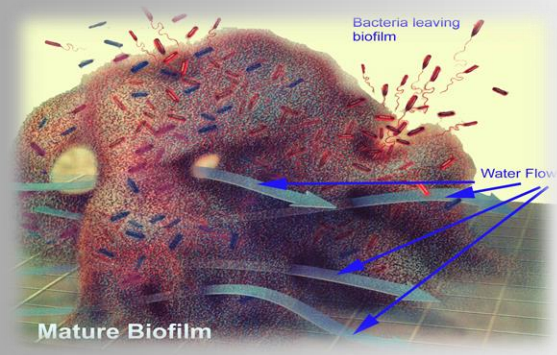
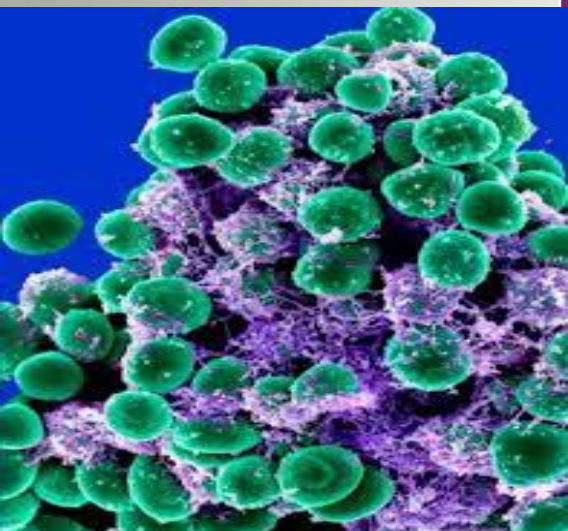




# ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΕΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΠΡΟΣΘΕΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ:



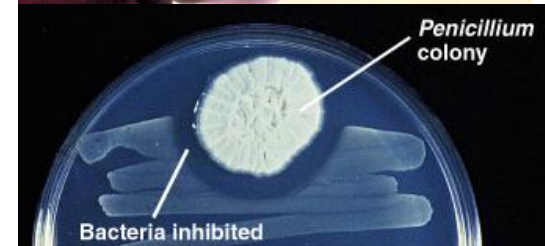
## Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΗΣ



Φ.ΚΟΛΟΝΙΤΣΙΟΥ  
ΕΠ.ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ  
ΤΜ.ΙΑΤΡΙΚΗΣ

# ΠΡΟ ΚΑΙ ΜΕΤΑ-ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΗ ΕΠΟΧΗ

- Προ- αντιβιοτική εποχή
  - Λοιμώξεις από κλασσικά παθογόνα
    - *S.pneumoniae*, *V.cholerae*, *Y.pestis*
- Antibiotic golden age
- Μετα-αντιβιοτική εποχή
  - Εμφάνιση και εξάπλωση ανθεκτικών βακτηρίων
  - Εμφάνιση χρόνιων λοιμώξεων που δύσκολα θεραπεύονται
    - Συνήθως λοιμώξεις από ευκαιριακά παθογόνα βακτήρια



# ΤΟ ΠΡΟΒΛΗΜΑ ΤΩΝ ΠΡΟΣΘΕΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

- ◉ Τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί η χρήση βιοιατρικών υλικών
  - Διαγνωστικά
  - Θεραπευτικά
- ◉ Η χρήση αυτών σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο βακτηριακών και μυκητιασικών λοιμώξεων ....

**Foreign body-related infections-FBRIs**

**Επιτείνεται το πρόβλημα των ενδονοσοκομειακών  
λοιμώξεων**

# ΤΟ ΠΡΟΒΛΗΜΑ ΤΩΝ ΠΡΟΣΘΕΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

Υλικό	Αρ. εμφυτευμένων υλικών /έτος ΗΠΑ	Ποσοστό λοίμωξης <sup>ο</sup> /ο	Θνητότητα
Ουροκαθετήρες	>30.000.000	10-30	χαμηλό
Κεντρικοί φλεβικοί καθετήρες	5.000.000	3-8	μέτριο
Οδοντικά εμφυτεύματα	1.000.000	5-10	χαμηλό
Αρθροπλαστικές	600.000	1-3	χαμηλό
Αγγειακά μοσχεύματα	450.000	1-5	μέτριο
Βηματοδότες	300.000	1-7	μέτριο
Μηχανικές βαλβίδες καρδιάς	85.000	1-3	υψηλό

# Medical Implant Killer or Saviour ?

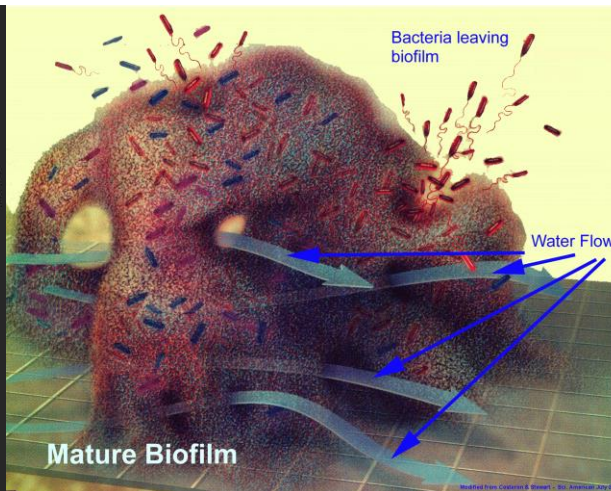
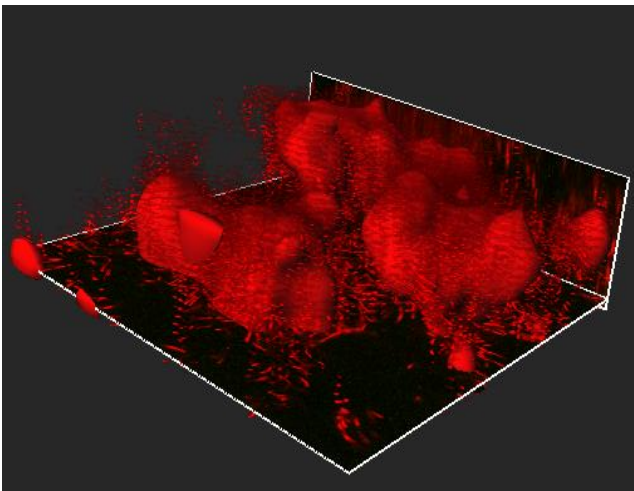


# ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ

- ⦿ Ικανότητα των βακτηρίων να προσκολλώνται στα προσθετικά υλικά και να σχηματίζουν βιομεμβράνη-biofilm

## ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΗ?

Βιομεμβράνη είναι μια κοινότητα μικροοργανισμών - ενός ή περισσότερων ειδών - τα οποία προκαλούν χρόνιες λοιμώξεις

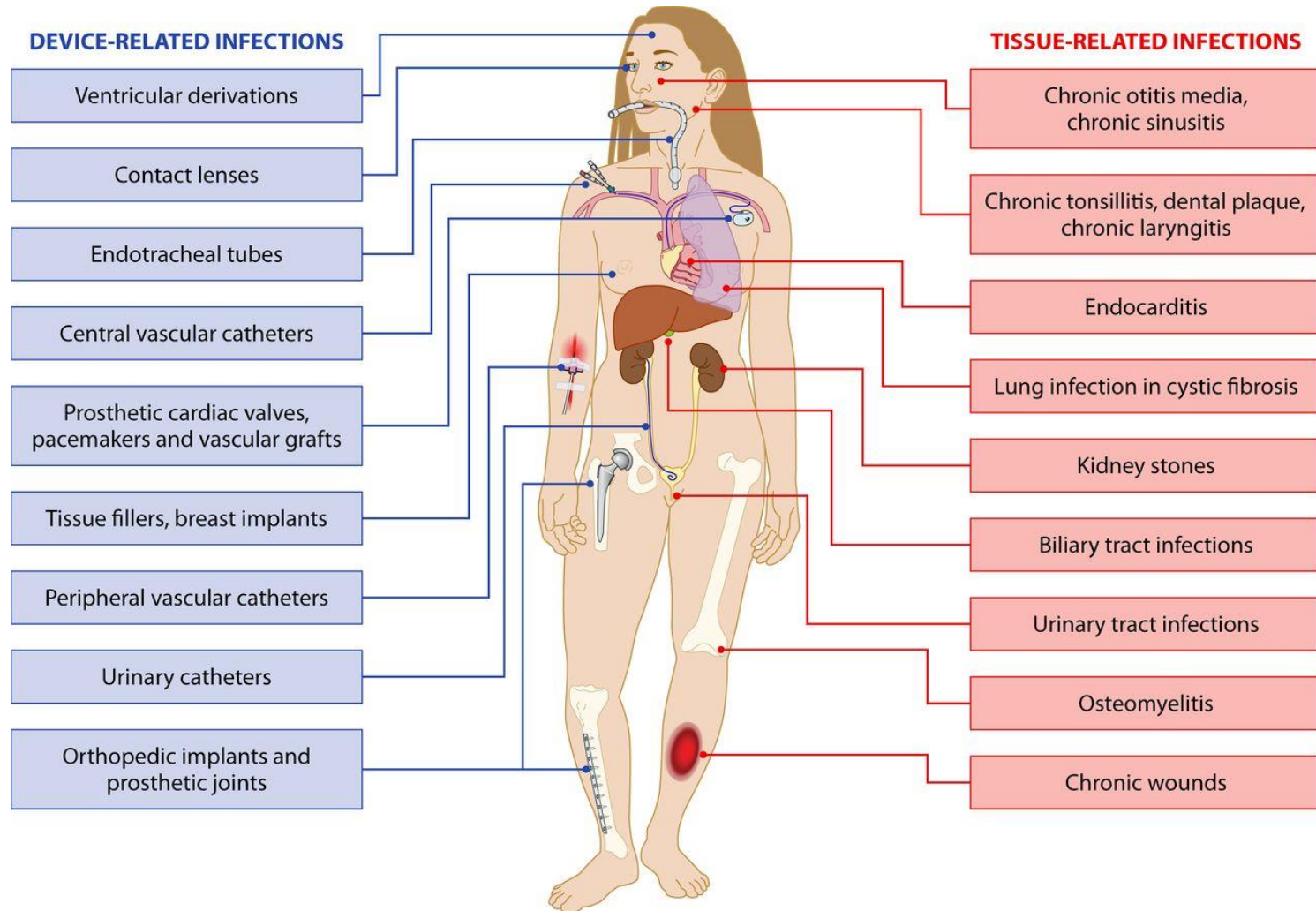


Ο σχηματισμός βιομεμβράνης είναι βασικό βήμα στην παθογένεια των **χρόνιων λοιμώξεων** - και στις λοιμώξεις που σχετίζονται με εμφυτευμένα υλικά

## Δύο σοβαρά προβλήματα

1. Οι βιομεμβράνες εκριζώνονται **δύσκολα** με αντιμικροβιακή αγωγή - δύσκολο πρόβλημα στην αντιμετώπιση αυτών των λοιμώξεων
2. Τα βακτήρια της βιομεμβράνης εμφανίζουν **υψηλή ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά**

# Που σχηματίζονται οι βιομεμβράνες?



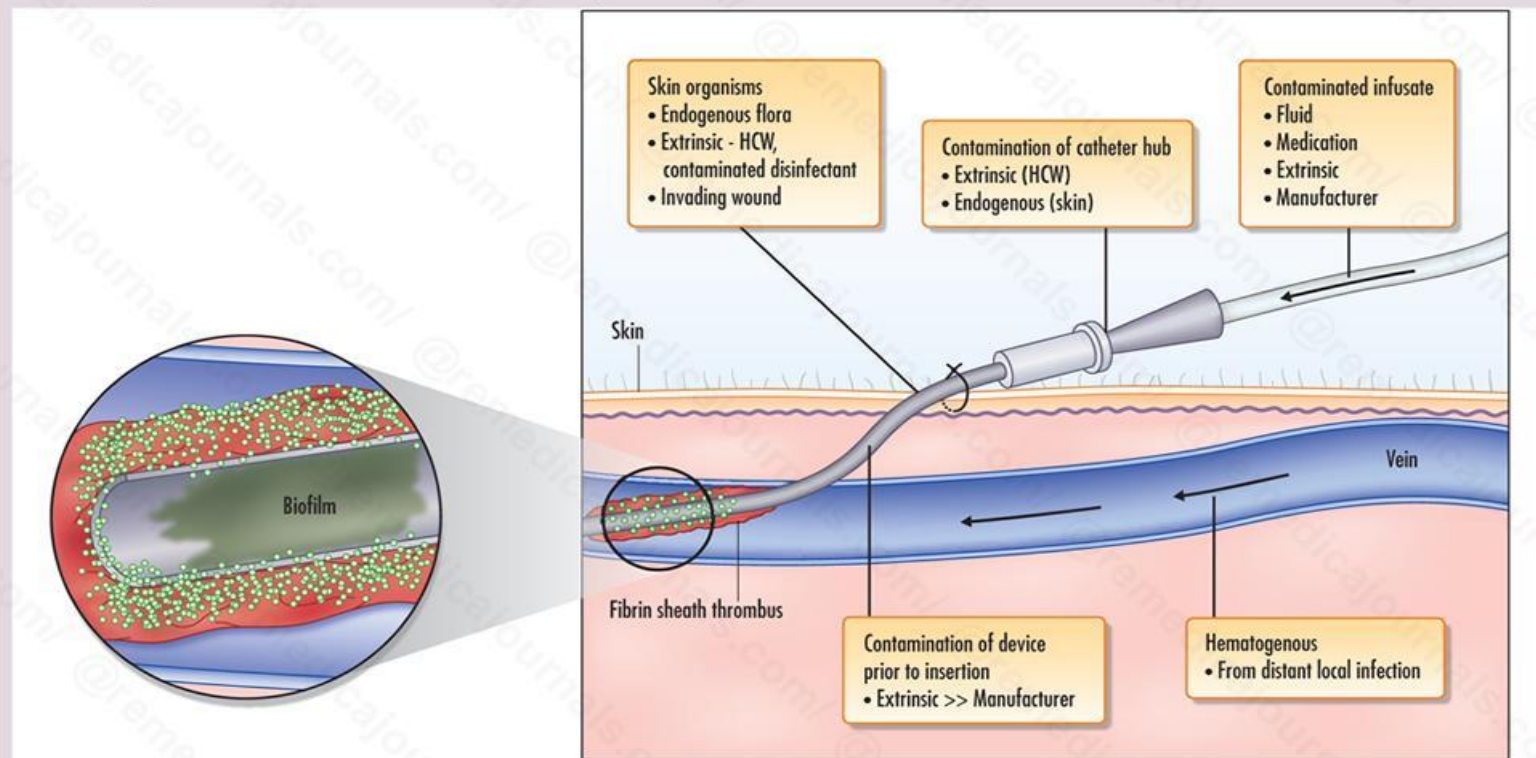
David Lebeaux et al. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2014;78:510-543

Microbiology and Molecular Biology Reviews



# ⦿ Λοιμώξεις ενδοφλέβιων καθετήρων

**Figure 2.** Diagram of an intravenous catheter with biofilm growth.

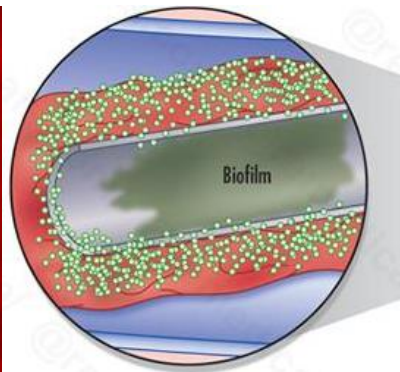
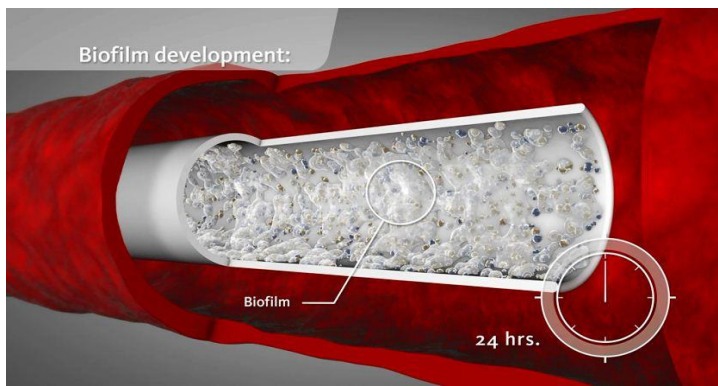


HCW: healthcare worker.

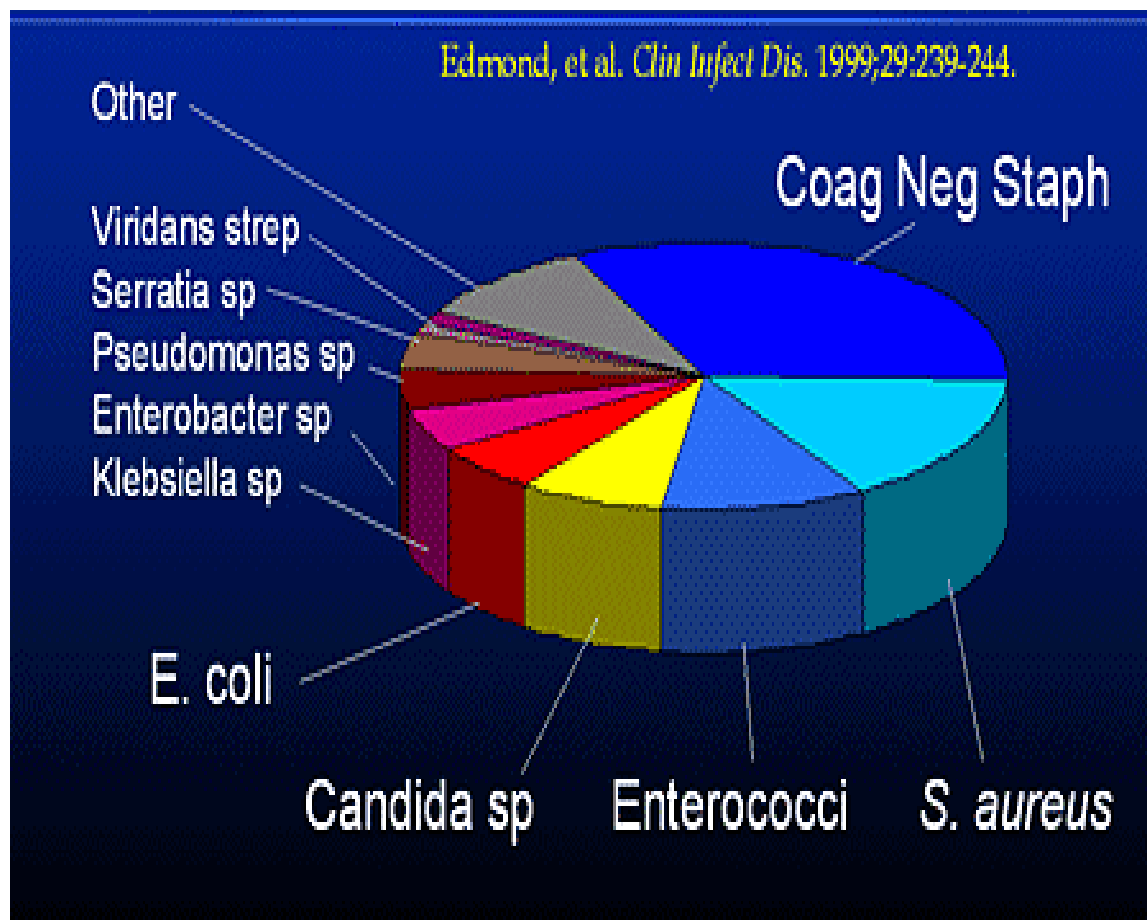
Image courtesy of Remedica Journals  
<http://www.remedicajournals.com/The-Journal-of-Invasive-Fungal-Infections/BrowseIssues/Volume-5-Issue-2/Article-The-Story-of-Biofilms>

# ⊙ Λοιμώσεις ενδοφλέβιων καθετήρων

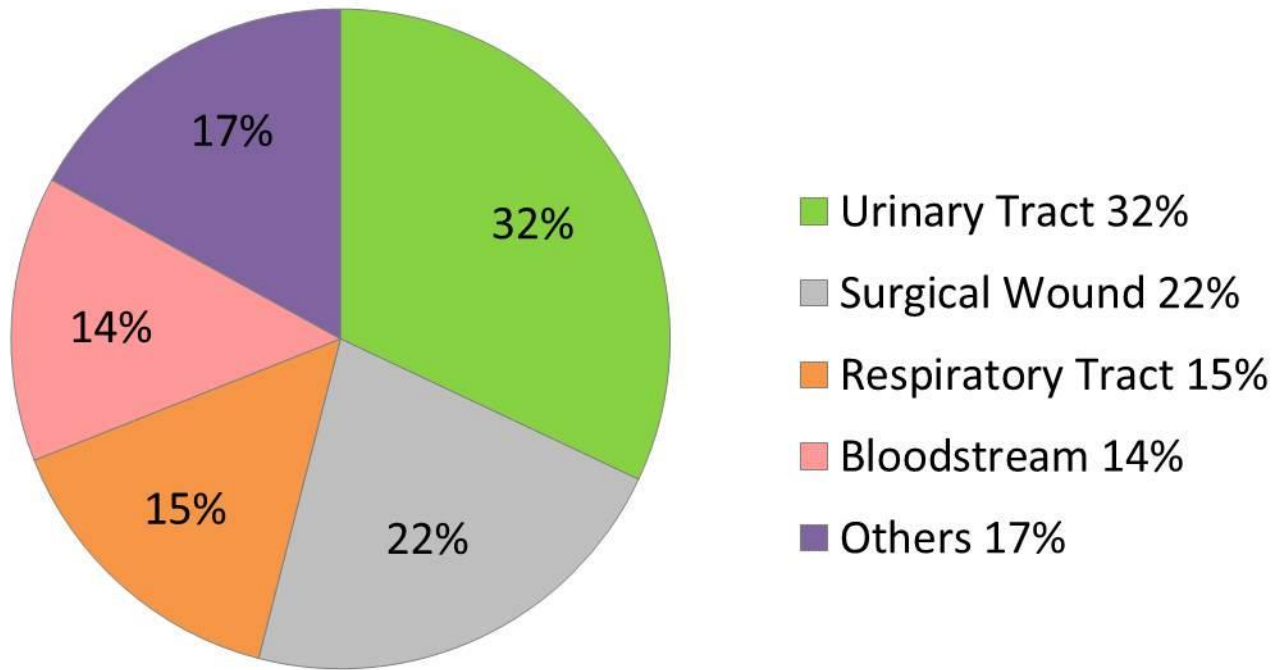
- ⊙ Ο αποικισμός γίνεται πολύ γρήγορα
  - Μέσα σε 24h
- ⊙ Καθετήρες που παραμένουν για λίγες μέρες ( μέχρι 10 ) αποικίζονται κυρίως **εξωτερικά**
- ⊙ Καθετήρες που παραμένουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα ( πάνω από 30 μέρες) σχηματίζουν περισσότερη **βιομεμβράνη στον αυλό**



# ΕΙΔΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ



# Λοιμώξεις ουροκαθετήρων



# Λοιμώξεις ουροκαθετήρων

Τοποθέτηση του καθετήρα



Εναπόθεση διαφόρων στοιχείων από τα ούρα  
Πρωτεΐνες, ηλεκτρολύτες κ.α.

