Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
ΜΠΣ Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Γενετική ποικιλομορφία των γονιδίων αντοχής στην κολιστίνη (mcr) σε στελέχη Acinetobacter baumannii

POST GRADUATE THESIS

Genetic diversity of colistin resistance genes (mcr) in Acinetobacter baumannii strains

ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ(ΤΩΝ)/NAME OF STUDENTS

Δημήτριος Καρακαλπακίδης

Dimitrios Karakalpakidis

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Απόστολος Μπελούκας

Apostolos Beloukas

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2022

Faculty of Health and Caring Professions

Department of Biomedical Sciences

Postgraduate program:

Biomedical methods and technology in diagnosis

POST GRADUATE THESIS

Genetic diversity of colistin resistance genes (mcr) in Acinetobacter baumannii strains

Dimitrios Karakalpakidis

20037

dimkarakal@gmail.com

FIRST SUPERVISOR

Apostolos Beloukas

SECOND SUPERVISOR

Crisa Vogiatzaki

AIGALEO 2022

Επιτροπή εξέτασης

Ημερομηνία εξέτασης: 3/10/2022

	Ονόματα εξεταστών	Υπογραφή
1ος Εξεταστής	Απόστολος Μπελούκας	Apostolos Beloukas Digitally signed by Apostolos Beloukas Date: 2022.10.06 08:35:28 +03'00'
2ος Εξεταστής	Χρύσα Βογιατζάκη	Chrysanthi Vogiatzaki Digitally signed by Chrysanthi Vogiatzaki Date: 2022.10.06 11:44:55 +03'00'

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος Δημήτριος Καρακαλπακίδης του Κωνσταντίνου, με αριθμό μητρώου 20037 φοιτητής του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Βοϊατρικές μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Ο Δηλών

Δημήτριος Καρακαλπακίδης

DIMITRIOS KARAKALPAKIDIS

Digitally signed by DIMITRIOS KARAKALPAKIDIS
Date: 2022.10.05 17:49:17 +03'00'

Ευχαριστίες

Με την περάτωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς ευχαριστίες μου στον κ. Απόστολο Μπελούκα ο οποίος είναι Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Μικροβιολογίας και Ιολογίας στο τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, στην κα. Όλγα Παππά Ακαδημαϊκή Υπότροφο του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών και Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια του Εργαστηρίου Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας (Ε.Μ.Μ.Α.) του τμήματος, και στην κα. Χρύσα Διολή διδακτορική φοιτήτρια του Εργαστηρίου Μοριακής Μικροβιολογίας και Ιολογίας, για την πολύτιμή βοήθεια, καθοδήγηση και γνώσεις τις οποίες μου προσέφεραν.

Εκ βαθέων θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Χριστίνα Κοτταρίδη Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας στον Τομέα Γενετικής Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας στο Τμήματος Βιολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, που ανέλαβε την εκπαίδευσή μου από τα πρώτα κιόλας πειράματα έως την ολοκλήρωση της έρευνας και την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα πρέπει να πω στο προσωπικό των νοσοκομειακών εργαστηρίων που συμμετείχαν στην έρευνα, για την πολύτιμη βοήθειά τους και την άψογη εξυπηρέτηση, παρά το φόρτο εργασίας που είχαν να αντιμετωπίσουν.

Τέλος δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τους δικούς μου ανθρώπους, την γυναίκα μου και τα δυο μου παιδιά, για την στήριξη που μου προσέφεραν και τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσαν για να μπορέσω να ολοκληρώσω την εργασία μου.

Περίληψη

Εισαγωγή: Το γένος *Acinetobacter* και ιδιαίτερα το *Acinetobacter baumannii* είναι ένα αναδυόμενο gram αρνητικό βακτηρίδιο το οποίο αποτελεί απειλή σε παγκόσμιο επίπεδο, λόγο της ανθεκτικότητας που παρουσιάζει στα αντιβιοτικά. Σχετίζεται με ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις και παρουσιάζει αυξημένο επιπολασμό σε μονάδες εντατικής θεραπείας. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι σε αρκετές περιπτώσεις δεν αφήνει καμία επιλογή καταπολέμησης με αντιβιοτικά αφού παρουσιάζεται ως πανανθεκτικό.

Σκοπός: Η παρούσας εργασίας θέτει σαν σκοπό την περιγραφή ανθεκτικών στην κολιστίνη στελεχών *Acinetobacter baumannii*, τα οποία απομονώθηκαν από καλλιέργειες ασθενών που νοσηλεύτηκαν σε νοσοκομεία της Θεσσαλονίκης. Στόχος αυτής της έρευνας είναι, η αναζήτηση συγκεκριμένου γονιδίου από τα *mcr 1-9* τα οποία προσδίδουν αντοχή στην κολιστίνη.

Μέθοδος: Η αρχική εκλογή των στελεχών *Acinetobacter baumannii* ανθεκτικών στην κολιστίνη, έγινε συμφώνα με τα αποτελέσματα από το vitek 2 microbial identification system του εκάστοτε νοσοκομείου. Η αντοχή στην κολιστίνη επιβεβαιώθηκε με e-test από την lioflichem (liofilchem mic test strip) και με την μέθοδο των μικροαραιώσεων microdilution colistin broth sensitivity. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε έλεγχος της παρουσίας γονιδίων αντοχής στην κολιστίνη *mcr 1, mcr 2, mcr 3, mcr 4, mcr 5, mcr 6, mcr 7, mcr 8, mcr 9* με την τεχνική της πολυπλεκτικής (multiplex) PCR.

Αποτελέσματα: Στα τα υπό εξέταση δείγματα με την διαδικασία της multiplex PCR, δεν ανιχνεύτηκε κανένα από τα γονίδια *mcr 1, mcr 2, mcr 3, mcr 4, mcr 5, mcr 6, mcr 7, mcr 8, mcr 9* που προσδίδουν αντοχή στην κολιστίνη, σε κανένα από τα στελέχη *Acinetobacter baumannii.*

Συμπεράσματα: Για την ανεύρεση του μηχανισμού αντοχής στην κολιστίνη που παρουσιάζεται σε στελέχη *Acinetobacter*, απαραίτητο είναι να διεξαχθεί ένας λεπτομερής γενετικός χαρακτηρισμός που θα καλύπτει διάφορες πιθανές αιτίες αντοχής.

Λέξεις κλειδιά: *Acinetobacter baumannii*, *mcr 1–9*, κολιστίνη.

Abstract

Introduction: The genus Acinetobacter, particularly Acinetobacter baumannii is an emerging gram negative bacterium that poses a global threat due to its resistance to antibiotics. It is associated with nosocomial infections and has an increased prevalence in intensive care units. Interestingly, it leaves no option for antibiotic treatment in many cases, as it is reported to be resistant to all antibiotics.

Purpose: The present study aims to describe colistin resistant strains of Acinetobacter baumannii isolated from cultures of patients hospitalized in hospitals in Thessaloniki. This research aims to search for a specific gene from *mcr 1-9* which confers resistance to colistin.

Method: The initial selection of Acinetobacter baumannii strains resistant to colistin, was done according to the results from the vitek 2 microbial identification system of each hospital. Colistin resistance was confirmed by e-test from lioflichem (liofilchem mic test strip) and by the microdilution colistin broth sensitivity method. Subsequently, the presence of colistin resistance genes *mcr 1, mcr 2, mcr 3, mcr 4, mcr 5, mcr 6, mcr 7, mcr 8, mcr 9* was tested by multiplex PCR technique.

Results: In the samples tested by multiplex PCR procedure, none of the *mcr 1, mcr 2, mcr 3, mcr 4, mcr 5, mcr 6, mcr 7, mcr 8, mcr 9* genes conferring colistin resistance were detected in any of the Acinetobacter baumannii strains.

Discussion: To find the mechanism of colistin resistance exhibited in Acinetobacter strains, it is necessary to carry out a detailed genetic characterization covering possible causes of resistance.

Key words: Acinetobacter baumannii, *mcr 1-9*, colistin.

Περιεχόμενα

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας iv
Ευχαριστίες vi
Περίληψη vii
Abstract viii
Πίνακας εικόνων xi
Συντομογραφίες xii
Πρόλογος 1
Εισαγωγή 2
1. Θεωρητικό μέρος 5
1.1 Αντιβιοτικά 5
2. Κολιστίνη 7
2.1 Μορφή και χημεία της Κολιστίνης 8
2.2 Δράση της Κολιστίνης 8
2.3 Φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική της κολιστίνης 9
2.4 Αντοχή στην κολιστίνη 10
3. Mobilized Colistin Resistance (MCR) γονίδια 10
3.1 MCR-1 11
3.2 MCR-2 12
3.3 MCR-3 12
3.4 MCR-4, MCR-5, MCR-6, MCR-7 13
3.5 MCR-8, MCR-9, MCR-10 13
3.6 Παραλλαγές MCR γονιδίων 14
4. Acinetobacter baumannii 15
4.1 Ιδιότητες και ταξινόμηση 15
4.2 Λοιμώξεις από *Acinetobacter baumannii* 16
4.3 Μηχανισμοί αντοχής του *Acinetobacter baumannii στα αντιβιοτικά* 17
4.4 *Acinetobacter baumannii* και βιοφίλμ 18
5. Πειραματικό μέρος 18
5.1 Σκοπός της μελέτης 18
5.2 Περιγραφή δειγμάτων 19
5.3 Ευαισθησία στην Κολιστίνη 24
5.4 Ευαισθησία στα αντιβιοτικά 25

5.5 Μοριακός έλεγχος 26
5.5.1 Εξαγωγή γενετικού υλικού 27
5.5.2 Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) 27
5.5.3 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων 28
5.6 Αποτελέσματα 28
6. Συζήτηση 30
Αναφορές 33

Πίνακας εικόνων

Εικόνα 1. Συσχέτιση της εμφάνισης αντοχής στα αντιβιοτικά ανάλογα με την ημερομηνία κυκλοφορίας τους [5]. 4
Εικόνα 2. Δομές κολιστίνης Α και Β [32]. 8
Εικόνα 3. Δράση της κολιστίνης στη βακτηριακή μεμβράνη [35]. 9
Εικόνα 4. Γεωγραφική κατανομή στελεχών ανθεκτικών στην κολιστίνη με την μεσολάβηση πλασμιδίου mcr-1 (Νοέμβριος 2015 – Απρίλιος 2016) [43]. 12
Εικόνα 5. Μορφολογία και ιδιότητες χρώσης του Acinetobacter baumannii. (Α) Χρώση κατά gram. (Β) και (Γ) εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο [62]. 15
Εικόνα 6. Απομόνωση A.baumannii στις διάφορες κλινικές μονάδες νοσηλείας (ΜΑΑ= Μονάδα Αναπνευστικής Ανεπάρεκειας, ΜΕΘ=Μονάδα Εντατικής Θεραπείας) 22
Εικόνα 7. Αναλογία είδους καλλιέργειας/κλινικού δείγματος απομόνωσης των στελεχών A.baumannii που συμμετείχαν στην έρευνα 23
Εικόνα 8. (Α) Συνύπαρξη και άλλου μικροβίου (ανθεκτικού ή μη) στο ίδιο δείγμα, (Β) Ανάπτυξη και άλλου πολυανθεκτικού μικροβίου στον ίδιο ασθενή. 23
Εικόνα 9. Αναλογία ανδρών και γυναικών από τους οποίους απομονώθηκαν τα στελέχη A.baumannii που μελετούνται στην παρούσα εργασία. 24
Εικόνα 10. Έλεγχος ευαισθησίας της κολιστίνη, μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού MIC με e-test από την lioflichem, MIC > 4μg/mL. (φωτογραφία από το προσωπικό μου αρχείο κατά την διάρκεια των πειραμάτων). 25
Εικόνα 11.Είκονα αποτελέσματος των PCR προϊόντων. mcr1=320bp, mcr2=715bp, mcr3=929bp, mcr5=1644bp και 4 κλινικά δείγματα, PCR WATER = Αρνητικός Μάρτυρας. (φωτογραφία από το προσωπικό μου αρχείο κατά την διάρκεια των πειραμάτων). 29
Εικόνα 12.Εικόνα αποτελέσματος των PCR προϊόντων. mcr1=320bp, mcr2=715bp, mcr3=929bp, mcr5=1644bp και 1 κλινικό δείγμα. (φωτογραφία από το προσωπικό μου αρχείο κατά την διάρκεια των πειραμάτων). 30

Συντομογραφίες

	Αγγλική ορολογία	Ελληνική ορολογία
°C	Degrees Celsius	Βαθμοί Κελσίου
Ca	Calcium	Ασβέστιο
CDC	Center of disease and prevention	Κέντρο ελέγχου και πρόληψης νοσημάτων
CLSI	Clinical and laboratory standards institute	Ινστιτούτο κλινικών και εργαστηριακών προτύπων
Da	Dalton	Ντάλτον
DNA	Deoxyribonucleic acid	Δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ
EptA	Phosphoethanolamine transferase	Τρανσφεράση της φωσφοαιθανολαμίνης
EtBr	Ethidium bromide	Βρωμιούχο αιθίδιο
EUCAST	European committee on antimicrobial susceptibility testing	Ευρωπαϊκή επιτροπή δοκιμών ευαισθησίας στα αντιμικροβιακά
GNB	Gram negative bacteria	Αρνητικά κατά χρώση Gram βακτήρια
HPLS	High performance liquid chromatography	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
LPS	Lipopolysaccharide	Λιποπολυσακχαρίτης
MCR	Mobilized colistin resistance	Κινητοποιημένη αντίσταση στην κολιστίνη
MDRAB	Multi drugs resistant *Acinetobacter baumannii*	Πολυανθεκτικό *Acinetobacter baumannii*
Mg	Magnesium	Μαγνήσιο
MIC	Minimal inhibitory concentration	Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση
Min	minutes	Λεπτά
Mm	Millimeters	Χιλιοστά
PCR	Polymerase chain reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PD	Pharmacodynamics	Φαρμακοδυναμική
PEtN	Phosphoethanolamine	Φωσφοαιθανολαμίνη
PK	Pharmacokinetics	Φαρμακοκινητική
RCS	Regulator of capsule synthesis	Ρυθμιστής της σύνθεσης της κάψουλας

RNA	Ribonucleic acid	Ριβονουκλεϊκό/ριβοζονουκλεϊκό οξύ
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid	Ριβοσωμικό ριβονουκλεϊκό/ριβοζονουκλεϊκό οξύ
Spp	more than one unnamed species	περισσότερα του ενός ανώνυμα είδη
V	Volt	Βόλτ
WFI	Water for injection	Νερό για ένεση
WHO	World health organization	Παγκόσμιος οργανισμός υγείας
ΕΝΥ	Cerebrospinal/spinal fluid	Εγκεφαλονωτιαίο Υγρό
ΜΑΑ	Respiratory insufficiency unit	Μονάδα αναπνευστικής ανεπάρκειας
ΜΑΦ	Advanced care unit	Μονάδα αυξημένης φροντίδας
ΜΕΘ	Intensive care unit	Μονάδα εντατικής θεραπείας

Πρόλογος

Στα πλαίσια της επιστήμης της Μικροβιολογίας, σε συνδυασμό με μεθόδους της Μοριακής Μικροβιολογίας και των δυνατοτήτων τις οποίες προσφέρει, αποφάσισα να ασχοληθώ με ένα νοσοκομειακό μικρόβιο μείζονος σημασίας, όσον αφορά την εξέλιξη και την μικροβιακή του αντοχή, το *Acinetobacter baumannii*.

