



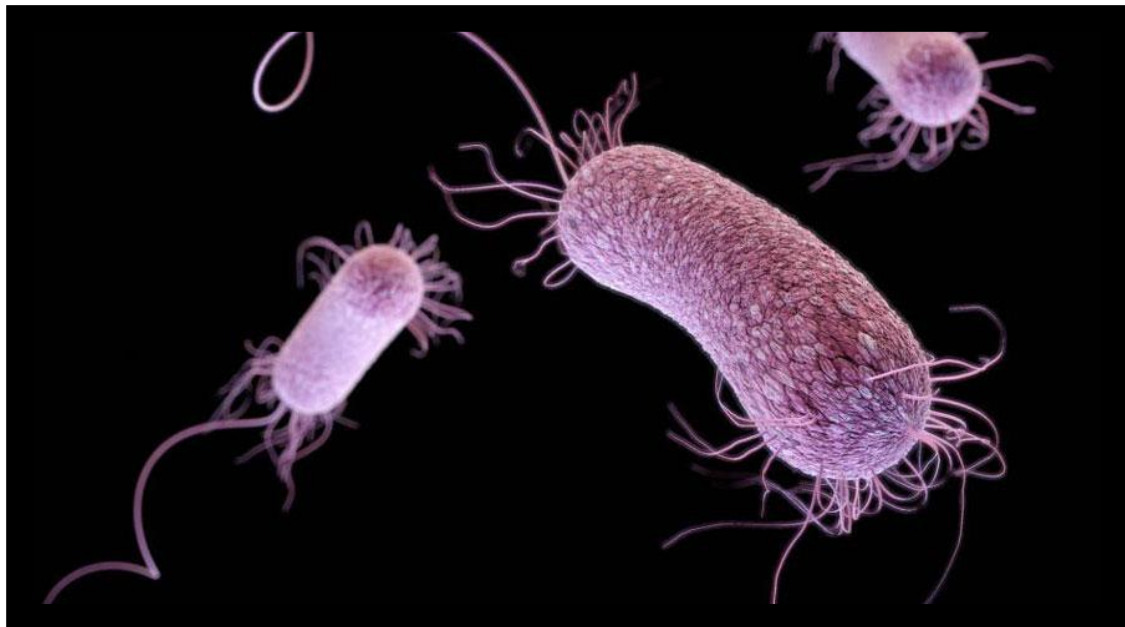
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ & ΠΡΟΝΟΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

Μοριακή ανίχνευση γονιδίων σχετιζόμενων με την κολιστίνη (*mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, colistin resistance genes) σε βακτηριακά στελέχη της Νοτίου Ελλάδας



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΦΟΙΤΗΤΗ: ΔΑΦΝΗ ΒΡΕΤΟΥΔΑΚΗ

ΑΜ: 62116945

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ ΜΠΕΛΟΥΚΑΣ, ANNA ΨΑΡΟΥΛΑΚΗ

ΑΘΗΝΑ 2021



UNIVERSITY OF WEST ATTICA

FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES

DIVISION OF MEDICAL LABORATORIES

Molecular detection of colistin-related genes (*mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, colistin resistance genes) in bacterial strains of Southern Greece



DISSERTATION

NAME: DAFNI VRETOUDAKI

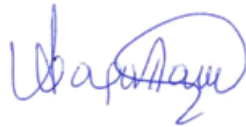
Candidate Number: 62116045

SUPERVISOR: APOSTOLOS BELOUKAS, ANNA PSAROULAKI

ATHENS 2021

ΜΕΛΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Άννα Ψαρουλάκη



Απόστολος Μπελούκας

**Apostolos
Beloukas**

Digitally signed by
Apostolos Beloukas
Date: 2021.03.13 09:16:04
+02'00'

Ελένη Γιαννουλάκη

Eleni Giannoulaki

Digitally signed by Eleni
Giannoulaki
Date: 2021.03.12 11:44:23 +02'00'

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Δάφνη Βρετουδάκη του Ιωάννη, με αριθμό μητρώου 62116045 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της διπλωματικής 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».

Η Δηλούσα
Δάφνη Βρετουδάκη



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ θερμά τους υπεύθυνους επιβλέποντες καθηγητές μου κύριο Μπελούκα Απόστολο επίκουρο καθηγητή Μοριακής Μικροβιολογίας και Ιολογίας του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής και κυρία Ψαρουλάκη Άννα καθηγήτρια Μικροβιολογίας / Ζωνόσων Τμήματος Κλινικής Μικροβιολογίας & Μικροβιακής Παθογένεσης στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Κρήτης, που δέχτηκαν να αναλάβουν την επίβλεψη της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Τους ευχαριστώ ιδιαίτερως που μου προσέφεραν τη δυνατότητα να ασκώμαι στα εργαστήρια τους αλλά και την πολύτιμη καθοδήγηση που έλαβα από εκείνους όλο αυτό το διάστημα.

Ακόμη, δε μπορώ να μην αναφέρω τις ευχαριστίες μου στο επιστημονικό και εργαστηριακό προσωπικό που ήταν δίπλα μου σε όλη την διάρκεια αυτού το πονήματος. Ειδικότερα, ευχαριστώ την Διολή Χρυσούλα, υποψήφια διδάκτορα του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, τον κύριο Χοχλάκη Δημοσθένη διδάκτορα Βιοχημικό του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Μικροβιακής Παθογένεσης στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Κρήτης όπως επίσης και την κυρία Μακριδάκη Ειρήνη και Μάκκα Σοφία που με τις συμβουλές και τις γνώσεις τους κατάφερα να φέρω εις πέρας τις πειραματικές διαδικασίες αλλά και τη συγγραφή της διπλωματικής εργασίας.

Τέλος, οφείλω να εκφράσω την αμέριστη αγάπη μου στην οικογένεια και τους φίλους μου που καθημερινά με στηρίζουν και με ενθαρρύνουν σε κάθε μου προσπάθεια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα βιβλιογραφική ανασκόπηση πραγματεύεται την ανάπτυξη αντοχής των βακτηρίων έναντι του αντιβιοτικού κολιστίνη ενώ συνοδεύεται από ορισμένα αποτελέσματα που προέκυψαν ύστερα από πειραματικές διαδικασίες στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας Τροφίμων, Υδάτων & Περιβάλλοντος της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης. Στο πρώτο μέρος, παρουσιάζεται μια σύντομη αναδρομή στην ιστορία των αντιμικροβιακών, οι ιδιότητες της κολιστίνης, η χρήση και οι παρενέργειες που έχουν αναφερθεί, καθώς και ο τρόπος δράσης της στα Gram αρνητικά βακτήρια. Γίνεται μια εκτεταμένη αναφορά στη βακτηριακή αντοχή, στα αίτια που την καθιστούν ως μια από τις μεγαλύτερες προκλήσεις στον κλάδο τόσο της ιατρικής όσο και της κτηνιατρικής/ κτηνοτροφίας, άλλα κα στην έννοια της «ενιαίας υγείας». Περιγράφεται αναλυτικά η αντοχή στην κολιστίνη, φαινόμενο που παρατηρείται την τελευταία δεκαετία και έχει ενισχυθεί λόγω της πρόσφατης ανακάλυψης των 10 γονιδίων *mcr* (mobile colistin resistance) που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα Gram αρνητικά βακτήρια έναντι της κολιστίνης. Παρατίθενται στοιχεία από πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με την εμφάνιση αυτών των γονιδίων σε εθνικό και παγκόσμιο επίπεδο, ενώ ταυτόχρονα δίνεται έμφαση στο περιβάλλον και στα βακτηριακά είδη που κυρίως ανευρίσκονται. Στο δεύτερο μέρος, περιγράφονται τα υλικά, οι αρχές μεθόδου και οι πειραματικές διαδικασίες που χρησιμοποιήθηκαν για την μοριακή ανίχνευση των γονιδίων *mcr-1*, *-2*, *-3*, *-4*, *-5* σε 60 περιβαλλοντικά στελέχη *Escherichia coli* και *Pseudomonas aeruginosa* (n=60) που απομονώθηκαν στο χρονικό διάστημα 2011 έως 2020 στην περιφέρεια Κρήτης και φυλάχθηκαν σε κατάλληλες συνθήκες στο αρχείο βιολογικών δειγμάτων του Πανεπιστημίου Κρήτης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του μοριακού ελέγχου δεν βρέθηκε στα υπό μελέτη στελέχη κάποιο από αυτά τα γονίδια *mcr*. Για μια πιο σφαιρική άποψη της αντοχής της στην κολιστίνης στα συγκεκριμένα στελέχη, συνιστώνται περαιτέρω μελέτες μέσω της μεθόδου αναφοράς για την κολιστίνη, Broth Microdilution, που μπορούν να συνεκτιμηθούν με τα αποτελέσματα της εν λόγω διπλωματικής εργασίας.

Λέξεις κλειδιά: αντιβιοτικά, αντιμικροβιακή αντοχή, κολιστίνη, Gram αρνητικά βακτήρια, ενιαία υγεία, μηχανισμοί αντοχής, επιλεκτική πίεση, γονίδια αντοχής, *mcr*, πλασμίδια, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRACT

This scientific review deals with the rise of the bacterial resistance against the antibiotic colistin and is accompanied by some results that emerged from experimental procedures in the Laboratory of Environmental Microbiology of the Medical School of the University of Crete. The first part, presents a brief overview of the history of antimicrobials, the properties of colistin, the use and side effects that have been reported, and the mode of action in Gram negative bacteria. An extensive analysis is made over the bacterial resistance, on the causes that make it one of the biggest challenges in the field of both medicine and veterinary / animal husbandry, but also on the approach of "one health". Colistin resistance is described in detail, a phenomenon that has been observed in the last decade and has been enhanced due to the recent discovery of 10 *mcr* (mobile colistin resistance) genes that impart resistance to Gram-negative bacteria against colistin. Data from recent literature on the occurrence of these genes are presented, on a national and worldwide level, while at the same time emphasis is given to the environment and the bacterial species that are mainly found. The second part, describes the materials, methods and experimental procedures used for the molecular detection of *mcr-1*, *-2*, *-3*, *-4*, *-5* genes in 60 environmental strains of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* (n = 60) which were isolated in the period 2011 to 2020 in the region of Crete and stored in appropriate conditions in the biological samples archive of the University of Crete. According to the results of the molecular test, none of these *mcr* genes were found in the studied strains. For a more comprehensive view of colistin resistance in these strains, further studies are recommended through the reference methods for colistin, Broth Microdilution, which can be taken into consideration with the results of this dissertation.