Conditioning film

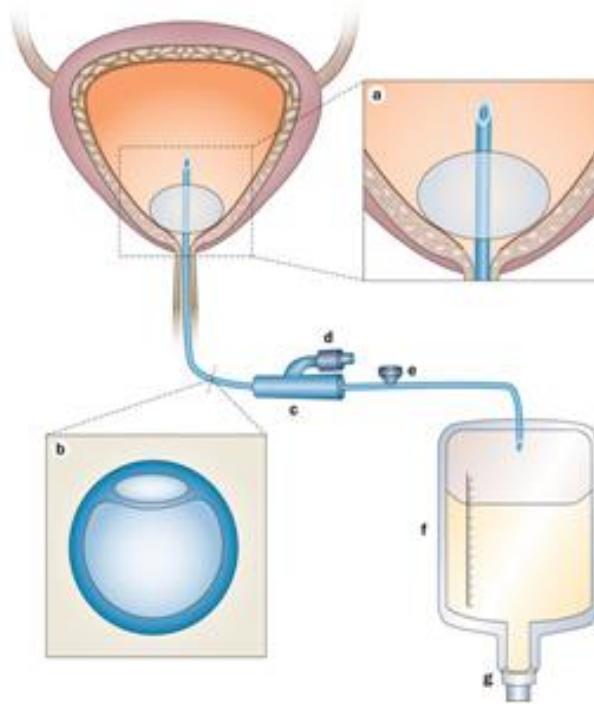


Προσκόλληση μικροβίων, έκκριση πολυσακχαριτών,  
σχηματισμός βιομεμβράνης



Ανιούσα λοίμωξη

# Λοιμώξεις ουροκαθετήρων



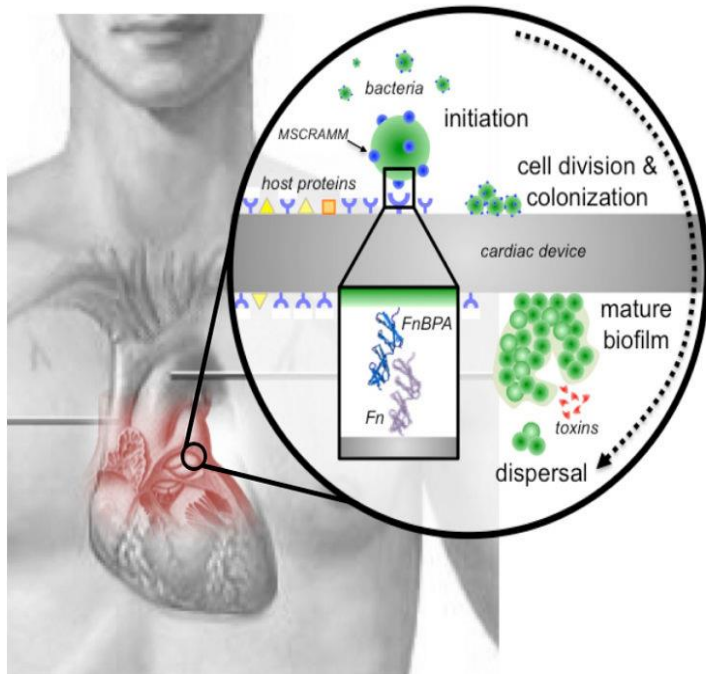
# Λοιμώξεις ουροκαθετήρων

Medscape®		www.medscape.com		
Species	Number (%) of catheters colonized by each species			
	All catheter biofilms	Mixed-species biofilms (76 catheters)	Single-species biofilms (30 catheters)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <sup>a</sup>	38 (35.9)	31 (40.8)	7 (23.3)	
<i>Enterococcus faecalis</i>	36 (34.0)	34 (44.7)	2 (6.7)	
<i>Escherichia coli</i>	33 (31.1)	31 (40.8)	2 (6.7)	
<i>Proteus mirabilis</i> <sup>a</sup>	32 (30.2)	26 (34.2)	6 (20.0)	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> <sup>a</sup>	19 (17.9)	18 (23.7)	1 (3.3)	
<i>Morganella morganii</i> <sup>a</sup>	14 (13.2)	11 (14.5)	3 (10.0)	
<i>Providencia stuartii</i>	11 (10.4)	9 (11.8)	2 (6.7)	
<i>Staphylococcus aureus</i> <sup>a</sup>	11 (10.4)	10 (13.2)	1 (3.3)	
<i>Enterobacter cloacae</i>	9 (8.5)	7 (9.2)	2 (6.7)	
<i>Klebsiella oxytoca</i> <sup>a</sup>	9 (8.5)	8 (10.5)	1 (3.3)	
<i>Providencia rettgeri</i> <sup>a</sup>	5 (4.7)	4 (5.3)	1 (3.3)	
Coagulase-negative staphylococci <sup>a</sup>	5 (4.7)	4 (5.3)	1 (3.3)	
<i>Citrobacter</i> species	4 (3.8)	4 (5.3)	0 (0.0)	
<i>Proteus vulgaris</i> <sup>a</sup>	3 (2.8)	2 (2.6)	1 (3.3)	

<sup>a</sup>Indicates species capable of producing urease. Table modified, with permission, from The Society for General Microbiology © Macleod SM and Stickler DJ (2007) *J Med Microbiol* 56: 1549–1557.

Source: Nat Clin Pract Urol © 2008 Nature Publishing Group

# ΕΝΔΟΚΑΡΔΙΤΙΔΑ ΠΡΟΣΘΕΤΙΚΩΝ ΒΑΛΒΙΔΩΝ



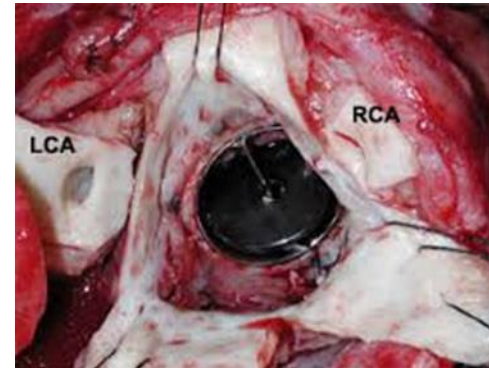
*S. epidermidis*

*S. aureus*

*Streptococcus spp*

Gram- αρνητικά βακτηρίδια

*Enterococcus spp*

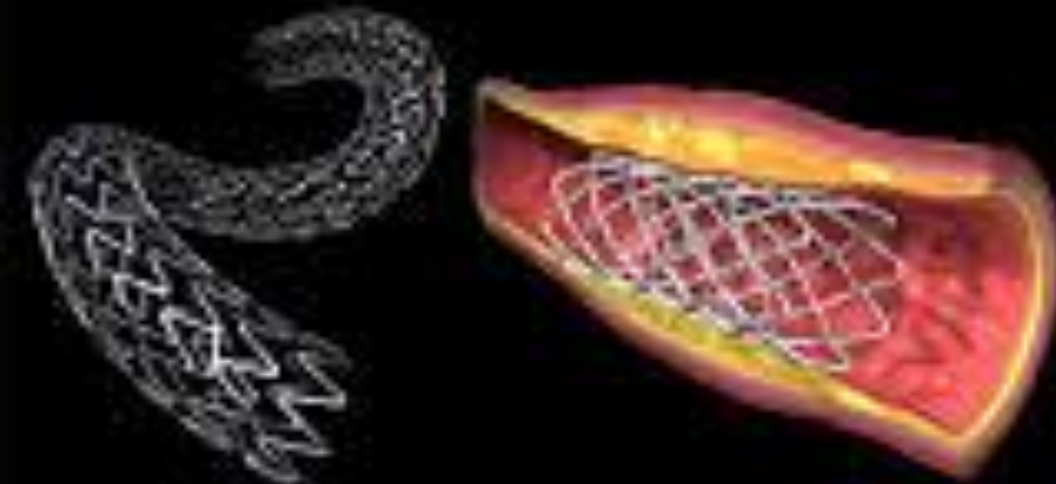


Early endocarditis : *S. epidermidis*

Μετά από οδοντική επέμβαση : *Streptococcus spp*



# Biofilm Streamers in Stents



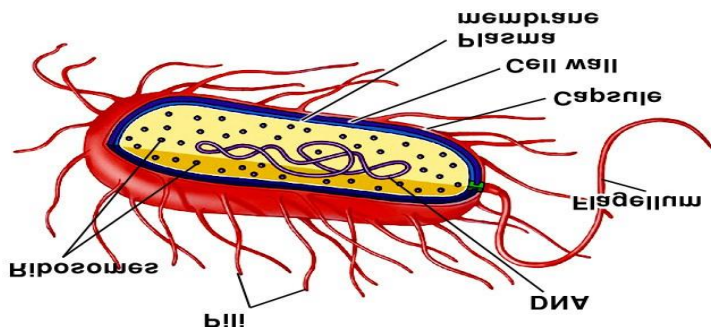
Biofilms clog stents

- Ureteral stents
- Biliary stents



# Βακτήρια

- ◉ Απλοί μονοκυττάριοι οργανισμοί
- ◉ Διαιρούνται με απλή διχοτόμηση
- ◉ Δεν αντιλαμβάνονται το περιβάλλον και δεν επικοινωνούν μεταξύ τους
- I think that a multiple of bacteria are stronger than a few and thus by union are able to overcome obstacles too great for the few



Smith 1905

# ΑΝΑΔΡΟΜΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- **Anton van Leeuwenhoek (17ος αιώνας):** Συσχετισμός οδοντικής πλάκας και ύπαρξης μικροοργανισμών.
- **Henrici (1933):** Τα βακτήρια δεν αιωρούνται ελεύθερα στο νερό αλλά αναπτύσσονται σε υποκείμενες επιφάνειες.
- **Heukelian & Heller (1940):** Χρησιμοποίηση του όρου “slime” και συσχετισμός προσκόλλησης με αυξημένη βακτηριακή ανάπτυξη και δραστηριότητα.

# ΑΝΑΔΡΟΜΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

## ➤ **Costerton (1978):**

Θεωρία δημιουργίας βιομεμβρανών. Το 99,9% των βακτηρίων σε όλα τα φυσικά οικοσυστήματα είναι προσκολλημένα σε διάφορες επιφάνειες.

## ➤ **Christensen (1982):**

Αναβίωση του όρου “**slime**” για το χαρακτηρισμό ενός εξωκυττάριου πολυμερούς (γλυκοκάλυκα), το οποίο παράγεται από προσκολλητικά στελέχη *S.epidermidis* σε ενδοφλέβιους καθετήρες.

✦ **1987:** Οι μικροβιακές βιομεμβράνες ενέχονται στην εμφάνιση χρόνιων λοιμώξεων που σχετίζονται με τη χρήση βιοϊατρικών υλικών.

# ΑΝΑΔΡΟΜΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

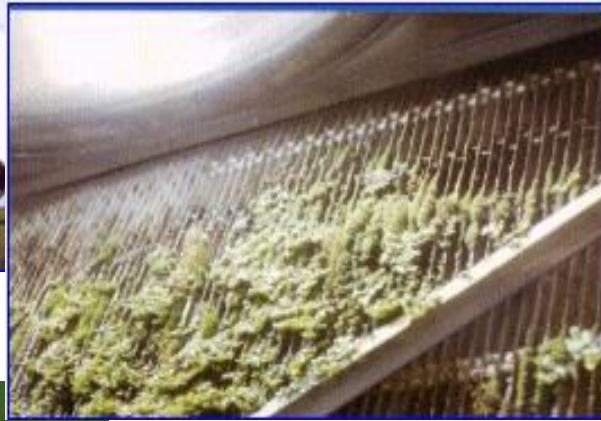
## Τελευταία 20ετία:

Μελέτη χημικής σύστασης και περιγραφή της μακροδομής των βιομεμβρανών.

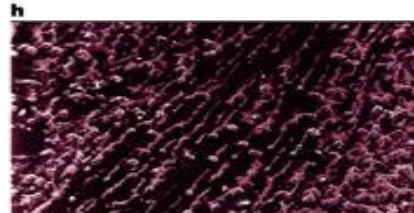
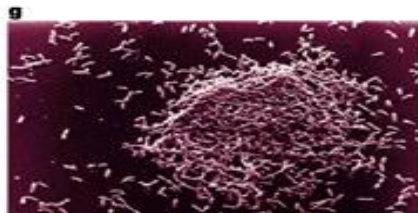
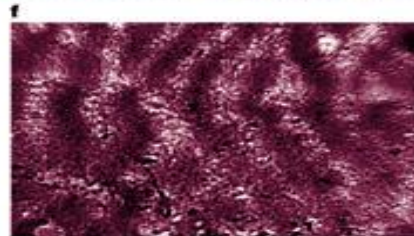
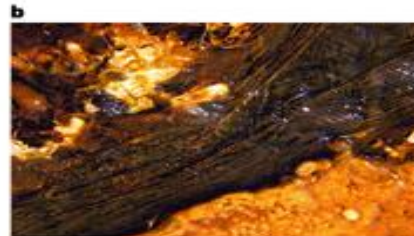
Γονίδια ρύθμισης παραγωγής των βιομεμβρανών

Ρόλος κυτταρο-κυτταρικής επικοινωνίας στην ανάπτυξη της βιομεμβράνης και την έκφραση λοιμογόνων παραγόντων

# BIOFILMS ARE EVERYWHERE

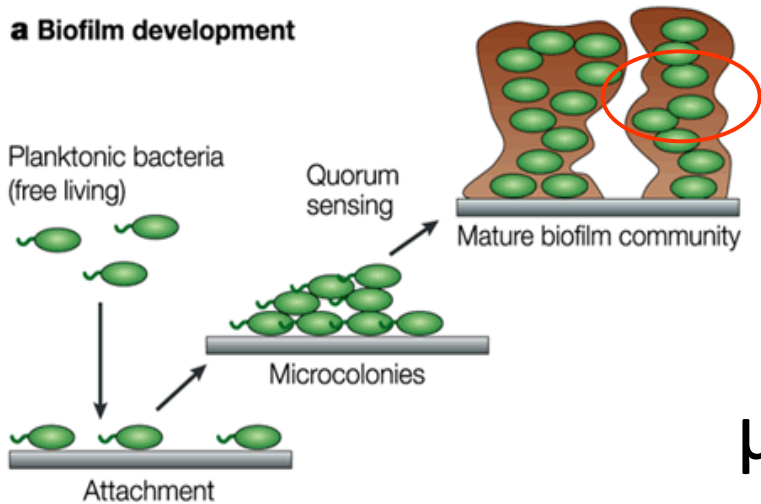


- ◎ Βακτηριακές βιομεμβράνες:
- ◎ Από το φυσικό περιβάλλον στη λοίμωξη



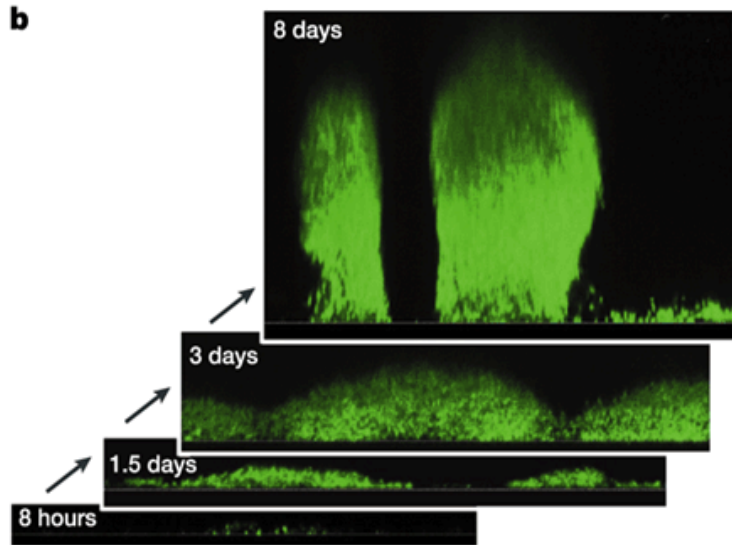
# ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΗΣ

## a Biofilm development



„ city of microbes“

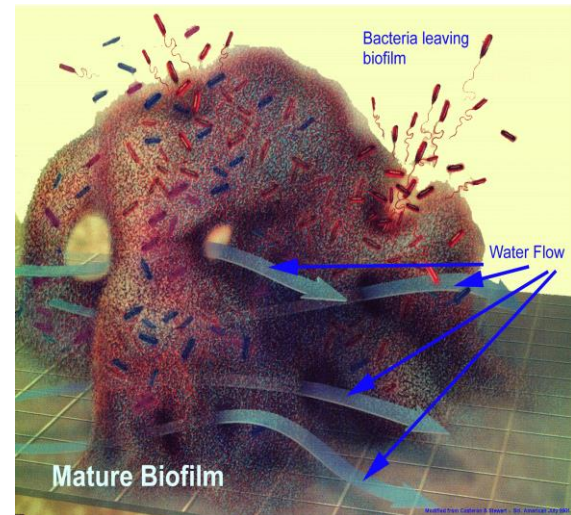
Κοινότητα βακτηρίων  
μέσα σε μια εξωκυττάρια  
πολυμερή ουσία  
(γλυκοκάλυκας, „slime“),  
προσκολλημένη σε  
αδρανή ή έμβυα  
επιφάνεια.