Τα βακτήρια του γένους *Acinetobacter*, είναι μικροοργανισμοί που μέχρι ορισμένα χρόνια πριν παρουσίαζαν ευαισθησία στις περισσότερες από τις ομάδες των αντιβιοτικών. Μέσα σε λίγα χρόνια τα βακτήρια του γένους *Acinetobacter* αναθεωρήθηκαν εκτενώς και ταξινομήθηκαν σε είδη, παρουσιάζοντας εκτεταμένη αντοχή σε πολλές ομάδες αντιβιοτικών. Από αυτά το *Acinetobacter baumannii* είναι το πιο σημαντικό κλινικά απομονωμένο είδος και αποτελεί το βακτηριακό στέλεχος της παρούσας ερευνητικής διπλωματικής εργασίας και πιο συγκεκριμένα το MDRAB (multi drugs resistant *Acinetobacter baumannii*)

Τα MDRAB στελέχη απομονώνονται από οποιοδήποτε υλικό καλλιέργειας όπως αίμα, πτύελα, βρογχικές εκκρίσεις, ούρα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ΕΝΥ), χειρουργικά τραύματα, προκαλώντας αντίστοιχα βακτηριαιμία, πνευμονία, ουρολοίμωξη, μηνιγγίτιδα κτλ. Η ευαισθησία τους στις διάφορες ομάδες αντιβιοτικών, δυστυχώς δεν δίνει στους κλινικούς ιατρούς πολλές επιλογές, βγάζοντας εκτός της θεραπευτικής αγωγής πολλά αντιβιοτικά και στενεύοντας επικίνδυνα το φάσμα εκλογής της κατάλληλης θεραπείας. Εμπειρικά τα MDRAB είναι ευαίσθητα σε δύο ομάδες αντιβιοτικών: σε αυτή των γλυκυλκυκλινών και στις πολυμιξίνες. Πιο συγκεκριμένα στην τιγεκυκλίνη και στην κολιστίνη. Σε κάποιες βέβαια περιπτώσεις οι επιλογές είναι μηδενικές καθώς *in vitro* παρουσιάζεται ανθεκτικότητα τόσο στην τιγεκυκλίνη όσο και στην θεραπεία τελευταίας επιλογής που είναι η κολιστίνη.

Σύμφωνα με πρόσφατα δημοσιευμένες μελέτες [1-4], η αντοχή στην κολιστίνη οφείλεται σε διάφορους μηχανισμούς. Ένας από τους μηχανισμούς αυτούς είναι το αποτέλεσμα της τροποποίησης του βακτηριακού λιπιδίου Α, συστατικό του λιποπολυσακχαρίτη (LPS). Ένας δεύτερος, ο οποίος συχνά ενοχοποιείται για την αντοχή που παρουσιάζουν στελέχη του γένους *Acinetobacter* στην κολιστίνη, σχετίζεται με την αντικατάσταση αμινοξέων στο οπερόνιο pmrCAB, γεγονός που προκαλεί διατάραξη στην έκφραση του pmrC επηρεάζοντας την δέσμευση της κολιστίνης. Τέλος ένας μηχανισμός ο οποίος φαί-

νεται να είναι ιδιαιτέρα σπάνιος για το συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος είναι τα γονίδια αντοχής τα οποία εδράζονται σε πλασμίδιο. Έως σήμερα έχουν περιγραφεί 10 γονίδια *mcr 1–10* (Mobilized Colistin Resistance – *mcr*), μέρος αυτών των γονιδίων και πιο συγκεκριμένα τα *mcr 1-9* , θα αναζητηθούν στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Σε στελέχη MDRAB, τα οποία έχουν απομονωθεί από καλλιέργειες ασθενών σε νοσοκομεία της Θεσσαλονίκης, με μεθόδους κλασικής μικροβιολογίας, πραγματοποιήθηκε μοριακός έλεγχος για την εξεύρεση του μηχανισμού ο οποίος προσδίδει αντοχή στην κολιστίνη.

Εισαγωγή

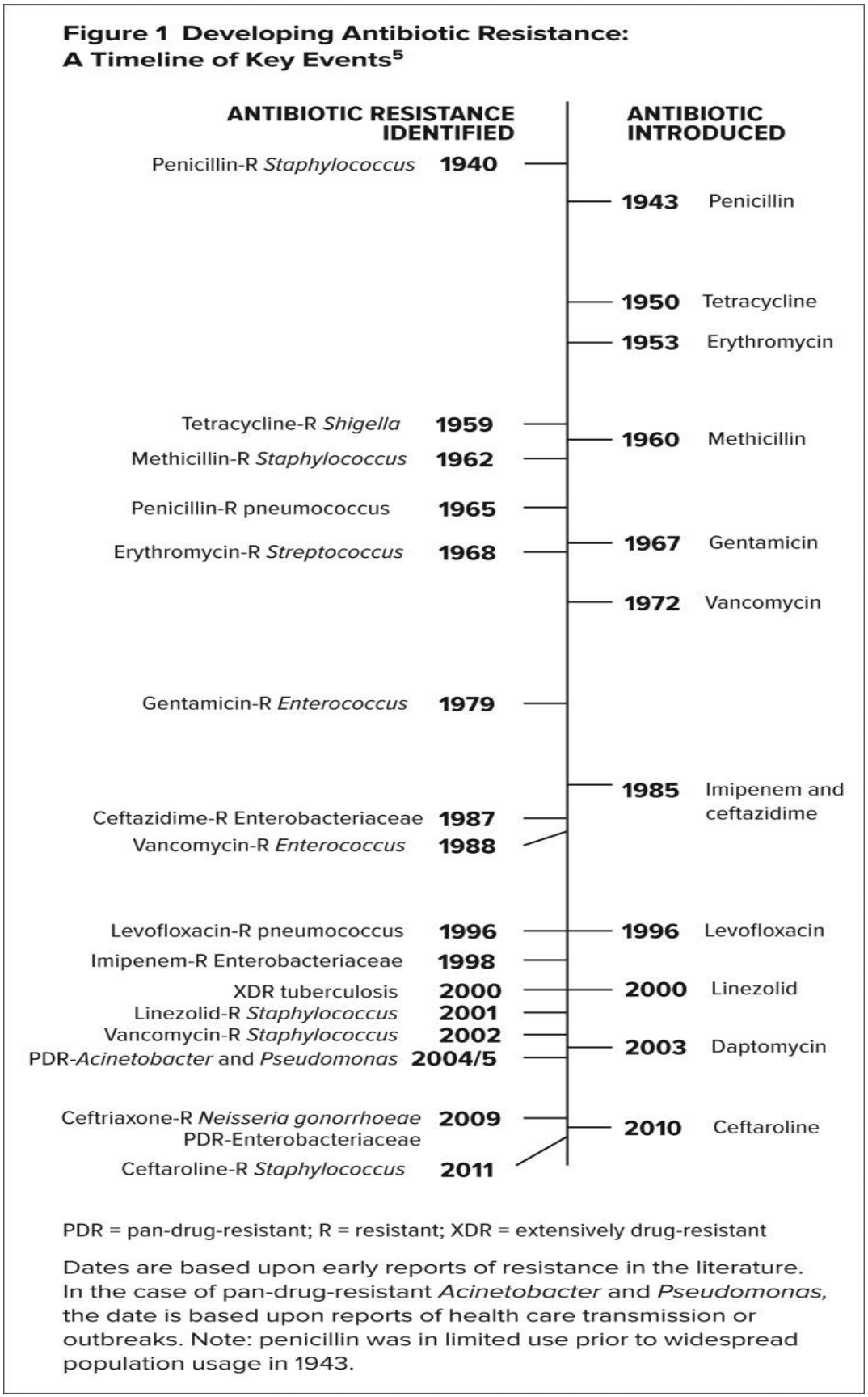
Η ανακάλυψη των αντιβιοτικών έθεσε την πορεία και την εξέλιξη της ιατρικής σε διαφορετικό επίπεδο [5]. Μετά την εμπορική κυκλοφορία των αντιβιοτικών κατά την δεκαετία του 1940 επήλθε μια επανάσταση στην σύγχρονη ιατρική επιτρέποντας την ίαση ασθενειών που πριν φάνταζε αδύνατη [6].

Μόλις κάποιες δεκαετίες μετά την ίαση των πρώτων ασθενών με την χρήση των αντιβιοτικών, οι βακτηριακές λοιμώξεις έχουν μετατραπεί και πάλι σε παγκόσμια απειλή [5]. Η μη σωστή, αλόγιστη και ακατάλληλη χρήση των αντιβιοτικών, όχι μόνο από την ιατρική κοινότητα, αλλά και από τους ίδιους τους ασθενείς, έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη μηχανισμών αντοχής σε πολλά από τα αντιβιοτικά (βλ. Εικόνα 1), γεγονός το οποίο είναι άμεσα συνδεδεμένο με την αύξηση της θνησιμότητας [7]. Φυσικά στην εξέλιξη αυτής της κατάστασης, έχει συμβάλει σημαντικά και η έλλειψη παραγωγής νέων αντιβιοτικών από τις υφιστάμενες φαρμακοβιομηχανίες, λόγω της χαμηλής χρηματοδότησης [8]. Με βάση αυτά τα δεδομένα, ο Παγκόσμιος Οργανισμό Υγείας (WHO) και το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (CDC), θεωρούν την αύξηση της αντοχής στα αντιβιοτικά ως μια «παγκόσμια κρίση» και έχουν θεμελίωση τη λειτουργία προγραμμάτων διαχείρισης αντιβιοτικών [9].

Λόγω της μικροβιακής αντοχής έχουμε αύξηση στο κόστος της υγείας, καθώς οι μέρες νοσηλείας εντός των νοσοκομειακών μονάδων αυξάνονται. Αυτή η αύξηση στις μέρες νοσηλείας είναι και εξαιρετικά επικίνδυνη για την ανάπτυξη ενδονοσοκομειακών

λοιμώξεων εξαιτίας πολυανθεκτικών μικροβίων, τα οποία κοστίζουν την ζωή χιλιάδων νοσηλευομένων, ιδίως στις Μονάδες Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ) [10].

Μεταξύ των κυριότερων παθογόνων μικροοργανισμών που παρουσιάζουν αυξημένη αντοχή στα αντιβιοτικά προκαλώντας πολύ συχνά ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις είναι: Όσον αφορά τα Gram θετικά μικρόβια, ο *Staphylococcus aureus* ανθεκτικός στην μεθικιλλίνη, οξακιλλίνη και κεφοξιτίνη, οι εντερόκοκκοι ανθεκτικοί στην βανκομυκίνη και οι πνευμονιόκοκκοι ανθεκτικοί στα β-λακταμικά. Ενώ από τα Gram αρνητικά μικρόβια ευθύνονται κυρίως η *Klebsiella pneumoniae*, η *Escherichia coli* και ο *Proteus mirabilis* που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στα β-λακταμικά και στις κεφαλοσπορίνες 3^{ης} γενιάς, καθώς και μικρόβια όπως η *Pseudomonas aeruginosa*, το *Acinetobacter* και *Stenotrophomonas maltophilia* τα οποία παρουσιάζονται ανθεκτικά σε πολλές κατηγορίες φαρμάκων [11].



Εικόνα 1. *Συσχέτιση της εμφάνισης αντοχής στα αντιβιοτικά ανάλογα με την ημερομηνία κυκλοφορίας τους [5].*

1. Θεωρητικό μέρος

1.1 Αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά είναι ουσίες που έχουν σαν στόχο τους να καταστρέψουν το μικρόβιο χωρίς να βλάψουν τον ξενιστή, συνήθως είναι συνθετικές ουσίες και χρησιμοποιούνται ενάντια στις βακτηριακές λοιμώξεις, υπάρχουν βέβαια και αντιβιοτικά φυσικής προέλευσης [12].

Σύμφωνα με τον τρόπο δράσης τους τα αντιβιοτικά διακρίνονται σε δυο κατηγορίες, στα βακτηριοστατικά και στα βακτηριοκτόνα, στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα αντιβιοτικά που σαν στόχο τους έχουν να αναχαιτίσουν την ανάπτυξη του βακτηρίου χωρίς όμως να μπορούν να το καταστρέψουν. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν τα αντιβιοτικά τα οποία στοχεύουν στην καταστροφή και τον θάνατο των βακτηρίων [13].

Μία δεύτερη διάκριση των αντιβιοτικών μπορεί να γίνει σύμφωνα με το φάσμα τον μικροβίων στα οποία είναι δραστικά, έτσι έχουμε τα αντιβιοτικά «ευρέος φάσματος», τα οποία είναι αποτελεσματικά έναντι πολλών διαφορετικών ομάδων βακτηρίων και τα αντιβιοτικά «στενού φάσματος», τα οποία είναι δραστικά έναντι λίγων ομάδων βακτηρίων [14].

Ο μηχανισμός δράσης των αντιβιοτικών είναι επίσης ένας σημαντικός τρόπος για την κατηγοριοποίηση των αντιβιοτικών. Ανάλογα με το σύστημα το οποίο επηρεάζουν στα βακτήρια, διακρίνονται σε : αναστολείς πρωτεϊνοσύνθεσης, σε αναστολείς σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος, σε αναστολείς σύνθεσης γενετικού υλικού (DNA/RNA) και σε αναστολείς σύνθεσης μυκολικού οξέος και φυλλικού οξέος [15, 16]. Στον Πίνακας 1 γίνεται μια διάκριση των οικογενειών των αντιβιοτικών συμφώνα με τον μηχανισμό δράσης τους.

Πίνακας 1. *Διάκριση αντιβιοτικών συμφώνα με τον μηχανισμό δράσης τους [17-28].*

ΑΝΑΣΤΕΛΛΟΥΝ ΤΗΝ ΣΥΝΘΕΣΗ		ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΕΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ	ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ			
ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΤΟΙΧΩΜΑΤΟΣ	ΒΗΤΑ ΛΑΚΤΑΜΙΚΑ	Πενικιλίνες	Πενικιλινάση ευαίσθητα			
			Φυσικές Πενικιλίνες	Penicillin G Penicillin V		
			Αμινοπενικιλλίνες	Amoxicillin Ampicillin		
			Πενικιλινάση ανθεκτικά			
			Nafcillin	Oxacillin	Dicloxacillin	
		Κεφαλοσπορίνες	1ης Γενιάς	Cefazolin	Cephapririn	Cephalexin
				cefadroxil	Cephapririn	
			2ης Γενιάς	Cefacor	Cefotetan	Cefuroxime
				Cefoxitin	Cefprozil	
			3ης Γενιάς	Ceftriaxone	Ceftazidime	Cefotaxime
					Cefixime	
			4ης Γενιάς	Cefepime	Cefpirome	
			5ης Γενιάς	Ceftaroline		
		Καρβαπενέμες	Ertapenem	Doripenem	Imipenem	Meropenem
		Μονοβακτάμες	Aztreonam			
		Αναστολείς βήτα λακταμασών	Sulbactam	Tazobactam	Clavulanic Acid	
	ΜΗ ΛΑΚΤΑΜΙΚΑ	Γλυκοπεπτίδια	Vancomycin	Bacitracin		
			Teicoplanin	Polymyxin B		
ΠΡΩΤ	Αμινογλικοσίδες		Gentamycin	Tobramycin	Streptomycin	
			Amikacin	Neomycin		
	Τετρακυκλίνες		Doxycycline	Tigecyclin		
			Tetracyclin	Minocycline		
	Οξαζολιδινόνες		Linezolid			

ΕΙΝΩΝ	Στρεπτογραμίνες	Quinupristin-Dalfopristin		
	Χλωραμφαινικόλη			
	Μακρολίδες	Erythromycin	Azithromycin	Clarythromycin
	Λινκοσαμίδες	Clindamycin	Lincomycin	
DNA	Κινολόνες	Nalidixic Acid		
	Φθορικινολόνες	Ciprofloxanin	Moxifloxacin	Ofloxacin
		Lecofloxacin	Norfloxacin	
	Μετρονιδαζόλη			
RNA	Ριφαμπικίνη			
ΦΥΛΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ	Σουλφοναμίδες	Sulfamethoxazole	Sulfadiazine	Sulfisoxazole
	Αναστολείς MTHFR	Pyrimethamine	Pyrimethamine	

2. Κολιστίνη

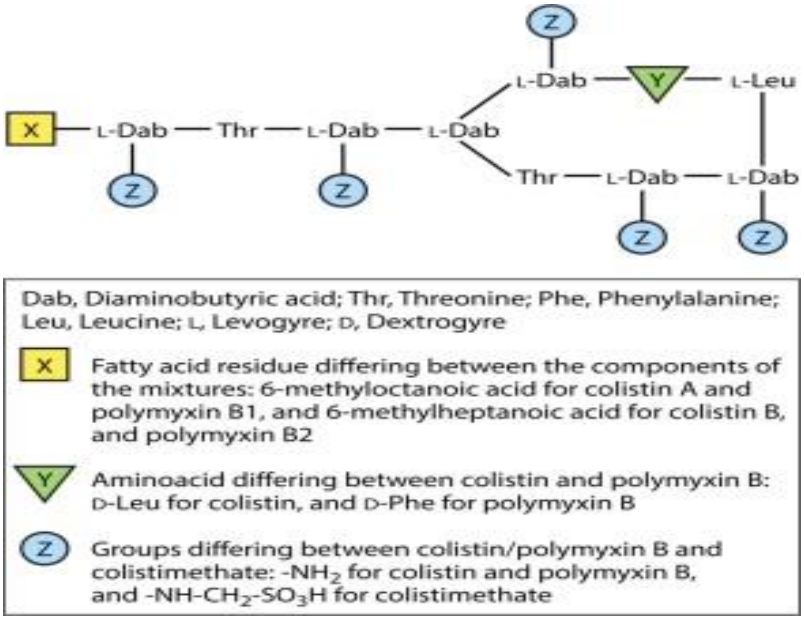
Η κολιστίνη ή αλλιώς πολυμυξίνη Ε, είναι ένα αντιβιοτικό το οποίο ανήκει στην κατηγορία των πολυμυξινών. Πρόκειται για μια ομάδα πολυπεπτιδίκων αντιβιοτικών που απαρτίζεται από τις πολυμυξίνες Α, Β, C, D και Ε [29]. Λόγο των τοξικών συνεπειών των πολυμυξινών στον ανθρώπινο οργανισμό, η θειική πολυμυξίνη Β και η κολιστίνη, είναι τα μόνα αντιβιοτικά από την κατηγορία των πολυμυξινών τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί κλινικά [30].