Keywords: antibiotics, antimicrobial resistance, colistin, Gram negative bacteria, one health, resistance mechanisms, selective pressure, resistance genes, *mcr*, plasmids, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	III
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	IV
ABSTRACT.....	V
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1- ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Αντιμικροβιακά	1
1.1.1 Ορισμός	1
1.1.2 Ιστορία αντιμικροβιακών	1
1.1.3 Αντιβιοτικά στη σύγχρονη εποχή.....	4
1.2 Πολυμιξίνες	6
1.2.1 Ιστορία της κολιστίνης	6
1.2.2 Πολυμιξίνη Β	6
1.2.3 Κολιστίνη	7
1.2.4 Διαφορές κολιστίνης και πολυμιξίνης Β	8
1.2.5 Χορήγηση	9
1.2.6 Φαρμακοδυναμική κολιστίνης	10
1.2.7 Φαρμακοκινητική.....	11
1.2.7.1 Πρωτεϊνική δέσμευση κολιστίνης.....	13
1.2.8 Χρήση	15
1.2.9 Αντενδείξεις.....	15
1.2.10 Παρενέργειες	16
1.2.10.1 Νεφροτοξικότητα	16
1.2.10.2 Νευροτοξικότητα	17
1.2.11 Μηχανισμός δράσης κολιστίνης	18
1.2.12 Κυτταρική μεμβράνη Gram αρνητικών βακτηρίων	18
1.2.12.1 Σύνθεση κυτταρικής μεμβράνης.....	18
1.2.12.2 Σύνθεση LPS	18
	VI

1.2.13 Αλληλεπίδραση κυτταρικής μεμβράνης βακτηρίων με την κολιστίνη	20
1.3 Βακτηριακή αντοχή στα αντιβιοτικά	23
1.3.1 Ορισμός	23
1.3.2 Ενιαία Υγεία.....	24
1.3.3 Φυσική αντοχή	24
1.3.4 Επίκτητη αντοχή.....	24
1.3.4.1 Χρωμοσωμικές μεταλλαγές	25
1.3.5 Μεταφερόμενη αντοχή στα αντιβιοτικά	25
1.3.5.1 Κάθετη μεταφορά	25
1.3.5.2 Οριζόντια μεταφορά	25
1.3.6 Μηχανισμοί αντοχής.....	26
1.3.6.1 Παρεμπόδιση διείσδυσης φαρμάκου.....	27
1.3.6.2 Αλλαγή στόχου δράσης του φαρμάκου.....	27
1.3.6.3 Ταχεία απάντληση του φαρμάκου	28
1.3.6.4 Βιομεμβράνες.....	28
1.3.7 Εξάπλωση και αίτια διασποράς της μικροβιακής αντοχής στα αντιβιοτικά	31
1.3.7.1 Υπέρμετρη συνταγογράφηση αντιβιοτικών	32
1.3.7.2 Μη συνταγογραφημένη αντιμικροβιακή αγωγή.....	32
1.3.7.3 Πρόωρη διακοπή της αντιμικροβιακής θεραπείας	33
1.3.7.4 Υπέρμετρη χρήση αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία και την αλιεία.....	33
1.3.7.5 Απουσία υγιεινής εκ μέρους της κοινωνίας	33
1.3.7.6 Έλλειψη επιτήρησης δημόσιας υγείας σε νοσοκομεία και κλινικές	34
1.3.8 Αντοχή στην κολιστίνη	34
1.3.9 Όρια ευαισθησίας στην κολιστίνη	35
1.4 Γονίδια αντοχής στην κολιστίνη	36
1.4.1 MCR-1.....	36

1.4.2 MCR-2.....	38
1.4.3 MCR-3.....	39
1.4.4 MCR-4.....	42
1.4.5 MCR-5.....	45
1.4.6 MCR-6.....	46
1.4.7 MCR-7.....	48
1.4.8 MCR-8.....	49
1.4.9 MCR-9.....	51
1.4.10 MCR-10.....	55
1.5 Εντόπιση γονιδίων <i>mcr</i> σε παγκόσμια κατανομή.....	56
1.6 Επιδημιολογικά δεδομένα για την Ελλάδα.....	60
1.6.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	60
1.6.2 <i>Escherichia coli</i>	61
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2- ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	65
2.1 Υλικά	66
2.2 Αρχή μεθόδου.....	68
2.3 Πειραματική πορεία	74
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ/ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	77
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	78
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	80

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1- ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Αντιμικροβιακά

Οι λοιμώδεις ασθένειες θανατώνουν κάθε χρόνο περίπου 14,9 εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως με την πνευμονία και τις συγγενείς ασθένειες του κατώτερου αναπνευστικού να είναι υπεύθυνες για παραπάνω από 3 εκατομμύρια θανάτους (1). Ένα μεγάλο ποσοστό των ασθενειών έχει εξαλειφθεί λόγω του έγκαιρου εμβολιασμό των πολιτών. Παρόλα αυτά αρκετές βακτηριακές ασθένειες χρήζουν αντιμετώπισης όταν μολυνθεί ο άνθρωπος. Σε αυτή τη περίπτωση κρίνεται αναγκαία η λήψη αντιμικροβιακού (2).

1.1.1 Ορισμός

Αντιμικροβιακά θεωρούνται οι χημικές ουσίες που στοχεύουν στην αντιμετώπιση λοιμώξεων από μικρόβια. Διαχωρίζονται σε 2 κατηγορίες ανάλογα με το πως θα επιδράσουν στα μικρόβια όταν προστεθούν κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης. Πρώτον, τα βακτηριοστατικά που οδηγούν σε αναστολή της αύξησης, αλλά όχι στον θάνατο και δεύτερον, τα βακτηριοκτόνα που θανατώνουν τους μικροοργανισμούς αλλά δεν οδηγούν σε λύση του κυττάρου (3).

1.1.2 Ιστορία αντιμικροβιακών

Υπάρχουν πολλά είδη αντιμικροβιακών ουσιών με διαφορετικό στόχο δράσης. Η ιστορία των αντιμικροβιακών ξεκινά με την ιδέα του Paul Ehrlich για μια «μαγική σφαίρα», η οποία είναι εξαιρετικά επιλεκτική και στοχεύει μόνο τους μικροοργανισμούς που προκαλούν ασθένειες. Η ιδέα αυτή προέκυψε ύστερα από την εργασία του σε εργοστάσιο παραγωγής χρωστικών στην Γερμανία. Ο Ehrlich υποστήριξε ότι οι χημικές ενώσεις θα μπορούσαν να συντεθούν με τέτοιο τρόπο ώστε να δράσουν εξειδικευμένα σε παράσιτα που εδρεύουν μέσα στον οργανισμό (4).

Το 1904, ξεκίνησε ένα πρόγραμμα για την ανακάλυψη ενός φαρμάκου δραστικού κατά της σύφιλης, της νόσου που είχε πάρει διαστάσεις επιδημίας στις ΗΠΑ και την Ευρώπη και ήταν δύσκολα θεραπεύσιμη εκείνη την περίοδο. Η βασική θεραπεία για αυτή τη σεξουαλικά μεταδιδόμενη ασθένεια, η οποία προκαλείται από την ωχρά σπειροχαίτη *Treponema pallidum*, περιελάμβανε χορήγηση χλωριούχου υδραργύρου μαζί με άλλα ανόργανα άλατα

υδραργύρου. Λόγω της τοξικότητας των ενώσεων του υδραργύρου, η θεραπεία είχε σοβαρές παρενέργειες και ταυτόχρονα μειωμένη αποτελεσματικότητα. Είχε δοκιμαστεί ένας άλλος τύπος θεραπείας με αρσενικό και ανόργανες αρσενικούχες ενώσεις, αλλά η τοξικότητα και η χαμηλή αποτελεσματικότητα παρέμενε ένα σοβαρό πρόβλημα σε αυτήν τη θεραπεία. Ένα λιγότερο τοξικό οργανικό αρσενικούχο φάρμακο, που ονομάζεται Atoxyl, συντέθηκε από την Antoine Béchamp το 1859 (5), και χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία της ασθένειας του αφρικανικού ύπνου. Αυτό το φάρμακο κέντρισε την προσοχή των Paul Ehrlich και Alfred Bertheim. Συντέθηκαν εκατοντάδες ενώσεις αρσενοβενζολίου και του παραγώγου αρσεφαναμίνης. Το 1909, οι Ehrlich και Bertheim, μαζί με τον βακτηριολόγο Sahachiro Hata, ανακοίνωσαν την αποτελεσματικότητα αυτής της ένωσης για την θεραπεία κονίκλων που έπασχαν από σύφιλη (4).

Το 1928 ακολούθησε η ανακάλυψη της πενικιλίνης που ανήκει στην ομάδα των β-λακταμών από τον Alexander Fleming. Η πενικιλίνη δεν αναγνωρίστηκε αμέσως ως κλινικά χρήσιμο αντιβιοτικό. Απαγορεύτηκε η χρήση της λόγω χαμηλής απόδοσης και απέκκρισης του φαρμάκου. Στρατιωτικές ενέργειες τη δεκαετία του 1940 βοήθησαν να εξελιχθεί η πενικιλίνη σε μια πολύτιμη θεραπεία λοιμώξεων. Έπειτα, η πενικιλίνη έγινε ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο αντιβιοτικό σε μολυσματικές ασθένειες που προηγουμένως δεν μπορούσαν να ιαθούν (6).

Στη συνέχεια ακολούθησαν και άλλοι επιστήμονες στην αναζήτηση αντιμικροβιακών παραγόντων για τη θεραπεία μολυσματικών ασθενειών. Συγκεκριμένα, η πρώτη κατηγορία αντιμικροβιακών που βγήκε σε μαζική παραγωγή ήταν η ομάδα φαρμάκων sulfa (7). Στα τέλη της δεκαετίας του 1920 και στις αρχές της δεκαετίας του 1930, η γερμανική βιομηχανία Bayer γνώρισε δραματική ανέλιξη λόγω των νέων συνθετικών αντιβιοτικών γνωστών και ως σουλφοναμιδών. Πλέον χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση λοιμώξεων ουροποιητικού συστήματος και σαν υποστηρικτική θεραπεία σε ασθενείς με HIV (8).