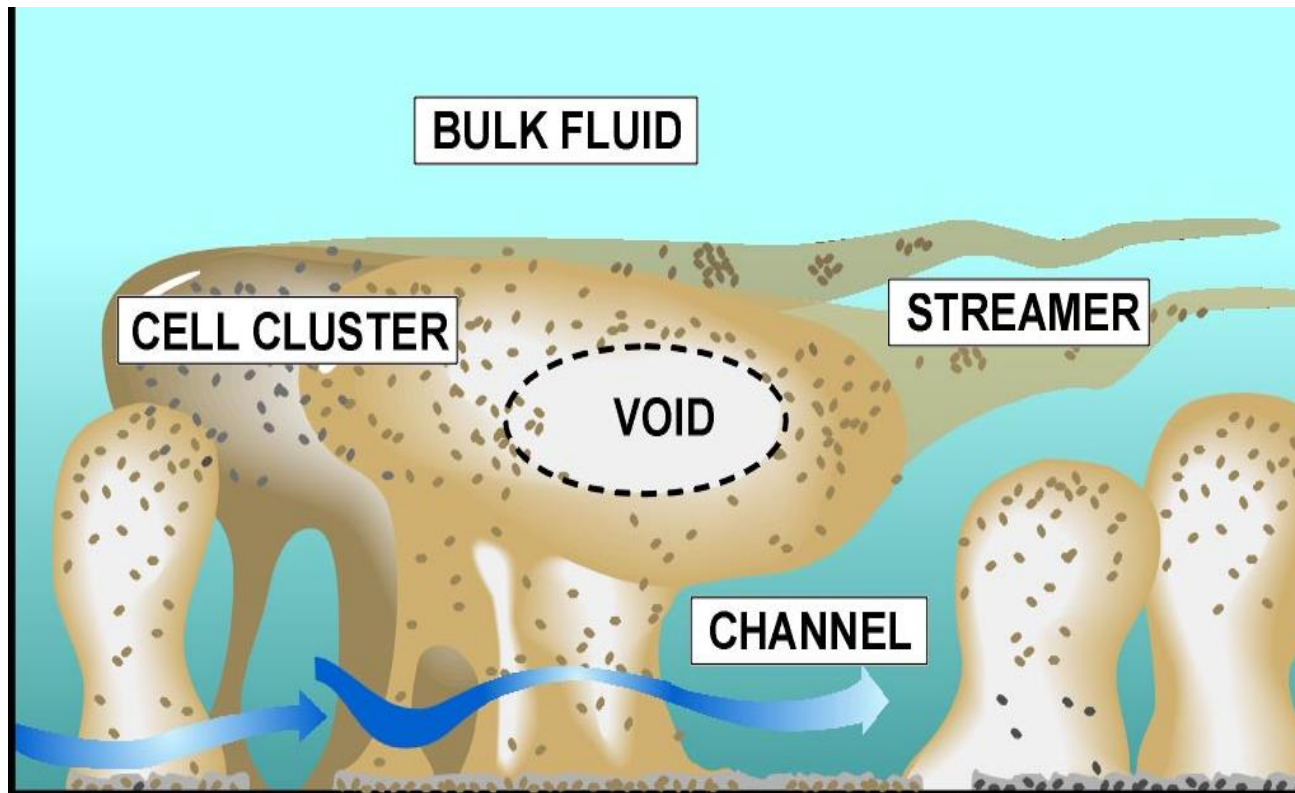




# ΜΑΚΡΟΔΟΜΗ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΩΝ

- ⊙ Μικροαποικίες σε **σχήμα μανιταριού** ή **πυραμίδας** που προεξέχουν από το υπόστρωμα ενώ ανάμεσά τους σχηματίζονται **ελεύθερες κοιλότητες** και **δίοδοι κυκλοφορίας υγρού**.
- ⊙ Εμφανίζουν **ετερογένεια** στη σύσταση
  - 15% βακτήρια,
  - 85% πολυσακχαριτικό στρώμα (~97% νερό)





Οργάνωση και συμπεριφορά αρχέγονου ιστού

# ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΗΣ

## ⊙ Προσκόλληση (Attachment)

- Cell – surface interaction

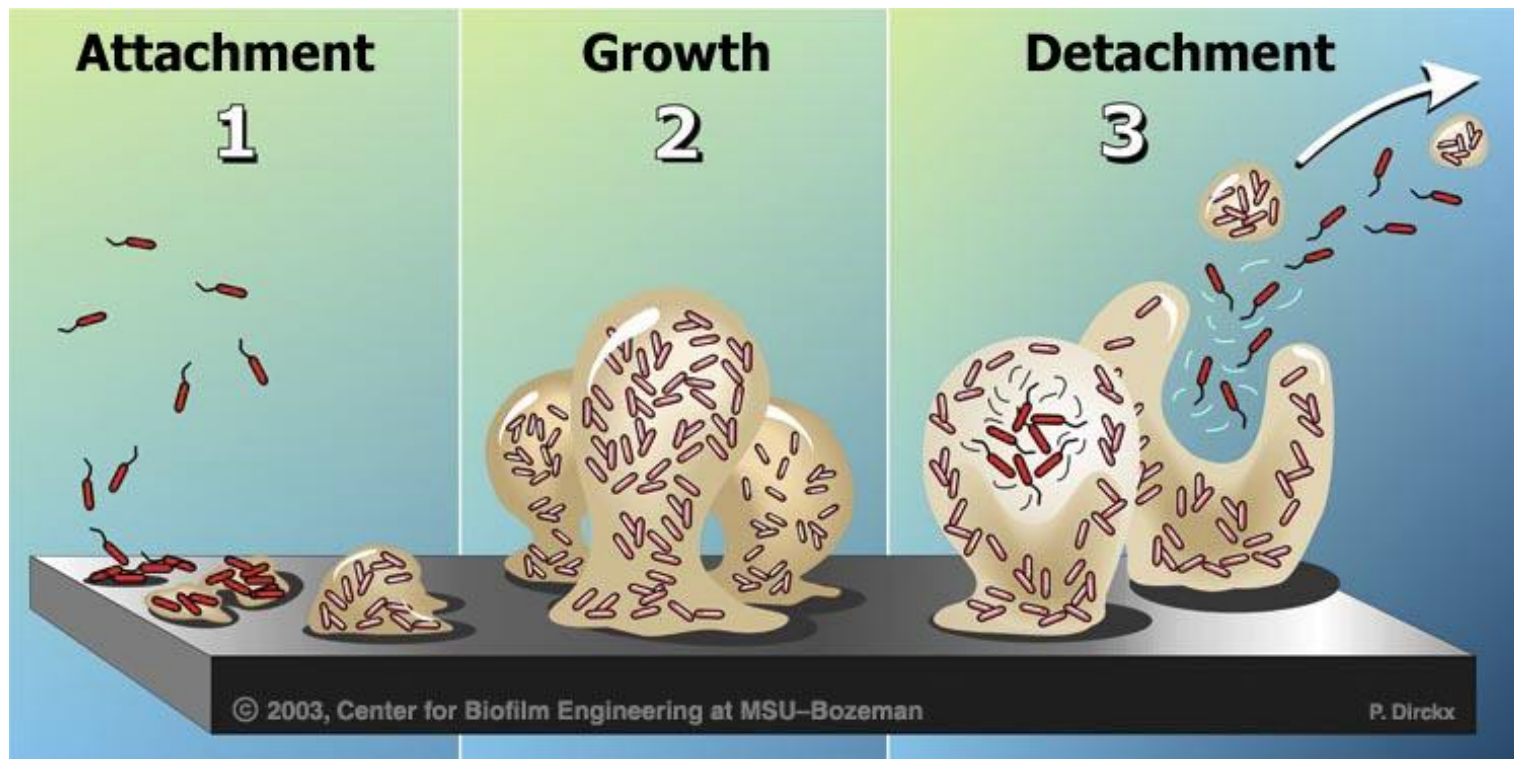
## ⊙ Ωρίμανση (Growth)

- Cell – cell interaction ... QUORUM SENSING
- 

## ⊙ Αποκόλληση (Detachment)

- Mechanical
- Starvation response

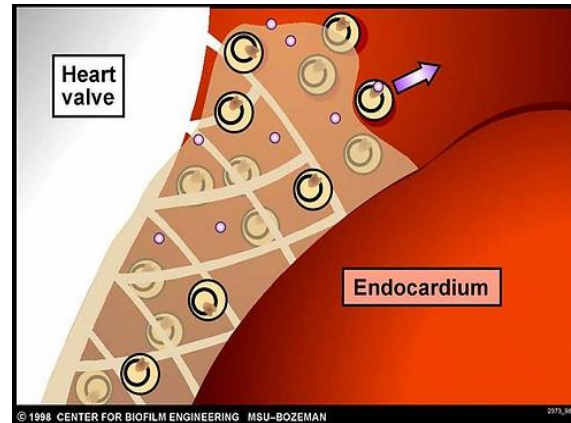
# ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΗΣ



# ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ ΠΡΟΣΚΟΛΗΣΗΣ ...

## ◎ Βιολογική ...

- Ιστοί
- Επιθήλια

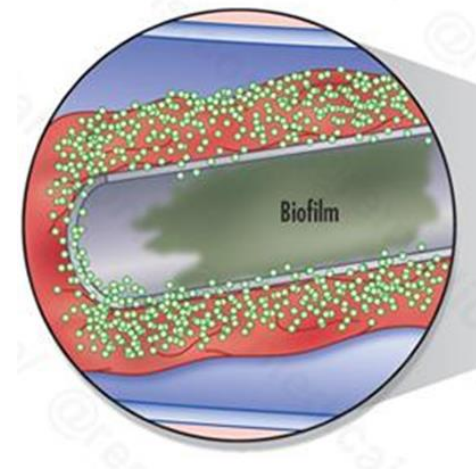


## ◎ Οργανική ...

- Βιο-ιατρικά υλικά (πλαστικοί καθετήρες, κτλ.)

## ◎ Ανόργανη ...

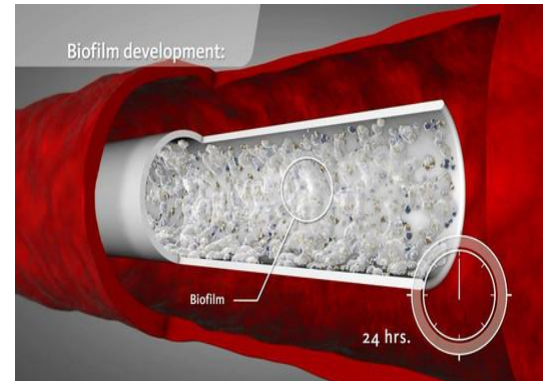
- Μεταλλικά προθέματα π.χ. τιτανίου
- Αδαμαντίνη – Υδροξυαπατίτης



# ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ

## ■ Ιδιότητες επιφάνειας

- Υφή : αδρή, λεία
- Φορτίο : ανιονικό, κατιονικό
- 
- Υδροφοβικότητα
- «**Surface conditioning**» : επικάλυψη με στοιχεία βιολογικών υγρών ή εκκρίσεων
- Είδος υλικού



# ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟ ΥΛΙΚΟ

## ◎ Τύπος υλικού

- Πολυβινύλιο, τεφλόν, πολυαιθυλένιο, πολυουραιθάνιο, latex , σιλικόνη

## ◎ Πηγή του προσθετικού υλικού

- Συνθετικά
- Βιοϋλικά

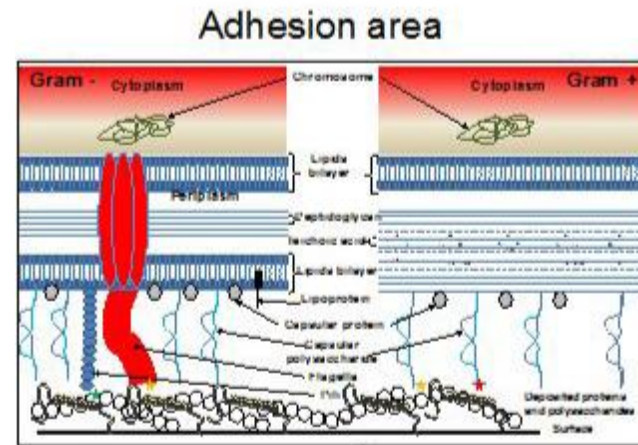
## ◎ Επιφάνεια υλικού

- Υδρόφοβη, υδρόφιλη, λεία

# ΠΡΟΣΚΟΛΗΣΗ

## ◎ Ιδιότητες βακτηρίου

- Υδροφοβικότητα
- Μόρια προσκόλλησης (fimbriae, pili...)
- LPS (λιποπολυσακχαρίτης)
- EPS (Εξωκυττάρια πολυσακχαρίτες)

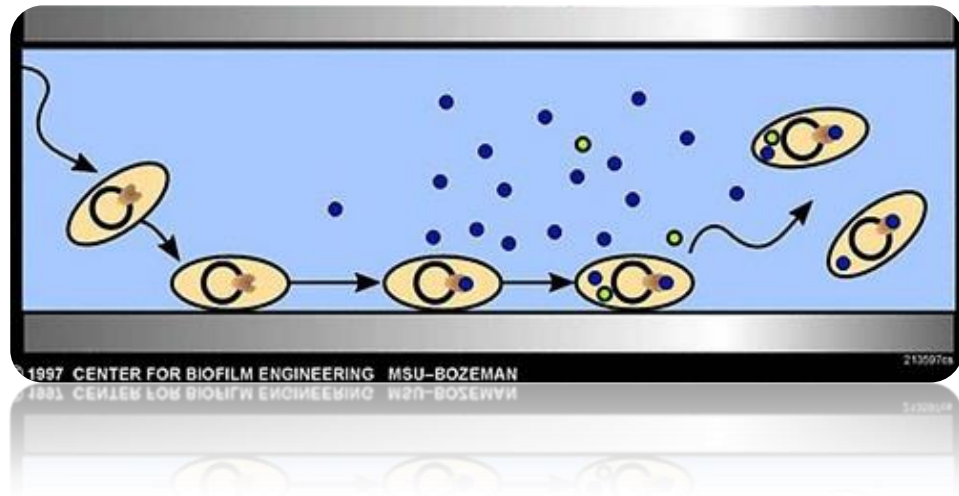




# ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΠΡΟΣΚΟΛΗΣΗΣ

## ⊙ Stage 1: Προσκόλληση μη ειδική και αναστρέψιμη

- Τυχαία προσέγγιση
- Χημειοταξία
- Φυσικές δυνάμεις
  - Ηλεκτροστατικές
  - Υδροδυναμικές
  - Υδρόφοβες
  - Wan der Waals

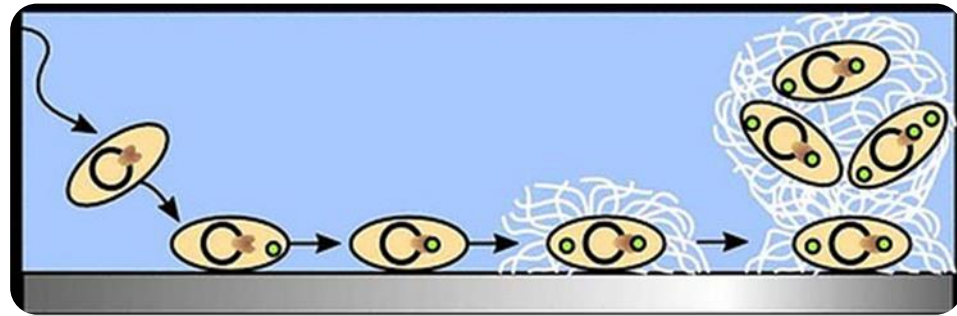


# ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΠΡΟΣΚΟΛΗΣΗΣ

## ◎ Stage 2: Προσκόλληση ειδική και μη αναστρέψιμη

### ■ Ειδικές προσκολλητίνες των μικροβίων

- MSCRAMMs (Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules)



### ■ Προσδέτες – μόρια της επιφάνειας :

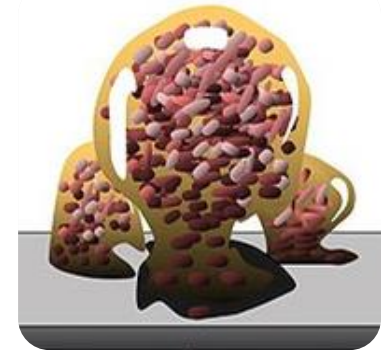
- ινωδογόνο
- ινοδονεκτίνη
- ινική
- αλβουμίνη, γλυκοζαμινογλυκάνες, κολλαγόνο, λαμινίνη ...

# ΠΡΟΣΚΟΛΗΣΗ ...

- ⊙ Αναγκαίο αλλά μη ικανό βήμα για τη δημιουργία Biofilm
- ⊙ Ενδιάμεσο βήμα από την πλανκτονική στην προσκολλημένη μορφή
- ⊙ Εξαρτάται από 2 παραμέτρους :
  - **Κυτταρο-κυτταρικές αλληλεπιδράσεις** (Cell – cell interaction)
  - **Κυτταρο-επιφανιακές αλληλεπιδράσεις** (Cell – surface interaction )

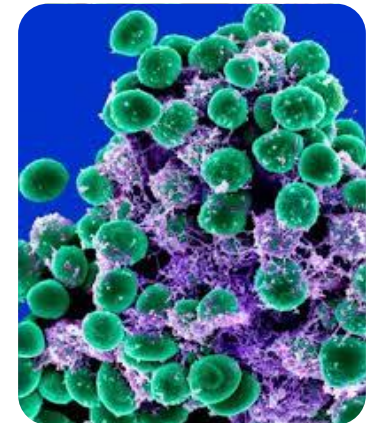
# ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΗΣ

- ◉ Πολλαπλασιασμός κυττάρων , παραγωγή εξωκυττάριου πολυσακχαρίτη και δημιουργία πολύπλοκης δομής
- ◉ Ελάττωση θρεπτικών υποστρωμάτων, συγκέντρωση τοξικών μεταβολικών προϊόντων,  $\downarrow$  pH,  $\downarrow$  pO<sub>2</sub>
- ◉ Μείωση ή αναστολή του πολλαπλασιασμού και των μεταβολικών δραστηριοτήτων κυττάρων της κατώτερης στοιβάδας.



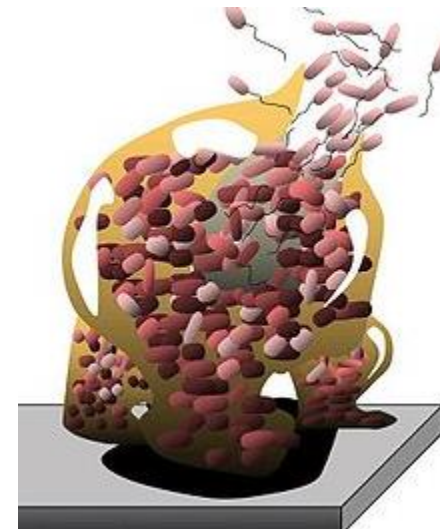
# ΩΡΙΜΑΝΣΗ: QUORUM SENSING

- ⊙ Ένα βακτήριο παράγει σηματοδοτικά μόρια
  - επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων
  - Συγκέντρωση σηματοδοτικών μορίων καθιστά το βακτήριο ικανό να αντιλαμβάνεται πότε αυξάνει η βακτηριακή συγκέντρωση
- ⊙ Η ανίχνευση ενός “quorum” οδηγεί στην αλλαγή έκφρασης γονιδίων
  - Παραγωγή λοιμογόνων παραγόντων
  - Σχηματισμός βιομεμβράνης

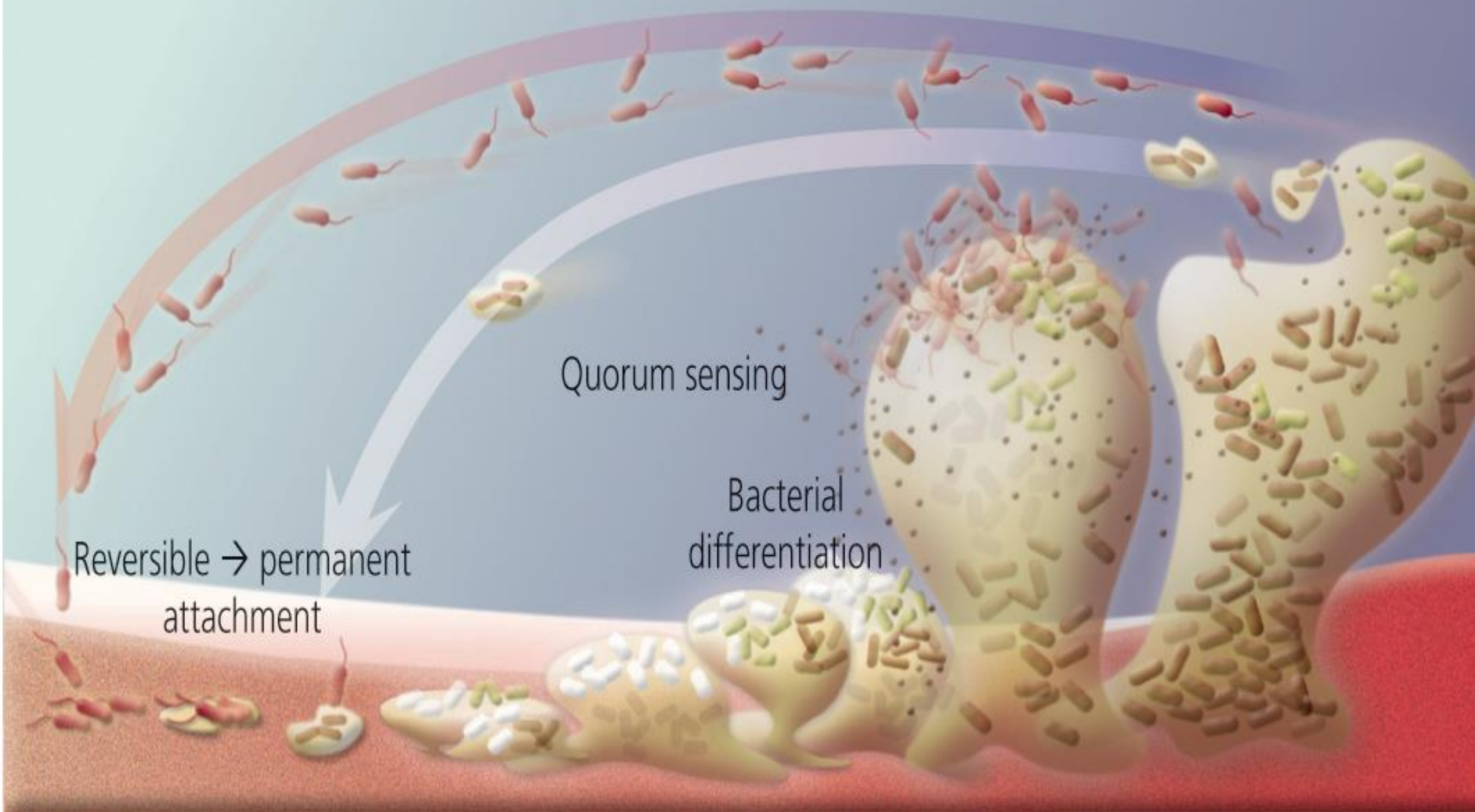


# ΑΠΟΚΟΛΛΗΣΗ - DETACHMENT

- Ελάττωση θρεπτικού υποστρώματος – Ενεργειακών αποθεμάτων
- Συγκέντρωση τοξικών μεταβολιτών
- Ελάττωση του pH



