal cases of diarrhoeal illness in Bangladesh. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1984;78(4):449-50.
- Calvo C, Brault J, Alonso JM, Mollaret HH. New waterborne bacteriophages active on *Yersinia enterocolitica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1981;42(1):35-38.

- Carniel E. The *Yersinia* high-pathogenicity island. *International Microbiology*. 1999; 2: 161–167.
- Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture and drug resistance. *J. Bacteriol.* 2001; 183:5385-5394.
- Chin J. *Yersiniosis/ Intestinal Yersiniosis/ Extraintestinal Yersiniosis. Control of Communicable Diseases Manual*. Vol. 17. Washington, DC, USA: American Public Health Association; 2000.
- Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun.* 1982 Jul;37(1):318-26.
- Chu G, Vollrath D, Davis RW. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science*. 1986; 234(4783):1582-1585.
- Clark MA, Hirst BH, Jepson MA. M-cell surface $\beta 1$ integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. *Infection & Immunity*. 1998;66(3):1237–1243.
- CLSI. 2009a. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 19th informational supplement M100–S19. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- CLSI. 2009b. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; approved standard—8th edition. CLSI document M07–A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Corbel, M. J. 1979. The relationship between the protective and cross-reacting antigens of *Brucella* spp., *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Salmonella* serotypes of Kauffman-White group N. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 5:50–63.
- Cornelis, G. 1975. Distribution of B-lactamases A and B in some groups of *Yersinia enterocolitica* and their role in resistance. *J. Gen. Microbiol.* 91:391–402.
- Cornelis GR. The *Yersinia* deadly kiss. *Journal of Bacteriology*. 1998;180(21):5495–5504.
- Cornelis GR, Boland A, Boyd AP, et al. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1998;62(4):1315–1352.
- Coquet L, Junter GA, Jouenne T. Resistance of artificial biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem and tobramycin. *J Antimicrob Chemother.* 1998 Dec;42(6):755-60.
- Cover TL, Aber RC. 1989. *Yersinia enterocolitica*. *N Engl J Med.* 321:16-24.
- Crichton EP. 1978. Suppurative conjunctivitis caused by *Yersinia enterocolitica*. *Can. Med. Ass. J.* 118, 22.
- Delor I, Cornelis GR. Role of *Yersinia enterocolitica* YST toxin in experimental infection of young rabbits. *Infection & Immunity*. 1992;60(10):4269–4277.
- Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 2002. Sep;8(9):881-90.

- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002 Apr;15(2):167-93.
- Dudley MV, Shotts EB Jr. Medium for isolation of *Yersinia enterocolitica*. *J Clin Microbiol.* 1979 Aug;10(2):180-3.
- Dunne WM Jr. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev.* 2002 Apr;15(2):155-66.
- Fällman M, Persson C, Wolf-Watz H. *Yersinia* proteins that target host cell signaling pathways. *Journal of Clinical Investigation.* 1997;99(6):1153–1157.
- Fetherston JD, Schuetze P, Perry RD. Loss of the pigmentation phenotype in *Yersinia pestis* is due to the spontaneous deletion of 102 kb of chromosomal DNA which is flanked by a repetitive element. *Mol. Microbiol.* 1992; 6:2693–2704.
- Frederiksen, W. 1964. A study of some *Yersinia pseudotuberculosis*-like bacteria (“*Bacterium enterocoliticum*” and *Pasteurella X*), p. 103–104. In Proceedings of the 14th Scandinavian Congress on Pathology and Microbiology, Oslo, Norway.
- Fredriksson-Ahomaa M, Korkeala H. Low occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical, food, and environmental samples: a methodological problem. *Clin Microbiol Rev.* 2003 Apr;16(2):220-9.
- Garcia, J. A., L. Dominguez, J. L. Larsen, and K. Pedersen. 1998. Ribotyping and plasmid profiling of *Yersinia ruckeri*. *J. Appl. Microbiol.* 85:949-955.
- Gayraud, M., M. R. Scavizzi, H. H. Mollaret, L. Guillemini, and M. J. Hornstein. 1993. Antibiotic treatment of *Yersinia enterocolitica* septicemia: a retrospective review of 43 cases. *Clin. Infect. Dis.* 17:405–410.
- Grahek-Ogden D, Schimmer B, Cudjoe KS, Nygård K, Kapperud G. Outbreak of *Yersinia enterocolitica* serogroup O:9 infection and processed pork, Norway. *Emerg Infect Dis.* 2007 May;13(5):754-6.