Το 1943 ο Albert Schatz μελέτησε 2 στελέχη *Streptomyces*, τα οποία παρήγαγαν την ενεργή ουσία στρεπτομυκίνη που ανήκει στην υπεροικογένεια των αμινογλυκοσίδων η οποία διαπιστώθηκε ότι λειτουργεί ανασταλτικά στην ανάπτυξη του βάκιλου της φυματίωσης και των Gram αρνητικών βακτηρίων που είναι ανθεκτικά στην πενικιλίνη. Οι αμινογλυκοσίδες χρησιμοποιήθηκαν εκτενώς το πρώτο διάστημα αλλά αντικαταστάθηκαν σε μεγάλο βαθμό το 1980 με πιο αποτελεσματικά αντιμικροβιακά, με λιγότερες παρενέργειες, όπως οι κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες και φθοροκινολόνες (9). Υπάρχει, ωστόσο, ένα νέο

ενδιαφέρον για τις αμινογλυκοσίδες λόγω του συνεχώς αυξανόμενου προβλήματος της αντοχής στα αντιβιοτικά. Συγκεκριμένα, η γενταμικίνη εξακολουθεί να χρησιμοποιείται ευρέως σε νοσοκομεία για τη θεραπεία σοβαρών λοιμώξεων (10).

Το πρώτο αντιβιοτικό της κατηγορίας των τετρακυκλινών, η χλωροτετρακυκλίνη, ανακαλύφθηκε το 1945 από τον Benjamin Minge Duggar (11). Το βακτήριο εδάφους που παράγει το εν λόγω αντιβιοτικό ονομάστηκε *Streptomyces aureofaciens*, και το αντιβιοτικό που λήφθηκε από αυτό διατέθηκε στην αγορά με την εμπορική ονομασία Aureomycin. Η aureomycin σε κλινικές δοκιμές, έδειξε μια εκτενή εφαρμογή του φαρμάκου που εκτιμάται ότι ήταν ίση με εκείνη της πενικιλίνης. Το 2005, εγκρίθηκε η τιγκεκυκλίνη, ο πρώτος εκπρόσωπος των τετρακυκλινών τρίτης γενιάς από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration- FDA) και χορηγείται σε λοιμώξεις δέρματος (12). Η εκτεταμένη διάδοση του γονιδίου *tet (X)*, το οποίο προσφέρει αντοχή σε όλες τις τετρακυκλίνες, συμπεριλαμβανομένης και της τιγκεκυκλίνης, σε παθογόνα μικρόβια, μπορεί επίσης να αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό πρόβλημα στον έλεγχο της αντοχής σε αυτό το αντιβιοτικό (13).

Χρονολογικά, το επόμενο αντιβιοτικό που βρισκόταν σε εξέλιξη ήταν η χλωραμφενικόλη, η οποία ανακαλύφθηκε και απομονώθηκε από το *Streptomyces venezuelae* από τον David Gottlieb το 1947 (14). Ανήκει στην κατηγορία των αμφενικολών και χρησιμοποιείται για τη θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* και *Haemophilus influenzae*. Παρόλα αυτά, δεν χρησιμοποιείται σε ευρεία κλίμακα λόγω της τοξικότητας της ενώ έχουν αναφερθεί αρκετές περιπτώσεις αντοχής σε αυτή (15).

Ακολουθεί η ανακάλυψη των λιποπεπτιδίων το 1947 από τον Koyama, που σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν οι πολυμυξίνες που αναλύονται περαιτέρω σε επόμενο κεφάλαιο (16).

Το πρώτο αντιβιοτικό της κατηγορίας των μακρολίδων, η πικρομυκίνη, απομονώθηκε από το *Streptomyces venezuelae* από τους Brockmann και Henkel το 1950 (17). Δεν είχε προχωρήσει σε κλινική χρήση, αλλά παραμένει ένας σημαντικός πρόδρομος για τη σύνθεση άλλων μακρολίδων (18). Το πρώτο εμπορικά επιτυχημένο μακρολίδιο, ήταν η ερυθρομυκίνη. Οι μακρολίδες χορηγούνται σε ασθενείς που έχουν αλλεργία στις β- λακτάμες, στις λοιμώξεις από Gram αρνητικά μικρόβια και σε θεραπεία από μυκόπλασμα (4).

Οι κινολόνες με αντιπροσωπευτικό παράδειγμα το ναλιδιξικό οξύ, ανακαλύφθηκαν κατά τη διάρκεια μιας απόπειρας σύνθεση χλωροκίνης (19). Μετά την εισαγωγή του ναλιδιξικού οξέος το 1962 για τη θεραπεία λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος, ακολούθησε η σύνθεση άλλων παραγώγων για τη διεύρυνση του εύρους των στοχευόμενων βακτηρίων. Έτσι, τα τελευταία χρόνια οι κινολόνες έγιναν μια προτιμώμενη επιλογή για τη θεραπεία λοιμώξεων αναπνευστικού συστήματος, του δέρματος και για τις λοιμώξεις ουροκαθετήρα (20).

1.1.3 Αντιβιοτικά στη σύγχρονη εποχή

Η λέξη αντιβιοτικό προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις «αντί-» και «βίος» που σημαίνει κατά της ζωής. Με άλλα λόγια τα αντιβιοτικά δρουν κατά των μικροβίων και συγκεκριμένα έχει επικρατήσει να αναφέρεται στη δράση κατά των βακτηρίων (2).

Η εισαγωγή αντιβιοτικών στην κλινική πράξη ήταν αναμφισβήτητα η μεγαλύτερη ιατρική ανακάλυψη του 20^{ου} αιώνα. Εκτός από τη θεραπεία των βακτηριακών λοιμώξεων, τα αντιβιοτικά κατέστησαν δυνατές πολλές σύγχρονες ιατρικές διαδικασίες, όπως τη θεραπεία καρκίνου, τις μεταμοσχεύσεις οργάνων και τη χειρουργική επέμβαση ανοιχτής καρδιάς. Ωστόσο, η μη ορθολογική χρήση αυτών είχε ως αποτέλεσμα την ταχεία άνοδο της αντιμικροβιακής αντοχής (Antimicrobial Resistance- AMR), καθιστώντας ορισμένες λοιμώξεις μη ιάσιμες. Οι κίνδυνοι μιας «μετα-αντιβιοτικής» εποχής ώθησαν τους υπεύθυνους να αναγνωρίσουν αυτή την απειλή για τη δημόσια υγεία και να στρέψουν το ενδιαφέρον τους στην ανακάλυψη και ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών (21).

Είδη αντιβιοτικών

Στόχος δράσης	Χημική ουσία
Σύνθεση κυτταρικού τοιχώματος	Βανκομυκίνη, Βακιτρακίνη, Πενικιλίνη, Κεφαλοσπορίνη, Μονομπακτάμη, Καρβαπενέμη
Κυτταροπλασματική μεμβράνη	Πολυμυξίνη
Μεταβολισμός φολικού οξέος	Τριμεθοπρίμη, Σουλφοναμίδη
Επιμήκυνση του RNA	Ακτινομυκίνη
DNA γυράση	Κινολόνες (Ναλιδικό οξύ, Σιπροφλοξασίνη), Νοβοβιοσίνη
DNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση	ΡΙφαμπικίνη, Στρεπτοβαρυκίνες
Πρωτεϊνοσύνθεση (αναστολείς υπομονάδας 50S)	Μακρολίδια (Ερυθρομυκίνη, Χλωραμφαινικόλη, Κλινδαμυκίνη, Λιγκομυκίνη)
Πρωτεϊνοσύνθεση (αναστολείς υπομονάδας 30S)	Τετρακυκλίνη, Αμινογλυκοσίδες (Στρεπτομυκίνη, Σπεκτινομυκίνη, Γενταμυκίνη, Τοβραμυκίνη, Καναμυκίνη, Αμικασίνη), Νιτροφουράνιο

Πίνακας 1. Κατηγορίες αντιβιοτικών ανάλογα με το μηχανισμό δράσης τους (22).

1.2 Πολυμιξίνες

Ομάδα αντιβιοτικών που αποτελούνται από μη ριβοσωμικά κυκλικά ολιγοπεπτίδια. Χωρίζονται σε 5 κύριες κατηγορίες: A, B, C, D και E. Πλέον, μόνο οι πολυμιξίνες B και E είναι εμπορικά διαθέσιμες, καθώς οι υπόλοιπες έχουν εγκαταλειφθεί λόγω της αυξημένης τοξικότητας τους (23). Ανήκουν στην κατηγορία των αντιβιοτικών που δρουν στον λιποσακχαρίτη (LPS), που βρίσκεται στην εξωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, με εξαίρεση ορισμένα είδη. Οι πολυμιξίνες διεισδύουν στον LPS και διαταράσσουν την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης.

1.2.1 Ιστορία της κολιστίνης

Οι πολυμιξίνες απομονώθηκαν από το θετικό κατά Gram βακτήριο *Paenibacillus polymyxa* το 1947 ενώ η κολιστίνη ανακαλύφθηκε δυο χρόνια αργότερα, το 1949, από στελέχη του *Bacillus polymyxa* και συγκεκριμένα στο υποείδος *Colistinus* από τον Κογάμα στην Ιαπωνία (16). Χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στις αρχές του 1950. Ξεκίνησε ως ενδοφλεβίως χορηγούμενο αντιβιοτικό υπό τη μορφή της θειικής κολιστιμεθάτης (CMS) και το 1959 εγκρίθηκε από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων ως αποτελεσματικός αντιμικροβιακός παράγοντας έναντι λοιμώξεων που σχετίζονται με Gram αρνητικούς μικροοργανισμούς, καθώς διαθέτει βακτηριοστατική δράση (24). Στις αρχές του 1970, παρατηρήθηκαν παρενέργειες της κολιστίνης στους ασθενείς όποτε άρχισε σταδιακά να εγκαταλείπεται η χρήση της από τους κλινικούς. Κατά το διάστημα 1990-2000 χρησιμοποιούνταν κυρίως σε λοιμώξεις από πολυανθεκτικά Gram αρνητικά βακτήρια σε ασθενείς με κυστική ίνωση (25). Από το 2000 έως σήμερα έχει επανέλθει η χρήση της για την καταπολέμηση επίμονων λοιμώξεων από Gram αρνητικά βακτήρια και θεωρείται αντιβιοτικό «έσχατης ανάγκης». Αντικείμενο έρευνας τις τελευταίες δυο δεκαετίες είναι η αύξηση των ανθεκτικών στελεχών στην κολιστίνη που αφορούν κυρίως παθογόνα είτε περιβαλλοντικά, είτε από μονάδες υγείας (26).