# Dispersion of planktonic bacteria and biofilm fragments from mature biofilm

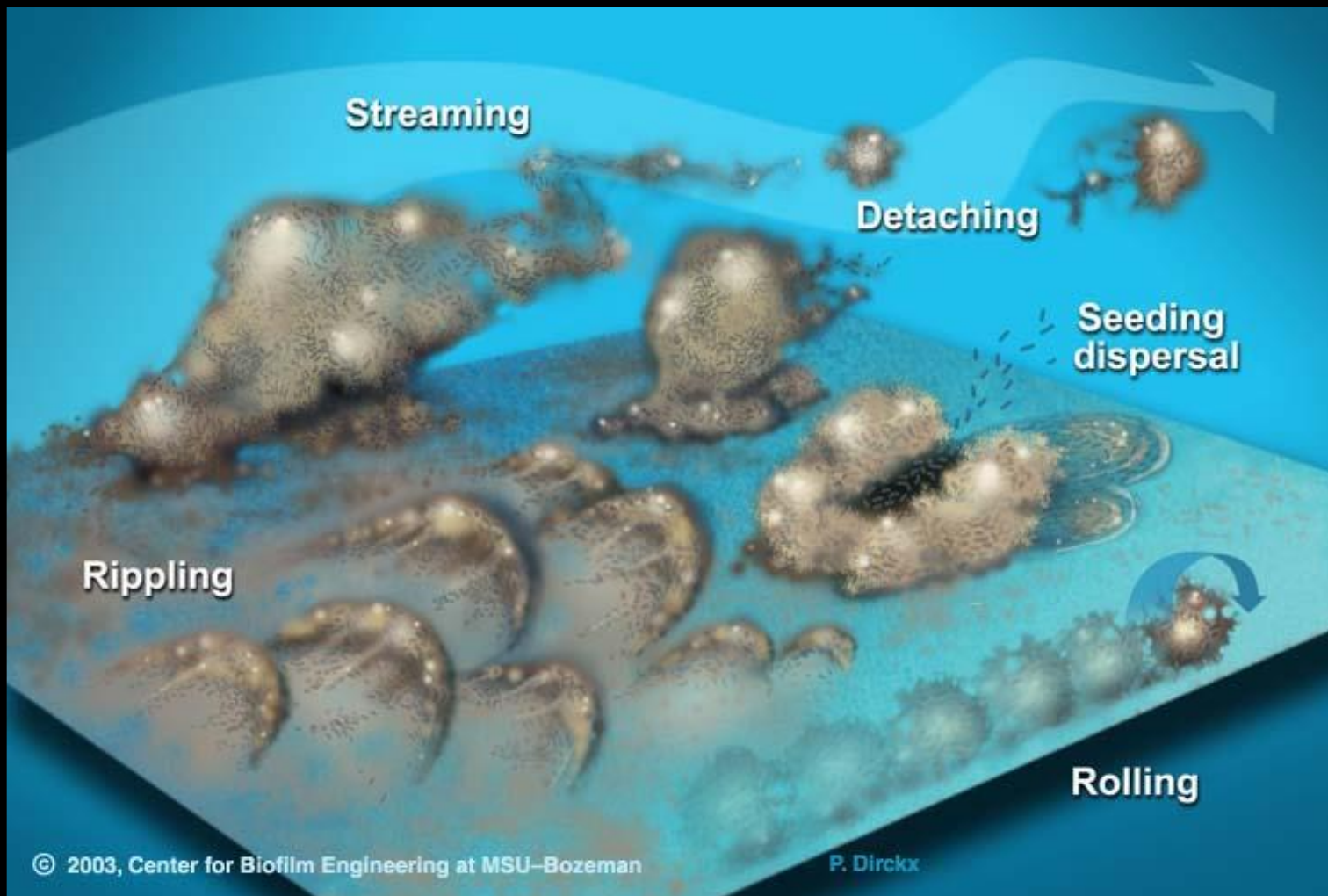


Contamination

Colonisation

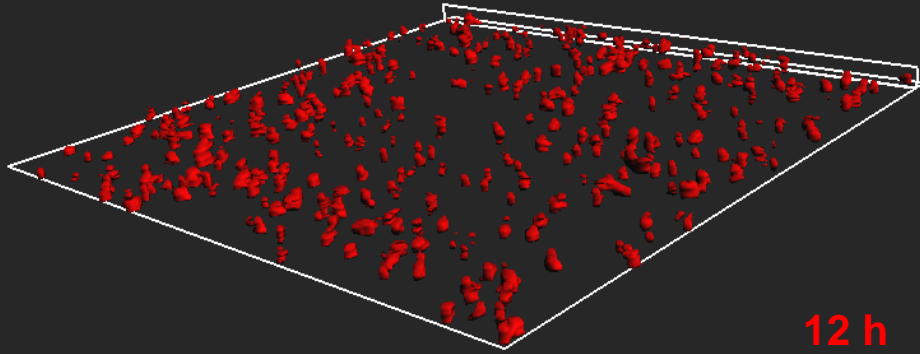
Biofilm development  
Inflammatory host response

Spreading → systemic infection

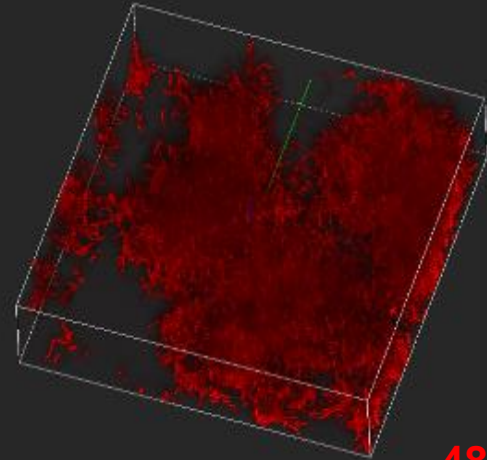




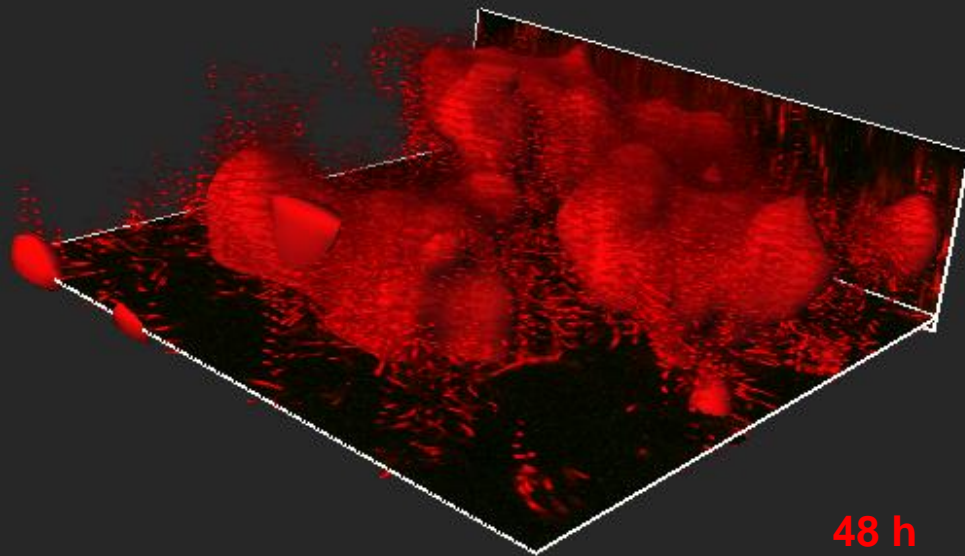
# Biofilm - *Legionella pneumophila*



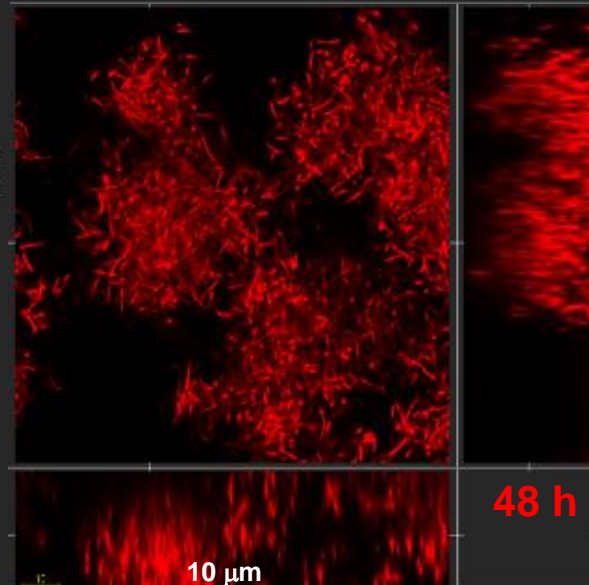
12 h



48 h



48 h



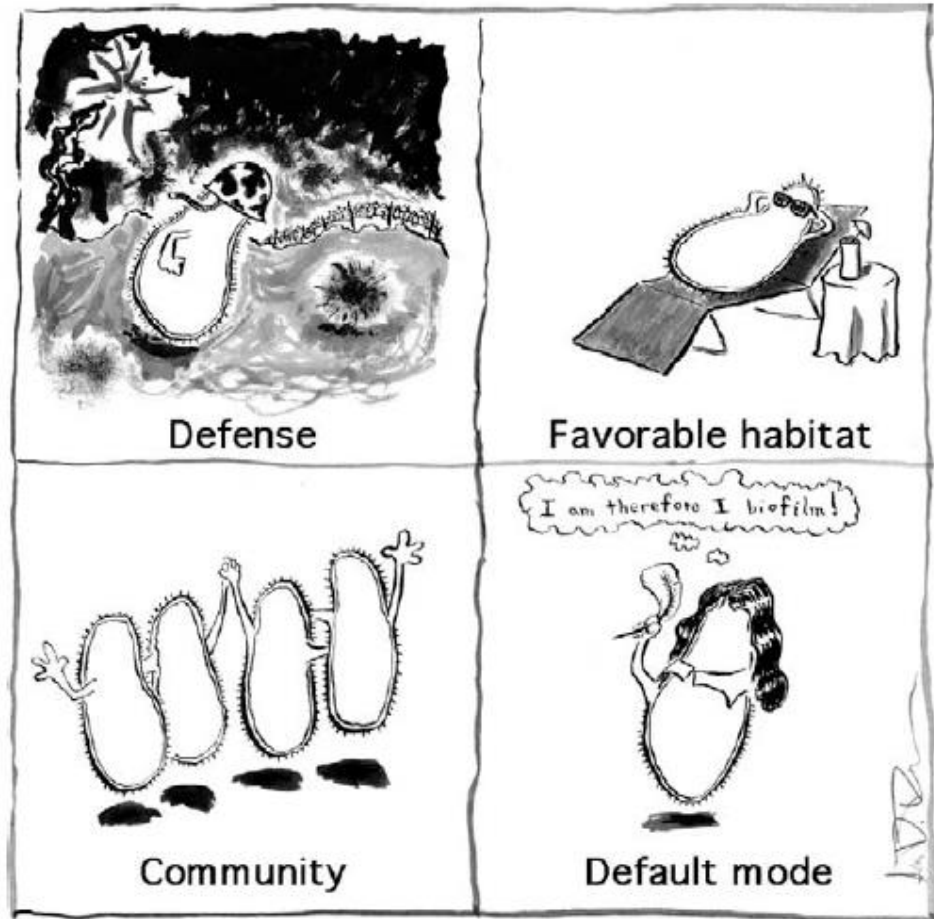
48 h

10 μm

# ΟΦΕΛΗ ΑΠΟ ΤΗ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΩΝ

The four driving forces  
behind bacterial biofilm  
formation

*KK Jefferson (2004)*



# 1.ΑΜΥΝΑ

- Μέσα στη βιομεμβράνη τα βακτήρια προστατεύονται από
  - φάγους
  - αντιβιοτικά
  - φαγοκύτταρα
  - αντισώματα



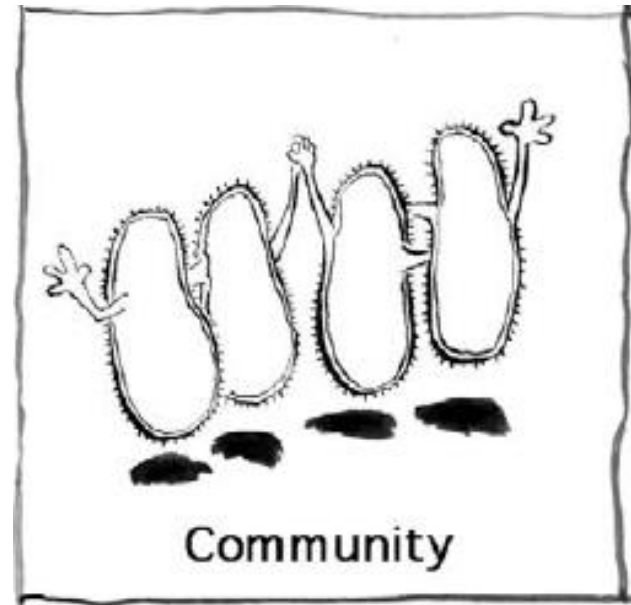
## 2. ΕΥΝΟΪΚΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

- ◉ Η βιομεμβράνη παρέχει συνθήκες **ΣΤΑΘΕΡΕΣ** και **ΕΥΝΟΪΚΕΣ** για επιβίωση
- ◉ Ο ανθρώπινος οργανισμός αποτελεί σταθερό περιβάλλον σε
  - Θερμοκρασία
  - Παροχή θρεπτικών συστατικών
  - Οξυγόνο
  - Νερό



# 3. ΒΙΟ-ΚΟΙΝΟΤΗΤΑ

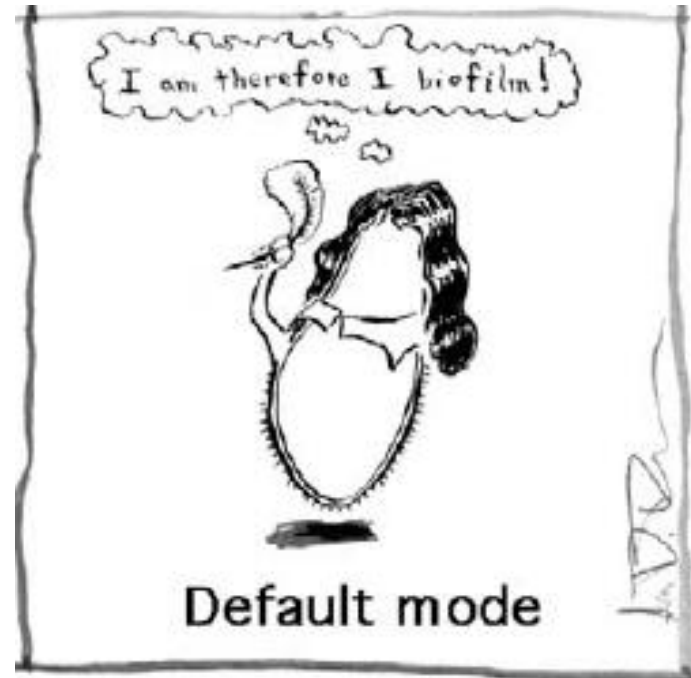
- Αντίληψη του περιβάλλοντος
  - προσαρμογή μεταβολικών διεργασιών
  - Καταμερισμός εργασίας
- Επικοινωνία
  - Autoinducing signal molecules
    - Quorum sensing
  - Gene transfer
    - Horizontal plasmid transfer
- Αλτρουιστική συμπεριφορά
  - Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος



**Gene adaptation (reversible), NOT terminal differentiation (irreversible)**

## 4. DEFAULT MODE OF GROWTH

- Αντίξοες για την ελεύθερη μορφή περιβαλλοντικές συνθήκες
  - επιβίωση μόνο μέσω βιομεμβράνης



# ΑΛΛΑΓΗ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ

Μια πολύ σημαντική ιδιότητα των βακτηρίων που βρίσκονται με τη μορφή του Biofilm είναι ότι εκφράζουν διαφορετικά γονίδια και εμφανίζουν διαφορετικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που αφορούν το μεταβολισμό τους και κυρίως την αντοχή τους στα αντιβιοτικά.

# ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

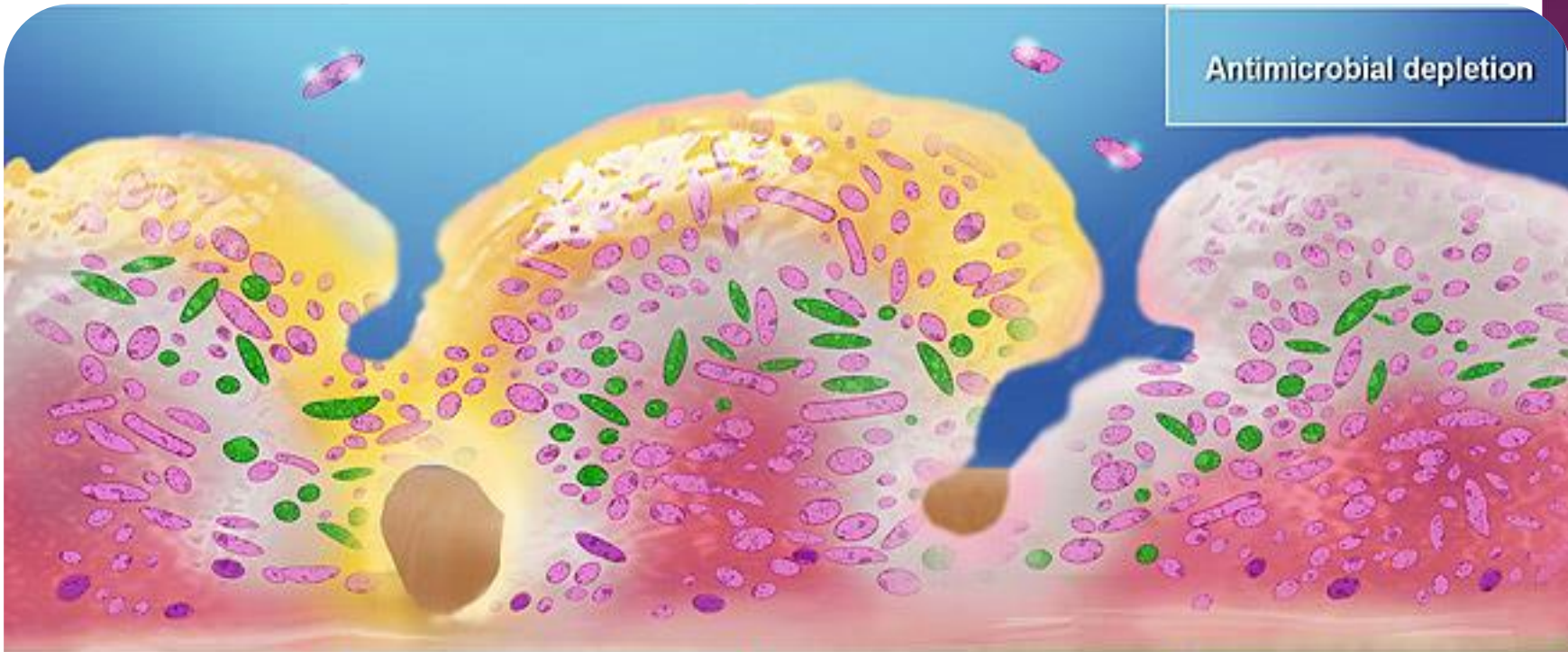
Οργανισμός	Αντιβιοτικό	Planktonic phenotype MIC	Biofilm phenotype MIC
<i>S.aureus</i>	vancomycin	2	20
<i>P.aeruginosa</i>	imipenem	1	>1.024
<i>E.coli</i>	ampicillin	2	512
<i>P.pseudomallei</i>	ceftazidime	8	800
<i>S.sanguis</i>	doxycycline	0,063	3,15

## MIC: Minimun Inhibitory Concentration

Η μικρότερη συγκέντρωση αντιβιοτικού που δεν επιτρέπει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού in vitro



# ΑΝΤΟΧΗ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ



Antimicrobial depletion

Slow  
penetration

Stress  
response

Altered  
microenvironment

Persisters

Slow  
penetration

Stress  
response

Altered  
microenvironment

Persisters

# ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

- ◎ Πλανκτονική μορφή (Planktonic ... free swimming)
  - Αιωρούνται ελεύθερα
  - Γενικά ευαίσθητα στα αντιβιοτικά, αντισώματα και φαγοκύτταρα

# ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

- ◎ Προσκολλημένη μορφή (Sessile ... biofilm )
  - Ρύθμιση ( up regulation) γονιδίων για
    - σχηματισμό βιομεμβράνης
    - έκφραση λοιμογόνων παραγόντων
    - μεταφορά γενετικού υλικού
    - διαφυγή ανοσιακού συστήματος

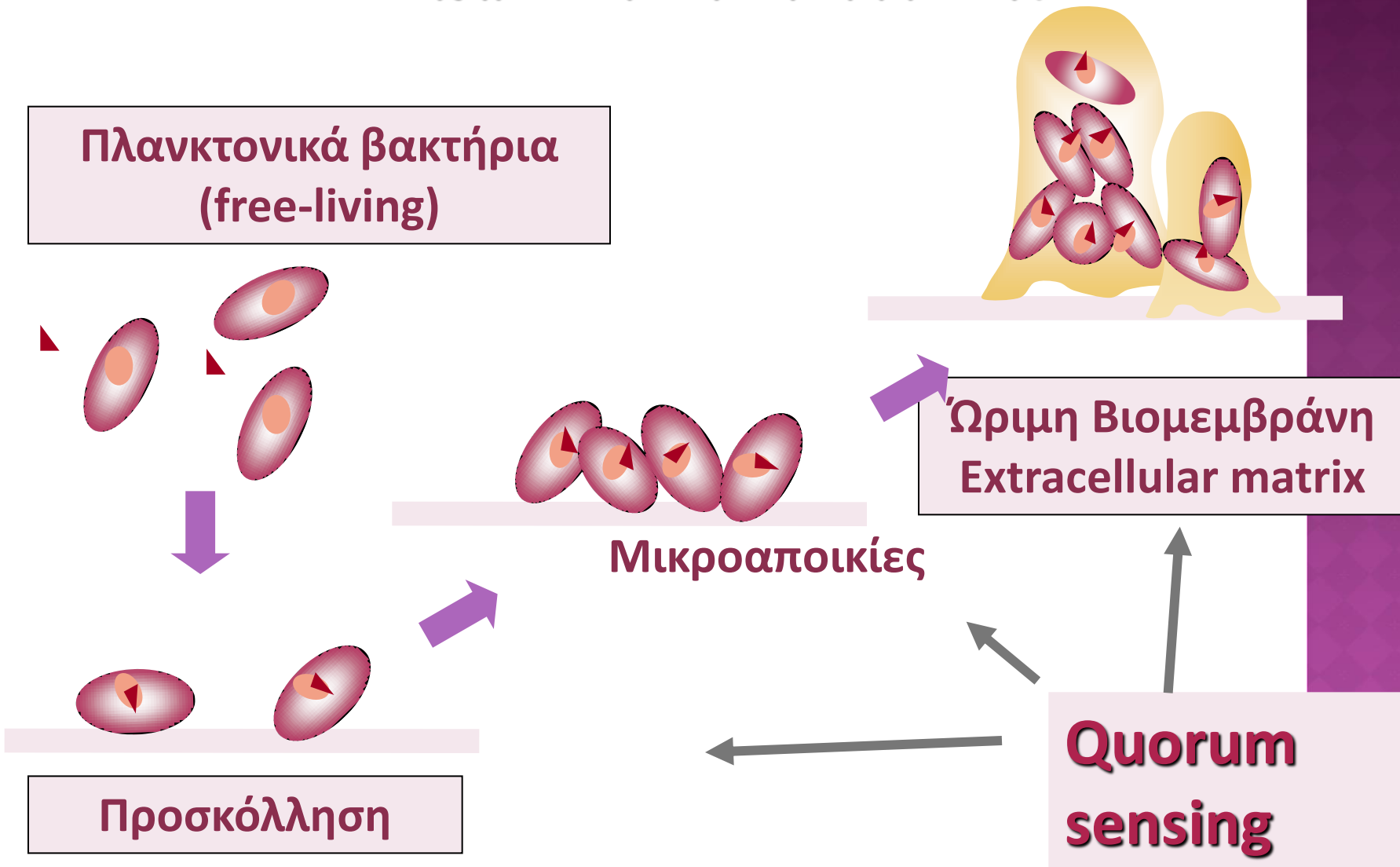
• In vitro καλλιέργειες :

ARTIFACT !!!