Η πρώτη απομόνωση της κολιστίνης αναφαίρετε το 1947 από το εδαφικό βακτήριο Paenibacillus polymyxa subsp. Colistinus [31]. Η χρήση της κολιστίνης είχε αποφθεχθεί για αρκετά χρόνια καθώς στο εμπόριο υπάρχουν φάρμακα με λιγότερο τοξικές παρενέργειες. Η απομόνωση όμως ανθεκτικών gram αρνητικών βακτηρίων με αντοχή στις περισσότερες κατηγορίες αντιβιοτικών, οδήγησε στην επανείσοδο της κολιστίνης στην κλινική πράξη, χαρακτηρίζοντάς την ως αντιβιοτικό τελευταίας επιλογής [32]. Στην πλειονότητα τους τα gram αρνητικά πολυανθεκτικά βακτηρίδια είναι ευαίσθητα στην κολιστίνη, ανάμεσα τους και πολυανθεκτικά στελέχη του γένους *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Klebsiella pneumoniae* [29]. Ενώ ενδογενή αντοχή στην κολιστίνη παρουσιάζουν είδη όπως ο *Proteus*, η *Neisseria*, η *Serratia*, η *Providencia* και τα αναερόβια μικρόβια [33].

Η χορήγηση της κολιστίνης μπορεί να γίνει ενδοφλεβίως, επίσης χορηγείτε δια μέσου εισπνεόμενων φαρμάκων καθώς και μέσω της ενδοκοιλιακής και ενδοραχιαίας οδού [34].

2.1 Μορφή και χημεία της Κολιστίνης

Οι πολυμυξίνες είναι θετικά φορτισμένα πολυπεπτίδια, η κολιστίνη ανήκει στην ομάδα αυτή. Η κολιστίνη συντίθεται μη ριβοσωμικά και έχει μοριακό βάρος 1750 Da, αποτελείτε από ένα κυκλικό επταπεπτίδιο με πλευρική τριπεπτιδική αλυσίδα που ακυλιώνεται στο N άκρο της από μία ουρά λιπαρού οξέος (βλ. Εικόνα 2). Η υδρόφοβη ιδιότητα του N τελικού άκρου είναι υπεύθυνη για την τοξικότητα της κολιστίνης και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανιμικροβιακή της δράση [32, 35].

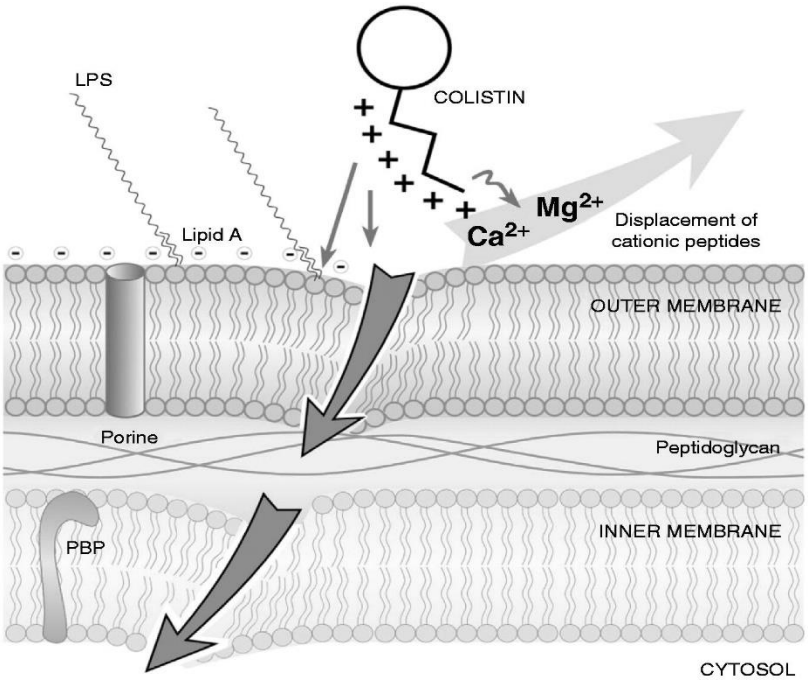


Εικόνα 2. *Δομές κολιστίνης A και B [32].*

2.2 Δράση της Κολιστίνης

Η δράση της κολιστίνης οφείλεται στην λύση και αποσύνθεση της μεμβράνης του βακτηρίου, αυτό επιτυγχάνεται διαμέσου της δέσμευσης του λιπιδικού τμήματος A του βακτηριακού λιποπολυσακχαρίτη [36]. Ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS) είναι ένα στοιχείο δόμησης της εξωτερικής μεμβράνης του βακτηρίου, αποτελείται από αντιγόνο, λιπίδιο A, πυρήνα και ένα πολυσακχαρίτη [37]. Είναι υπεύθυνος για την ακεραιότητα και την σταθερότητα της εξωτερικής μεμβράνης του βακτηρίου και είναι αρνητικά φορτισμένος. Οι

πολυμυξίνες που είναι θετικά φορτισμένες εκτοπίζουν το Mg^{2+} ή Ca^{2+} και δεσμεύουν το λιπιδικό τμήμα Α προκαλώντας την διάσπαση και την αποσταθεροποίηση των εσωτερικών και εξωτερικών μεμβρανών [38]. Η υδρόφοβη λιπιδική ουρά είναι το πιο ανθεκτικό τμήμα του μορίου της πολυμυξίνης. Μετά την απομάκρυνση του λιπιδικού τμήματος Α, παραμένει το εννιαπεπτίδιο του μορίου της πολυμυξίνης δηλαδή το ακυλικό τμήμα είναι αυτό το οποίο ασκεί αντιμικροβιακές ιδιότητες [39].



Εικόνα 3. *Δράση της κολιστίνης στη βακτηριακή μεμβράνη [35].*

2.3 Φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική της κολιστίνης

Λόγω της μικρής απορρόφησης της υπεριώδους ακτινοβολίας και την έλλειψη του φυσικού φθορισμού υπάρχει δυσκολία στην ανάλυση της κολιστίνης με HPLC, τα περισσότερα δεδομένα προκύπτουν από μικροβιολογικές αναλύσεις. Επόμενος δεν υπάρχει πλήρης εικόνα σχετικά με τα φαρμακοκινητικά (PK) και φαρμακοδυναμικά (PD) δεδομένα [40]. Τα δεδομένα αυτά λόγω της τοξικότητας της κολιστίνης είναι ακόμα λιγότερα σε ανθρώπινο οργανισμό, οι περισσότερες αναφορές προέρχονται από δοκιμές σε σκύλους, αρουραίους και μοσχάρια [41, 42].

2.4 Αντοχή στην κολιστίνη

Η επίκτητη αντίσταση στην κολιστίνη συχνά συνδέεται με διάφορες χρωμοσωματικές μεταλλάξεις. Στην πλειονότητά τους οι μηχανισμοί που επιφέρουν αντοχή στην κολιστίνη είναι αυτοί που προκαλούν τροποποίηση του λιπιδικού τμήματος Α του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) της μεμβράνης, το οποίο είναι και ο κύριος στόχος της κολιστίνης. Αυτό συμβαίνει με την τροποποίηση του λιπιδίου Α με 4-αμινο-4-δεοξυ-l-αραβινόζη (l-ara4N) και / ή φωσφοαιθανολαμίνη (PEtN) [43].

Η πλήρης απώλεια του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) θεωρείται επίσης μηχανισμός αντοχής στην κολιστίνη, λόγω μιας μετάλλαξης η οποία λαμβάνει χώρα σε ένα από τα τρία πρώτα γονίδια (*lpxA, lpxB, lpxC*) τα οποία είναι αναγκαία στην βιοσύνθεση του λιπιδίου Α, με αποτέλεσμα την αδυναμία σύνθεσης του λιπιδίου Α και του λιποπολυσακχαρίτη (LPS). [3] Επίσης για αυτόν τον μηχανισμό αντίστασης ο οποίος σχετίζεται με την πλήρη έλλειψη του λιποπολυσακχαρίτη (LPS), φαίνεται ότι ευθύνεται και μια μετάλλαξη στην LptD, μία πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης που επιτρέπει την τελική μετατόπιση του νεοσυσταθέντος LPS [44].

Η αντίσταση στην κολιστίνη συχνά οφείλεται σε μηχανισμούς των αντλιών εκροής. Η ενεργοποίηση των αντλιών εκροής ή των ρυθμιστών των αντλιών εκροής δημιουργούν ταυτόχρονη αντίσταση σε πολλές οικογένειες αντιβιοτικών, έχουν παρατηρηθεί σε πολλά είδη και φαίνεται ότι επηρεάζουν και την αντίσταση στην κολιστίνη [43].

Ένας άλλος μηχανισμός ο όποιος υπάρχει σε βακτήρια και προσδίδει φυσική ενδογενή αντοχή στην κολιστίνη είναι ο σχηματισμός κάψουλας. Ο συγκεκριμένος μηχανισμός φαίνετε ότι μπορεί να ενεργοποιηθεί μέσω κατάλληλων ρυθμιστών, όπως το *Rcs* (regulator of capsule synthesis/ρυθμιστής της σύνθεσης της κάψουλας) οι οποίοι ελέγχουν τον σχηματισμό της κάψουλας [45].

3. Mobilized Colistin Resistance (MCR) γονίδια

Οι μηχανισμοί αντίστασης στην κολιστίνη δεν οφείλονται μόνο σε χρωμοσωματικές μεταλλάξεις και μηχανισμούς οι οποίοι δεν μπορούν να μεταφερθούν οριζόντια. Συμφώνα με πρόσφατες μελέτες η αντοχή στην κολιστίνη οφείλεται στα γονίδια *mcr (mobilized colistin resistance)* τα οποία εδρεύουν σε πλασμίδιο, μπορούν να μεταφερθούν μεταξύ βακτηριδίων του ίδιου είδους ή και μεταξύ διαφορετικών βακτηριακών ειδών διαμέσου

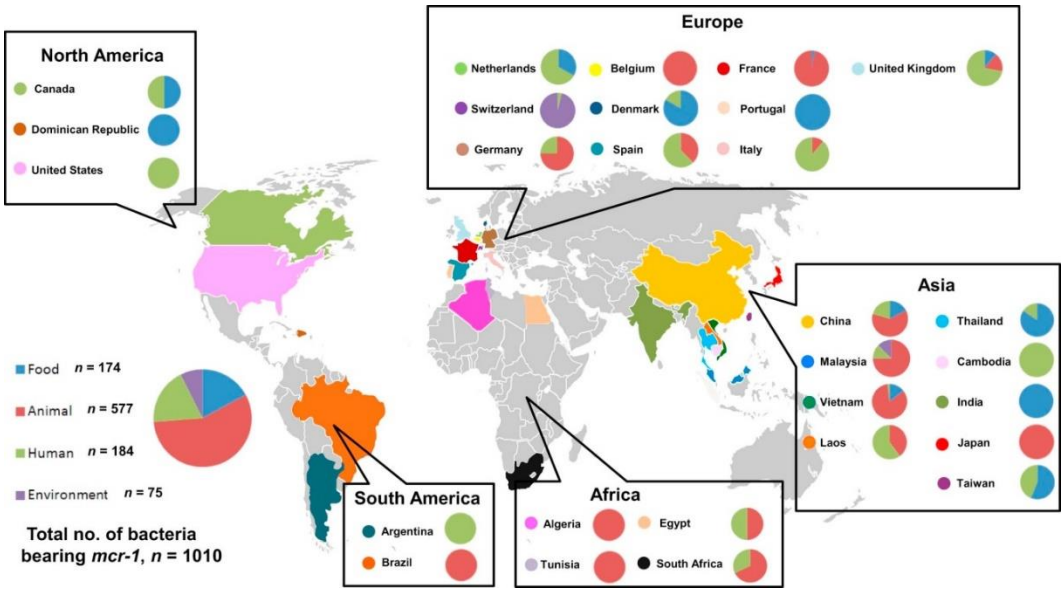
της σύζευξης. Η ανακάλυψη του μηχανισμού αυτού έχει φέρει μια παγκόσμια ανησυχία μετατρέποντας την αντοχή στην κολιστίνη από περιορισμένη σε εκτενή με ραγδαία εξάπλωση [46]. Έως σήμερα, κάνουμε λόγο για την ύπαρξη 10 γνωστών *mcr* γονιδίων *(mcr 1–10*) [47].

3.1 MCR-1

Στα τέλη του 2015 στην Κίνα, οι Liu et al. περιγράφουν σε στελέχη *Escherichia coli* και *Klebsiella pneumoniae* ένα γονίδιο το οποίο εδρεύει σε πλασμίδιο και είναι υπεύθυνο για την αντοχή στην κολιστίνη [46].

Οι πηγές απομονώσεως των ανθεκτικών στελεχών αφορούν κυρίως ζωικά ενδιαιτήματα, όπως αυτό φαίνεται στην Εικόνα 4, γεγονός που μας οδηγεί να σκεφτούμε ότι το γονίδιο αυτό είναι ζωικής προελεύσεως. Την θεωρία αυτή ενισχύει το γενετικό πλαίσιο του γονιδίου. Το γονίδιο συνδέεται πολύ συχνά με την αλληλουχία εισαγωγής IS Apl1, πρόκειται για μία αλληλουχία που απαντάται κατά κύριο λόγο σε ζωικής προελεύσεως βακτήρια, επίσης η παρουσία άλλων γονιδίων αντοχής σε διαφορές ομάδες αντιβιοτικών, κυρίως κτηνιατρικής χρήσης, είναι ενδεικτικό της ζωικής προέλευσης του *mcr-1* [46, 48, 49].

Το γονίδιο αντοχής *mcr-1* είναι μία τρανσφεράση της φωσφοαιθανολαμίνης η οποία έρχεται σε επαφή με τις ομάδες λιπιδίων Α που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη με αποτέλεσμα την μετατροπή αυτών με φωσφοαιθανολαμίνη, το γεγονός αυτό είναι υπεύθυνο για αντοχή στην κολιστίνη καθώς μειώνει την συγγένεια της [50].



Εικόνα 4. *Γεωγραφική κατανομή στελεχών ανθεκτικών στην κολιστίνη με την μεσολάβηση πλασμιδίου mcr-1 (Νοέμβριος 2015 – Απρίλιος 2016) [43].*

3.2 MCR-2

Σε έρευνα η οποία διεξήχθη στο Βέλγιο, σε ανθεκτικά στην κολιστίνη στελέχη *E.coli* χοίρων και βοοειδών, εντοπίστηκε ένα νέο γονίδιο το οποίο μετατρέπει την τρανσφεράση της φωσφοαιθανολαμίνης με την μεσολάβηση πλασμιδίου, το γονίδιο αυτό ονομάστηκε *mcr-2* [51].