1.2.2 Πολυμιξίνη B

Η πολυμιξίνη B αποτελείται από ένα κυκλικό επταπεπτίδιο και μια πλευρική αλυσίδα τριπεπτιδίου ακετυλιωμένο στο αμινοτελικό άκρο από ένα λιπαρό οξύ. Τα αμινοξικά

συστατικά στο μόριο της πολυμιξίνης Β είναι D-φαινυλαλανίνη, L-θρεονίνη και L-α-γ-διαμινοβουτυρικό οξύ (27).

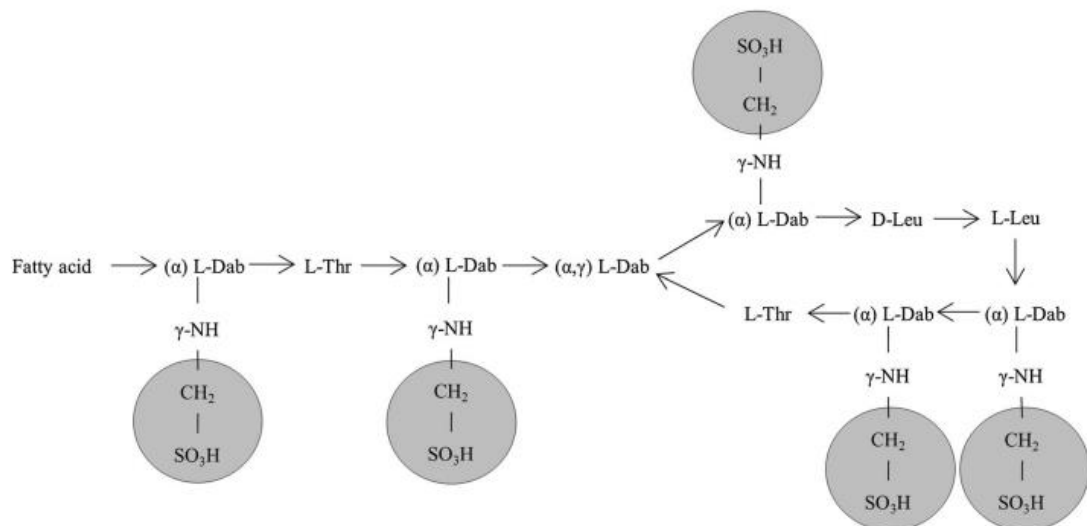
1.2.3 Κολιστίνη

Η κολιστίνη ή διαφορετικά πολυμιξίνη Ε ανακαλύφθηκε στον *Bacillus polymyxa* και συγκεκριμένα στο υποείδος *Colistinus*, το οποίο ανευρίσκεται στο έδαφος. Έχει μοριακό βάρος 1200 Daltons (Da) (26). Αποτελείται από ένα κυκλικό επταπεπτίδιο και μια πλευρική αλυσίδα τριπεπτιδίου ακετυλιωμένο στο αμινοτελικό άκρο από ένα λιπαρό οξύ. Τα αμινοξικά συστατικά στο μόριο της κολιστίνης είναι D-λευκίνη, L-θρεονίνη και L-α-γ-διαμινοβουτυρικό οξύ. Επομένως, η διαφορά στη δομή της από την πολυμιξίνη Β είναι ότι αντί της D-φαινυλαλανίνης υπάρχει η D-λευκίνη (27). Το άκρο του πεπτιδίου είναι υδρόφιλο ενώ το τμήμα των λιπαρών οξέων είναι υδρόφοβο και κατά συνέπεια, συνολικά, έχει αμφίφιλο χαρακτήρα, δηλαδή μπορεί να αντιδρά πολικά (με ηλεκτροστατικό φορτίο) ή μη πολικά έναντι του στόχου, δηλαδή του LPS της μεμβράνης των βακτηρίων (24).

Θεωρείται αποτελεσματική σε λοιμώξεις που αφορούν πολυανθεκτικά βακτήρια (Multi-Drug Resistant Organisms-MDRO) (24) όπως: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* και άλλα *Enterobacteriaceae*. Αντίθετα, υπάρχουν και αρκετοί μικροοργανισμοί που διαθέτουν φυσική αντοχή έναντι των πολυμιξινών όπως: *Serratia marcescens*, *Proteus spp.*, *Providencia spp.*, *Morganella morganii*, *Vibrio cholera*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Legionella*, *Chromobacterium*, *Neisseria spp.*, *Edwardsiella spp.*, μερικά είδη *Aeromonas*, *Burkholderia cepacia*, αναερόβιοι Gram αρνητικοί κόκκοι, φυσιολογική μικροχλωρίδα ευκαριωτικών οργανισμών και κύτταρα θηλαστικών (23). Ακόμη, η κολιστίνη συνιστά ένα δημοφιλές φάρμακο στο πεδίο της κτηνοτροφίας, όχι μόνο για τη θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από *Enterobacteriaceae* αλλά χρησιμοποιείται επίσης και ως αυξητικός και προστατευτικός παράγοντας (28).

Τα δύο κύρια συστατικά είναι η κολιστίνη Α (πολυμιξίνη Ε1) και η κολιστίνη Β (πολυμιξίνη Ε2) (29). Διατίθενται εμπορικά δύο διαφορετικές μορφές κολιστίνης: θειική κολιστίνη (εφεξής «κολιστίνη») και θειική κολιστιμεθάτη (CMS). Η CMS παράγεται από την αντίδραση της κολιστίνης με φορμαλδεΰδη και όξινο θειώδες νάτριο (30), το οποίο οδηγεί στην προσθήκη μιας ομάδας σουλφομεθυλίου στις πρωτοταγείς αμίνες της κολιστίνης. Η κολιστίνη χρησιμοποιείται κυρίως τοπικά σε δερματικές λοιμώξεις λόγω αυξημένης τοξικότητας. Οι δύο μορφές του αντιβιοτικού μπορούν να δοθούν και μέσω εισπνοής (31). Η

CMS είναι λιγότερο τοξική από την κολιστίνη όταν χορηγείται παρεντερικά (32) και για αυτό υπήρξε η ανάγκη για ανάπτυξη αυτού του παραγώγου της κολιστίνης (33). Όταν η CMS βρίσκεται σε υδατικά διαλύματα, υδρολύεται με αποτέλεσμα να χωρίζεται σε μεθυλιωμένα παράγωγα εκ των οποίων ένα από αυτά είναι η κολιστίνη (34). Τα διαθέσιμα εμπορικά παρασκευάσματα αποτελούνται από θειική κολιστιμεθάτη Α (85%) και Β (15%), που διαφέρουν ανάλογα με τα υπολείμματα λιπαρών οξέων (35).



Εικόνα 1. Χημική δομή της μεθυλιωμένης κολιστιμεθάτης (CMS) και της κολιστίνης. Οι θειομεθυλομάδες της CMS απεικονίζονται μέσα στους γκρι κύκλους. Ακυλομάδα λιπαρού οξέος: 6-μεθυλο-οκτάνιο για την κολιστίνη Α και 6-μεθυλο-επτάνιο για την κολιστίνη Β. Τα α και γ αναφέρονται στις αντίστοιχες -NH₂ που συμμετέχουν στον πεπτιδικό δεσμό. Το Dab αναφέρεται στο διαμινοβουτυρικό οξύ, το Leu στη λευκίνη και το Thr στη θρεονίνη (36).

1.2.4 Διαφορές κολιστίνης και πολυμιξίνης Β

Κολιστίνη	Πολυμιξίνη Β
Χορηγείται ως προ-φάρμακο (CMS), χρειάζεται την μετατροπή του σε κολιστίνη (ενεργός μορφή)	Χορηγείται ως το ενεργό αντιβιοτικό, δεν απαιτείται μετατροπή του
Σημαντική διακύμανση της σταθερής συγκέντρωσης της στο πλάσμα μεταξύ πληθυσμών	Μικρή διακύμανση της σταθερής συγκέντρωσης της στο πλάσμα μεταξύ πληθυσμών

Η CMS αποβάλλεται με τα ούρα, η μετατροπή της έχει ως αποτέλεσμα υψηλή συγκέντρωση κολιστίνης στα ούρα	Δεν αποβάλλεται μέσω ούρων, μικρή συγκέντρωση πολυμιξίνης Β στα ούρα
Απαιτείται αρχική δόση	Δεν απαιτείται αρχική δόση
Απομακρύνεται με την αιμοκάθαρση, απαιτείται προσαρμογή δόσης	Απομακρύνεται ελάχιστα με την αιμοκάθαρση, δεν απαιτείται προσαρμογή δόσης
Απαιτείται αυστηρή παρακολούθηση των θεραπευτικών φαρμάκων στη συλλογή, φύλαξη και στη μεταφορά του δείγματος για να αποφευχθεί η μετατροπή της CMS σε κολιστίνη	Δεν παρατηρείται κάποια δυσκολία
Η CMS μετατρέπεται με αργό ρυθμό σε κολιστίνη, οπότε η συγκέντρωση της αυξάνεται με βραχύ ρυθμό στο πλάσμα	Η συγκέντρωση της στο πλάσμα αυξάνεται άμεσα

Πίνακας 2. Σημαντικότερες διαφορές κολιστίνης και πολυμιξίνης Β ως προς τη χορήγηση, τη συγκέντρωσή τους στο πλάσμα και την αποβολή τους από το σώμα (26).

1.2.5 Χορήγηση

Στην κλινική πράξη η κολιστίνη χορηγείται ενδοφλέβια σε λοιμώξεις από MDR gram αρνητικά βακτήρια, εισπνεόμενα σε λοιμώξεις από Gram αρνητικά βακτήρια σε ασθενείς με κυστική ίνωση, βρογχεκτασία, τραχειοβρογχίτιδα και σε πνευμονία που συνδέεται με αναπνευστήρα (Ventilator Associated Pneumonia- VAP) και ενδοκοιλιακά- ενδορραχιαία σε λοιμώξεις όπως κολίτιδα και μηνιγγίτιδα για τα οποία ενοχοποιούνται μικροοργανισμοί όπως *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Acinetobacter baumannii* (37).

Παλαιότερα, η κολιστίνη χορηγούνταν και ενδομυϊκά. Πλέον, έχει εγκαταλειφθεί αυτός ο τρόπος χορήγησης καθώς ήταν αρκετά επώδυνο για τον ασθενή στο σημείο έγχυσης του φαρμάκου. Ο συνδυασμός κολιστίνης και αναισθητικού χρησιμοποιείται συνήθως σε κολλύρια/ αλοιφές που προορίζονται σε λοιμώξεις από πολυανθεκτικά Gram αρνητικά βακτήρια όπως την *Pseudomonas aeruginosa* στους οφθαλμούς και στα ώτα (27).