Η planktonic με τη sessile μορφή έχουν μεγάλες διαφορές ...

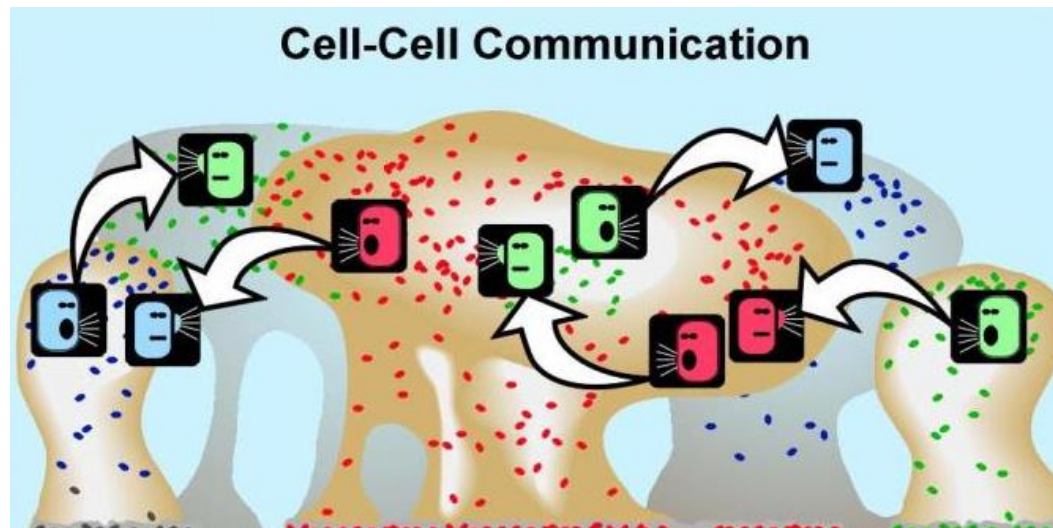
- Αντιγονικότητας
- Φάσματος αντιμικροβιακής αντοχής

# Ρύθμιση παραγωγής βιομεμβράνης QS στο σχηματισμό βιομεμβράνης



# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- **Quorum sensing** είναι ένας ειδικός **διακυτταρικός σηματοδοτικός μηχανισμός** ο οποίος επιτρέπει στα βακτήρια να ελέγχουν την **έκφραση γονιδίων**.
  - Εξαρτάται αποκλειστικά από την **πυκνότητα** των βακτηρίων.

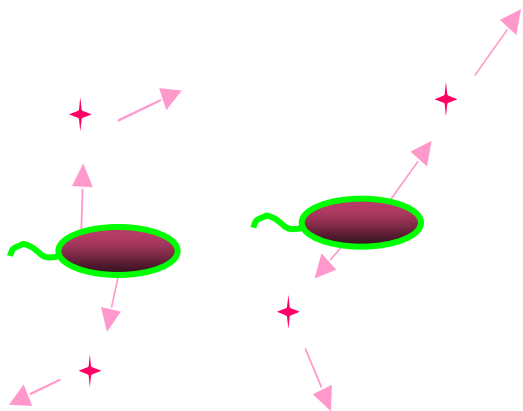


# Quorum Sensing

Χαμηλή βακτηριακή  
πυκνότητα

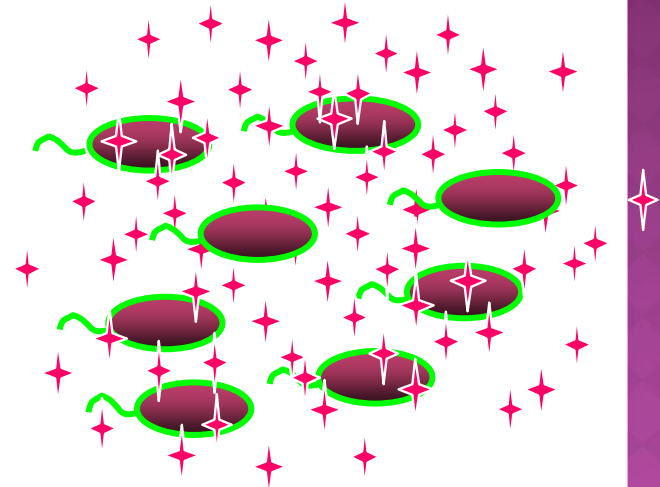
Παραγωγή σηματοδοτικών μορίων

Μικρή ενεργοποίηση  
QS-controlled genes



Υψηλή βακτηριακή  
πυκνότητα

Ενεργοποίηση γονιδίων  
(>600 στην *P. aeruginosa*)



**A density-dependent control**

# Αυτοεπαγωγείς-Ποικιλία

- Ολιγοπεπτίδια-φερομόνες

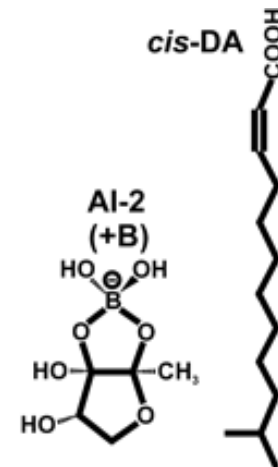
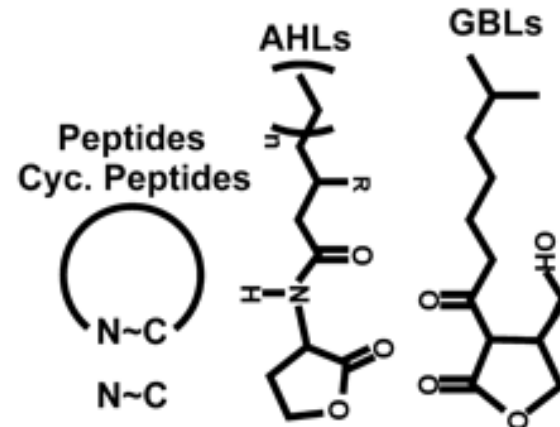
- Gram θετικά βακτήρια
  - *B. subtilis*, *S. aureus*

- AHLs (acyl-HSL)

- Gram αρνητικά βακτήρια
  - *P. aeruginosa*,
  - *V. fischeri*,
  - *E. carotovora*

- AI-2 (furanosylborate)

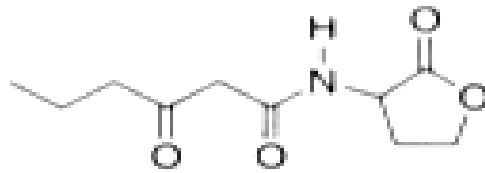
- *Vibrio harveyi*



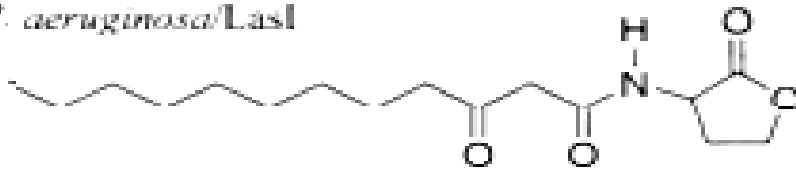


## A Acyl-Homoserine Lactone Autoinducers

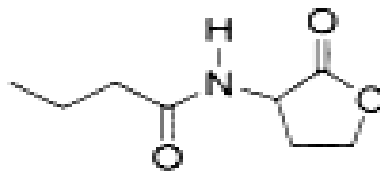
*V. fischeri*/LuxI



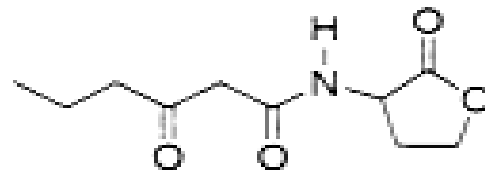
*P. aeruginosa*/LasI



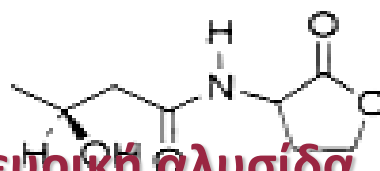
*P. aeruginosa*/RhlI



*P. stewartii*/EsaI



*V. harveyi*/LuxLM



Ποικίλλει η Acyl πλευρική αλυσίδα  
(4-18 C)

## B Oligopeptide Autoinducers

*B. subtilis*/ComX

ADPITRQWGI\*

*B. subtilis*/CSF

ERGMT

*S. aureus*/subgroup 1

YSTCDFIM



*S. aureus*/subgroup 2

GVNACSSLF



*S. aureus*/subgroup 3

YINCDFLL



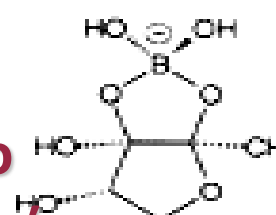
*S. aureus*/subgroup 4

YSTCYFIM



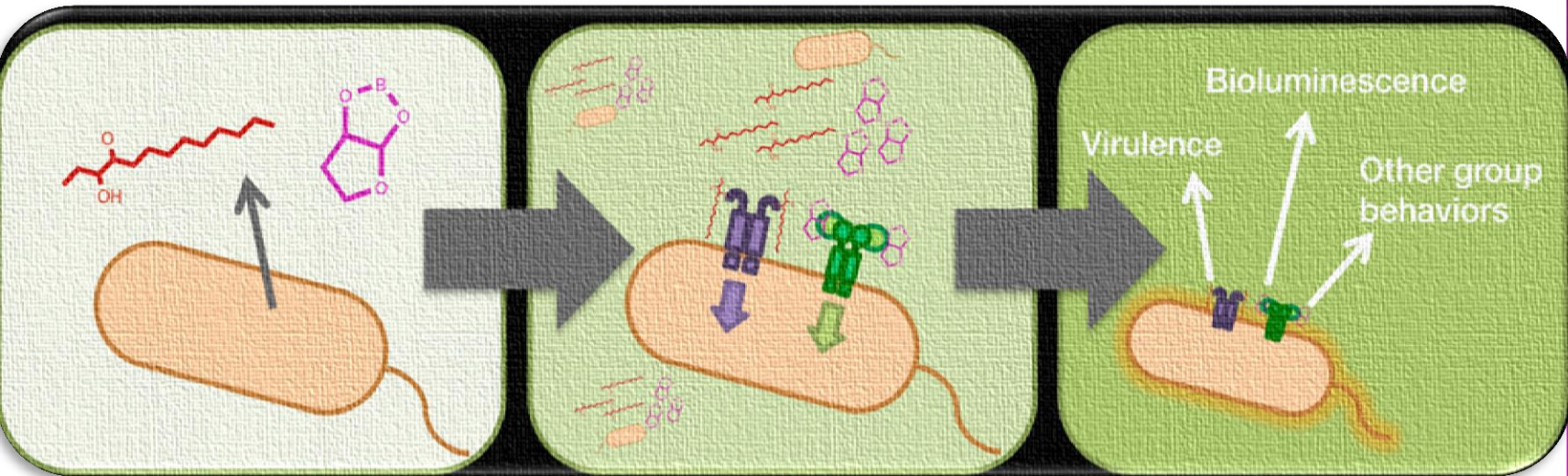
## C AI-2

*V. fischeri*/LuxS



Μεγαλύτερο προπεπτίδιο  
διαμορφούμενο κατά την έκκριση

# Quorum sensing : 3 βασικές αρχές



1.

Παραγωγή του  
αυτοεπαγωγέα

2.

Αναγνώριση του  
αυτοεπαγωγέα  
από υποδοχείς

\*Μεμβράνη

3.

Ενεργοποίηση  
γονιδίων

Αντίληψη της κυτταρικής πυκνότητας

Απελευθέρωση των βακτηρίων από τη βιομεμβράνη

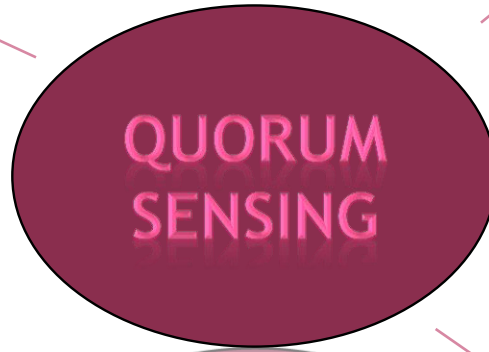
Έκφραση λοιμογόνων παραγόντων

Αντοχή στα αντιβιοτικά

Σχηματισμός βιομεμβράνης

Σπορογονία

Κινητικότητα



Μεταφορά DNA

Μεταβολισμός

Πολλαπλασιασμός

Παραγωγή χρωστικών

Είσοδος σε στατική φάση ανάπτυξης

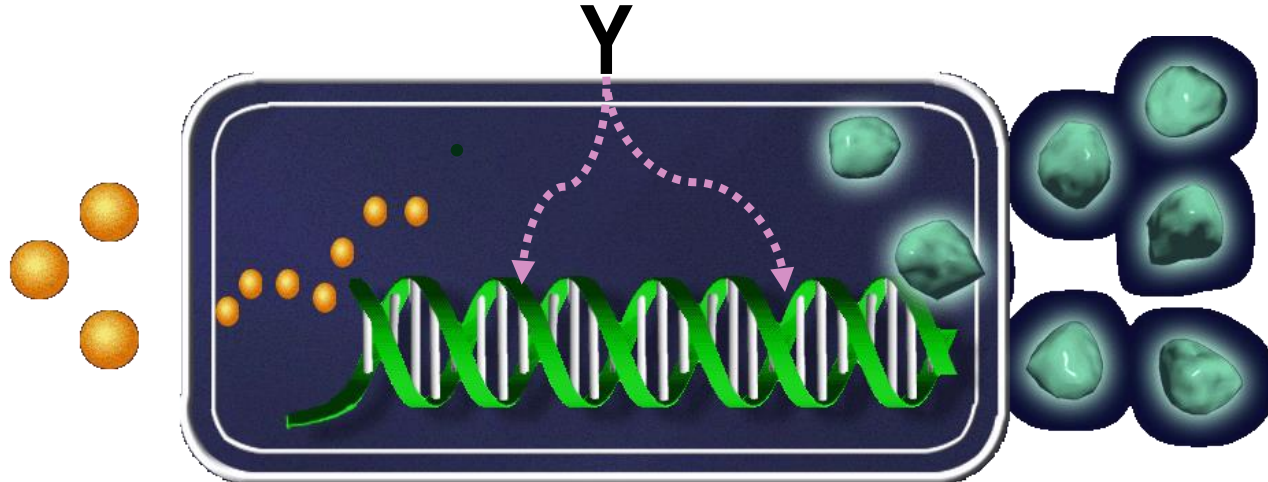
Διαφυγή των αμυντικών μηχανισμών του ξενιστή

# Quorum Targets

## Αντιπαθογόνα – Αντιλοιμογόνα

Πλεονεκτήματα:  
Καταστροφή της βιομεμβράνης,  
Μείωση λοιμογόνων παραγόντων  
Ενίσχυση ανοσολογικής απάντησης  
Αύξηση ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

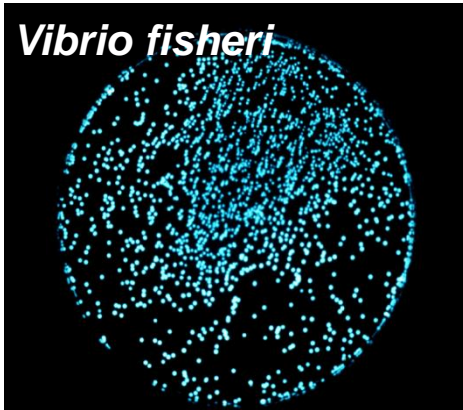
Όχι εκλεκτική πίεση για εμφάνιση αντοχής