Η φυλογενετική ανάλυση του *mcr-2* έδωσε πληροφορίες ότι μπορεί να προέρχεται από την *Moraxella catarrhalis,* καθώς συνυπάρχει με ένα γονίδιο λιπιδικής φωσφατάσης που παρουσιάζει την μεγαλύτερη ομολογία με την φωσφατάση της Moraxella spp. [51].

3.3 MCR-3

Στην Κίνα, κατά την διάρκεια μιας διαδικασίας ρουτίνας, όσων αφορά τον έλεγχο της μικροβιακής αντοχής βακτηρίων από ζώα εκτροφής, σε στέλεχος *Escherichia coli* από κόπρανα χοίρου εντοπίστηκε ανθεκτικότητα στην κολιστίνη. Η PCR απέκλεισε την παρουσία γονιδίων *mcr-1 και mcr-2* , πραγματοποιήθηκε περεταίρω έλεγχος με αποτέλεσμα την αποκάλυψη ενός γονιδίου τρανσφεράσης της φωσφοαιθανολαμίνης στο οποίο αποδόθηκε η αντοχή στην κολιστίνη και ονομάστηκε *mcr-3* [52].

Ενδιαφέρον προκαλεί έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε επιφανειακά νερά ποταμών της Νοτίου Αφρικής, σε δείγματα που συλλέχτηκαν το 2019 και το 2020. Έπειτα

από απομονώσεις το πιο συχνό Gram Negative Bacteria (GNB) ανθεκτικό στην κολιστίνη ήταν η *Aeromonas spp.* Σε αυτό ταυτοποιήθηκε η παρουσία του *mcr-3*, γεγονός το οποίο εμπνέει μεγάλη ανησυχία καθώς η διάχυση του γονίδιου αντοχής στις κοινότητες θα μπορούσε να οδηγήσει σε οριζόντια μεταφορά ανθρώπινων παθογόνων προκαλώντας δυνητική απειλή της δημοσιάς υγείας [53].

3.4 MCR-4, MCR-5, MCR-6, MCR-7

Στην κεντρική Ιταλία σε στέλεχος *Salmonella enterica* serovar Typhimurium από κόπρανα χοίρου ανιχνεύθηκε το γονίδιο *mcr-4*. Έπειτα το *mcr-4* εντοπίζεται ως επί το πλυστών σε στελέχη *Escherichia coli* [54]. Γενετικά το *mcr-4* παρομοιάζει στενά με τον προσδιορισμό της εγγενούς αντίστασης EptA η οποία κωδικοποιείται στο χρωμόσωμα της *Neisseria* [55].

Σε δείγματα κοπράνων χοίρων ανιχνεύθηκε και το γονίδιο *mcr-5*. Το 2017 κατά τον έλεγχο μικροβιακής αντοχής από το εθνικό πρόγραμμα παρακολούθησης μικροβιακής αντοχής σε ζωονοσογόνους παράγοντες της Γερμανίας, περιγράφηκε το *mcr-5* σε στελέχη *Salmonella enterica* [56].

Σε πληθυσμό χοίρων ο οποίος προήλθε από 57 φάρμες της Μεγάλης Βρετανίας το χρονικό διάστημα 2014 έως 2015, απομονώθηκαν στελέχη *Moraxella Pluranimalium* τα οποία έφεραν μηχανισμό αντοχής στην κολιστίνη. Έπειτα από έλεγχο για την εξεύρεση του μηχανισμού αντοχής στην κολιστίνη, ανιχνεύθηκαν παραλλαγές γονιδίων του *mcr-2* που ονομάστηκαν *mcr-2.2* στην συνέχεια όμως πήρε την τελική ονομασία του ως *mcr-6* [57].

Το γονίδιο *mcr-7* ανιχνεύτηκε στην Κίνα σε στελέχη Klebsiella pneumoniae τα οποία απομονώθηκαν από κοτόπουλα. Τα στελέχη συλλέχτηκαν από το 2010 έως το 2015 από 13 επαρχίες της Κίνας [58]. Δομικά το γονίδιο *mcr-7* παρομοιάζει κατά 70% με το γονίδιο *mcr-3* [59].

3.5 MCR-8, MCR-9, MCR-10

Στην επαρχία Shandong της Κίνα, έρευνα η οποία έγινε σε προϊόντα κτηνοτροφικής προέλευσης από το 2015 έως το 2017, έδειξε αυξημένη αντοχή στην κολιστίνη σε στελέχη *Klebsiella pneumoniae*. Σε απομόνωση στελέχους *K.pneumoniae* από κόπρανα χοίρου

περιγράφηκε το γονίδιο αντοχής *mcr-8*, το γονίδιο βρέθηκε σε ένα μεταβιβάσιμο πλασμίδιο τύπου IncFII [58].

Το *mcr-9* ταυτοποιήθηκε σε στέλεχος MDR *Salmonella enterica Typhimurium*. Η απομόνωση του στελέχους έγινε το 2010 σε έναν ασθενή στην πολιτεία της Ουάσιγκτον και η περιγραφή του έγινε το 2019. Φαίνεται ότι η δομή του *mcr-9* παρομοιάζει αρκετά με αυτή των *mcr-3* και *mcr-4* [60].

Πρόσφατη μελέτη η οποία διεξάγει για την παρακολούθηση των λυμάτων νοσοκομείου έφερε στο φώς το νέο γονίδιο αντοχής mcr, το *mcr-10*. Το νέο γονίδιο απομονώθηκε σε στελέχη *Enterobacter roggenkampii.* Τα πλασμίδια τα οποία έφεραν το *mcr-10* ήταν νέα πλασμίδια και άνηκαν στα IncFIB-FII και IncFIB [47].

3.6 Παραλλαγές MCR γονιδίων

Στα συνολικά δέκα γονίδια *mcr*, έχουν περιγραφεί παραλλαγές για τα περισσότερα από αυτά σε διάφορα gram αρνητικά βακτηρίδια *όπως Aeromonas spp., Providencia spp., Pseudomonas spp., Salmonella spp., Citrobacter spp., Escherichia coli, Klebsiella spp.* Στον Πίνακας 2 φαίνονται τα γονίδια *mcr 1-10* και οι παραλλαγές που έχουν περιγραφεί μέχρι πρόσφατα. Κάποιες από τις παραλλαγές αυτές δεν είναι απαραίτητο ότι προσδίδουν αντοχή στην κολιστίνη [53].

Πίνακας 2. *Γονίδια αντοχής MCR και το σύνολο των παραλλαγών που έχουν περιγραφεί μέχρι πρόσφατα [53].*

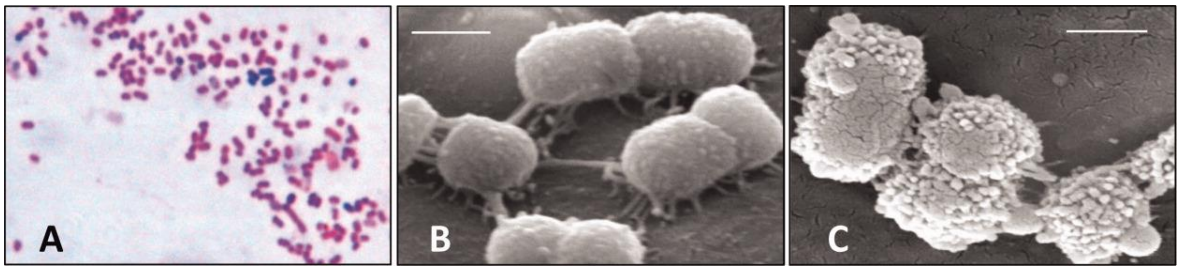
Γονίδιο MCR	Αριθμός παραλλαγών
mcr-1	30 παραλλαγές mcr-1.1 έως mcr-1.30
mcr-2	7 παραλλαγές mcr-2.1 έως mcr-2.7
mcr-3	40 παραλλαγές mcr-3.1έως mcr-3.40
mcr-4	6 παραλλαγές mcr-4.1 έως mcr-4.6
mcr-5	4 παραλλαγές mcr-5.1 έως mcr-5.4
mcr-6	Δεν έχουν περιγραφεί παραλλαγές μέχρι σήμερα
mcr-7	Δεν έχουν περιγραφεί παραλλαγές μέχρι σήμερα
mcr-8	3 παραλλαγές mcr-3.1 έως mcr-3.3
mcr-9	3 παραλλαγές mcr-9.1 έως mcr-9.3
mcr-10	Δεν έχουν περιγραφεί παραλλαγές μέχρι σήμερα

4. Acinetobacter baumannii

4.1 Ιδιότητες και ταξινόμηση

Τα βακτήρια του γένους *Acinetobacter* ανήκουν στην υποκατηγορία *γ- Proteobacteria ,* της οικογένειας *Moraxellaceae*. Εμφανίζονται στο μικροσκόπιο με την εικόνα gram αρνητικού κοκκοβάκιλλου, σε αλυσίδες μικρού ή μεγάλου μήκους όπως φαίνεται στην Εικόνα 5 , είναι αυστηρά αερόβιοι ακίνητοι μικροοργανισμοί δεν ζυμώνουν την γλυκόζη, δίνουν θετική την αντίδραση της καταλάσης και αρνητική την αντίδραση της οξειδάσης [61].

Η ανάπτυξη του Acinetobacter στο εργαστήριο μπορεί να γίνει σε απλά θρεπτικά υλικά, σχηματίζοντας θολωτές και λείες αποικίες με διάμετρο τα 2mm, σε στερεά υλικά το χρώμα που παίρνουν είναι συνήθως ένα απαλό κίτρινο έως και γκρι. Το εύρος της θερμοκρασίας ανάπτυξης είναι ~ 37 °C [62].



Εικόνα 5. *Μορφολογία και ιδιότητες χρώσης του Acinetobacter baumannii. (Α) Χρώση κατά gram. (Β) και (Γ) εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο [62].*

Η αναγνώριση των στελεχών Acinetobacter σε επίπεδο μεμονωμένου είδους με μεθόδους κλασικής μικροβιολογίας καθώς και με τα μηχανήματα αυτόματης ταυτοποίησης είναι εξαιρετικά δύσκολη. Με την είσοδο όμως μοριακών τεχνικών οι οποίες στοχεύουν στην χαρτογράφηση του γενετικού υλικού μπορούμε να πάρουμε αξιόπιστα και αντικειμενικά δεδομένα ταξινόμησης [62, 63]. Στον Πίνακας 3 φαίνονται μερικά από τα πιο συχνά απομονωμένα είδη *Acinetobacter*

Τα γενετικά κριτήρια που καθορίζουν τον διαχωρισμό βακτηριακών γενετικών ειδών απαιτούν 70% ομολογία DNA, < 5% διαφορά στην θερμική σταθερότητα του DNA και 97% ταυτοποίηση του γονιδίου 16S rRNA [64].

Πίνακας 3. *Μερικά από τα πιο συχνά απομονωμένα είδη Acinetobacter [65].*

Commonly found human pathogens			
A. baumannii (genospecies 2)			
A. nosocomialis (genospecies 13TU)			
A. pittii (genospecies 3)			
A. calcoaceticus (genospecies 1)			
Uncommon organisms in clinical infections			
A. baylyi	*A. guillouiae*	*A. lwoffii*	*A. soli*
A. beijerinckii	*A. gyllenbergii*	*A. nectaris*	*A. tandoii*
A. bereziniae	*A. haemolyticus*	*A. parvus*	*A. tjernbergiae*
A. boissieri	*A. harbinensis*	*A. puyangensis*	*A. towneri*
A. bouvetii	*A. indicus*	*A. qingfengensis*	*A. ursingii*
A. brisouii	*A. johnsonii*	*A. radioresistens*	*A. venetianus*
A. gerneri	*A. junii*	*A. rudis*	
A. grimontii	*A. kookii*	*A. schindleri*	

4.2 Λοιμώξεις από *Acinetobacter baumannii*

Τα είδη του *Acinetobacter* είναι ευρέως διαδεδομένα στο φυσικό περιβάλλον, απομονώσεις στελεχών έχουν γίνει σε χώμα και λάσπη, σε νερό, ζώα και σε φυτά [66]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ικανότητα να επιβιώνει για μεγάλο χρονικό διάστημα πάνω σε ξηρές επιφάνειες, γεγονός που ενισχύει τον τρόπο μετάδοσης εντός του νοσοκομειακού περιβάλλοντος [67]. Επιφάνειες στις οποίες φιλοξενούνται συνήθως *Acinetobacter* είναι αναπνευστήρες, μαξιλάρια, σεντόνια, στρώματα, γάντια, ηλεκτρονικός ιατρικός εξοπλισμός [68].

Η συγκεκριμένη ιδιότητα του *Acinetobacter* το βοηθά να μεταδοθεί σαν ευκαιριακά παθογόνο μικρόβιο ιδίως σε μονάδες εντατικής θεραπείας. Το στέλεχος το οποίο είναι υπεύθυνο για τις περισσότερες μολύνσεις εντός του νοσοκομειακού περιβάλλοντος είναι το *Acinetobacter baumannii* [67].

Το *Acinetobacter baumannii* μαζί με τα στενά γονιδιακά συγγενικά του είδη 3 και 13TU είναι υπεύθυνα για λοιμώξεις διαφόρων συστημάτων στον ανθρώπινο οργανισμό. Οι κυριότερες από αυτές περιλαμβάνουν, λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος,

βακτηριαιμία, μηνιγγίτιδα και ουρολοιμώξεις ενώ σπανιότερα έχουν αναφερθεί ενδοκαρδίτιδα και οφθαλμικές λοιμώξεις [69].

Λόγω του γεγονότος ότι το *Acinetobacter baumannii* αποτελεί ευκαιριακό παθογόνο προσβάλει στην πλειοψηφία ανοσοκατασταλμένους ασθενείς καθώς και βαρέως πάσχοντες παρουσιάζοντας υψηλό ποσοστό θνητότητας [70].

Τα τελευταία χρόνια η εξάπλωση των λοιμώξεων που οφείλονται στο *Acinetobacter baumannii* αποτελεί παγκόσμια απειλή, υπάρχει μια συνεχή αύξηση της εξάπλωσης του η οποία συνοδεύεται από αύξηση αντίστασης στα αντιβιοτικά. Οι περισσότερες απομονώσεις έχουν αναφερθεί σε Μονάδες Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ) [71]. Σήμερα το 9% των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων που ευθύνονται σε gram αρνητικά βακτήρια οφείλονται στο *Acinetobacter baumannii,* με τις περισσότερες να αφορούν λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος [72].

4.3 Μηχανισμοί αντοχής του *Acinetobacter baumannii στα αντιβιοτικά*

Ομαδοποιώντας τους μηχανισμούς αντίστασης του *Acinetobacter baumannii* στα αντιβιοτικά προκύπτουν 3 ομάδες στις οποίες αποδίδεται είτε η επίκτητη είτε η ενδογενείς αντοχή. Αυτές είναι: α) Η υπερέκφραση της λειτουργίας των αντλιών εκροής φαρμάκων, με αυτόν τον τρόπο αυξάνεται η εκροή του αντιβιοτικού από τα βακτήρια αποτρέποντας την επαφή του με τον στόχο, β) Μεταλλάξεις σε στόχους δέσμευσης αντιβιοτικών, αυτό επιτυγχάνεται μέσω γενετικών μεταλλάξεων ή μεταφραστικών τροποποιήσεων καθώς και με γονίδια αντοχής και γ) Με απευθείας υδρόλυση των αντιβιοτικών δηλαδή με ενζηματική αδρανοποίηση [73].

Τα αντιβιοτικά τα οποία χρησιμοποιούνται εναντία στο Acinetobacter baumannii δυστυχώς δεν είναι πολλά , χρησιμοποιούνται κυρίως αμινογλυκοσίδες πολυμυξίνες και συγκεκριμένες τετρακυκλίνες [73].

Η γρήγορη εξάπλωση της αντοχής σε πολλά φάρμακα στο *A.baumannii* αποτελεί απειλή για την δημόσια υγεία, η ικανότητα του να αποικίζει βιοτικές και αβιοτικές επιφάνειες και να παράγει βιοφίλμ συμβάλει στην αντοχή στα αντιβιοτικά πέραν του γεγονότος ότι προκαλεί χρόνιες και επίμονες λοιμώξεις [74, 75].