1.2.6 Φαρμακοδυναμική κολιστίνης

Μέχρι τα τελευταία χρόνια, τα δεδομένα για τη φαρμακοκινητική και τη φαρμακοδυναμική και, κυρίως, η σχέση μεταξύ της φαρμακοκινητικής και φαρμακοδυναμικής για την CMS και την κολιστίνη, ήταν ανεπαρκή. Η φαρμακοδυναμική της κολιστίνης έχει κυρίως μελετηθεί μέσα από *in vitro* πειράματα. Αυτά έχουν δείξει ότι τόσο η κολιστίνη όσο και η πολυμυξίνη Β έχουν δοσοεξαρτώμενη δράση ενάντια στα πολυανθεκτικά Gram αρνητικά μικρόβια *Pseudomonas aeruginosa* και *Acinetobacter baumannii*, εμφανίζοντας μέτρια μετά-αντιβιοτική δράση (Post Antibiotic Effect- PAE) όταν χορηγηθούν σε μεγάλες συγκεντρώσεις (38).

Σε μελέτη που διεξήχθη σε ένα πρότυπο μοντέλο λοίμωξης μηρού μυός (39), αποκάλυψε ότι η αναλογία επιφάνειας κάτω από την καμπύλη (Area Under the Curve- AUC) και ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) (AUC/MIC) είναι ο πιο αξιόπιστος προγνωστικός δείκτης για την εκρίζωση της λοίμωξης από *P. aeruginosa* (40), σε σχέση με άλλες φαρμακοδυναμικές παραμέτρους όπως Cmax/MIC και %T/MIC για τις οποίες δεν έχουν ακόμη καθοριστεί βέλτιστες τιμές (38).

Σε πειράματα θανάτωσης μικροβιακών πληθυσμών συναρτήσε χρόνου (time- killing), διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση κολιστίνης με την πάροδο του χρόνου, η κολιστίνη αποδείχθηκε ότι ήταν βακτηριοκτόνος σε στελέχη *P. aeruginosa* σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από 0,5×MIC. Παρατηρήθηκε ότι η πλήρης θανάτωση συνέβη πολύ γρήγορα και τα βακτήρια δεν ήταν ανιχνεύσιμα 4 ώρες μετά την έναρξη της θεραπείας. Σε συγκεντρώσεις ίσες με 0,5×MIC, παρατηρήθηκε αρχικά μικρή μείωση της συγκέντρωσης μονάδων σχηματισμού αποικιών (Colony Forming Units- CFU) που όμως ακολουθήθηκε από επαναπολλαπλασιασμό στις πρώτες 24 ώρες (41).

Πειράματα time- killing πραγματοποιήθηκαν επίσης στο στέλεχος αναφοράς *A. baumannii* ATCC19606 και σε κλινικά στελέχη. Παρόμοιο με αυτό που παρατηρήθηκε στην *P. aeruginosa*, χαμηλές συγκεντρώσεις κολιστίνης προκάλεσαν μια αρχική μείωση των cfu/mL ακολουθούμενο από αναγέννηση στις 24 ώρες. Παρόλα αυτά, εμφανίστηκε επαναπολλαπλασιασμός μέσα στις πρώτες 24 ώρες ακόμα και σε συγκεντρώσεις 64×MIC, κάτι που είναι πιθανό να οφείλεται στην ετεροαντίσταση που εμφανίζει το συγκεκριμένο παθογόνο (38). Σε ανάλογα πειράματα που εφαρμόστηκαν σε κλινικά στελέχη και σε στελέχη αναφοράς της *K. pneumoniae*, επαναπολλαπλασιασμός παρατηρήθηκε επίσης μετά από μια

αρχική ταχεία θανάτωση, ακόμη και σε υψηλή συγκέντρωση κολιστίνης λόγω χάρη $64 \times \text{MIC}$ (42).

Όλα αυτά καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή όταν χορηγείται CMS ενδοφλέβια ως μονοθεραπεία και με μεγάλο μεσοδιάστημα, καθώς υπάρχει κίνδυνος αναποτελεσματικότητας στην αντιμετώπιση τέτοιων νοσοκομειακών λοιμώξεων (43).

1.2.7 Φαρμακοκινητική

Η θετικά φορτισμένη κολιστίνη εμφανίζει ένα πολύ διαφορετικό φαρμακοκινητικό προφίλ με αυτό του σουλφομεθυλιωμένου παραγωγού της, δηλαδή της CMS (44). Η CMS αποβάλλεται κυρίως από τα νεφρά, ενώ η κολιστίνη αποβάλλεται κυρίως μέσω άλλης διαδρομής, εκτός της νεφρικής απέκκρισης (38). Μετά την παρεντερική χορήγηση CMS, η κολιστίνη σχηματίζεται αργά, με τη συγκέντρωση στο πλάσμα να αυξάνεται αργά.

Σε έρευνα των Couet και των συνεργατών του, σε υγιείς εθελοντές μετά από 1 ώρα ενδοφλέβιας έγχυσης 1 MIU CMS, οι συγκεντρώσεις της CMS στο πλάσμα ήταν $\overline{C_{max}} = 4,8$ mg /L στο τέλος της χορήγησης. Στη συνέχεια, οι συγκεντρώσεις CMS μειώθηκαν εκθετικά με χρόνο ημιζωής 0,5 ώρες και τελικό χρόνο ημιζωής 2 ώρες. Ο χρόνος για την μέγιστη συγκέντρωση της δραστικής ένωσης (κολιστίνη) στο πλάσμα (C_{max}) ήταν 2 ώρες μετά την έναρξη της έγχυσης (1 ώρα μετά τη διακοπή της έγχυσης) με τιμή 0,83 mg /L. Η συγκέντρωση της κολιστίνης στο πλάσμα μειώθηκε εκθετικά με τελικό χρόνο ημιζωής 3 ώρες. Ας σημειωθεί ότι καθώς ο τελικός χρόνος ημιζωής της κολιστίνης ήταν μεγαλύτερος από εκείνον της CMS, σημαίνει ότι η αποβολή της κολιστίνης δεν περιορίζεται από το ρυθμό σχηματισμού της (45). Όσον αφορά την κάθαρση, η CMS ελαττώθηκε στα δύο τρίτα με νεφρική απέκκριση. Η νεφρική κάθαρση του CMS στους υγιείς εθελοντές ήταν περίπου 100 mL/min.

Σε διαφορετική έρευνα, ο Plachouras και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι μπορεί να χρειαστούν περισσότερες από 36 ώρες για να φτάσει σε σταθερά επίπεδα η συγκέντρωση της κολιστίνης η οποία ιδανικά πρέπει να είναι 2 mg /L με ενδοφλέβια χορήγηση 3 MIU CMS κάθε 8 ώρες σε ασθενείς με καλή νεφρική λειτουργία (46).

Αυτό το εύρημα τονίζει ότι η χαμηλή αρχική έκθεση σε σχηματισμένη κολιστίνη είναι μια σημαντική πρόκληση για τη βελτιστοποίηση της χορήγησης CMS σε ασθενείς. Αυτό το

δίλημμα μπορεί να αντισταθμιστεί εν μέρει με τη δόση εφόδου¹. Σε μελέτες που αξιολόγησαν δόσεις εφόδου CMS 6 MIU και 9 MIU, οι μέσες συγκεντρώσεις κολιστίνης στο πλάσμα έφτασαν τα 1,34 mg /L και 2,65 mg /L αντίστοιχα, στις 8 ώρες μετά τη δόση εφόδου, με την πιθανότητα πρόωρης εξάλειψης των μολυσματικών βακτηρίων (47)· (48).

Σε ασθενείς με κρίσιμη ασθένεια, νεφρική ανεπάρκεια και θεραπεία υποκατάστασης νεφρικής λειτουργίας (Renal Replacement Therapy- RRT), η επίδραση στη φαρμακοκινητική της CMS και της σχηματισμένης κολιστίνης είναι δραματική (49)· (50). Δεδομένου ότι η συγκέντρωση της σχηματισμένης κολιστίνης στο πλάσμα επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τη νεφρική λειτουργία, είναι σημαντικό το δοσολογικό σχήμα της CMS να προσαρμόζεται ανάλογα με τη νεφρική λειτουργία του εκάστοτε ασθενή, για να επιτευχθεί η κατάλληλη δόση. Σε ασθενείς με $CL_{Cr} > 80$ mL /min, μόνο το 65-75% των ασθενών που έλαβαν την εγκεκριμένη ενημέρωση δόση που συνιστά η Αμερικανικός Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων και ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (EMA) πέτυχε μέσο όρο συγκέντρωσης σχηματισμένης κολιστίνης ≥ 2 mg /L. Καθώς η MIC_{90} για κολιστίνη είναι ≤ 2 mg /L έναντι *P. aeruginosa*, *A. baumannii* και *K. pneumoniae*, θα ήταν κλινικά χρήσιμο να χορηγηθεί η μέγιστη δόση CMS σε ασθενείς με $CL_{Cr} > 80$ mL /min, συνδυαστικά με ένα άλλο αντιβιοτικό που μπορεί να παρέχει συνεργική βακτηριακή θανάτωση (49)· (51). Έχει υπολογισθεί ότι το 50% της κολιστίνης συναντάται μη δεσμευμένο στο πλάσμα (51). Επομένως, η συγκέντρωση κολιστίνης σε σταθερή κατάσταση της τάξεως των 2 mg /L είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική θεραπεία των βακτηρίων με $MIC = 2$ mg /L. Για ασθενείς με RRT, προκειμένου να επιτευχθεί σε σταθερή κατάσταση συγκέντρωση κολιστίνης περίπου 2 mg /L, η τρέχουσα οδηγία προτείνει για την CMS δόση εφόδου 9 MIU ακολουθούμενη στις 24 ώρες από 1 MIU κάθε 12 ώρες για ασθενείς σε διαλείπουσα αιμοδιάλυση και 4,3 MIU κάθε 48 ώρες ή 6,3 MIU κάθε 12 ώρες για ασθενείς που υποβάλλονται σε συνεχή αιμοδιάλυση (52).