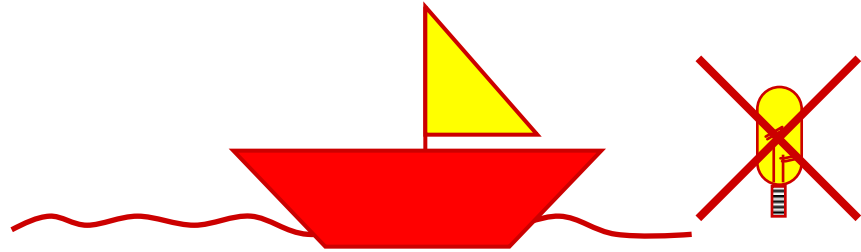
# QUORUM SENSING

Η ιστορία αρχίζει εδώ-1970

*Vibrio fischeri*

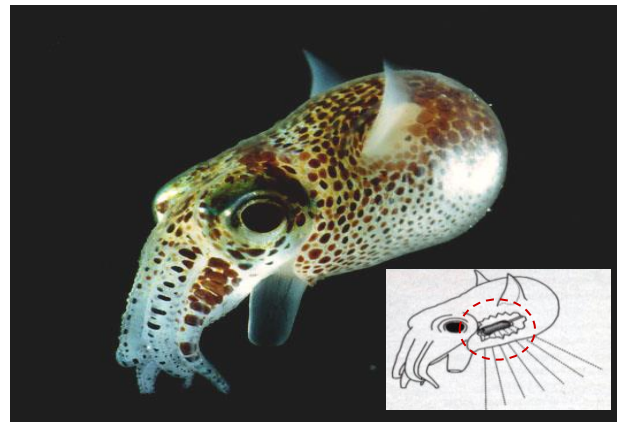


*Euprymna scolopes*



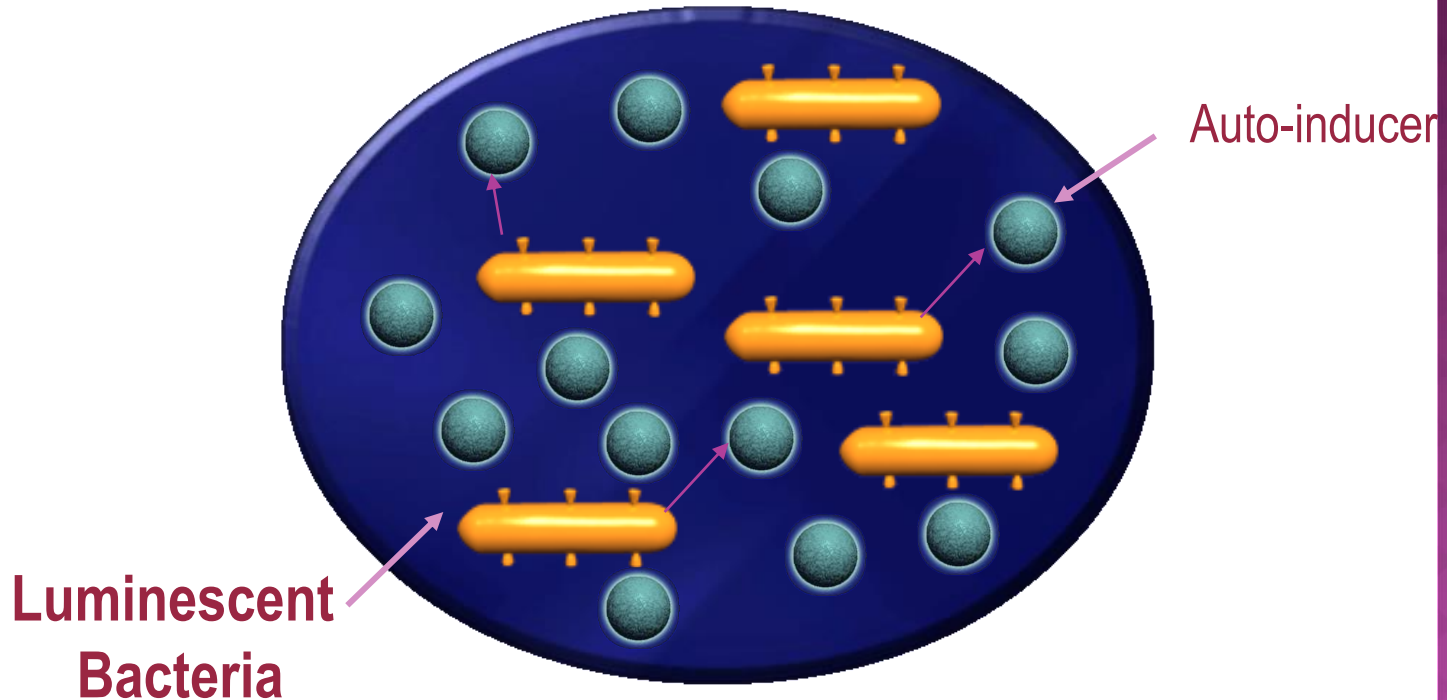
Θαλάσσιο νερό =  $\sim 5$  Vf cells/ml

---



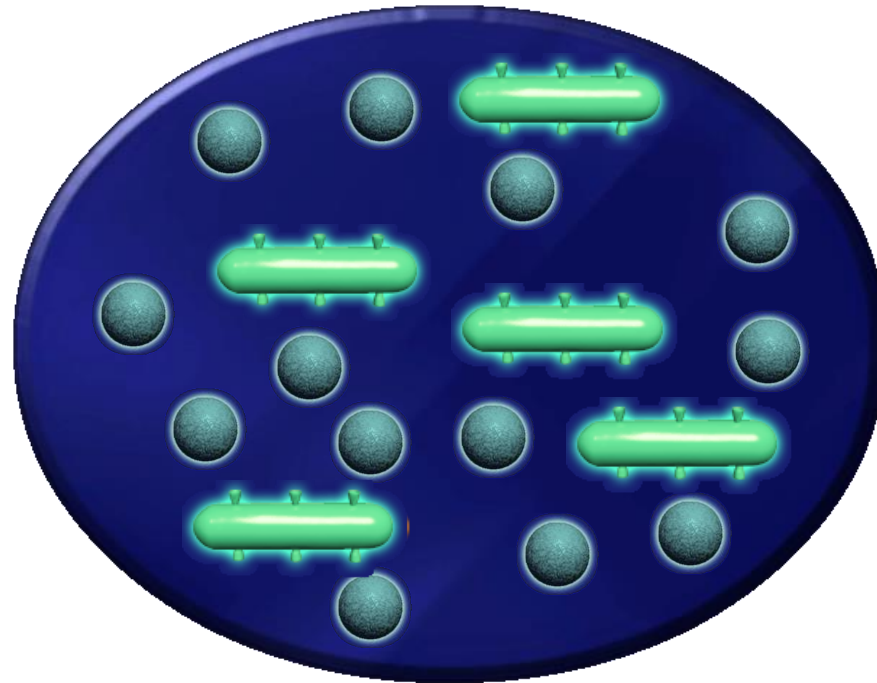
light organ =  $\sim 10^{10-11}$  Vf cells/ml

# QUORUM SENSING: THE DISCOVERY



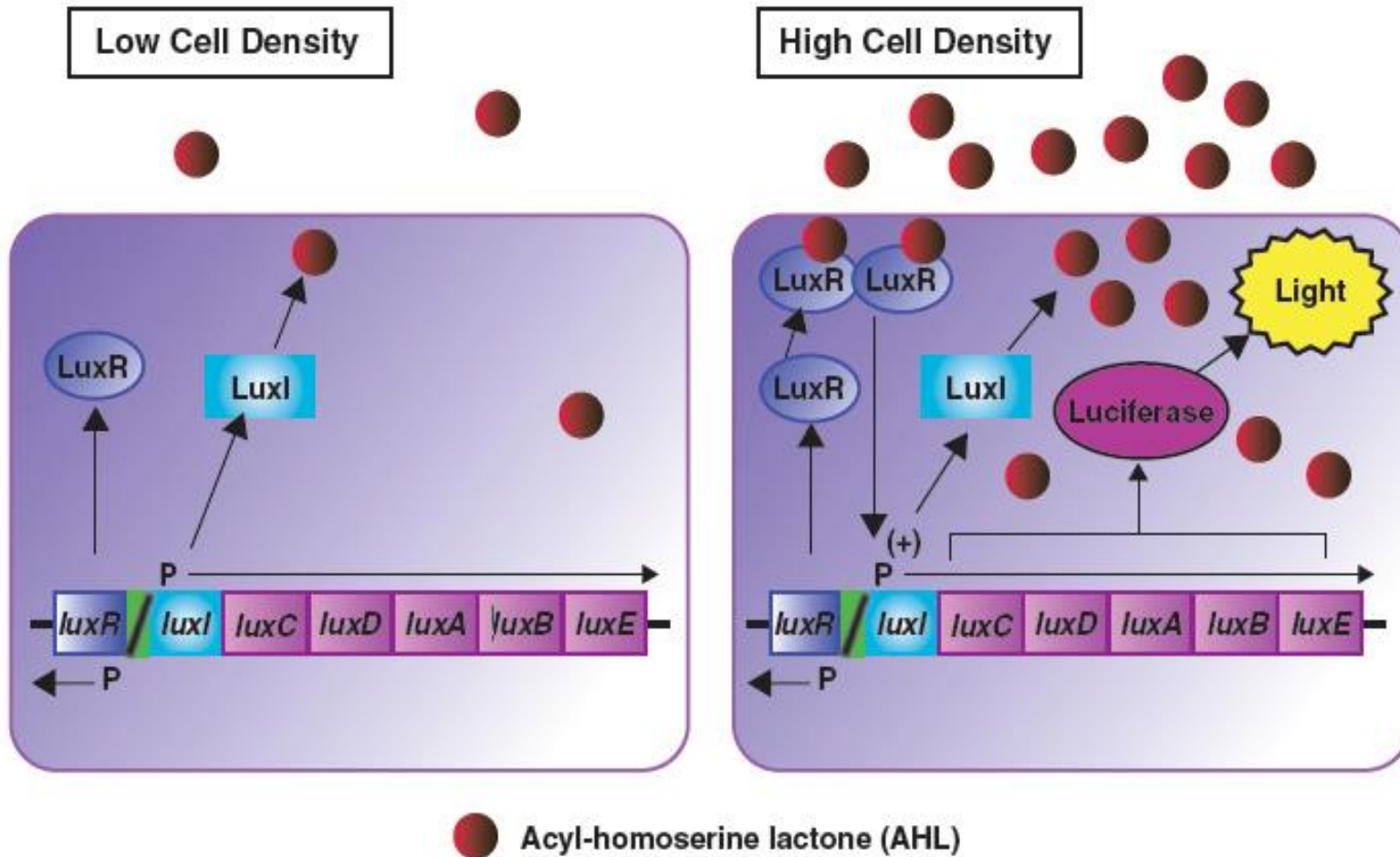
- Low cell density
- Low autoinducer concentration
- Luminescence pathways **Off**

# QUORUM SENSING: THE DISCOVERY



- High cell density
- High autoinducer concentration
- Luminescence pathways **ON**

## Quorum Sensing



Quorum sensing in *Vibrio fischeri*



## Quorum Sensing Gram-θετικών βακτηρίων

### Μεταμόρφωση

- *S. pneumoniae*
- *B. subtilis*

### Σπορογονία

- *B. subtilis*

### Έκφραση λοιμογόνων παραγόντων

- S. aureus*
- E. faecalis*
- L. monocytogenes*
- C. perfringens*

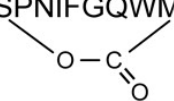
# Quorum Sensing Gram-θετικών βακτηρίων

ADPITRQWGD<sup>\*</sup>

ComX (*B. subtilis*)

ERGMT


CSF (*B. subtilis*)

QNSPNIFGQWM  


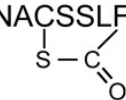
GBAP (*E. faecalis*)

EMRLSKFFRDFILQRKK

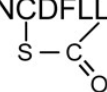
CSP (*S. pneumoniae*)

YSTCDFIM  



AIP-I (*S. aureus* group 1)

GVNACSSLF  


AIP-II (*S. aureus* group 2)

INCDFLL  


AIP-III (*S. aureus* group 3)

YSTCYFIM  


AIP-IV (*S. aureus* group 4)

## Σηματοδοτικά μόρια

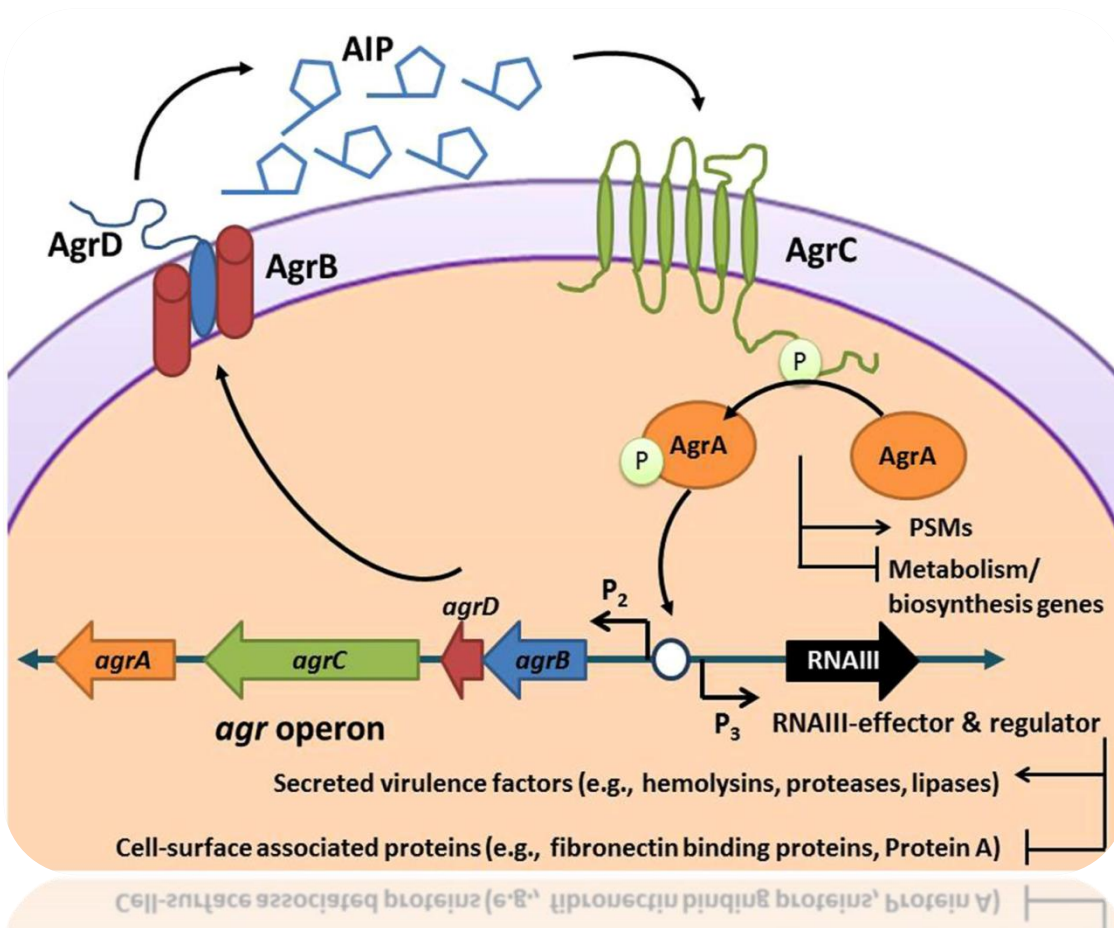
### □ Autoinducer peptides –AIPs

□ Συντίθενται σαν προπεπτίδια

□ Ολιγοπεπτίδια με 5-17 αμινοξέα

# *S.aureus* - Quorum Sensing

## *agr* locus (accessory gene regulator)



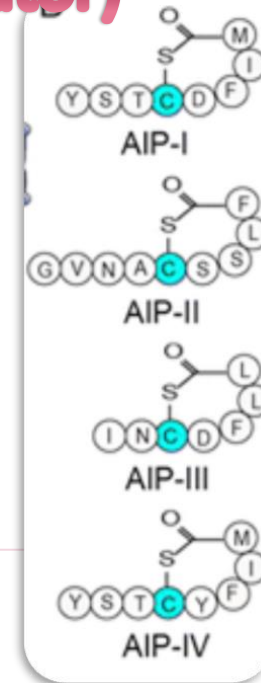
Χαμηλή κυτταρική συγκέντρωση → παράγοντες προσκόλλησης και αποικισμού

Υψηλή κυτταρική συγκέντρωση → τοξίνες και πρωτεάσες

# *S. aureus* - Quorum Sensing

## *agr* locus (accessory gene regulator)

- Υπερμεταβλητότητα στο *agrD* και *agrB*
  - 4 ομάδες
    - AIP-I, II : Αντοχή στη vancomycin
      - AIP-III : Toxic shock sdr
    - AIP-IV : Νεκρωτική πνευμονία
- Υπερμεταβλητότητα στο *agrC*



ΤΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΤΗΣ ΚΑΘΕ ΟΜΑΔΑΣ ΑΝΑΣΤΕΛΛΟΥΝ ΤΟ QS SYSTEM ΤΩΝ ΑΛΛΩΝ

ΤΕΛΙΚΑ ΘΑ ΕΠΙΚΡΑΤΗΣΕΙ Η ΟΜΑΔΑ Η ΟΠΟΙΑ ΠΡΩΤΗ ΘΑ ΕΓΚΑΤΑΣΤΗΣΕΙ ΤΟ ΔΙΚΟ ΤΗΣ QS SYSTEM

# S.AUREUS -QS ΣΑΝ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΣ ΣΤΟΧΟΣ

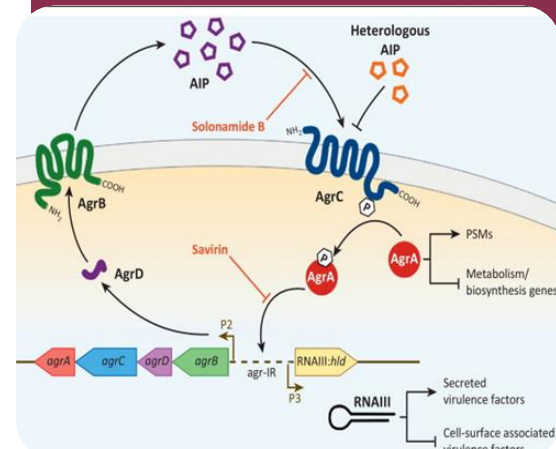
## AGR MUTANS : ΧΑΜΗΛΗ ΛΟΙΜΟΓΟΝΟ ΔΥΝΑΜΗ

### Στόχος ο υποδοχέας AgrC

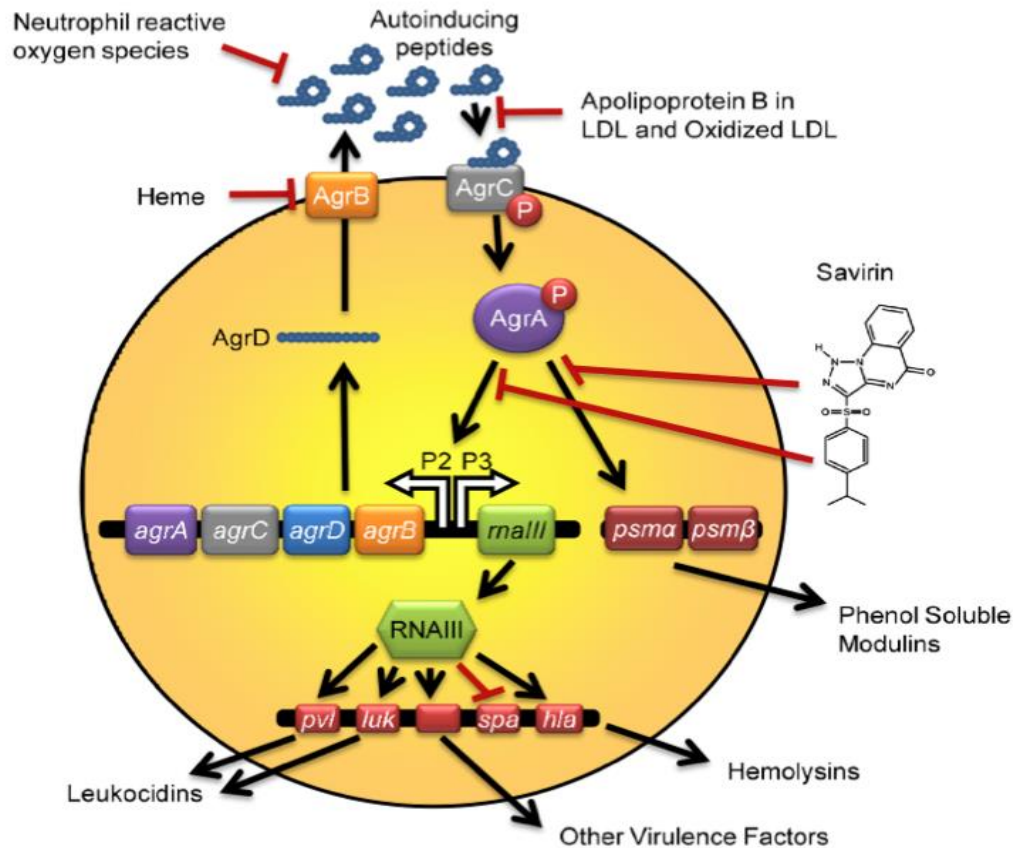
- Μεταβολή στο μέγεθος της πλευρικής αλυσίδας
- Μεταβολή στην αλληλουχία των αμινοξέων

### Στόχος τα ολιγοπεπτίδια

- Μονοκλωνικά abs
- highly-specific quencher

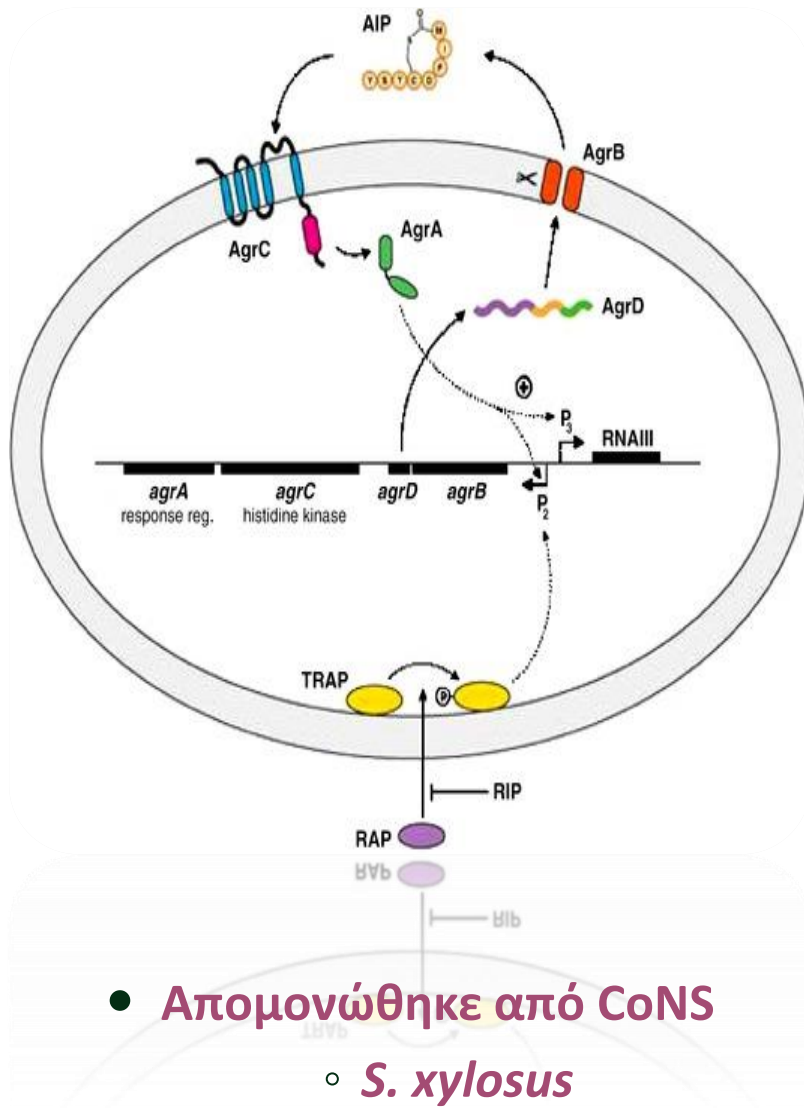


# *S.aureus* -QS σαν θεραπευτικός στόχος



Selective Chemical Inhibition of *agr* Quorum Sensing in *Staphylococcus aureus* Promotes Host Defense with Minimal Impact on Resistance. Published online 2014 Jun 12