4.4 *Acinetobacter baumannii* και βιοφίλμ

Τα βιοφίλμ δημιουργούνται από βακτήρια τα οποία έχουν προσκολληθεί σε μια εξωτερική μήτρα πολυμερούς υλικού αποτελούμενη από πολυσακχαρίτες , λιπίδια, νουκλεϊκα οξέα και πρωτεΐνες. Ο σχηματισμός του βιοφίλμ γίνεται σε τρία στάδια α) προσκόλληση στην επιφάνεια, β) ωρίμανση και σχηματισμός του βιοφίλμ, γ) αποκόλληση και διασπορά του βιοφίλμ [75].

Τα βακτήρια τα οποία έχουν την ικανότητα σχηματισμού βιοφίλμ, ανάμεσα σε αυτά είναι και το *A.baumannii*, είναι αρκετά ανθεκτικά σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες σε φάρμακα αλλά και στο ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενή [76].

Η ικανότητα του *A.baumannii* να σχηματίζει βιοφίλμ, αποτελεί βασικό παράγοντα επιβίωσης του σε σκληρές περιβαλλοντικές συνθήκες, αυξάνει την ικανότητά του για προσκόλληση σε ιατρικές συσκευές και σε αβιοτικές επιφάνειες, καθώς και στην αντίσταση που παρουσιάζει στα αντιβιοτικά αφού μπορεί να γίνει γρήγορα ανθεκτικό. Επιπλέον αποτελεί σημαντικό παράγοντα επιδείνωσης των λοιμώξεων από *A.baumannii [77-79].*

5. Πειραματικό μέρος

5.1 Σκοπός της μελέτης

Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε μοριακός έλεγχος στελεχών *A.baumannii* με σκοπό την ανεύρεση γονιδίων τα οποία προσδίδουν αντοχή στην κολιστίνη. Συγκεκριμένα με την τεχνική της multiplex PCR ελέχθησαν 40 στελέχη *A.baumannii* (n=40) για την παρουσία γονιδίων *mcr 1, mcr 2, mcr 3, mcr 4, mcr 5, mcr 6, mcr 7, mcr 8, mcr 9* . Τα στελέχη αυτά απομονώθηκαν από καλλιέργειες βιολογικών υγρών στα Εργαστήρια Μικροβιολογίας νοσοκομείων της Θεσσαλονίκης.

Συγκεκριμένα, η απομόνωση των στελεχών έγινε την χρονική περίοδο από 20/01/2022 έως 08/06/2022 από καλλιέργειες νοσηλευομένων ασθενών (περιγραφή των δειγμάτων φαίνεται στον Πίνακας 5). Οι οποίοι στην πλειονότητα τους νοσηλευτήκαν σε Μονάδες Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ).

Μετά την απομόνωσή τους τα στελέχη φυλάχθηκαν σε κατάλληλες συνθήκες στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, στο οποίο πραγματοποιήθηκε και η πειραματική διαδικασία. Παρακο-

λουθώντας την βιβλιογραφία, διαπιστώθηκε ότι ο συγκεκριμένος μηχανισμός αντοχής είναι εξαιρετικά σπάνιος για τα βακτήρια του γένους *Acinetobacter,* αν και υπάρχουν αναφορές οι οποίες ενοχοποιούν τα γονίδια *mcr* ως μηχανισμό αντοχής στην κολιστίνη σε στελέχη *Acinetobacter* [80].

5.2 Περιγραφή δειγμάτων

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος σε 40 στελέχη *A.baumannii,* τα οποία απομονώθηκαν από καλλιέργειες βιολογικών υγρών ασθενών, στα εργαστήρια νοσοκομείων της Θεσσαλονίκης, την χρονική περίοδο από 20/01/2022 έως 08/06/2022.

Τα απομονωμένα στελέχη στο σύνολό τους ανήκουν στην κατηγορία *wild type A.baumannii* ή διαφορετικά *MDRAB.* Στον Πίνακας 4 παρουσιάζονται μερικά από τα χαρακτηρίστηκα των δειγμάτων, όπως μας χορηγήθηκαν από τα νοσοκομεία διαλογής τους.

Πίνακας 4. *Περιγραφή δειγμάτων τα οποία συμμετείχαν στην έρευνα. Τα στοιχεία παρουσιάζονται σύμφωνα με τα αρχεία των εργαστηρίων απομόνωσης των στελεχών του εκάστοτε νοσοκομείου. (ΜΑΑ =Μονάδα Αναπνευστικής Ανεπάρκειας, ΜΑΦ =Μονάδα Αυξημένης Φροντίδας)*

Α/Δ	**Ημερομηνία Απομόνωσης**	**Φύλλο**	**Είδος Κλινικού Δείγματος**	**Μονάδα Νοσηλείας Ασθενή**	**Συνύπαρξη Αλλού Μικροβίου Στο Ίδιο Δείγμα**	**Συνύπαρξη Αλλού Πολυανθεκτικού Μικροβίου Στον Ίδιο Ασθενή**
1Α	20/01/2022	Άνδρας	Αερόβια Καλλιέργεια Αίματος	ΜΕΘ	Όχι	Ναι
2Α	20/01/2022	Άνδρας	Αερόβια Καλλιέργεια Αίματος	ΜΕΘ	Ναι	Ναι
3Π	21/01/2022	Άνδρας	Αερόβια Καλλιέργεια Αίματος	ΜΑΑ	Όχι	Ναι
4Ι	24/01/2022	Άνδρας	Αερόβια Καλλιέργεια αίματος	ΜΑΦ	Όχι	Ναι
5Π	23/02/2022	Άνδρας	Καλλιέργεια Εγκαυματικής Επιφάνειας	ΜΕΘ	Όχι	Ναι
6Π	01/04/2022	Γυναίκα	Καλλιέργεια Βρογχικών Εκκρίσεων	ΜΑΑ	Όχι	Ναι

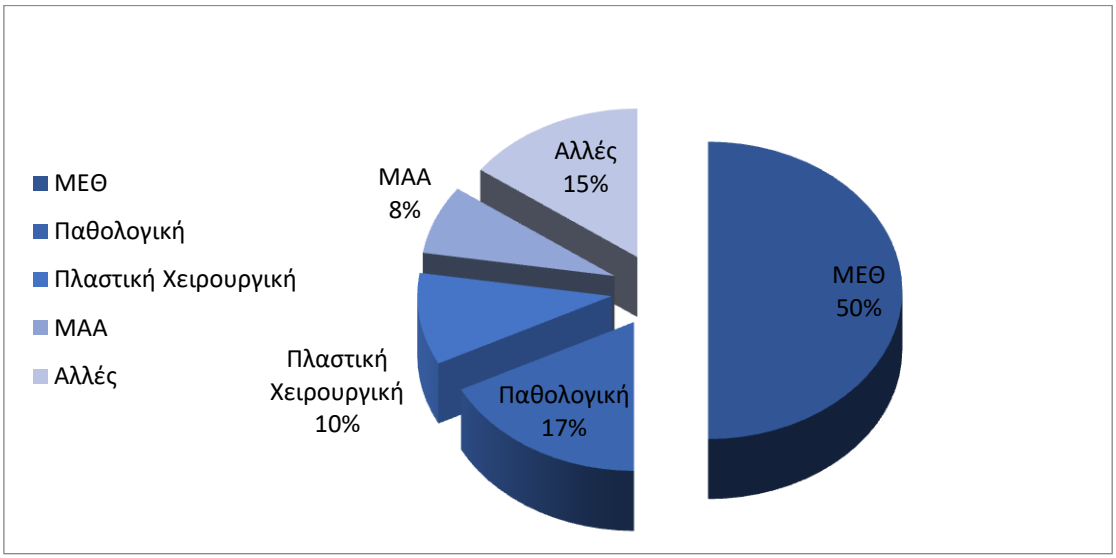
7Π	30/03/2022	Γυναίκα	Καλλιέργεια Ούρων	Πλαστική Χειρουργική	Ναι	Όχι
8Π	30/3/2022	Άνδρας	Καλλιέργεια Βρογχικών Εκκρίσεων	Καρδιολογική	Όχι	Ναι
9Γ	15/04/2022	Γυναίκα	Αερόβια Καλλιέργεια Αίματος	ΜΕΘ	Όχι	Ναι
10Ι	11/05/2022	Γυναίκα	Αερόβια Καλλιέργεια Αίματος	Μαιευτική/ Γυναικολογι-κή	Όχι	Ναι
11Ι	12/05/2022	Άνδρας	Αερόβια Καλλιέργεια Αίματος	ΜΕΘ	Όχι	Ναι
12Ι	03/05/2022	Γυναίκα	Καλλιέργεια Άκρου Κεντρικού Φλεβικού Καθετήρα	Παθολογική	Όχι	Όχι
13Ι	11/05/2022	Άνδρας	Καλλιέργεια Ούρων	Παθολογική	Όχι	Ναι
14Ι	30/05/2022	Άνδρας	Αερόβια Καλλιέργεια Αίματος	ΜΕΘ	Όχι	Ναι
15Ι	12/05/2022	Άνδρας	Καλλιέργεια Ούρων	ΜΕΘ	Όχι	Ναι
16Ι	10/05/2022	Γυναίκα	Καλλιέργεια Βρογχικών Εκκρίσεων	Παθολογική	Όχι	Ναι
17Ι	13/04/2022	Γυναίκα	Καλλιέργεια Βρογχικών Εκκρίσεων	Παθολογική	Ναι	Ναι
18Ι	03/05/2022	Γυναίκα	Καλλιέργεια Βρογχικών Εκκρίσεων	ΜΕΘ	Όχι	Ναι
19Ι	25/05/2022	Άνδρας	Καλλιέργεια Βρογχικών Εκκρίσεων	ΜΕΘ	Ναι	Ναι
20Π	19/05/2022	Γυναίκα	Καλλιέργεια Βρογχοκυψελι-δικού Εκπλύματος	Νευρολογική	Όχι	Όχι
21Π	18/05/2022	Γυναίκα	Καλλιέργεια Βρογχικών Εκκρίσεων	Πλαστική Χειρουργική	Ναι	Ναι
22Π	17/03/2022	Άνδρας	Καλλιέργεια Βρογχικών Εκκρίσεων	ΜΕΘ	Όχι	Ναι
23Π	19/05/2022	Γυναίκα	Καλλιέργεια Κοπράνων	ΜΑΑ	Ναι	Ναι

24Π	24/05/2022	Άνδρας	Καλλιέργεια Ούρων	ΜΕΘ	Όχι	Ναι
25Π	25/05/2022	Γυναίκα	Καλλιέργεια Βρογχικών Εκκρίσεων	Πλαστική Χειρουργική	Όχι	Ναι
26Π	21/05/2022	Γυναίκα	Αερόβια Καλλιέργεια Αίματος	ΜΕΘ	Όχι	Ναι
27Π	22/05/2022	Γυναίκα	Αερόβια Καλλιέργεια Αίματος	Πλαστική Χειρουργική	Ναι	Ναι
28Ι	20/05/2022	Γυναίκα	Καλλιέργεια Ούρων	ΜΕΘ	Όχι	Όχι
29Ι	23/05/2022	Γυναίκα	Αερόβια Καλλιέργεια Αίματος	Παθολογική	Όχι	Ναι
30Ι	20/05/2022	Άνδρας	Καλλιέργεια Δερματικής Βλάβης	ΜΕΘ	Όχι	Όχι
31Ι	13/05/2022	Άνδρας	Αερόβια Καλλιέργεια Αίματος	ΜΕΘ	Όχι	Ναι
32Ι	16/05/2022	Άνδρας	Αερόβια Καλλιέργεια Αίματος	Παθολογική	Όχι	Ναι
33Ι	23/05/2022	Άνδρας	Αερόβια Καλλιέργεια Αίματος	Χειρουργική	Όχι	Ναι
34Ι	04/05/2022	Άνδρας	Αερόβια Καλλιέργεια Αίματος	ΜΕΘ	Όχι	Ναι
35Ι	13/05/2022	Άνδρας	Καλλιέργεια Άκρου Κεντρικού Φλεβικού Καθετήρα	ΜΕΘ	Όχι	Ναι
36Ι	14/05/2022	Άνδρας	Καλλιέργεια Βρογχικών Εκκρίσεων	ΜΕΘ	Ναι	Ναι
37Ι	01/06/2022	Άνδρας	Αερόβια Καλλιέργεια Αίματος	Παθολογική	Όχι	Ναι
38Ι	30/05/2022	Άνδρας	Καλλιέργεια Βρογχικών Εκκρίσεων	ΜΕΘ	Όχι	Ναι
39Ι	31/05/2022	Γυναίκα	Καλλιέργεια Βρογχικών Εκκρίσεων	ΜΕΘ	Ναι	Ναι
40Ι	8/06/2022	Άνδρας	Καλλιέργεια Δερματικής Βλάβης	Νεφρολογική	Ναι	Ναι

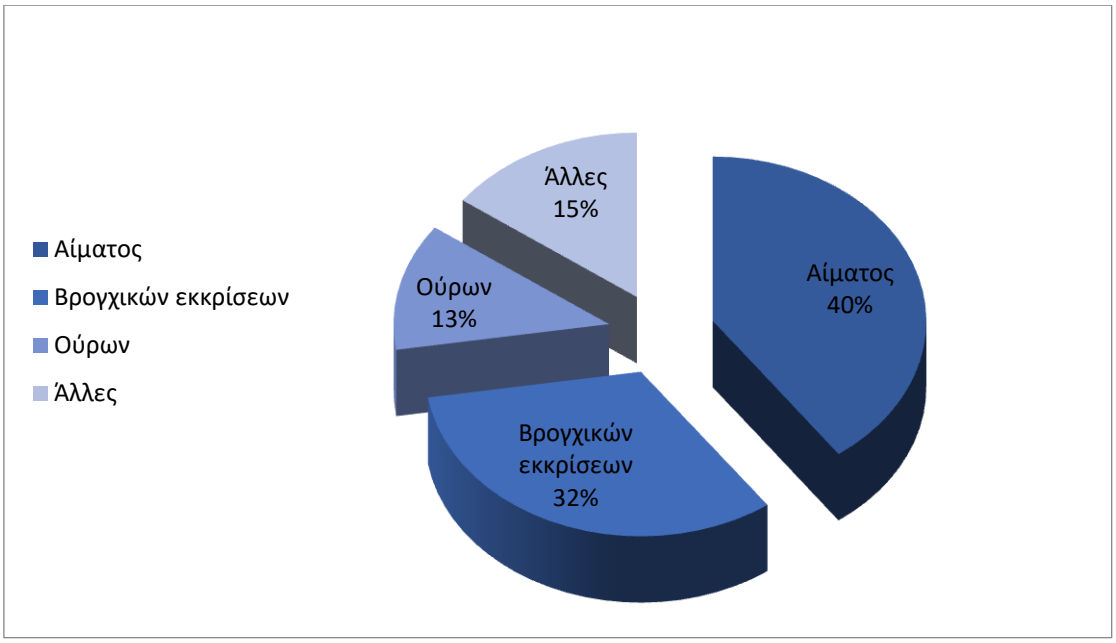
Αξίζει να σημειωθεί το γεγονός ότι το 50% των στελεχών *A. baumannii* προέρχεται από ασθενείς που νοσηλευτήκαν στις ΜΕΘ, με μεγάλη διαφορά 17% ακολουθεί η νοσηλεία στην παθολογική κλινική. Στην Εικόνα 6 φαίνεται το ποσοστό των διαφορετικών μονάδων κλινικής νοσηλείας που απομονώθηκε ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός.

Σύμφωνα με τα αρχεία των εργαστηρίων, το είδος του κλινικού δείγματος που παρουσιάζει τις συχνότερες απομονώσεις στελεχών *A. baumannii* είναι οι αερόβιες καλλιέργειες αίματος, με ποσοστό 40% του συνόλου και οι καλλιέργειες βρογχικών εκκριμάτων/εκπλυμάτων με ποσοστό 32% όπως φαίνεται και στην Εικόνα 7.