- Grant T, Bennett-Wood V, Robins-Browne RM. Identification of virulence-associated characteristics in clinical isolates of *Yersinia enterocolitica* lacking classical virulence markers. *Infection & Immunity.* 1998;66(3):1113–1120.
- Grutzkau A, Hanski C, Hahn H, Riecken EO. Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer’s patches: a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other enteroinvasive bacteria. *Gut.* 1990;31(9):1011–1015.
- Guasch JF, Piqué N, Climent N, Ferrer S, Merino S, Rubires X, Tomas JM, Regué M. Cloning and characterization of two *Serratia marcescens* genes involved in core lipopolysaccharide biosynthesis. *J Bacteriol.* 1996 ;178(19):5741-5747.
- Gutman LT, Ottesen EA, Quan TJ, Noce PS, Katz SL. An inter-familial outbreak of *Yersinia enterocolitica* enteritis. *N Engl J Med.* 1973 Jun 28;288(26):1372-7.

- Hansen P, Wenzel B, Brix T, Hegedüs L (2006). "Yersinia enterocolitica infection does not confer an increased risk of thyroid antibodies: evidence from a Danish twin study". *Clin Exp Immunol* **146** (1): 32–8.
- Hinnebusch BJ, Perry RD, Schwan TG. Role of the *Yersinia pestis* hemin storage (*hms*) locus in the transmission of plague by fleas. *Science*. 1996;273:367–370.
- Hoogkamp-Korstanje, J. A. A., J. de Koning, and J. P. Samson. 1986. Incidence of human infection with *Yersinia enterocolitica* serotypes O:3, O:8 and O:9 and the use of indirect immunofluorescence in diagnosis. *J. Infect. Dis.* 153:138–141.
- Hoogkamp-Korstanje, J. A. A. 1987. Antibiotics in *Yersinia enterocolitica* infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 20:123–131
- Horisaka T, Fujita K, Iwata T, Nakadai A, Okatani AT, Horikita T, Taniguchi T, Honda E, Yokomizo Y, Hayashidani H. Sensitive and specific detection of *Yersinia pseudotuberculosis* by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol.* 2004 Nov;42(11):5349-52.
- Huang X, Yoshino KI, Nakao H, Takeda T. Nucleotide sequence of a gene encoding the novel *Yersinia enterocolitica* heat-stable enterotoxin that includes a pro-region-like sequence in its mature toxin molecule. *Microbial Pathogenesis.* 1997;22(2):89–97.
- Ibrahim, A. 1995. Genetic diversity among *Yersinia enterocolitica* strains as revealed by sequence analysis of the 16S rRNA gene. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 13:277-280.
- Ibrahim A, Liesack W, Stackebrandt E. 1992. Polymerase chain reaction-gene probe detection system specific for pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica*. *J Clin Microbiol.* 30:1942-1947.
- Ikeda M, Yu DT. The pathogenesis of HLA-B27 arthritis: role of HLA-B27 in bacterial defense. *Am J Med Sci.* 1998 Oct;316(4):257-63.
- Iriarte M, Sory MP, Boland A, Boyd AP, Mills SD, Lambermont I, Cornelis GR. TyeA, a protein involved in control of Yop release and in translocation of *Yersinia* Yop effectors. *EMBO J.* 1998 Apr 1;17(7):1907-18.
- Iriarte M, Vanooteghem JC, Delor I, Diaz R, Knutton S, Cornelis GR. The Myf fibrillae of *Yersinia enterocolitica*. *Molecular Microbiology.* 1993;9(3):507–520.
- Isberg RR. Discrimination between intracellular uptake and surface adhesion of bacterial pathogens. *Science.* 1991;252(5008):934–938.
- Isberg RR, Barnes P. Subversion of integrins by enteropathogenic *Yersinia*. *Journal of Cell Science.* 2001;114(1):21–28.
- Iteman, I., A. Guiyoule, and E. Carniel. 1996. Comparison of three molecular methods for typing and subtyping pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains. *J. Med. Microbiol.* 45:48-56.

- Itoh Y, Wang X, Hinnebusch BJ, Preston JF, III, Romeo T. Depolymerization of s-1,6-N-acetyl-D-glucosamine disrupts the integrity of diverse bacterial biofilms. *J. Bacteriol.* 2005; 187:382–387.