Επί του παρόντος, είναι ελάχιστα τα διαθέσιμα δεδομένα για τη φαρμακοκινητική της CMS και της σχηματισμένης κολιστίνης σε εξωαγγειακές θέσεις. Σε ασθενείς με κρίσιμη ασθένεια με και χωρίς μόλυνση του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), η κατανομή της κολιστίνης στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό φαίνεται να είναι πολύ χαμηλή μετά την ενδοφλέβια χορήγηση CMS (53).

¹ Χαρακτηρίζεται η αρχική δόση ενός φαρμάκου

Μια πρόσφατη μελέτη σε ασθενείς με κυστική ίνωση έδειξε ότι η συγκέντρωση της σχηματισμένης κολιστίνης στα πύελα, μετά από ενδοφλέβια χορήγηση της CMS, είναι ελάχιστη (54). Σε άλλη μελέτη που συγκρίνει την ενδοπνευμονική και συστηματική φαρμακοκινητική της σχηματισμένης κολιστίνης σε ασθενείς με κρίσιμη ασθένεια χορηγήθηκαν μέσω εισπνοής 2 MIU CMS. Τα αποτελέσματα φανέρωσαν πως οι συγκεντρώσεις κολιστίνης σε σταθερή κατάσταση στο υγρό που επενδύει τις κυψελίδες (Epithelial Lining Fluid-ELF) ήταν πολύ υψηλότερες από τις συγκεντρώσεις κολιστίνης στο πλάσμα σε σταθερή κατάσταση (9,53-1137 mg / L έναντι 0,15-0,73 mg /L) (55). Αυτά τα ευρήματα υπογραμμίζουν τη δυνατότητα χορήγησης εισπνεόμενης CMS για τη θεραπεία της πνευμονίας που έχει προκληθεί από Gram αρνητικό βακτήριο, αυξάνοντας την παρουσία της σχηματισμένης κολιστίνης στους πνεύμονες. Με αυτό τον τρόπο ελαχιστοποιείται η συγκέντρωση της κολιστίνης στο πλάσμα που σχετίζεται με εκτεταμένη τοξικότητα. Είναι σαφές ότι απαιτούνται περαιτέρω μελέτες φαρμακοδυναμικής/ φαρμακοκινητικής για τη βελτιστοποίηση της χρήσης εισπνεόμενης CMS (52).

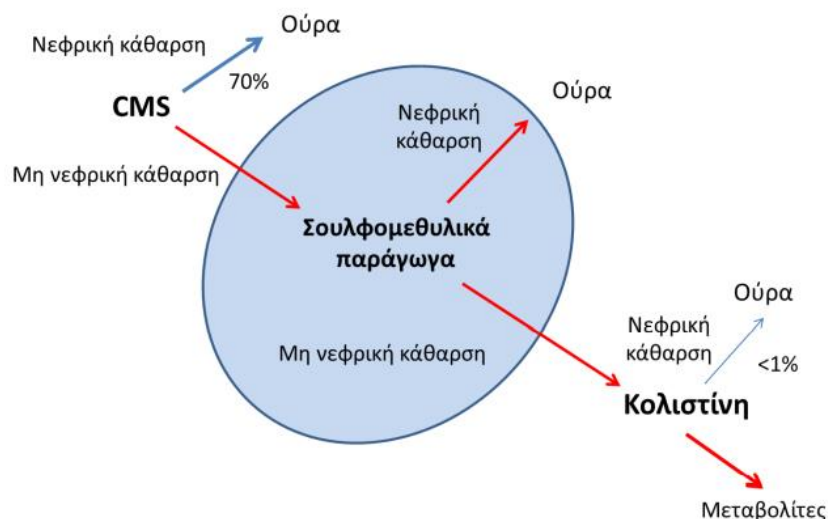
Η απορρόφηση της κολιστίνης από το γαστρεντερικό σωλήνα είναι ελάχιστη ή απουσιάζει (56). Σε εργαστηριακή έρευνα προσομοίωσης γαστρικού υγρού έχει δειχθεί ότι η κολιστίνη αποικοδομείται γρήγορα λόγω διάσπασης του πεπτιδικού δεσμού στο τμήμα τριπεπτιδίου της ουράς υπό τη δράση της πεψίνης (28). Η θειική κολιστίνη χρησιμοποιείται ορισμένες φορές για περιεγχειρητική απολύμανση του πεπτικού σωλήνα, ιδιαίτερα για την καταστολή των εντεροβακτηριδίων που παράγουν εκτεταμένου φάσματος β- λακταμάσες (ESBL-E) (36). Σε αυτές τις περιπτώσεις, η θειική κολιστίνη χορηγείται από το στόμα με δοσολογία 100 mg κάθε 6 ώρες, σε συνδυασμό με άλλους αντι-μολυσματικούς παράγοντες όπως αμφοτερικίνη Β και τομπραμυκίνη. Ωστόσο, αυτή η πρακτική έχει αποδειχθεί ότι ενισχύει την επιλεκτική πίεση σε ανθεκτικά στην κολιστίνη βακτήρια και η χρήση της είναι αμφιλεγόμενη (57).

1.2.7.1 Πρωτεϊνική δέσμευση κολιστίνης

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η πρωτεϊνική δέσμευση των πολυμιξινών μπορεί να ποικίλει στο πλάσμα των μολυσμένων ασθενών (και ζώων), γεγονός που πιθανώς να σχετίζεται με μεταβολές που προκαλούνται από τη συγκέντρωση της α₁-όξινης γλυκοπρωτεΐνης (AGP) στο πλάσμα, μια πρωτεΐνη οξείας φάσης που είναι σημαντική για την δέσμευση πολλών βασικών φαρμάκων (58) (40). Παρόλα αυτά η σύνδεση με άλλα συστατικά του πλάσματος όπως η

αλβουμίνη, οι λιποπρωτεΐνες ή οι σφαιρίνες δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί (59). Τα επίπεδα της AGP μπορούν να αυξηθούν ανάλογα το είδος της ασθένειας και ειδικότερα όταν πρόκειται για βακτηριακή λοίμωξη (60). Σε ζώα, η δέσμευση της κολιστίνης στην πρωτεΐνη πλάσματος είναι 55% όπως έχει αναφερθεί σε αρουραίους, σκύλους και μοσχάρια (34)· (61). Σε μυς, το μέσο ποσοστό δέσμευσης ήταν περίπου 91% σε συνολικό εύρος συγκέντρωσης 2-50 mg /L (51).

Σε ασθενείς με κρίσιμη ασθένεια, η κολιστίνη βρέθηκε ότι συνδέεται με την AGP σε ποσοστό περίπου 59-74%. Συνεπώς, αναμένεται η δέσμευση της κολιστίνης να είναι υψηλότερη σε ασθενείς με κρίσιμη ασθένεια σε αντιπαράθεση με υγιείς εθελοντές. Αυτό δεν έχει ακόμη εξακριβωθεί σε ανθρώπινο επίπεδο. Ωστόσο, η πρωτεϊνική δέσμευση της κολιστίνης ήταν μεγαλύτερη σε μολυσμένους μυς από ότι σε υγιείς (59). Επιπλέον, η πρωτεϊνική δέσμευση της πολυμικσίνης Β, που είναι χημικά κοντά στην κολιστίνη, είναι μεγαλύτερη σε ασθενείς με κρίσιμη ασθένεια από ότι σε υγιείς εθελοντές (58). Στο αναπνευστικό σύστημα, η κολιστίνη συνδέεται με τη βλεννίνη, η οποία μπορεί να μειώσει την αντιβακτηριακή αποτελεσματικότητα, αυξάνοντας κατά εκατό φορές την MIC της όταν προστίθεται βλεννίνη στο μέσο ανάπτυξης (62).



Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση της μεταβολικής πορείας που ακολουθεί η CMS δηλαδή της κατανομής και της αποβολής της, καθώς και των ενδιάμεσων παραγώγων και της δραστικής κολιστίνης ύστερα από ενδοφλέβια χορήγηση CMS (63).

1.2.8 Χρήση

Χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση ασθενειών βακτηριακής φύσεως κυρίως από τα πανανθεκτικά Gram αρνητικά μικρόβια όπως *Enterobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, *K. pneumoniae* και *Acinetobacter spp.*. Ενδεικτικά για τις περιπτώσεις χρήσης της κολιστίνης αναφέρονται οι πνευμονικές διαταραχές όπως, πνευμονία από κυστική ίνωση και πνευμονία σχετιζόμενη με αναπνευστήρα (Ventilator Associated Pneumonia- VAP), οι λοιμώξεις ουροποιητικού όπως επίμονες ουρολοιμώξεις, λοιμώξεις σχετιζόμενες με ουροκαθετήρες, λοιμώξεις γαστρεντερολογικού συστήματος, όπως η θεραπεία διάρροιας στην εντεροκολίτιδα και η θεραπεία της βακτηριακής δυσεντερίας, ιδιαίτερα σε βρέφη και παιδιά, η μηνιγγίτιδα, η οστεομυελίτιδα, οι μολύνσεις του οφθαλμού, του ωτός και του δέρματος (24).

1.2.9 Αντενδείξεις

Η δραστική ουσία κολιστίνη και η πολυμιξίνη Β δεν συνιστώνται σε ασθενείς με βαριά μυασθένεια Gravis (24) καθώς έχει παρατηρηθεί ότι προκαλούν έντονη αδυναμία, ειδικά όταν συνδυάζονται με νευρομυϊκά ανασταλτικά φάρμακα ή άλλα αντιβιοτικά (παραδείγματος χάρη μακρολίδες). Ο μηχανισμός δράσης των παραπάνω ουσιών έγκειται στην μειωμένη απελευθέρωση ακετυλοχολίνης, και ως ένα βαθμό στο μπλοκάρισμα των μετασυναπτικών υποδοχέων. Ακόμη, έχει αναφερθεί ότι η κολιστίνη ενδέχεται να προκαλέσει οξεία αναπνευστική ανεπάρκεια σε ασθενείς με μυασθένεια Gravis με μία μόνο δόση ενδομυϊκής χορήγησης (64).