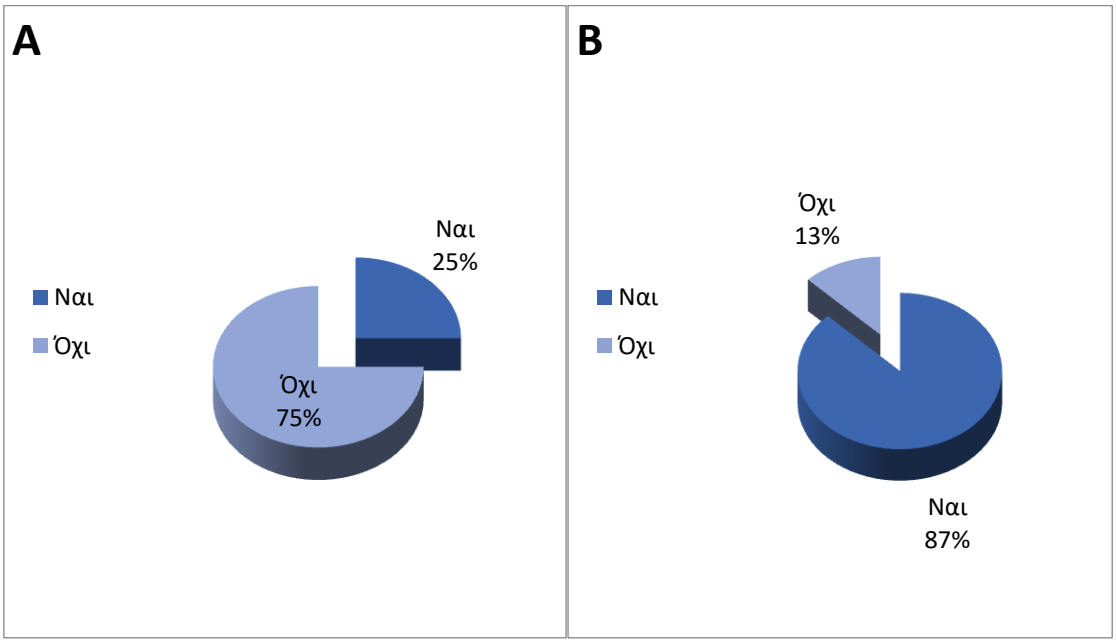
Ενδιαφέρον παρουσιάζει η συνύπαρξη και άλλου πολυανθεκτικού μικροβίου στον ίδιο ασθενή σε ποσοστό 87%, γεγονός που επαληθεύει την άποψη ότι το *A.baumannii* προσβάλλει κυρίως ανοσοκατασταλμένους ασθενείς. Ενώ μόλις το 13% του συνόλου των ασθενών δεν παρουσίασαν ανάπτυξη και άλλου πολυανθεκτικού μικροβίου, μέχρι την χρονική στιγμή της συλλογής των δειγμάτων. Όσων αφορά την συνύπαρξη και άλλου μικρόβιου στο ίδιο δείγμα, φαίνεται ότι στο 75% των δειγμάτων αναφερόμαστε σε μονοκαλλιέργεια *A.baumannii* και στο 25% συνυπάρχει δεύτερο μικρόβιο στο ίδιο κλινικό δείγμα. Λαμβάνοντας υπόψη μας ότι, το 40% του συνόλου των δειγμάτων μας αφορά αερόβιες καλλιέργειες αίματος στις οποίες σπάνια συναντάμε την συνύπαρξη δυο ή περισσότερων μικροβίων, μπορούμε εύκολα να δικαιολογήσουμε αυτά τα ποσοστά. Σχετικό γράφημα φαίνεται στην Εικόνα 8.



***Εικόνα 6**. Απομόνωση A.baumannii στις διάφορες κλινικές μονάδες νοσηλείας (ΜΑΑ= Μονάδα Αναπνευστικής Ανεπάρεκειας, ΜΕΘ=Μονάδα Εντατικής Θεραπείας).*



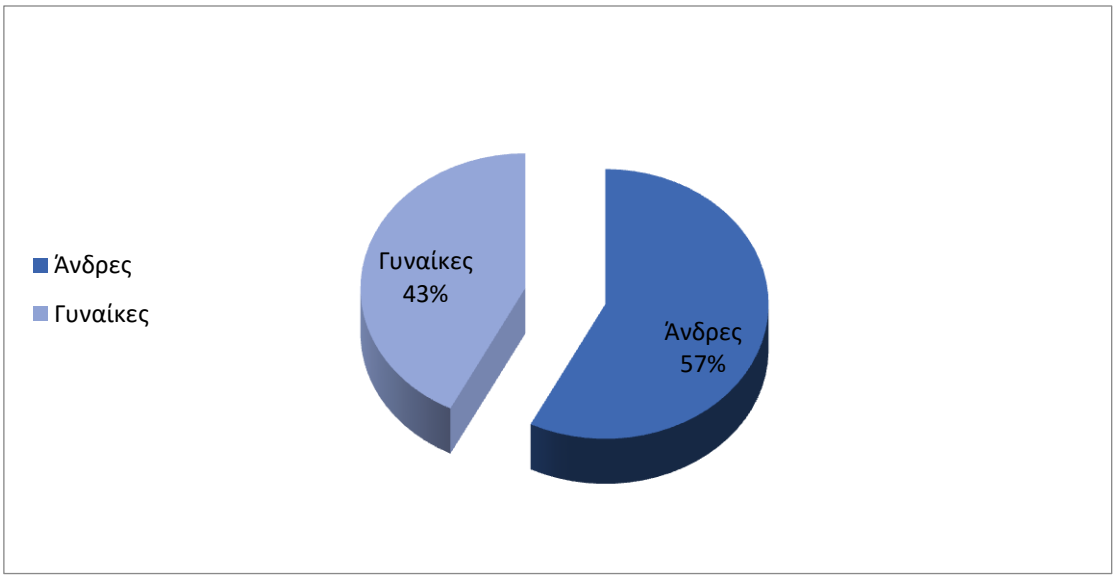
Εικόνα 7. *Αναλογία είδους καλλιέργειας/κλινικού δείγματος απομόνωσης των στελεχών A.baumannii που συμμετείχαν στην έρευνα.*



Εικόνα 8. *(A) Συνύπαρξη και άλλου μικροβίου (ανθεκτικού ή μη) στο ίδιο δείγμα, (B) Ανάπτυξη και άλλου πολυανθεκτικού μικροβίου στον ίδιο ασθενή.*

Με βάση μελέτες που έχουν γίνει σχετικά με το εάν το βιολογικό φύλο επηρεάζει την ευαισθησία στο *A.baumannii* (κυρίως στην πνευμονία οφειλόμενη σε *A.baumannii*), δεν έχουμε συγκεκριμένα αποτελέσματα που να δικαιολογούν αυξημένη ευαισθησία σε ένα από τα 2 φύλλα [81, 82]. Στην παρούσα εργασία το ποσοστό των απομονώσεων που

πραγματοποιήθηκε από άνδρες ασθενείς άφορα το 57% ενώ το υπόλοιπο 43% αφορά το γυναικείο φύλλο όπως φαίνεται στην Εικόνα 9.



Εικόνα 9. *Αναλογία ανδρών και γυναικών από τους οποίους απομονώθηκαν τα στελέχη A.baumannii που μελετούνται στην παρούσα εργασία.*

5.3 Ευαισθησία στην Κολιστίνη

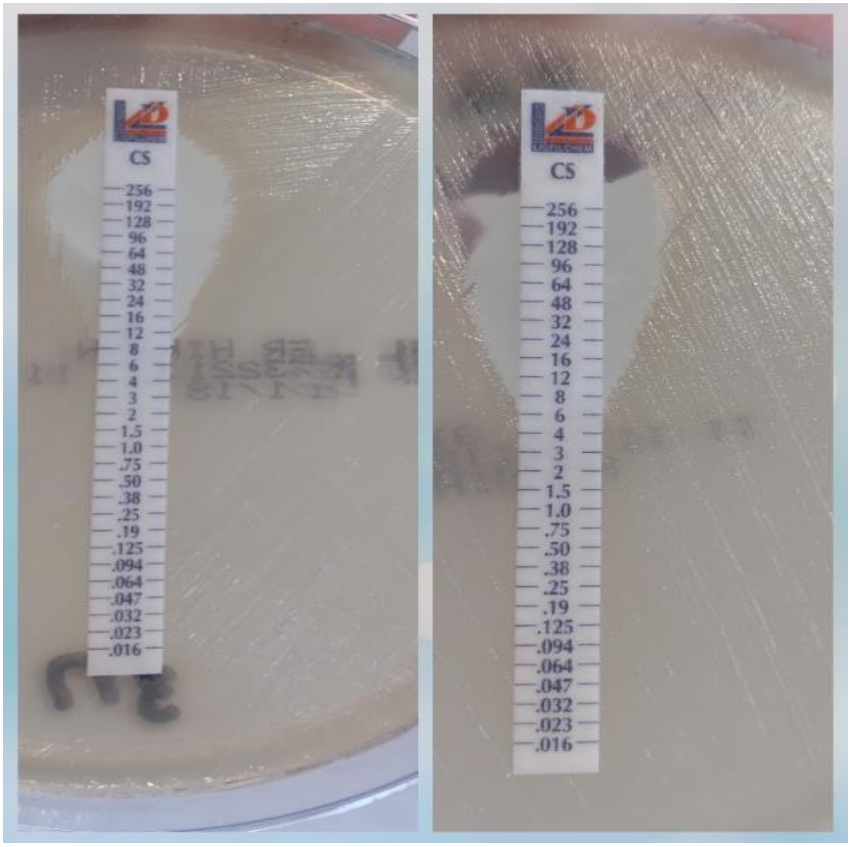
Η αρχική εκλογή των στελεχών έγινε συμφώνα με το αποτέλεσμα ευαισθησίας στην κολιστίνη του vitek 2 microbial identification system του εκάστοτε νοσοκομείου. Τα εργαστήρια που συμμετείχαν στην έρευνα ακολουθούν τα όρια ευαισθησίας που προτείνει το EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Τα στελέχη που συλλέχτηκαν συμφώνα με το vitek 2 παρουσίαζαν αντοχή στην κολιστίνη στο 100% του συνόλου τους με MIC ≥ 4 μg/mL (Minimal Inhibitory Concentration) [83].

Ο έλεγχος της ευαισθησίας στην κολιστίνη συνεχίστηκε με την μέθοδο των μικροαραιώσεων microdilution colistin broth sensitivity. Σύμφωνα με τις οδηγίες του EUCAST και του CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) καθώς και της πρόσφατης βιβλιογραφίας, ο τρόπος αυτός αποτελεί την μέθοδο αναφοράς για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας στην κολιστίνη [83-85]. Τα αποτελέσματα που πήραμε από τον προσδιορισμό της ευαισθησίας με την παραπάνω μέθοδο συμφωνούσαν πλήρως με την ανθεκτικότητα που μας έδωσε το vitek 2.

Η ευαισθησία στην κολιστίνη επιβεβαιώθηκε επίσης και με την μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού MIC με e-test από την lioflichem (lioflichem MIC test strip, Roseto

degli Abruzzi, Italy), όπως φαίνεται στην Εικόνα 10. Τα αποτελέσματα από αυτή την μέθοδο επιβεβαίωσαν τις δύο προηγούμενες μεθόδους.

Οι δόκιμες ευαισθησίας που πραγματοποιήθηκαν επιβεβαίωσαν ότι όλα τα στελέχη *A.baumannii* είχαν τιμές MIC για την κολιστίνη πάνω από το όριο αντοχής (MIC ≥ 4 μg/mL).



Εικόνα 10. *Έλεγχος ευαισθησίας της κολιστίνη, μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού MIC με e-test από την lioflichem, MIC > 4 μg/mL. (φωτογραφία από το προσωπικό μου αρχείο κατά την διάρκεια των πειραμάτων).*

5.4 Ευαισθησία στα αντιβιοτικά

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η εκλογή των δειγμάτων έγινε συμφώνα με το αποτέλεσμα της ευαισθησίας στην κολιστίνη από το vitek 2. Εκτός από την κολιστίνη, τα στελέχη ελέγχτηκαν για την ευαισθησία τους και σε άλλες ομάδες αντιβιοτικών σύμφωνα με την ρουτίνα του κάθε νοσοκομείου. Από τον έλεγχο αυτό προκύπτει, πως τα απομονωμένα στελέχη *A.baumannii* τα οποία μελετήθηκαν παρουσιάζουν 95% αντοχή σε όλες τις ομάδες αντιβιοτικών για τις οποίες ελέχθησαν, όπως φαίνεται στον Πίνακας 5.

Πίνακας 5. *Ευαισθησία των απομονωμένων στελεχών A.baumannii στα αντιβιοτικά ρουτίνας του κάθε νοσοκομείου.*

Αντιβιοτικό	Αριθμός στελεχών που παρουσιάζονται ως S = Ευαίσθητο (Sensitive)	Αριθμός στελεχών που παρουσιάζονται ως R = Ανθεκτικό (Resistance)
Amoxicillin	0	40
Amikacin	0	40
Ampicillin	0	40
Aztreonam	0	40
Cefepime	0	40
Cefixime	0	40
Cefotaxime	0	40
Cefoxitin	0	40
Ceftaroline	0	40
Ceftriaxone	0	40
Cefuroxime	0	40
Cefuroxime Axetil	0	40
Chloramphenicol	0	40
Ciprofloxacin	0	40
Colistin	0	40
Doxycycline	0	40
Ertapenem	0	40
Fosfomycin	0	40
Gentamycin	0	40
Imipenem	0	40
Levofloxacin	0	40
Meropenem	0	40
Moxifloxacin	0	40
Nitrofurantoin	0	40
Piperacillin/Tazobactam	0	40
Tetracyclin	0	40
Tigecycline	1	39
Tobramycin	0	40
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	1	39

Σύμφωνα λοιπόν με τα αποτελέσματα του Vitek 2, πρόκειται για πανανθεκτικά στελέχη *A.baumannii* ή wild-type *A.baumannii,* το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει τις βιβλιογραφικές αναφορές οι οποίες κάνουν λόγο για αύξηση της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά των βακτηρίων του γένους *Acinetobacter*.

5.5 Μοριακός έλεγχος

Στα πλαίσια της πειραματικής διαδικασίας τα απομονωμένα στελέχη MDRAB (multi drugs resistant Acinetobacter baumannii), ελέγχτηκαν για την παρουσία γονιδίων αντο-

χής *mcr 1, mcr 2, mcr 3, mcr 4, mcr 5, mcr 6, mcr 7, mcr 8, mcr 9* με την διαδικασία της multiplex PCR.

5.5.1 Εξαγωγή γενετικού υλικού

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η εξαγωγή του γενετικού υλικού με το εμπορικά διαθέσιμο kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit K182001 (Thermo Fisher Scientific). Η εξαγωγή του γενετικού υλικού έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή [86].

Στο στάδιο αυτό και για την εξαγωγή του γενετικού υλικού, δεν χρησιμοποιήθηκε αποκλειστικά το kit PureLink™ Genomic, αλλά και η κλασική μέθοδος απομόνωσης γενετικού υλικού με την διαδικασία του βρασμού. Για την διαδικασία αυτή διαλυτοποιήθηκαν 3-4 φρέσκιες αποικίες *A.baumannii* σε eppendorf με 250 mL water for injection (WFI). Στην συνέχεια τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 100°C για 20–30min και αμέσως μετά ψύχθηκαν στους -20°C για 5min, ακλούθησε φυγοκεντρική στις 10.000rpm για 10min, ώστε να πάρουμε το υπερκείμενο στο οποίο ανευρίσκεται το γενετικό υλικό.

5.5.2 Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR)

Η τεχνική της πολυπλεκτικής (multiplex) PCR πραγματοποιήθηκε με τον θερμικό κυκλοποιητή PTC-100 Peltier Thermal Cycler της MJ Research. Το πρωτόκολλο σύμφωνα με το οποίο έλαβε χώρα η διαδικασία της πολυπλεκτικής PCR για τα *mcr 1, mcr 2, mcr 3, mcr 4, mcr 5,* περιγράφεται στην δημοσίευση των Rebelo A.R. et al, 2018 [87], ενώ για τα *mcr 6, mcr 7, mcr 8, mcr 9* ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο όπως περιγράφεται από τους Borowiak, M., et al, 2020 [88].

Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες για *τα mcr 1, mcr 2, mcr 3, mcr 4, mcr 5, mcr 6, mcr 7, mcr 8, mcr 9* καθώς και οι εκκινητές (primers) περιγράφονται στον Πίνακας 6. Η προμήθεια των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες, έγινε από το Εθνικό Ινστιτούτο Τροφίμων, Τεχνικό Πανεπιστήμιο της Δανίας (Technical University of Denmark).

Πίνακας 6. Εκκινητές, μέγεθος σε ζεύγη βάσεων προϊόντος PCR και θετικοί μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν [87, 88].

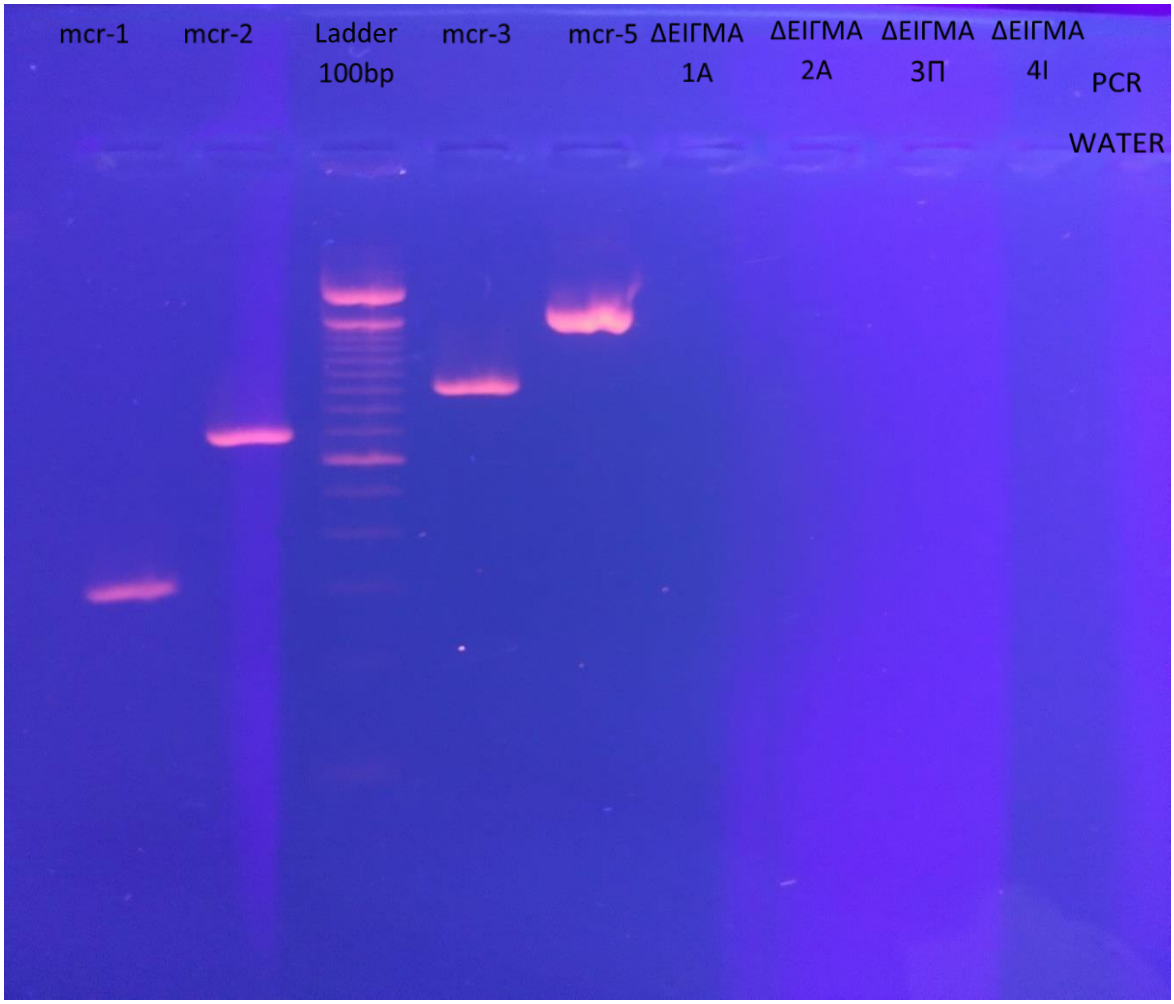
Γονίδιο mcr	Εκκινητές	Μέγεθος (bp)	Θετικά Controls
mcr-1	mcr1-F	320	Escherichia coli 2012–60–1176–27
	mcr1-R		
mcr-2	mcr2-F	715	E.coli KP37
	mcr2-R		
mcr-3	mcr3-F	929	E coli 2013-SQ352
	mcr3-R		
mcr-4	mcr4-F	1116	E.coli DH5α
	mcr4-R		
mcr-5	mcr5-F	1644	Salmonella 13- SA01718
	mcr5-R		
mcr-6	mcr-6F	252	
	mcr-6R		
mcr-7	mcr-7F	551	
	mcr-7R		
mcr-8	mcr-8F	856	
	mcr-8R		
mcr-9	mcr-9F	1011	
	mcr-9R		

5.5.3 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων

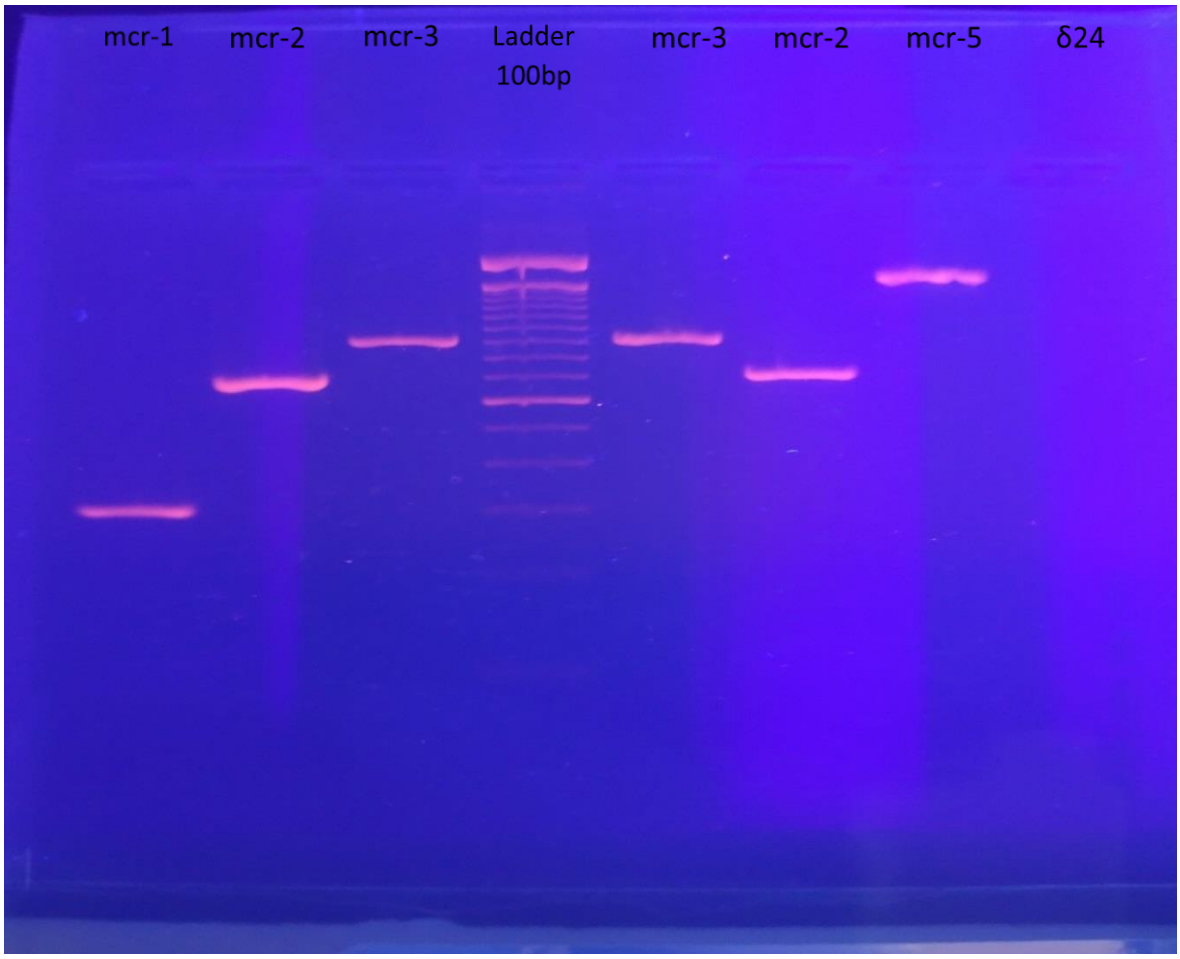
Η ηλεκτροφόρηση έλαβε χώρα σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%. Η χρωστική που χρησιμοποιήθηκε στην παρασκευή του πηκτώματος ήταν το βρωμιούχο αιθίδιο - Ethidium bromide (EtBr). Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης έγινε για 30–40 min στα 130V

5.6 Αποτελέσματα

Από τα υπό εξέταση δείγματα με την διαδικασία της multiplex PCR, δεν ανιχνεύτηκε κανένα από τα γονίδια *mcr 1, mcr 2, mcr 3, mcr 4, mcr 5, mcr 6, mcr 7, mcr 8, mcr 9* που προσδίδουν αντοχή στην κολιστίνη, σε κανένα από τα στελέχη *A.baumannii. Στην* Εικόνα 11 *κα στην* Εικόνα 12 παρατίθεται παράδειγμα ηλεκτροφόρησης δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης.



Εικόνα 11.*Είκονα αποτελέσματος των PCR προϊόντων. mcr1=320bp, mcr2=715bp, mcr3=929bp, mcr5=1644bp και 4 κλινικά δείγματα, PCR WATER = Αρνητικός Μάρτυρας. (φωτογραφία από το προσωπικό μου αρχείο κατά την διάρκεια των πειραμάτων).*



***Εικόνα 12**.Εικόνα αποτελέσματος των PCR προϊόντων. mcr1=320bp, mcr2=715bp, mcr3=929bp, mcr5=1644bp και 1 κλινικό δείγμα. (φωτογραφία από το προσωπικό μου αρχείο κατά την διάρκεια των πειραμάτων).*

6. Συζήτηση

Η όλο και αυξανόμενη αντοχή στην κολιστίνη αποτελεί γεγονός σοβαρής ανησυχίας, καθώς η κολιστίνη χορηγείται ως αντιβιοτικό τελευταίας επιλογής, για την θεραπεία λοιμώξεων από πολυανθεκτικά Gram αρνητικά βακτήρια. Αποτελεί επομένως σημαντικό πεδίο έρευνας η κατανόηση του μηχανισμού αντοχής στην κολιστίνη, γεγονός που θα βοηθήσει τόσο σε προγράμματα επιτήρησης και επιδημιολογίας, όσο και στην ανάπτυξη καινούργιων στόχων για την παραγωγή νέων αντιμικροβιακών φαρμάκων.

Ένα από τα πολυανθεκτικά Gram αρνητικά βακτήρια που προαναφέρθηκαν είναι και το *Acinetobacter baumannii*, το οποίο ενοχοποιείται όλο και περισσότερο για την ανάπτυξη ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων. Αποτελεί το κυριότερο αίτιο της νοσοκομειακής πνευμονίας κυρίως στις ΜΕΘ. Τα τελευταία χρόνια η αντοχή του στις ομάδες αντιβιοτικών αυξάνεται επικίνδυνα, με αποτέλεσμα την δυσκολία της αντιμετώπισης σοβαρών

ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων. Η ιδιότητα του να επιζεί σε επιφάνειες για μεγάλο χρονικό διάστημα διευκολύνει την μετάδοση του σε νοσοκομειακά περιβάλλοντα. Τα τελευταία χρόνια στα Ελληνικά νοσοκομεία αυξάνεται ο ρυθμός καταγραφής στελεχών *Acinetobacter baumannii* τα οποία παρουσιάζουν αντοχή στην κολιστίνη [89].

Η ανακάλυψη των γονιδίων αντοχής *mcr 1, mcr 2, mcr 3, mcr 4, mcr 5,* από το 2015, και έπειτα των γονιδίων *mcr 6, mcr 7, mcr 8, mcr 9, mcr 10* ήρθε για να επιτείνει ακόμα περισσότερο την όλο και αυξανόμενη ανησυχία όσων αφορά την αντοχή στην κολιστίνη. Τα γονίδια αυτά ανευρίσκονται σε πλασμίδια, ως εκ τούτου η μεταφορά τους ανάμεσα σε βακτηριακους πληθυσμούς μπορεί να επιτευχτεί με μεγάλη ευκολία [87].

Συμφώνα με έρευνες οι οποίες πραγματοποιήθηκαν και είχαν σαν στόχο την μελέτη του μηχανισμού αντοχής του *A.baumannii* στην κολιστίνη, ανακαλύφθηκε ότι οι μηχανισμοί αντίστασης για το συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος, είναι πολύ περισσότερο περίπλοκοι από ότι αρχικά πιστευόταν και χρειάζεται περαιτέρω αποσαφήνιση. Είναι σημαντικό να εκτιμηθούν οι ειδικοί για το *A.baumannii* πολυμορφισμοί που παρουσιάζονται σε αλληλόμορφα σχετιζόμενα με την αντίσταση στην κολιστίνη [4].

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, αναζητήθηκε ένας μηχανισμός αντοχής στην κολιστίνη ο οποίος φαίνεται να είναι εξαιρετικά σπάνιος για τα βακτήρια του γένους *Acinetobacter.* Τα στελέχη που εξετάστηκαν βρέθηκαν αρνητικά στο σύνολό τους για τα γονίδια αντοχής στην κολιστίνη *mcr 1, mcr 2, mcr 3, mcr 4, mcr 5, mcr 6, mcr 7, mcr 8, mcr 9*. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, ο μηχανισμός αυτός έχει ανιχνευτεί ως υπαίτιος για την αντοχή στην κολιστίνη σε στέλεχος Acinetobacter baumannii το 2019 σε έρευνα η οποία διεξήχθη στην Κίνα. Συγκεκριμένα ανιχνευτικέ το *mcr4.3* σε δείγμα από κόπρανα χοίρου [90].

Καταλήγοντας, για την ανεύρεση του μηχανισμού αντοχής στην κολιστίνη που παρουσιάζεται σε στελέχη *Acinetobacter*, απαραίτητο είναι να διεξαχθεί ένας πολυπαραγοντικός έλεγχος, ένας λεπτομερής γενετικός χαρακτηρισμός που θα καλύπτει διάφορες πιθανές αιτίες αντοχής. Συμφώνα με έρευνες οι οποίες είχαν ως στόχο τους την αποκάλυψη του μηχανισμού αντίστασης στην κολιστίνη σε στελέχη *Acinetobacter* παρατηρήθηκε ότι ο συχνότερα υπεύθυνος μηχανισμός είναι μεταλλάξεις στο οπερόνιο pmrCAB. Το γονίδιο pmrC κωδικοποιεί μια τρανσφεράση PetN και τα pmrA και pmrB κωδικοποιούν το TCS. Οι μεταλλάξεις στο pmrAB TCS ενεργοποιούν την υπερέκφραση του pmrC, οδηγώντας στην τροποποίηση του λιπιδίου A με PetN και τελικά σε αντίσταση στην κολι-

στίνη [91]. Απαραίτητο, σύμφωνα με τα παραπάνω, αποδεικνύεται το γεγονός πως σε μία ανάλυση επιτήρησης δεν θα πρέπει να παρακάμπτεται το κομμάτι της κλασικής Μικροβιολογίας και ο προσδιορισμός MIC, καθώς θα μπορούσε να οδηγήσει σε λανθασμένα αποτελέσματα αφήνοντας εκτός απομονώσεις ανθεκτικές στην κολιστίνη με διαφορετικούς μηχανισμούς αντοχής.