- Izquierdo L, Abitiu N, Coderch N, Hita B, Merino S, Gavin R, Tomás JM, Regué M. The inner-core lipopolysaccharide biosynthetic waaE gene: function and genetic distribution among some *Enterobacteriaceae*. *Microbiology.* 2002;148(Pt 11):3485-3496.
- Jacobs J, Jamaer D, Vandeven J, Wouters M, Vermeylen C, Vandepitte J. *Yersinia enterocolitica* in donor blood: a case report and review. *Journal of Clinical Microbiology.* 1989;27(5):1119–1121.
- Jalava K, Hakkinen M, Valkonen M, Nakari UM, Palo T, Hallanvuori S, Ollgren J, Siitonen A, Nuorti JP. An outbreak of gastrointestinal illness and erythema nodosum from grated carrots contaminated with *Yersinia pseudotuberculosis*. *J Infect Dis.* 2006 Nov 1;194(9):1209-16.
- Jarrett CO, Deak E, Isherwood KE, Oyston PC, Fischer ER, Whitney AR, Kobayashi SD, DeLeo FR, Hinnebusch BJ. Transmission of *Yersinia pestis* from an infectious biofilm in the flea vector. *J. Infect. Dis.* 2004 Aug 15;190(4):783-92.
- Jones TF. From pig to pacifier: chitterling-associated yersiniosis outbreak among black infants. *Emerg Infect Dis.* 2003 Aug;9(8):1007-9.
- Kanan TA, Abdulla ZA. Isolation of *Yersinia* spp. from cases of diarrhoea in Iraqi infants and children. *East Mediterr Health J.* 2009 Mar-Apr;15(2):276-84.
- Kapperud G, Namork E, Skurnik M, Nesbakken T. Plasmid-mediated surface fibrillae of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica*: relationship to the outer membrane protein YOP1 and possible importance of pathogenesis. *Infection & Immunity.* 1987;55(9):2247–2254.
- Kechagia N, Nicolaou C, Ioannidou V, Kourti E, Ioannidis A, Legakis NJ, Chatzipanagiotou S. Detection of chromosomal and plasmid--encoded virulence determinants in *Yersinia enterocolitica* and other *Yersinia* spp. isolated from food animals in Greece. *Int J Food Microbiol.* 2007 Sep 30;118(3):326-31.
- Kelesidis T, Balba G, Worthington M. Axillary abscess in a patient with *Yersinia enterocolitica* infection as a result of exposure to pork. *American Journal of Medicine.* 2008;121(3):p. e1.
- Kim TJ, Young BM, Young GM. Effect of flagellar mutations on *Yersinia enterocolitica* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 2008 Sep;74(17):5466-5474.
- Kirillina O, Fetherston JD, Bobrov AG, Abney J, Perry RD. HmsP, a putative phosphodiesterase, and HmsT, a putative diguanylate cyclase, control Hms-dependent biofilm formation in *Yersinia pestis*. *Mol. Microbiol.* 2004; 54:75–88.
- Kist M, Langmaack H, Just M. Spread of *Yersinia enterocolitica* infection within a hospital. *Dtsch Med Wochenschr.* 1980 Feb 8;105(6):185-9.

- Kohl S, Jacobson J, Nahmias A. 1975. *Yersinia enterocolitica* infection in children. J. Pediatr. 89, 77.
- Kot B, Trafny EA. The application of PCR to the identification of selected virulence markers of *Yersinia* genus. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 2004;7(1):27–31.
- Kotetishvili M, Kreger A, Wauters G, Morris JG Jr, Sulakvelidze A, Stine OC. 2005. Multilocus sequence typing for studying genetic relationships among *Yersinia* species. J Clin Microbiol. 43(6):2674-84.
- Kwaga J, Iversen JO, Misra V. 1992. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled polynucleotide probes. J Clin Microbiol. 30:2668-2673.
- Kyriazi Z, Chatzipanagiotou S, Trikka-Graphakos E, Legakis NJ, Tassios PT. Serotype, biotype and genomic DNA XbaI restriction fragment analysis of *Yersinia enterocolitica*, isolated from infected beta-thalassemic and nonthalassemic children in Greece. Clin Microbiol Infect. 2000 6(3):157-8.
- Lan, R., and P. R. Reeves. 2001. When does a clone deserve a name? A perspective on bacterial species based on population genetics. Trends Microbiol. 9:419-424.