# *S. aureus* - QS σαν θεραπευτικός στόχος



- Απομονώθηκε από CoNS
  - *S. xylosus*

## RIP

επταπεπτίδιο που αναστέλλει τη φωσφοριλίωση της TRAP

- In vivo
  - Κυτταρίτιδα
  - Σηπτική αρθρίτιδα
  - Κερατίτιδα
  - Οστεομυελίτιδα
  - Μαστίτιδα

Συνδέεται με την TRAP όλων των στελεχών του *S. aureus*

# Quorum Sensing Gram-αρνητικών βακτηρίων

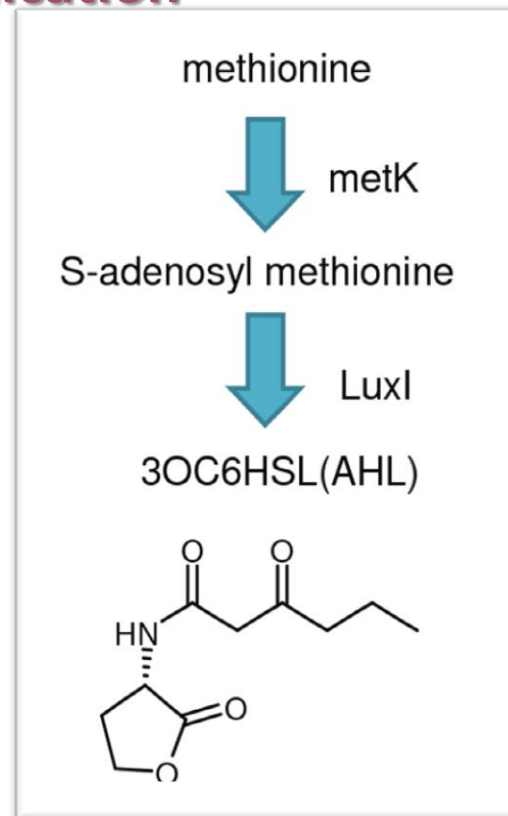
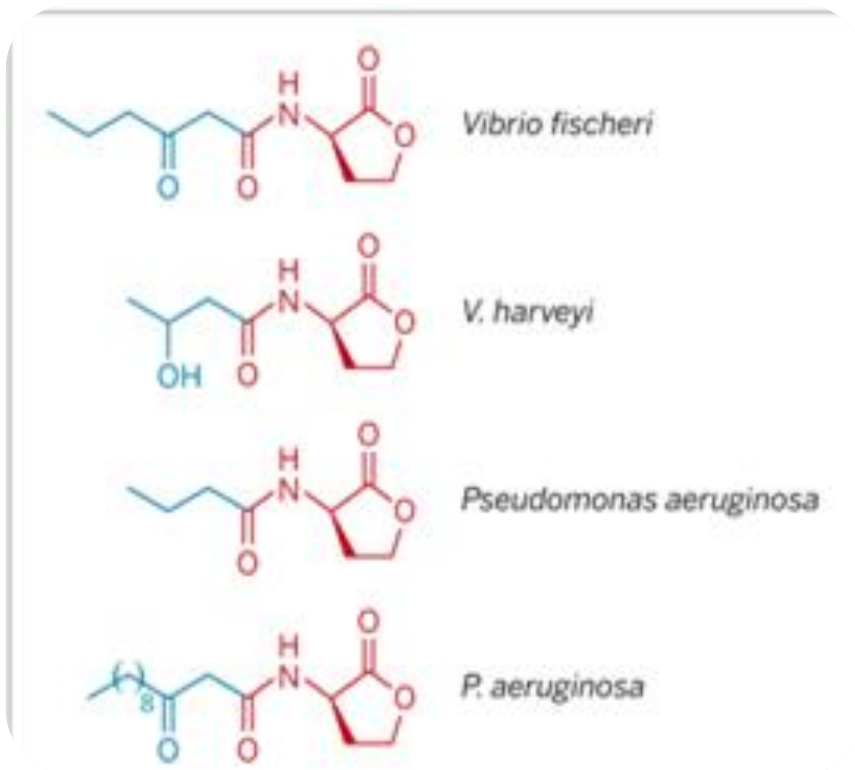
- ◉ Όλα τα Gram αρνητικά βακτήρια επικοινωνούν με ανάλογα συστήματα
  - *Pseudomonas aeruginosa* (1991)
  - *Agrobacterium tumefaciens* (1993)
- ◉ Κάθε είδος βακτηρίου παράγει ένα μοναδικό ΑΕ ή ένα μοναδικό συνδυασμό αυτοεπαγωγέων
  - ειδικότητα του συστήματος



# Quorum Sensing Gram-αρνητικών βακτηρίων

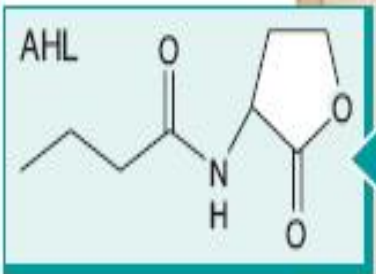
Σηματοδοτικά μόρια : **Acyl-homoserine lactones**

**Intraspecies-specific communication**



# Quorum Sensing Gram-αρνητικών βακτηρίων

1. AHLs are produced in the bacterium by the AHL synthase...



2. ...and can diffuse from the cell to enter neighboring bacteria.

AHL synthase



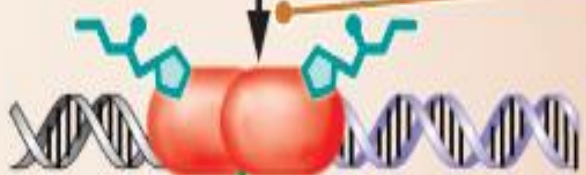
LuxI

AHL receptors

LuxR



3. AHL binding to the receptor polypeptide leads to formation of active dimers.



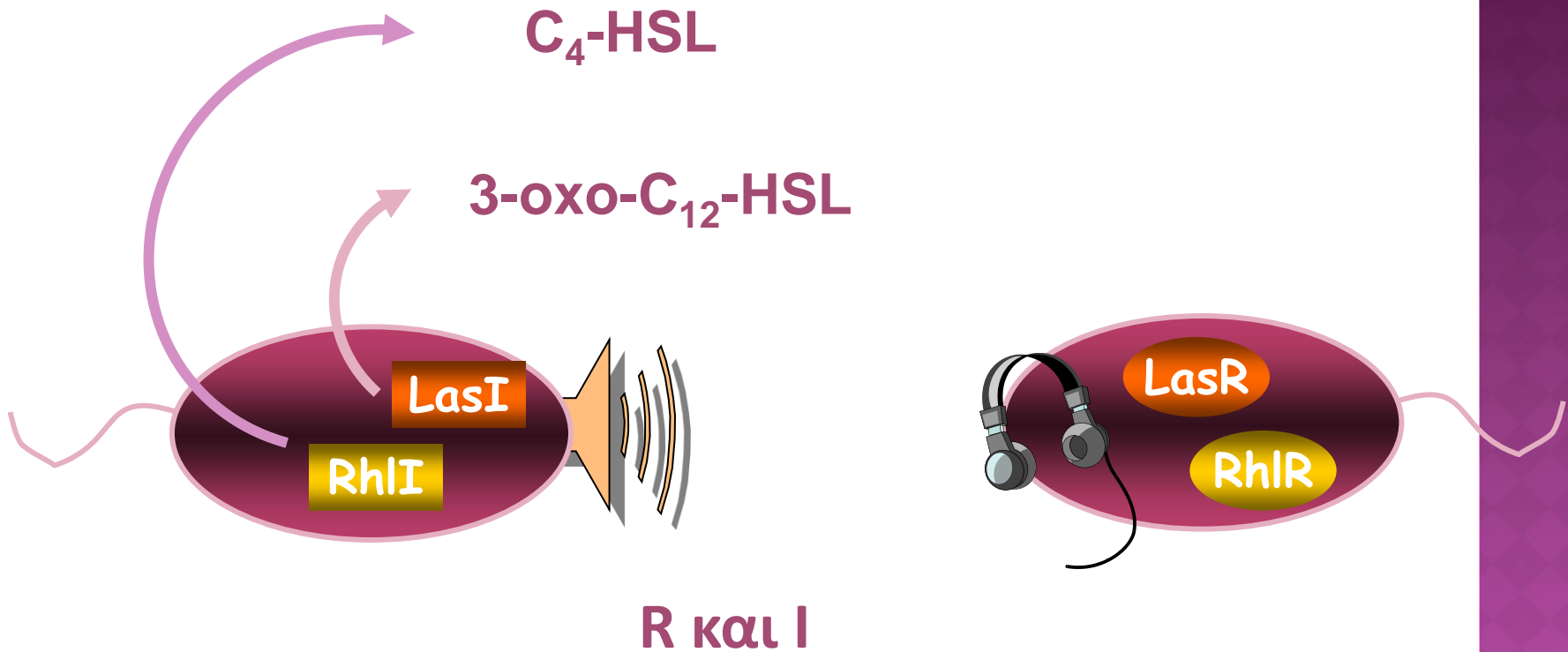
Promoter sequence

Virulence, motility, defense, transport, community structure

4. The receptor dimers bind to specific promoter sequences and activate transcription of sets of genes.



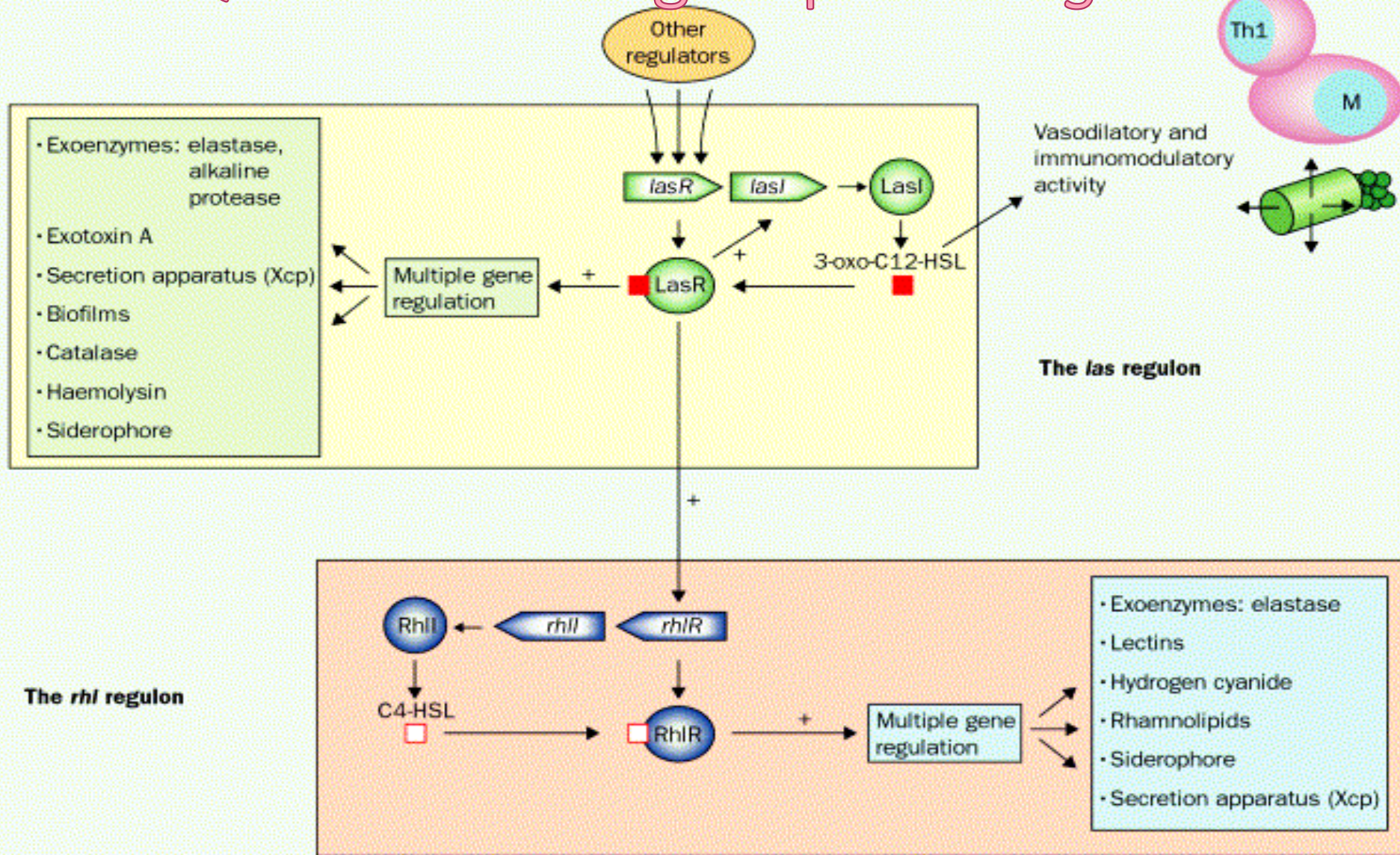
## *P. aeruginosa*-QS



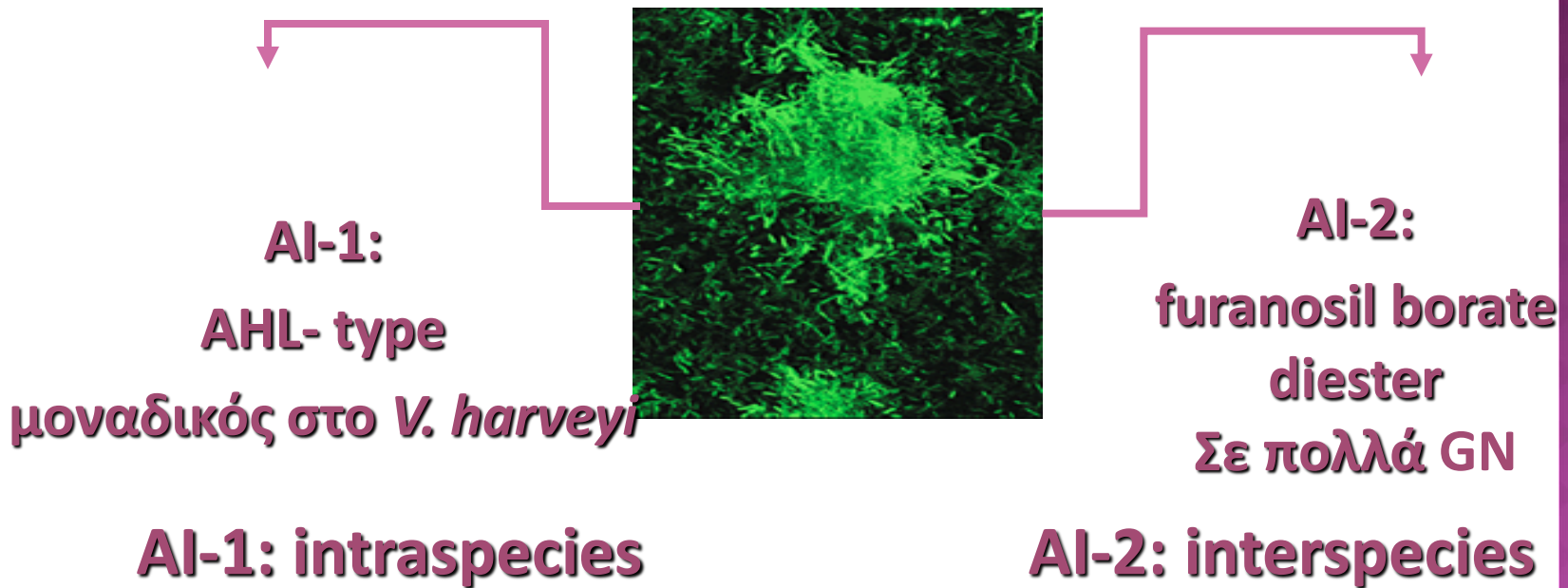
I : N-acyl-homoserine lactone synthase

R: Receptor, Μεταγραφικός παράγοντας για I και R

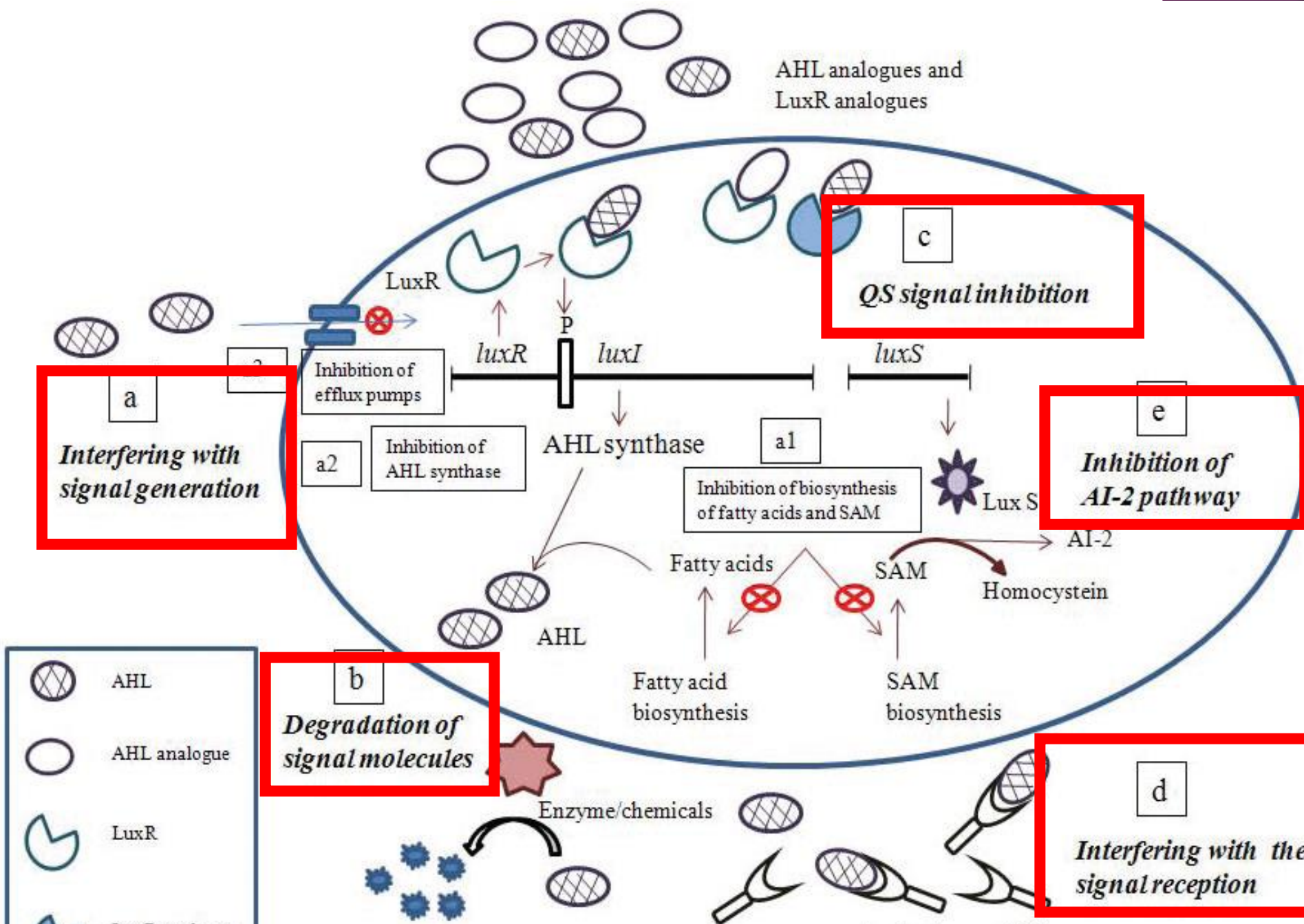
# Quorum sensing στην *P.aeruginosa*



# *V. harvey* - Quorum sensing



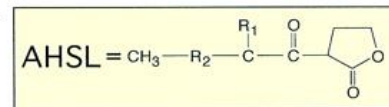
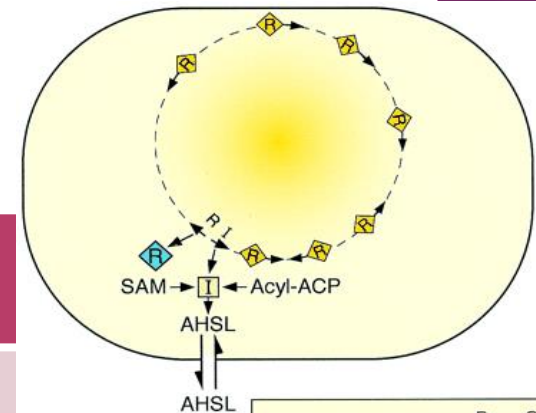
**Multilingual bacteria**