Αναφορές

1. Beceiro, A., et al., *Phosphoethanolamine modification of lipid A in colistin-resistant variants of Acinetobacter baumannii mediated by the pmrAB two-component regulatory system.* Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(7): p. 3370-9.
2. Adams, M.D., et al., *Resistance to colistin in Acinetobacter baumannii associated with mutations in the PmrAB two-component system.* Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(9): p. 3628-34.
3. Moffatt, J.H., et al., *Colistin resistance in Acinetobacter baumannii is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production.* Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(12): p. 4971-7.
4. Gerson, S., et al., *Diversity of amino acid substitutions in PmrCAB associated with colistin resistance in clinical isolates of Acinetobacter baumannii.* Int J Antimicrob Agents, 2020. **55**(3): p. 105862.
5. Ventola, C.L., *The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats.* P T, 2015. **40**(4): p. 277-83.
6. Dutescu, I.A. and S.A. Hillier, *Encouraging the Development of New Antibiotics: Are Financial Incentives the Right Way Forward? A Systematic Review and Case Study.* Infect Drug Resist, 2021. **14**: p. 415-434.
7. Baraka, M.A., et al., *Health care providers' perceptions regarding antimicrobial stewardship programs (AMS) implementation-facilitators and challenges: a cross-sectional study in the Eastern province of Saudi Arabia.* Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2019. **18**(1): p. 26.
8. Edwards, S.E. and C.M. Morel, *Learning from our mistakes: using key opportunities to remove the perverse incentives that help drive antibiotic resistance.* Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res, 2019. **19**(6): p. 685-692.
9. Spellberg, B., A. Srinivasan, and H.F. Chambers, *New Societal Approaches to Empowering Antibiotic Stewardship.* JAMA, 2016. **315**(12): p. 1229-30.
10. Medina, E. and D.H. Pieper, *Tackling Threats and Future Problems of Multidrug-Resistant Bacteria.* Curr Top Microbiol Immunol, 2016. **398**: p. 3-33.
11. Jones, R.N., *Resistance patterns among nosocomial pathogens: trends over the past few years.* Chest, 2001. **119**(2 Suppl): p. 397S-404S.
12. Κοντοπίδου, Φ., *Αντοχή των Μικροβίων στα Αντιβιοτικά Μικροβιακή Αντοχή*. 2019: Γραφείο Νοσοκομειακών Λοιμώξεων και Μικροβιακής Αντοχής Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας 2019. p. 1-53.
13. Hasan, C.M., D. Dutta, and A.N.T. Nguyen, *Revisiting Antibiotic Resistance: Mechanistic Foundations to Evolutionary Outlook.* Antibiotics (Basel), 2021. **11**(1).
14. Koyasseril-Yehiya, T.M., et al., *Supramolecular antibiotics: a strategy for conversion of broad-spectrum to narrow-spectrum antibiotics for Staphylococcus aureus.* Nanoscale, 2020. **12**(40): p. 20693-20698.
15. Walsh, C., *Antibiotics*, ed. C. Walsh. 2003, Washington USA: American Society for Mikrobiology (ASM).
16. Davis, B.D., *Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides.* Microbiol Rev, 1987. **51**(3): p. 341-50.
17. Alfei, S. and A.M. Schito, *beta-Lactam Antibiotics and beta-Lactamase Enzymes Inhibitors, Part 2: Our Limited Resources.* Pharmaceuticals (Basel), 2022. **15**(4).

18. Acharya, Y., et al., *Pursuit of next-generation glycopeptides: a journey with vancomycin.* Chem Commun (Camb), 2022. **58**(12): p. 1881-1897.
19. *Cephalosporins*, in *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. 2012: Bethesda (MD).
20. *Penicillins (4th Generation)*, in *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. 2012: Bethesda (MD).
21. *Fluoroquinolones*, in *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. 2012: Bethesda (MD).
22. Lupia, T., et al., *Temocillin: Applications in Antimicrobial Stewardship as a Potential Carbapenem-Sparing Antibiotic.* Antibiotics (Basel), 2022. **11**(4).
23. *Aztreonam*, in *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. 2012: Bethesda (MD).
24. Alfei, S. and G. Zuccari, *Recommendations to Synthetize Old and New beta-Lactamases Inhibitors: A Review to Encourage Further Production.* Pharmaceuticals (Basel), 2022. **15**(3).
25. Amponsah, S.K., et al., *Bioanalysis of aminoglycosides using high-performance liquid chromatography.* ADMET DMPK, 2022. **10**(1): p. 27-62.
26. Markley, J.L. and T.A. Wencewicz, *Tetracycline-Inactivating Enzymes.* Front Microbiol, 2018. **9**: p. 1058.
27. Ndukwe, A.R.N., et al., *Strategies to Improve the Potency of Oxazolidinones towards Bacterial Biofilms.* Chem Asian J, 2022: p. e202200201.
28. Miklasinska-Majdanik, M., *Mechanisms of Resistance to Macrolide Antibiotics among Staphylococcus aureus.* Antibiotics (Basel), 2021. **10**(11).
29. Kasiakou, S.K., et al., *Combination therapy with intravenous colistin for management of infections due to multidrug-resistant Gram-negative bacteria in patients without cystic fibrosis.* Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(8): p. 3136-46.
30. Evans, M.E., D.J. Feola, and R.P. Rapp, *Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria.* Ann Pharmacother, 1999. **33**(9): p. 960-7.
31. Benedict, R.G. and A.F. Langlykke, *Antibiotic activity of Bacillus polymyxa.* J Bacteriol, 1947. **54**(1): p. 24.
32. Poirel, L., A. Jayol, and P. Nordmann, *Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes.* Clin Microbiol Rev, 2017. **30**(2): p. 557-596.
33. Falagas, M.E. and S.K. Kasiakou, *Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections.* Clin Infect Dis, 2005. **40**(9): p. 1333-41.
34. Michalopoulos, A.S. and D.C. Karatza, *Multidrug-resistant Gram-negative infections: the use of colistin.* Expert Rev Anti Infect Ther, 2010. **8**(9): p. 1009-17.
35. Bialvaei, A.Z. and H. Samadi Kafil, *Colistin, mechanisms and prevalence of resistance.* Curr Med Res Opin, 2015. **31**(4): p. 707-21.
36. Falagas, M.E., P.I. Rafailidis, and D.K. Matthaiou, *Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options.* Drug Resist Updat, 2010. **13**(4-5): p. 132-8.
37. Raetz, C.R. and C. Whitfield, *Lipopolysaccharide endotoxins.* Annu Rev Biochem, 2002. **71**: p. 635-700.

38. Schindler, M. and M.J. Osborn, *Interaction of divalent cations and polymyxin B with lipopolysaccharide.* Biochemistry, 1979. **18**(20): p. 4425-30.
39. Tsubery, H., et al., *The functional association of polymyxin B with bacterial lipopolysaccharide is stereospecific: studies on polymyxin B nonapeptide.* Biochemistry, 2000. **39**(39): p. 11837-44.
40. Li, J., et al., *Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria.* Int J Antimicrob Agents, 2005. **25**(1): p. 11-25.
41. al-Khayyat, A.A. and A.L. Aronson, *Pharmacologic and toxicologic studies with the polymyxins. II. Comparative pharmnacologic studies of the sulfate and methanesulfonate salts of polymyxin B and colistin in dogs.* Chemotherapy, 1973. **19**(2): p. 82-97.
42. Ziv, G., J.F. Nouws, and C.A. van Ginneken, *The pharmacokinetics and tissue levels of polymyxin B, colistin and gentamicin in calves.* J Vet Pharmacol Ther, 1982. **5**(1): p. 45-58.
43. Baron, S., et al., *Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns.* Int J Antimicrob Agents, 2016. **48**(6): p. 583-591.
44. Wand, M.E., et al., *Retention of virulence following adaptation to colistin in Acinetobacter baumannii reflects the mechanism of resistance.* J Antimicrob Chemother, 2015. **70**(8): p. 2209-16.
45. Olaitan, A.O., S. Morand, and J.M. Rolain, *Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria.* Front Microbiol, 2014. **5**: p. 643.
46. Liu, Y.Y., et al., *Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study.* Lancet Infect Dis, 2016. **16**(2): p. 161-8.
47. Xu, T., et al., *Identi fi cation of mcr-10 carried by self-transmissible plasmids and chromosome in Enterobacter roggenkampii strains isolated from hospital sewage water.* Environ Pollut, 2021. **268**(Pt B): p. 115706.
48. Snesrud, E., et al., *A Model for Transposition of the Colistin Resistance Gene mcr-1 by ISApl1.* Antimicrob Agents Chemother, 2016. **60**(11): p. 6973-6976.
49. Kieffer, N., P. Nordmann, and L. Poirel, *Moraxella Species as Potential Sources of MCR-Like Polymyxin Resistance Determinants.* Antimicrob Agents Chemother, 2017. **61**(6).
50. Anandan, A., et al., *Structure of a lipid A phosphoethanolamine transferase suggests how conformational changes govern substrate binding.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(9): p. 2218-2223.
51. Xavier, B.B., et al., *Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in Escherichia coli, Belgium, June 2016.* Euro Surveill, 2016. **21**(27).
52. Yin, W., et al., *Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene mcr-3 in Escherichia coli.* mBio, 2017. **8**(3).
53. Snyman, Y., et al., *Characterisation of mobile colistin resistance genes (mcr-3 and mcr-5) in river and storm water in regions of the Western Cape of South Africa.* Antimicrob Resist Infect Control, 2021. **10**(1): p. 96.
54. Carattoli, A., et al., *Novel plasmid-mediated colistin resistance mcr-4 gene in Salmonella and Escherichia coli, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016.* Euro Surveill, 2017. **22**(31).
55. Zhang, H., et al., *Action and mechanism of the colistin resistance enzyme MCR-4.* Commun Biol, 2019. **2**: p. 36.

56. Hammerl, J.A., et al., *mcr-5 and a novel mcr-5.2 variant in Escherichia coli isolates from food and food-producing animals, Germany, 2010 to 2017.* J Antimicrob Chemother, 2018. **73**(5): p. 1433-1435.
57. AbuOun, M., et al., *mcr-1 and mcr-2 variant genes identified in Moraxella species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015.* J Antimicrob Chemother, 2017. **72**(10): p. 2745-2749.
58. Wang, X., et al., *Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, mcr-8, in NDM-producing Klebsiella pneumoniae.* Emerg Microbes Infect, 2018. **7**(1): p. 122.
59. Yang, Y.Q., et al., *Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-7.1 in Klebsiella pneumoniae.* J Antimicrob Chemother, 2018. **73**(7): p. 1791-1795.
60. Carroll, L.M., et al., *Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene mcr-9 in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible Salmonella enterica Serotype Typhimurium Isolate.* mBio, 2019. **10**(3).
61. Van Looveren, M., H. Goossens, and A.S. Group, *Antimicrobial resistance of Acinetobacter spp. in Europe.* Clin Microbiol Infect, 2004. **10**(8): p. 684-704.
62. Visca, P., H. Seifert, and K.J. Towner, *Acinetobacter infection--an emerging threat to human health.* IUBMB Life, 2011. **63**(12): p. 1048-54.
63. Lin, M.F. and C.Y. Lan, *Antimicrobial resistance in Acinetobacter baumannii: From bench to bedside.* World J Clin Cases, 2014. **2**(12): p. 787-814.
64. Stackebrandt, E. and B.M. Goebel, *Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1994. **44**(4): p. 846-849.
65. Visca, P., H. Seifert, and K.J. Towner, *Acinetobacter infection - an emerging threat to human health.* IUBMB Life, 2011. **63**(12): p. 1048-1054.
66. Baumann, P., *Isolation of Acinetobacter from soil and water.* J Bacteriol, 1968. **96**(1): p. 39-42.
67. Borges Duarte, D.F. and A. Goncalves Rodrigues, *Acinetobacter baumannii: insights towards a comprehensive approach for the prevention of outbreaks in health-care facilities.* APMIS, 2022. **130**(6): p. 330-337.
68. Hanlon, G.W., *The emergence of multidrug resistant Acinetobacter species: a major concern in the hospital setting.* Lett Appl Microbiol, 2005. **41**(5): p. 375-8.
69. Bassetti, M., et al., *Therapeutic options for difficult-to-treat Acinetobacter baumannii infections: a 2020 perspective.* Expert Opin Pharmacother, 2021. **22**(2): p. 167-177.
70. Giannella, M., et al., *Prognostic Utility of the New Definition of Difficult-to-Treat Resistance Among Patients With Gram-Negative Bloodstream Infections.* Open Forum Infect Dis, 2019. **6**(12): p. ofz505.
71. Joly-Guillou, M.L., *Clinical impact and pathogenicity of Acinetobacter.* Clin Microbiol Infect, 2005. **11**(11): p. 868-73.
72. McDonald, L.C., S.N. Banerjee, and W.R. Jarvis, *Seasonal variation of Acinetobacter infections: 1987-1996. Nosocomial Infections Surveillance System.* Clin Infect Dis, 1999. **29**(5): p. 1133-7.
73. Granata, G., et al., *Durlobactam in the Treatment of Multidrug-Resistant Acinetobacter baumannii Infections: A Systematic Review.* J Clin Med, 2022. **11**(12).

74. Roy, R., et al., *Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action.* Virulence, 2018. **9**(1): p. 522-554.
75. Gedefie, A., et al., *Acinetobacter baumannii Biofilm Formation and Its Role in Disease Pathogenesis: A Review.* Infect Drug Resist, 2021. **14**: p. 3711-3719.
76. Bekele, S.T., et al., 2018.
77. Sunu Kumari, A.M., et al., *Imipenem resistance and biofilm production in Acinetobacter.* Drug Invention Today, 2013. **5**(3): p. 256-258.
78. Greene, C., et al., *The influence of biofilm formation and multidrug resistance on environmental survival of clinical and environmental isolates of Acinetobacter baumannii.* American Journal of Infection Control, 2016. **44**(5): p. e65-e71.
79. Cerqueira, G.M. and A.Y. Peleg, *Insights into Acinetobacter baumannii pathogenicity.* IUBMB Life, 2011. **63**(12): p. 1055-1060.
80. Kalova, A., et al., *Characterisation of Colistin -Resistant Enterobacterales and Acinetobacter Strains Carrying mcr Genes from Asian Aquaculture Products.* Antibiotics (Basel), 2021. **10**(7).
81. Raut, S., et al., *Trend and Characteristics of Acinetobacter baumannii Infections in Patients Attending Universal College of Medical Sciences, Bhairahawa, Western Nepal: A Longitudinal Study of 2018.* Infect Drug Resist, 2020. **13**: p. 1631-1641.
82. Pires, S., et al., *Biological sex influences susceptibility to Acinetobacter baumannii pneumonia in mice.* JCI Insight, 2020. **5**(7).
83. EUCAST, *Clinical Break Points Tables v. 12.0, valid from 2022-01-01*. 2022.
84. Sacco, F., et al., *Susceptibility Testing of Colistin for Acinetobacter baumannii: How Far Are We from the Truth?* Antibiotics (Basel), 2021. **10**(1).
85. Ezadi, F., A. Ardebili, and R. Mirnejad, *Antimicrobial Susceptibility Testing for Polymyxins: Challenges, Issues, and Recommendations.* J Clin Microbiol, 2019. **57**(4).
86. *PureLink® Genomic DNA Kits*. 2012: www.lifetechnologies.com. p. 1-48.
87. Rebelo, A.R., et al., *Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes.* Euro Surveill, 2018. **23**(6).
88. Borowiak, M., et al., *Development of a Novel mcr-6 to mcr-9 Multiplex PCR and Assessment of mcr-1 to mcr-9 Occurrence in Colistin-Resistant Salmonella enterica Isolates From Environment, Feed, Animals and Food (2011-2018) in Germany.* Front Microbiol, 2020. **11**: p. 80.
89. Maniatis, A.N., et al., *Multiresistant Acinetobacter baumannii isolates in intensive care units in Greece.* Clin Microbiol Infect, 2003. **9**(6): p. 547-53.
90. Ma, F., et al., *Identification of a Novel Plasmid Carrying mcr-4.3 in an Acinetobacter baumannii Strain in China.* Antimicrob Agents Chemother, 2019. **63**(6).
91. Trebosc, V., et al., *Dissecting Colistin Resistance Mechanisms in Extensively Drug-Resistant Acinetobacter baumannii Clinical Isolates.* mBio, 2019. **10**(4).