- Lantz PG, Knutsson R, Blixt Y, Al Soud WA, Borch E, Rådström P. 1998. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in enrichment media and pork by a multiplex PCR: a study of sample preparation and PCR-inhibitory components. Int J Food Microbiol. 45:93-105.
- Larsen JH. The spectrum of clinical manifestations of infections with *Yersinia enterocolitica* and their pathogenesis. Contrib Microbiol Immunol. 1979;5:257-69.
- Leclercq A, Martin L, Vergnes ML, et al. Fatal *Yersinia enterocolitica* biotype 4 serovar O:3 sepsis after red blood cell transfusion. *Transfusion*. 2005;45(5):814–818.
- Lee LA, Gerber AR, Lonsway DR, et al. 1990. *Yersinia enterocolitica* O:3 infections in infants and children, associated with the household preparation of chitterlings. N Engl J Med.;322:984–987.
- Leirisalo M, Repo H, Tiilikainen A, Kosunen TU, Laitinen O. Chemotaxis in yersinia arthritis. HLA-B27 positive neutrophils show high stimulated motility in vitro. Arthritis Rheum. 1980 Sep;23(9):1036-44.
- Li H, Bhaduri S, Magee WE. Maximizing plasmid stability and production of released proteins in *Yersinia enterocolitica*. Appl Environ Microbiol. 1998 May;64(5):1812-1815.
- Lillard JW Jr, Fetherston JD, Pedersen L, Pendrak ML, Perry RD. Sequence and genetic analysis of the hemin storage (hms) system of *Yersinia pestis*. Gene. 1997; 193:13–21.
- Lobato, M. J., E. Landeras, M. A. Gonzalez-Hevia, and M. C. Mendoza. 1998. Genetic heterogeneity of clinical strains of *Yersinia enterocolitica* traced by ribotyping and relationships between ribotypes, serotypes, and biotypes. J. Clin. Microbiol. 36:3297-3302.

- Marra A, Isberg RR. Invasin-dependent and invasin-independent pathways for translocation of *Yersinia pseudotuberculosis* across the Peyer's patch intestinal epithelium. *Infection & Immunity*. 1997;65(8):3412–3421.
- Matthew, M., G. Cornelis, and G. Wauters. 1977. Correlation of serological and biochemical groupings of *Yersinia enterocolitica* with B-lactamases of the strains. *J. Gen. Microbiol.* 102:55–59.
- McIver, M. A., and R. M. Pike. 1934. Chronic glanders-like infection of face caused by an organism resembling *Flavobacterium pseudomallei* Whitmore, p. 16–21. In: *Clinical miscellany*, vol. 1. Mary Imogene Basset Hospital, Cooperstown, N.Y
- Menzies BE. Axillary abscess due to *Yersinia enterocolitica*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010;48(9):3438–3439.
- Miller VL, Farmer JJ, III, Hill WE, Falkow S. The aid locus is found uniquely in *Yersinia enterocolitica* serotypes commonly associated with disease. *Infection & Immunity*. 1989;57(1):121–131.
- Miller VL, Finlay BB, Falkow S. Factors essential for the penetration of mammalian cells by *Yersinia*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 1988;138:15–39.
- Mollaret HH, Bercovier H, Alonso JM. 1979. Summary of the data received at the WHO reference center for *Yersinia enterocolitica*. *Contr. Microbiol. Immun.* 5, 174.
- Mollaret H, Nicole P. On the frequency of lysogenicity in the new species, *Yersinia enterocolitica*. *C R Hebd Seances Acad Sci*. 1965 Jan 18;260:1027-9.
- Moriki S, Nobata A, Shibata H, et al. Familial outbreak of *Yersinia enterocolitica* serotype O9 biotype 2. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2010;16(1):56–58.
- Mors V, Pai CH. Pathogenic properties of *Yersinia enterocolitica*. *Infection & Immunity*. 1980;28(1):292–294.
- Najdenski, H., I. Itean, and E. Carniel. 1994. Efficient subtyping of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 32:2913-2920.
- O'Ev, Gall DG, Pai CH. 1990 *Yersinia enterocolitica*: mechanisms of microbial pathogenesis and pathophysiology of diarrhoea. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 5:173–179.
- O'Gara JP, Humphreys H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *J Med Microbiol*. 2001;50(7):582-7.