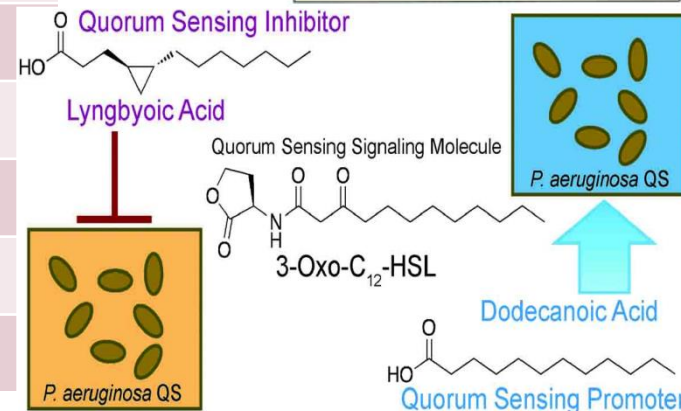
# Αναστολή σχηματισμού του αυτοεπαγωγέα

Τα AHL μόρια παράγονται από λιπαρά οξέα και το SAM (S-adenosyl-methionine)

- Ουσίες ανάλογες του SAM αναστέλλουν τη σύνθεση των AHL



Αναστολείς	Αναστολή %
L-S-adenosylhomocystein (50μM)	62
L-S-adenosylhomocystein (500μM)	91
D-S-adenosylhomocystein (50μM)	43
D-S-adenosylhomocystein (500μM)	88
Sinefungin (100 μM)	58
Butyryl-SAM (50 μM)	24
Butyryl-SAM (500 μM)	65



# Διάσπαση των AHL μορίων

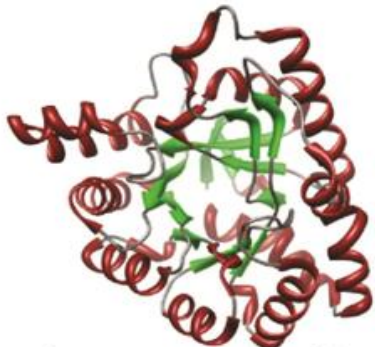
## ○ Acylase, lactonases, oxidoreductase

### ■ Lactonases

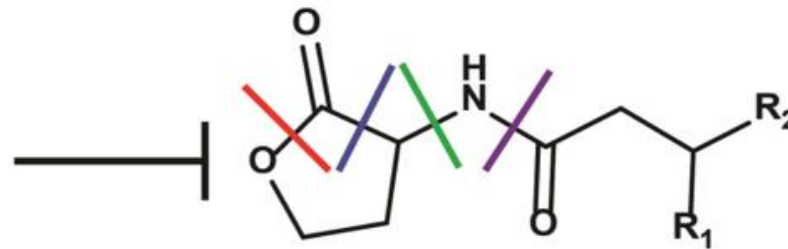
○ **Αυξάνουν** την ευαισθησία στα αντιβιοτικά

- Ciprofloxacin
- Gentamicin

### 3. Quorum-quenching enzymes



Quorum-quenching enzymes

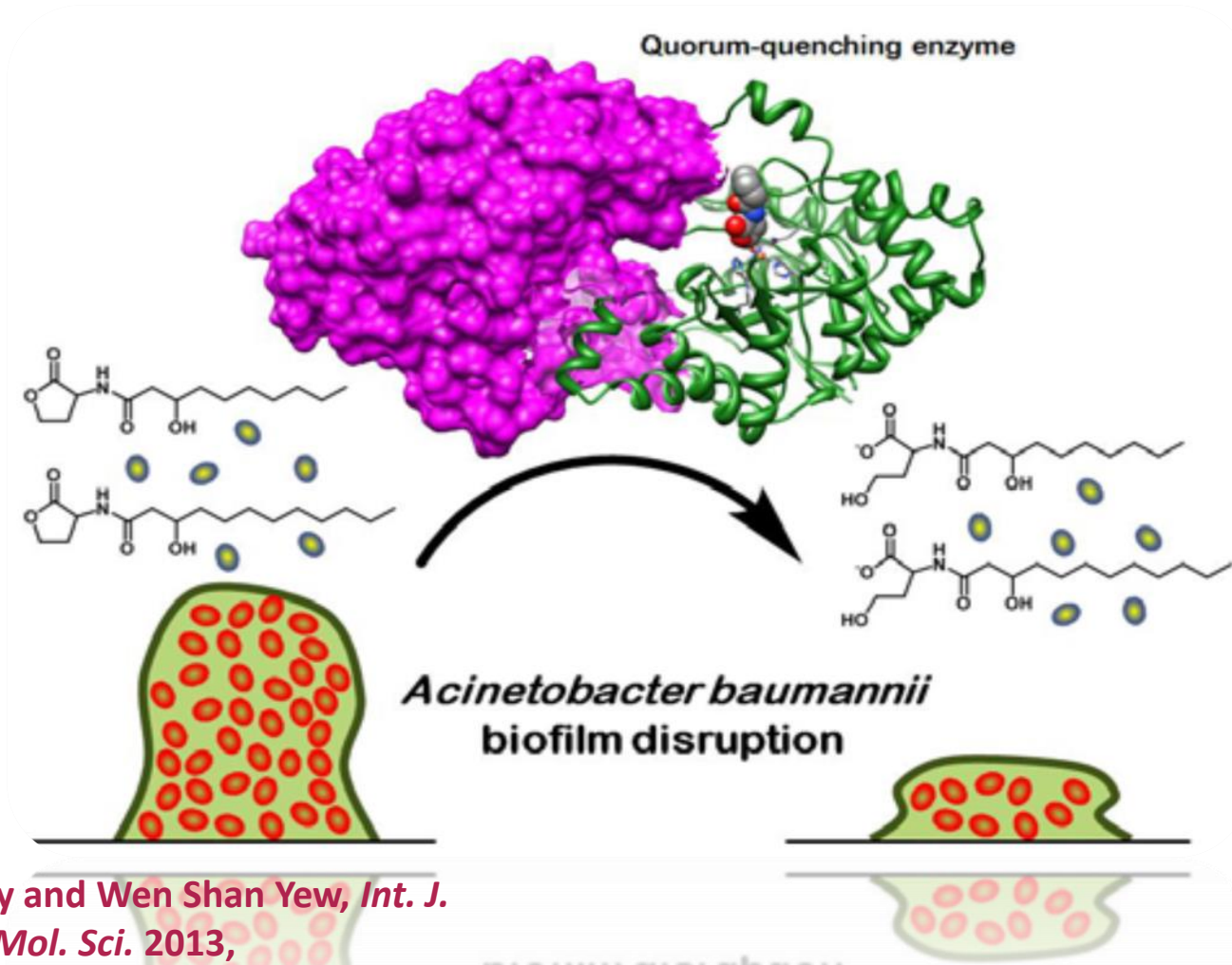


N-Acylhomoserine lactone

- Lactonase
- Decarboxylase
- Deaminase
- Acylase



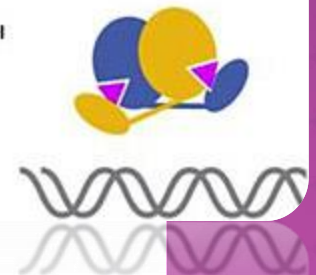
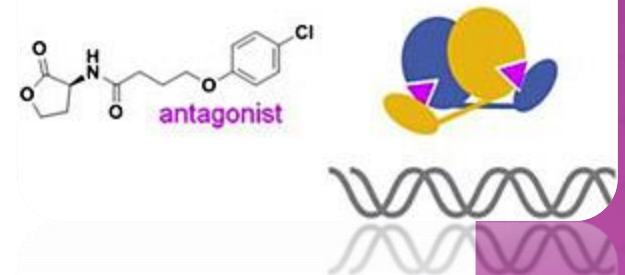
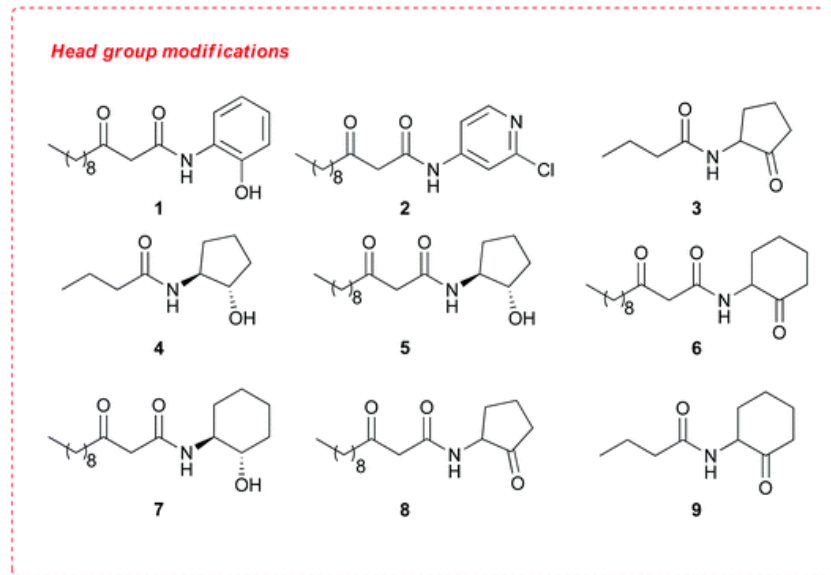
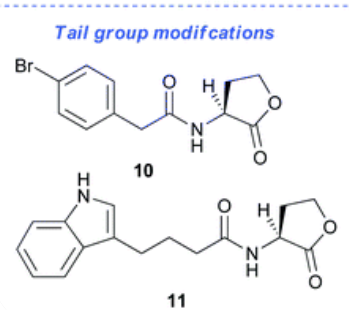
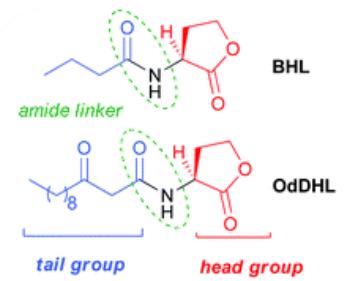
# Disruption of biofilm formation in *A. baumannii* using engineered quorum-quenching lactonases



# Αναστολή δέσμευσης με τον υποδοχέα

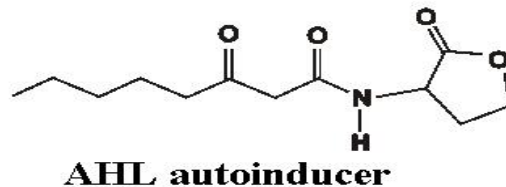
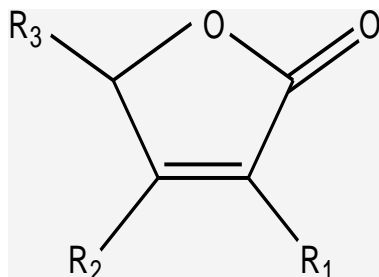
## Αλλαγές στα σηματοδοτικά μόρια

- Λακτονικό δακτύλιο
  - Πιο σταθερό μόριο
- Πλευρικές αλυσίδες

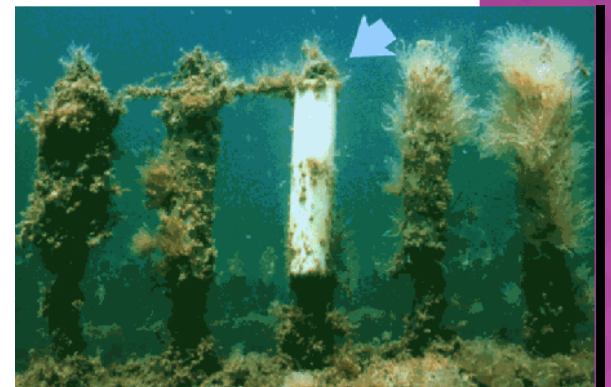


# Φυσικές φουρανόνες

- Μιμούνται τα AHL μόρια και παρεμβαίνουν στα συστήματα επικοινωνίας των βακτηρίων (1995)
- Οι **φουρανόνες δεσμεύονται** ειδικά στους υποδοχείς των AHL μορίων και επιταχύνουν την πρωτεολυτική τους διάσπαση
- Αναστέλλουν την **QS-regulated έκφραση γονιδίων** στα βακτήρια του εντέρου όπως *E. coli* και *Salmonella*, η οποία χρησιμοποιεί μόρια AI-2

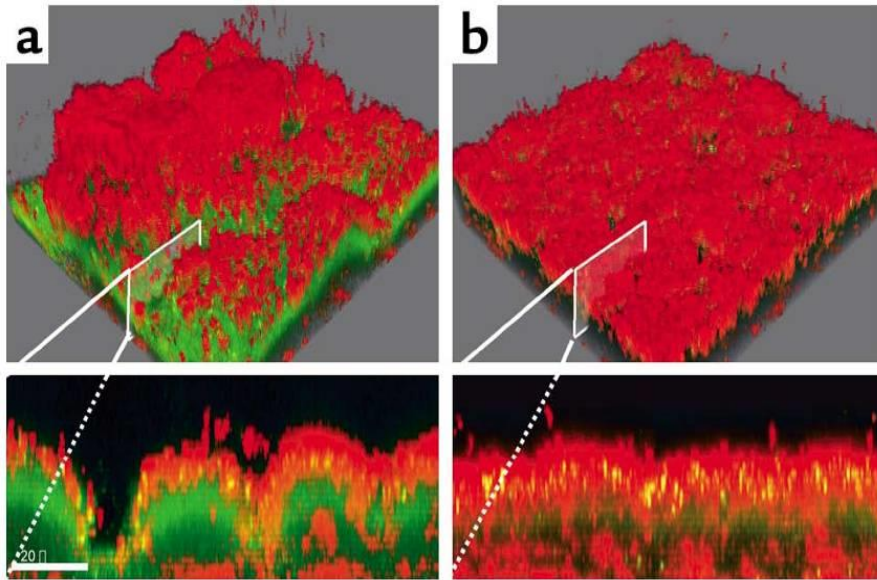


*D. pulhra*



# Συνθετικές φουρανόνες

## Δραστικές έναντι της *P.aeruginosa*



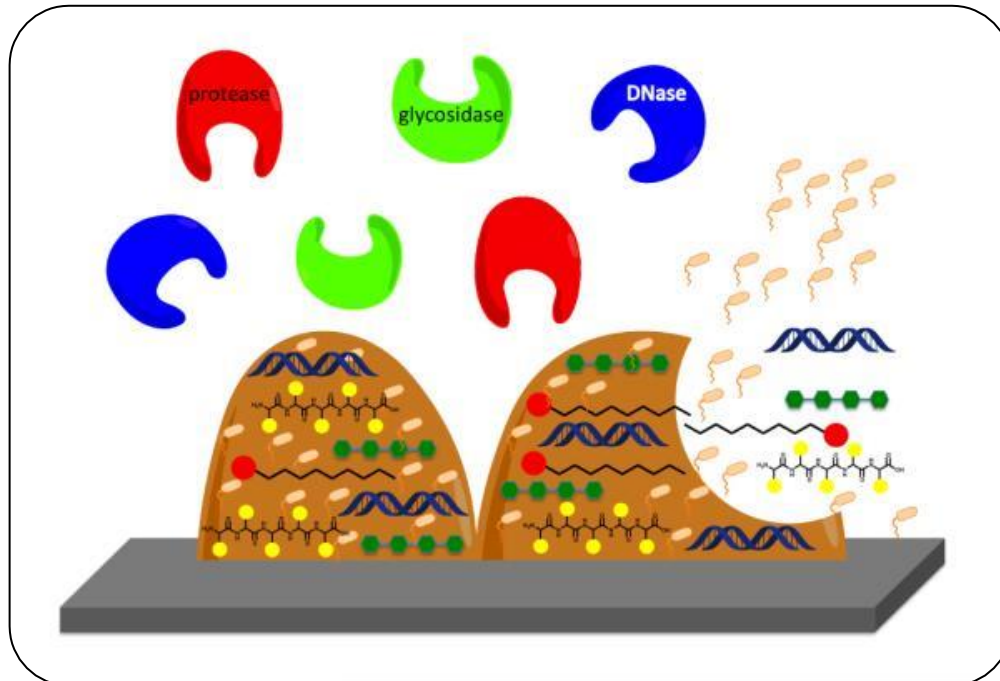
- 93 γονίδια
- 80% ελέγχονται από qs
- Αναστέλλουν την παραγωγή και έκκριση λοιμογόνων παραγόντων:
  - πρωτεάση
  - πυοκυανίνη

# Ενζυματική διάσπαση της βιομεμβράνης

**Dnase : *S. aureus***

**Hydrolase : *Aggregatibacter actinomycetemcomitans***

**Lyase : *P. aeruginosa***



# Ενζυματική διάσπαση της βιομεμβράνης

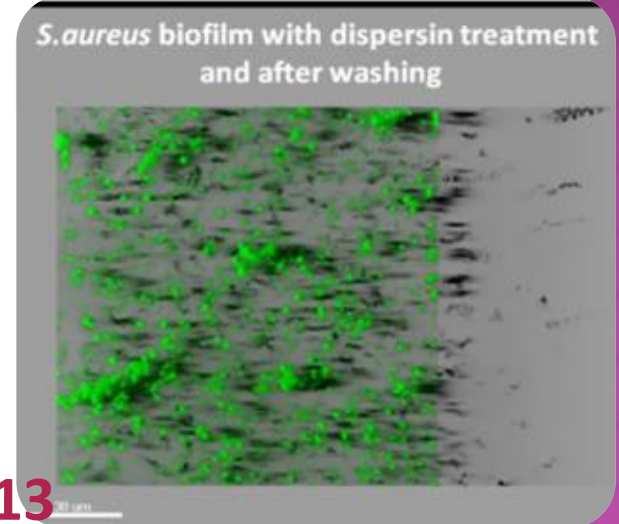
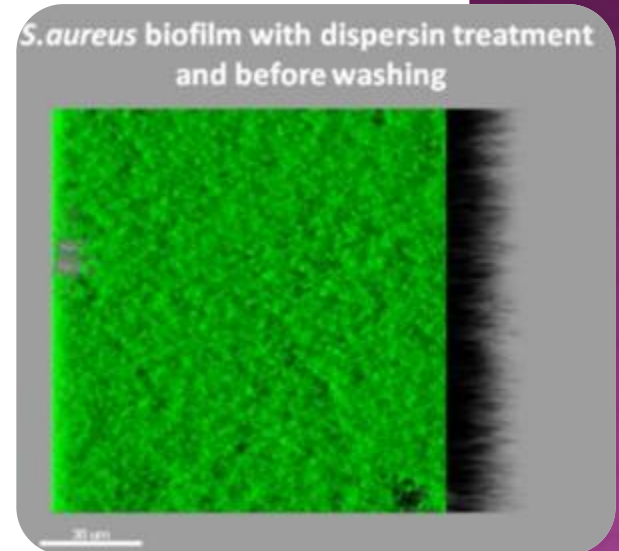
## ⊙ Dispersin B :

### ⊙ Αναστέλλει το σχηματισμό βιομεμβράνης

- *S.aureus*
- *S.epidermidis*
- *P. aeruginosa*
- *E.coli*

### ⊙ In vivo

### ⊙ Σε συνδιασμό με triclosan αποτρέπει τον αποικισμό των καθετήρων με *S.aureus*



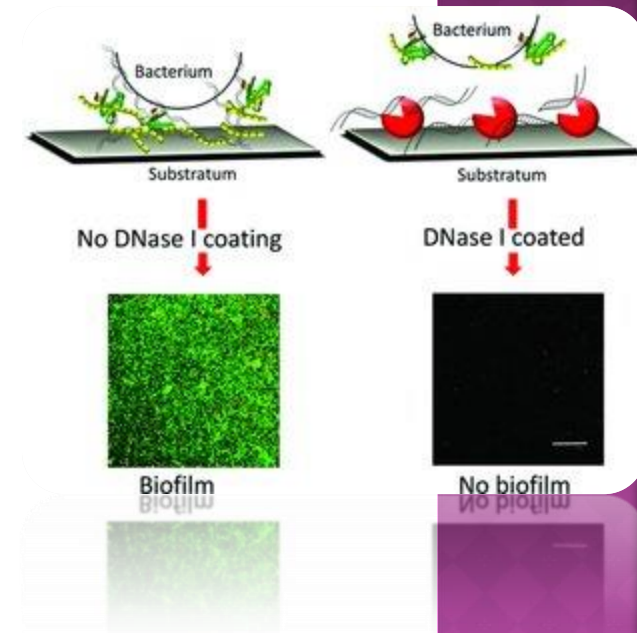
# Ενζυματική διάσπαση της βιομεμβράνης

## ◎ Dnase : *B. licheniformis*

- Διασπά σχηματισμένες βιομεμβράνες από Gram- positive και Gram-negative βακτήρια

## ■ Recombinant human DNase I (rh DNase)

- Αυξάνει τη δράση των αμινογλυκοσιδών έναντι της *P. aeruginosa*
- Χρησιμοποιείται στην κυστική ίνωση
  - Pulmozyme



# Συμπεράσματα

- ⊙ Ανάγκη ανεύρεσης νέων φαρμάκων για την αντιμετώπιση λοιμώξεων με ανθεκτικά στελέχη
- ⊙ Τα διακυτταρικά συστήματα επικοινωνίας φαίνεται ότι αποτελούν ζωτικής σημασίας μηχανισμούς με τους οποίους τα βακτήρια ρυθμίζουν τους λοιμογόνους μηχανισμούς
- ⊙ Οι αναστολείς των QS φαίνεται ότι *in vitro* και σε πειραματόζωα έχουν πολύ καλά αποτελέσματα αλλά χρειάζεται περισσότερη μελέτη για να χρησιμοποιηθούν στην κλινική πράξη

**Πολλά υποσχόμενο πεδίο**



**ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ ΠΟΛΥ**