Δεν συνιστάται σε άτομα που εμφανίζουν υπερευαισθησία στην πολυμιξίνη. Όσον αφορά γυναίκες σε κύηση τα δεδομένα είναι ανεπαρκή. Μελέτες στις οποίες χορηγείται εφάπαξ δόση κολιστίνης σε έγκυες γυναίκες δείχνουν ότι η κολιστίνη διαπερνά τον πλακούντα προκαλώντας δυνητικά εμβρυοτοξικότητα. Επιπλέον, δεν συνιστάται η χορήγηση κολιστίνης σε περίοδο γαλουχίας διότι η νατριούχος κολιστιμεθάτη (μεταβολικό παράγωγο της κολιστίνης) εκκρίνεται στο μητρικό γάλα. Για άτομα με νεφρική ανεπάρκεια μπορεί να χορηγείται η κολιστίνη, ύστερα όμως από προσαρμογή δόσης και στενή παρακολούθηση κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Τα δεδομένα που περιγράφουν την φαρμακοκινητική του

αντιβιοτικού αυτού σε ασθενείς με μειωμένη νεφρική λειτουργία είναι ελάχιστα και για αυτό πρέπει να λαμβάνεται με προσοχή (65).

Η ταυτόχρονη χορήγηση κολιστίνης και άλλων αντιβιοτικών με νεφροτοξικές ιδιότητες όπως είναι οι αμινογλυκοσίδες (γενταμικίνη, αμικασίνη, νετλιμικίνη, τομπραμικίνη) προτιμάται να αποφεύγεται. Ο κίνδυνος για εκδήλωση νεφροτοξικότητας αυξάνεται με τη συγχορήγηση αντιβιοτικών της ομάδας των κεφαλοσπορινών (65).

1.2.10 Παρενέργειες

Από το 1970 άρχισε σταδιακά να εγκαταλείπεται η χρήση της CMS σε λοιμώξεις σχετιζόμενες με πολυανθεκτικά μικρόβια λόγω της τοξικής της επίδρασης που παρατηρήθηκε σε πληθώρα ασθενών όταν δίνονταν ενδοφλεβίως (27). Η νεφροτοξικότητα είναι η πιο συχνά παρατηρούμενη παρενέργεια που απασχολεί τους κλινικούς γιατρούς. Παρόλα αυτά, φαίνεται να είναι αντιστρεπτή όταν σταματήσει η χορήγηση της. Πιο σπάνια, εκδηλώνεται νευροτοξικότητα (38).

1.2.10.1 Νεφροτοξικότητα

Η βλάβη στους νεφρούς οφείλεται στο γεγονός ότι η κολιστίνη αποβάλλεται κυρίως από αυτούς. Έχει προταθεί ότι η τοξικότητα των πολυμιξινών μπορεί εν μέρει να οφείλεται στην περιεκτικότητά τους σε D-αμινοξέα και στη σύσταση των λιπαρών οξέων. Ο προτεινόμενος μηχανισμός με τον οποίο προκαλεί η πολυμιξίνη Β τα νεφροτοξικά συμβάντα είναι η αύξηση στην διαπερατότητα της μεμβράνης, με αποτέλεσμα την αυξημένη εισροή κατιόντων, ανιόντων και νερού, που οδηγεί σε διόγκωση και λύση των κυττάρων (66) (67). Ο μηχανισμός που φαίνεται να την καθιστά υπεύθυνη για την νεφρική τοξικότητα δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί αλλά ύστερα από *in vitro* μελέτες παρατηρήθηκε ότι η κολιστίνη, σε μεγάλη δόση, αυξάνει την διαεπιθηλιακή αγωγιμότητα του επιθηλίου της ουροδόχου κύστης (68). Το μέγεθος της αύξησης της αγωγιμότητας εξαρτάται από τη συγκέντρωση και τη διάρκεια έκθεσης στις πολυμιξίνες, καθώς και τη συγκέντρωση των δισθενών κατιόντων. Οι βασικοί μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους η πολυμιξίνη Β αυξάνει την διαεπιθηλιακή αγωγιμότητα στο ουροποιητικό σύστημα έχουν προταθεί ως ίδιοι με αυτούς της κολιστίνης (68).

Το ποσοστό των ασθενών που εμφανίζουν νεφρική βλάβη κυμαίνεται από 0% έως 53,5% σε 26 μελέτες που διεξήχθησαν από το 1999 έως το 2010 (69). Επομένως, δεν είναι απόλυτα καθορισμένο αν η νεφρική τοξικότητα είναι απειλητική. Σε ασθενείς με προϋπάρχουσες νεφρικές παθήσεις όπως Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια (ΧΝΑ) ο κίνδυνος για εμφάνιση νεφρικών βλαβών ήταν 2,5 έως 7 φορές μεγαλύτερος από ότι σε ασθενείς χωρίς νεφρικές παθήσεις. Άλλοι παράγοντες κινδύνου είναι ο συνδυασμός της κολιστίνης με άλλα νεφροτοξικά φάρμακα και η ηλικία του ασθενούς. Οι ηλικιωμένοι έχουν περισσότερες πιθανότητες να εμφανίσουν νεφροτοξικότητα. Θεωρείται ότι τα τελευταία χρόνια έχουν μειωθεί οι παρενέργειες στα νεφρά επειδή η κολιστίνη χρησιμοποιείται σε μορφή νατριούχου κολιστιμεθάτης και όχι ως θειούχος κολιστιμεθάτη (CMS), και η προσαρμογή της δόσης γίνεται εξατομικευμένα για κάθε ασθενή (69).

1.2.10.2 Νευροτοξικότητα

Η κολιστίνη αντιδρά με τα νευρικά κύτταρα που έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε λιπίδια κάτι το οποίο έχει συσχετισθεί με περιφερική και στοματοπροσωπική παραισθησία, διαταραχές στην όραση, ίλιγγο, αταξία, διανοητική σύγχυση και επιληπτικές κρίσεις. (70) Άλλα επίφοβα συμπτώματα είναι το μπλοκάρισμα των νευρομυϊκών συνάψεων, το οποίο εκδηλώνεται ως μυασθένεια αλλά και παράλυση των αναπνευστικών μυών που οδηγεί σε άπνοια (71). Το έναυσμα για εδραίωση της νευροτοξικότητας μπορεί να είναι η υποξεία, η ταυτόχρονη χορήγηση με την κολιστίνη άλλων φαρμάκων (μυοχαλαρωτικά, ναρκωτικά, ηρεμιστικά, αναισθητικά φάρμακα και κορτικοστεροειδή) και η μειωμένη νεφρική λειτουργία (69). Σε βιβλιογραφία έως το 1975 η νευροτοξικότητα παρατηρούνταν σε ποσοστό 7% των ασθενών με κύριο σύμπτωμα την παραισθησία (72). Η άπνοια αναφερόταν σπάνια σε ασθενείς που λάμβαναν ενδομυϊκά κολιστίνη, εκ των οποίων οι περισσότεροι είχαν προηγουμένως διαγνωσθεί με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια ή λαμβάνουν αγωγή με μυοχαλαρωτικά που ατροφούν τους αναπνευστικούς μυς. Σε πιο πρόσφατες έρευνες δεν παρατηρείται συσχέτιση της κολιστίνης με την εμφάνιση νευροτοξικότητας. Αξίζει να σημειωθεί ότι η διάγνωση της νευροτοξικότητας πραγματοποιείται σε κλινικό στάδιο, γεγονός που καθιστά δύσκολη την απόδοση της στην χορήγηση κολιστίνης ή το πιο σύνηθες σε προϋπάρχουσα σοβαρή πολυνευροπάθεια ή/και πολυμυοπάθεια σε ασθενείς που νοσηλεύονται σε μονάδες εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ). Τέλος, δεν έχει αποδειχτεί ότι η κολιστίνη ευνοεί το μπλοκάρισμα των νευρομυϊκών συνάψεων (69).

1.2.11 Μηχανισμός δράσης κολιστίνης

Η βακτηριοστατική επίδραση που έχει η κολιστίνη στα κύτταρα είναι ταχεία. Παρόλα αυτά ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο μπορεί η κολιστίνη να θανατώσει τα βακτηριακά κύτταρα δεν είναι πλήρως κατανοητός (73). Δρα κυρίως ενάντια στα Gram αρνητικά βακτήρια λόγω της παρουσίας του LPS στο κυτταρικό τοίχωμα τους (74). Επομένως, η κατανόηση της δομής της εξωτερικής μεμβράνης των Gram αρνητικά βακτηρίων είναι καθοριστική για την αποκρυπτογράφηση των μηχανισμών της δράσης της κολιστίνης (23).

1.2.12 Κυτταρική μεμβράνη Gram αρνητικών βακτηρίων

Τα Gram αρνητικά βακτήρια διαθέτουν έναν φυσικό φραγμό σε εξωτερικούς παράγοντες, όπως τα αντιβιοτικά ή τις μεγάλου μοριακού βάρους ουσίες, χάρη στο κυτταρικό τους περίβλημα (75). Αυτό αποτελείται από μια εξωτερική μεμβράνη και μια εσωτερική μεμβράνη, οι οποίες διαχωρίζονται από έναν περιπλασματικό χώρο (76).

1.2.12.1 Σύνθεση κυτταρικής μεμβράνης

Η εξωτερική μεμβράνη αποτελείται από μια ασύμμετρη διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων, του οποίου το εσωτερικό φύλλο αποτελείται από γλυκεροφωσφολιπίδια, ενώ το εξωτερικό φύλλο σχηματίζεται από λιποπολυσακχαρίτες (LPS) που καλύπτουν περίπου το 75% της εξωτερικής επιφάνειας. Ο υπόλοιπος χώρος χαρακτηρίζεται κατά κύριο λόγο από την παρουσία μεμβρανικών πρωτεϊνών, όπως πορίνες, διάυλοι εισόδου και εξόδου υδρόφιλων μικρών μορίων και λιποπρωτεϊνών, που έχουν δομικές λειτουργίες. Γενικά, η εξωτερική μεμβράνη αυξάνει το φράγμα διαπερατότητας σε υδρόφοβες ενώσεις και υδρόφιλες ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους. Μεταξύ των δύο μεμβρανών βρίσκεται ο περιπλασματικός χώρος, ένα κολλώδες κυτταρικό διαμέρισμα στο οποίο βρίσκεται η στοιβάδα πεπτιδογλυκάνης (77).