- Old DC, Adegbola RA. Relationships among broad-spectrum and narrow-spectrum mannose-resistant fimbrial hemagglutinins in different *Yersinia* species. *Microbiology and Immunology*. 1984;28(12):1303–1311.
- O'Loughlin EV, Gall DG, Pai CH. 1990. *Yersinia enterocolitica*: mechanisms of microbial pathogenesis and pathophysiology of diarrhoea. *J Gastroenterol Hepatol.* 5:173-179.

- Parkhill J, Wren BW, Thomson NR, Titball RW, Holden MT, Prentice MB, Sebahia M, James KD, Churcher C, Mungall KL, Baker S, Basham D, Bentley SD, Brooks K, Cerdeño-Tárraga AM, Chillingworth T, Cronin A, Davies RM, Davis P, Dougan G, Feltwell T, Hamlin N, Holroyd S, Jagels K, Karlyshev AV, Leather S, Moule S, Oyston PC, Quail M, Rutherford K, Simmonds M, Skelton J, Stevens K, Whitehead S, Barrell BG. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature*. 2001;413(6855):523-527.
- Pepe JC, Miller VL. *Yersinia enterocolitica* invasin: a primary role in the initiation of infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(14):6473–6477.
- Perry RD, Bobrov AG, Kirillina O, Jones HA, Pedersen L, Abney J, Fetherston JD. Temperature regulation of the hemin storage (Hms+) phenotype of *Yersinia pestis* is posttranscriptional. *J. Bacteriol*. 2004; 186:1638–1647.
- Persson C, Carballeira N, Wolf-Watz H, Fällman M. The PTPase YopH inhibits uptake of *Yersinia*, tyrosine phosphorylation of p130^{Cas} and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions. *EMBO Journal*. 1997;16(9):2307–2318.
- Pham JN, Bell SM, Hardy MJ, Martin L, Guiyoule A, Carniel E. Susceptibility to beta-lactam agents of *Yersinia enterocolitica* biotype 4, serotype O3 isolated in various parts of the world. *J Med Microbiol*. 1995 Jul;43(1):9-13.
- Pham JN, Bell SM, Lanzarone JY. A study of the beta-lactamases of 100 clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*. *J Antimicrob Chemother*. 1991 Jul;28(1):19-24.
- Poole K. Stress responses as determinants of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol*. 2012 May;20(5):227-234.
- Prigent-Combaret C, Vidal O, Dorel C, Lejeune P. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1999 Oct;181(19):5993-6002.
- Prpic JK, Robins-Browne RM, Davey RB. 1985. In vitro assessment of virulence in *Yersinia enterocolitica* and related species. *J Clin Microbiol*. 22:105-110.
- Prpic JK, Robins-Browne RM, Davey RB. 1987. Congo red pigmentation in *Yersinia enterocolitica* and related species. *Contrib Microbiol Immunol*. 9:190-194.
- Rabson AR, Koornhof HJ, Notman J, Maxwell WG. Hepatosplenic abscesses due to *Yersinia enterocolitica*. *Br Med J*. 1972 Nov 11;4(5836):341.
- Rackowska A, Skorek K, Brzostkowska M, Lasińska A, Brzostek K. Pleiotropic effects of a *Yersinia enterocolitica* ompR mutation on adherent-invasive abilities and biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett*. 2011 Aug;321(1):43-9.
- Rasmussen HN, Rasmussen OF, Christensen H, Olsen JE. Detection of *Yersinia enterocolitica* O:3 in faecal samples and tonsil swabs from pigs using IMS and PCR. *J Appl Bacteriol*. 1995 May;78(5):563-8.

- Ratnam S, Mercer E, Picco B, Parsons S, Butler R. A nosocomial outbreak of diarrheal disease due to *Yersinia enterocolitica* serotype O:5, biotype 1. *Journal of Infectious Diseases*. 1982;145(2):242–247.
- Regué M, Climent N, Abitiu N, Coderch N, Merino S, Izquierdo L, Altarriba M, Tomás JM. Genetic characterization of the *Klebsiella pneumoniae* waa gene cluster, involved in core lipopolysaccharide biosynthesis. *J Bacteriol*. 2001;183(12):3564-3573.
- Robins-Browne RM, Still CS, Miliotis MD, Koornhof HJ. Mechanism of action of *Yersinia enterocolitica* enterotoxin. *Infection & Immunity*. 1979;25(2):680–684.
- Sabina Y, Rahman A, Ray RC, Montet D. *Yersinia enterocolitica*: Mode of Transmission, Molecular Insights of Virulence, and Pathogenesis of Infection. *J Pathog*. 2011;2011:429069.
- Sansonetti P. Host-pathogen interactions: the seduction of molecular cross talk. *Gut*. 2002;50(3):iii2–iii8.
- Sakai T, Nakayama A, Hashida M, Yamamoto Y, Takebe H, Imai S. Outbreak of food poisoning by *Yersinia enterocolitica* serotype O8 in Nara prefecture: the first case report in Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2005 Aug;58(4):257-8.
- Schiemann DA. Synthesis of a selective agar medium for *Yersinia enterocolitica*. *Can J Microbiol*. 1979 Nov;25(11):1298-1304.
- Schiemann DA, Devenish JA. Relationship of HeLa cell infectivity to biochemical, serological, and virulence characteristics of *Yersinia enterocolitica*. *Infection & Immunity*. 1982;35(2):497–506.
- Schleifstein, J., and M. B. Coleman. 1939. An unidentified microorganism resembling *B. lignieri* and *Past. pseudotuberculosis* and pathogenic for man. *N. Y. State J. Med*. 39:1749–1753.
- Schubert S, Fischer D, Heesemann J. Ferric enterochelin transport in *Yersinia enterocolitica*: molecular and evolutionary aspects. *Journal of Bacteriology*. 1999;181(20):6387–6395.
- Sebes JI, Mabry EH Jr, Rabinowitz JG. Lung abscess and osteomyelitis of rib due to *Yersinia enterocolitica*. *Chest*. 1976 Apr;69(4):546-8.
- Shenkman, L., and E. J. Bottone. 1976. Antibodies to *Yersinia enterocolitica* in thyroid disease. *Ann. Intern. Med*. 85:735–739.
- Sigal LH. Update on reactive arthritis. *Bull Rheum Dis*. 2001;50(4):1-4.
- Simm R, Fetherston JD, Kader A, Romling U, Perry RD. Phenotypic convergence mediated by GGDEF-domain-containing proteins. *J. Bacteriol*. 2005; 187:6816–6823.
- Strieder T, Wenzel B, Prummel M, Tijssen J, Wiersinga W (2003). "Increased prevalence of antibodies to enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* virulence proteins in relatives of patients with autoimmune thyroid disease". *Clin Exp Immunol* **132** (2): 278–82.

- Stock I, Wiedemann B. An in-vitro study of the antimicrobial susceptibilities of *Yersinia enterocolitica* and the definition of a database. *J Antimicrob Chemother.* 1999 Jan;43(1):37-45.
- Sutherland IW. The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* 2001 May;9(5):222-7.
- Tennant SM, Grant TH, Robins-Browne RM. Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A. *FEMS Immunology and Medical Microbiology.* 2003;38(2):127–137.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995 Sep;33(9):2233-2239.
- Thoerner P, Kingombe CIB, Bogli-Stuber K, et al. PCR detection of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* and investigation of virulence gene distribution. *Applied and Environmental Microbiology.* 2003;69(3):1810–1816.
- Tipple MA, Bland LA, Murphy JJ, et al. Sepsis associated with transfusion of red cells contaminated with *Yersinia enterocolitica*. *Transfusion.* 1990;30(3):207–213.
- Toivanen P, Toivanen A (1994). Does *Yersinia* induce autoimmunity?. *Int Arch Allergy Immunol* **104** (2): 107–11.
- Toivanen P, Toivanen A, Olkkonen L, Aantaa S. Hospital outbreak of *Yersinia enterocolitica* infection. *Lancet.* 1973 Apr 14;1(7807):801-3.
- Tomer Y, Davies T (1993). "Infection, thyroid disease, and autoimmunity". *Endocr Rev* **14** (1): 107–20.
- Vesikari, T., K. Granfors, M. Maki, and P. Gronroos. 1980. Evaluation of ELISA in the diagnosis of *Yersinia enterocolitica* diarrhoea in children. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.*88:139–142.
- Vesikari T, Nurmi T, Maki M. Plasmids in *Yersinia enterocolitica* serotypes O:3 and O:9: correlation with epithelial cell adherence *in vitro*. *Infection & Immunity.* 1981;33(3):870–876.
- Vuong C, Otto M. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes Infect.* 2002 Apr;4(4):481-9.
- Wang X, Cui Z, Wang H, et al. Pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica* isolated from domestic dogs (*Canis familiaris*) belonging to farmers are of the same subtype as pathogenic *Y. enterocolitica* strains isolated from humans and may be a source of human infection in Jiangsu Province, China. *Journal of Clinical Microbiology.* 2010;48(5):1604–1610.
- Wang X, Li Y, Jing H, Ren Y, Zhou Z, Wang S, Kan B, Xu J, Wang L. Complete genome sequence of a *Yersinia enterocolitica* "Old World" (3/O:9) strain and comparison with the "New World" (1B/O:8) strain. *J Clin Microbiol.* 2011;49(4):1251-1259.

- Wang X, Preston JF, Romeo T. The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *J. Bacteriol.* 2004; 186:2724–2734.
- Wang X, Qiu H, Jin D, Cui Z, Kan B, Xiao Y, Xu Y, Xia S, Wang H, Yang J, Wang X, Hu W, Xu J, Jing H. O:8 serotype *Yersinia enterocolitica* strains in China. *Int J Food Microbiol.* 2008 Jul 31;125(3):259-66.
- Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol.* 2000. May;182(10):2675-9.
- Wauters G, Kandolo K, Janssens M. Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. *Contributions to Microbiology and Immunology.* 1987; 9: 14–21.
- Wauters G, Le Minor L, Chalon AM. Somatic and flagellar antigens of *Yersinia enterocolitica*. *Ann Inst Pasteur (Paris).* 1971 May;120(5):631-42.
- Weissfeld AS, Sonnenwirth AC. *Yersinia*--a Canadian organism? *J Pediatr.* 1981 Mar;98(3):504-6.
- Wilson M. Bacterial biofilms and human disease. *Sci Prog.* 2001;84(Pt 3):235-54.
- Winblad, S. 1975. Arthritis associated with *Yersinia enterocolitica* infection. *Scand. J. Infect. Dis.*7:191–195.
- Winblad S, Niléhn B, Sternby NH. *Yersinia enterocolitica* (*Pasteurella x*) in human enteric infections. *Br Med J.* 1966 Dec 3;2(5526):1363-6.
- Wordsworth P. Genes in the spondyloarthropathies. *Rheum Dis Clin North Am.* 1998 Nov;24(4):845-63.
- Young GM, Smith MJ, Minnich SA, Miller VL. The *Yersinia enterocolitica* motility master regulatory operon, *flhDC*, is required for flagellin production, swimming motility, and swarming motility. *J Bacteriol.* 1999 May;181(9):2823-2833.
- Yotsu R, Mii S, Hayashi R, Harada H, Furukawa K, Eto H. Erythema nodosum associated with *Yersinia enterocolitica* infection. *J Dermatol.* 2010 Sep;37(9):819-22.
- Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, Thomson K, Rubinstein E, Hoban DJ, Noreddin AM, Karlowsky JA. Comparative review of the carbapenems. *Drugs.* 2007;67(7):1027-52.
- Zumbihl R, Aepfelbacher M, Andor A, et al. The cytotoxin YopT of *Yersinia enterocolitica* induces modification and cellular redistribution of the small GTP-binding protein RhoA. *Journal of Biological Chemistry.* 1999;274(41):29289–29293.
- Βαμβακοπούλου ΣΕ, Κολονίτσιου Φ, Δημητρακόπουλος ΓΟ, Αναστασίου ΕΔ. 2003. Μικροβιακές βιομεμβράνες: Biofilms. *Δελτ. Ελλην. Μικροβιολ. Εταιρ.* 48:328-339.
- Κεχαγιά Ν. Μοριακή επιδημιολογία υερσινιώσεων στην Ελλάδα από στελέχη *Yersinia enterocolitica* προερχόμενα από ανθρώπους, ζώα και περιβαλλοντικές πηγές. Διδακτορική Διατριβή, Αθήνα, 2007.
- Κούρτη Ε, Σαμαράκη Β, Παπαβασιλείου Ι. 1984. Συχνότης απομονώσεως στελεχών *Yersinia* από διάφορα είδη πτηνών. *Δελτ. Ελλην. Μικροβιολ. Εταιρ.* 29:189-212.

Τρίκα Ε. Υερσίνιεσ και υερσινιώσεισ σε παιδιά με μεσογειική αναιμία. Διδακτορική Διατριβή, Αθήνα, 1983.