1.2.12.2 Σύνθεση LPS

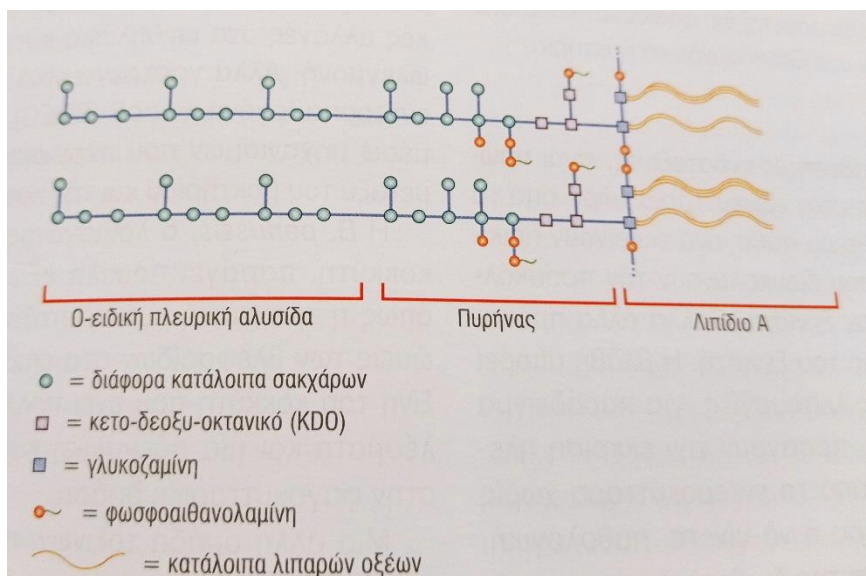
Η χημική δομή του LPS διαφέρει ανάμεσα στα διάφορα είδη των Gram αρνητικών βακτηρίων. Όμως, η αλληλουχία σύνδεσης των κύριων ομάδων παραμένει ίδια. Αποτελείται από 3 μέρη:

O- ειδική πλευρική αλυσίδα ή Αντιγόνο O, Κεντρικός ολιγοσακχαρίτης ή Πυρήνας και Λιπίδιο A (78).

Η O- ειδική πλευρική αλυσίδα ή Αντιγόνο O συνιστά ένα επαναλαμβανόμενο πολυμερές γλυκάνης που προσδένεται στον κύριο πολυσακχαρίτη και βρίσκεται στο εσωτερικό του LPS. Διαφέρει ανάλογα το στέλεχος δηλαδή αποτελεί τον ορότυπο του (79). Η παρουσία του καθιστά τον LPS λείο, ενώ η απουσία του αδρό (80). Τα βακτήρια που έχουν λείο LPS είναι συνήθως περισσότερο διαπερατά σε υδρόφοβα αντιβιοτικά καθώς ο LPS είναι περισσότερο υδρόφοβος (81).

Ο κύριος πολυσακχαρίτης αγκυροβολείται στο λιπίδιο A και περιέχει σάκχαρα όπως επτόζη και κετο-δεοξυ-οκτανικό (KDO) (82). Ο πυρήνας του LPS είναι ένας συχνά διακλαδισμένος και φωσφορυλιωμένος ετερο-ολιγοσακχαρίτης με λιγότερα από δεκαπέντε σάκχαρα, πιο διατηρημένα στην εσωτερική περιοχή, κοντά στο λιπίδιο A, και συχνά φέρουν μη στοιχειομετρικές υποκαταστάσεις που οδηγούν σε παραλλαγές και μικρή ετερογένεια. Σε πολλά βακτήρια περιέχει μη ενυδατωμένα με άνθρακα συστατικά όπως αμινοξέα, φωσφορικά και κατάλοιπα αιθανολαμίνης. Συμβάλλει στη βακτηριακή βιωσιμότητα και σταθερότητα της εξωτερικής μεμβράνης ενώ διαθέτει αντιγονικές ιδιότητες (77).

Το λιπίδιο A είναι ένας φωσφορυλιωμένος γλυκοζο-αμινο δισακχαρίτης με πολλαπλά λιπαρά οξέα. Αυτά τα υδρόφοβα λιπαρά οξέα αγκυροβολούν τον LPS στην κυτταρική μεμβράνη ενώ το υπόλοιπο τμήμα του LPS προεξέχει προς την εξωτερική επιφάνεια του κυττάρου. Το τμήμα του λιπιδίου A είναι υπεύθυνο για την αυξημένη τοξικότητα των Gram αρνητικών βακτηρίων. Όταν τα Gram αρνητικά βακτήρια εξουδετερώνονται από το ανοσοποιητικό σύστημα, αυτό έχει ως συνέπεια να απελευθερώνονται στην κυκλοφορία κυστίδια της μεμβράνης που περιέχουν το λιπίδιο A, προκαλώντας πυρετό, διάρροια και πιθανό τοξικό επεισόδιο ή αλλιώς σηπτική καταπληξία. Το τμήμα του λιπιδίου A θεωρείται καλά διατηρημένο συστατικό του LPS (83). Ωστόσο, η δομή του ποικίλλει μεταξύ βακτηριακών ειδών και προκαλεί ανοσογόνο δράση στον ξενιστή (84).



Εικόνα 3. Βασική δομή του LPS στα Gram αρνητικά βακτήρια (78).

Επιπλέον με αυτούς τους φυσικούς φραγμούς, υπάρχουν πολλαπλές αντλίες εκροής στο περίβλημα του κυττάρου που μπορούν περαιτέρω να μειώσουν την καθαρή διαπερατότητα στα Gram αρνητικά βακτήρια.

Αλλαγές στην ικανότητα των αντιβιοτικών να διαπεράσουν το κυτταρικό περίβλημα, λόγω της απώλειας πορινών και άλλων συστημάτων μεταφοράς ή απομάκρυνσης των αντιβιοτικών μέσω της ρύθμισης των αντλιών εκροής, μπορεί να οδηγήσουν σε κλινική αντιβακτηριακή αντοχή (85): (76).

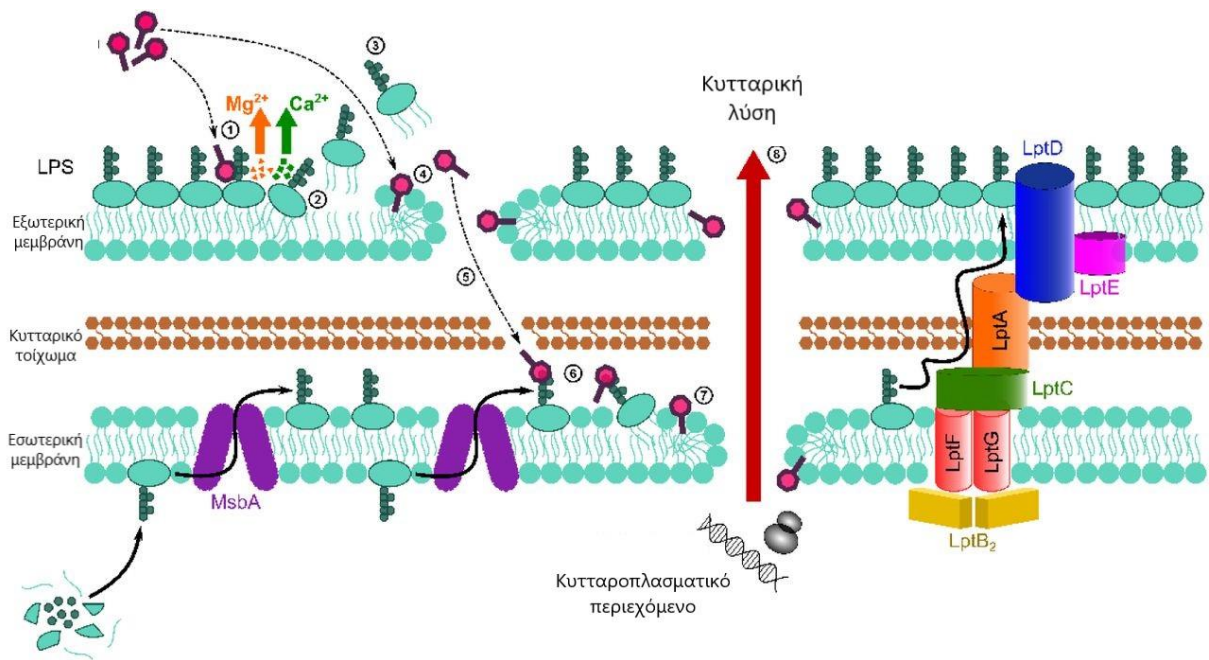
1.2.13 Αλληλεπίδραση κυτταρικής μεμβράνης βακτηρίων με την κολιστίνη

Έχει βρεθεί ότι η κολιστίνη διαθέτει πολλαπλούς πιθανούς μηχανισμούς δράσης στην κυτταρική μεμβράνη. Ο LPS των Gram αρνητικών βακτηρίων διαθέτει συνολικά αρνητικό φορτίο. Η κολιστίνη που διαθέτει θετικό φορτίο όταν προστίθεται σε ένα διάλυμα συνδέεται ηλεκτροστατικά με την κατά αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια των φωσφορικών ομάδων του LPS των Gram αρνητικών βακτηρίων. Θεωρείται κρίσιμο στάδιο για την αλληλεπίδρασή της με το υδρόφοβο λιπιδίου Α του LPS. Έτσι προσκολλάται στον LPS, δρα ανταγωνιστικά και εκτοπίζει τα ιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} , που βρίσκονται στις φωσφορικές ομάδες του LPS και παρέχουν υποστηρικτικό ρόλο στη μεμβράνη (86). Αυτή η διαδικασία είναι ανεξάρτητη από την είσοδο της κολιστίνης στο κύτταρο (87) και φαίνεται να αναστέλλεται παρουσία αυτών των δισθενών κατιόντων (72). Με άλλα λόγια, η κολιστίνη όταν συνδέεται στην εξωτερική

μεμβράνη ανταγωνίζεται τα δισθενή κατιόντα με συνέπεια την μειωμένη βακτηριοστατική της δράση (36). Η κολιστίνη συνδέεται με το λιπίδιο A προκαλώντας την αποδιάταξη του LPS και τη διάσπαση της εξωτερικής μεμβράνης. Επομένως, η κολιστίνη που εισέρχεται μέσα από τις ρωγμές της εξωτερικής μεμβράνης προκαλεί αυτοπροωθούμενη πρόσληψη όπως επίσης και καταστροφή των περιπλασματικών και κυτταροπλασματικών στοιχείων, καταλήγοντας σε βακτηριακό θάνατο (88). Η ενδοτοξίνη των Gram αρνητικών βακτηρίων που περιέχεται σε τμήμα του λιπιδίου A αποβάλλεται από τα βακτήρια κατά την διάρκεια της αντιμικροβιακής θεραπείας και μπορεί να είναι υπεύθυνο για ενδοτοξικό επεισόδιο. Η κολιστίνη έχει αντι-ενδοτοξινική δράση καθώς συνδέεται με τον LPS και τον καθιστά ουδέτερο (36).

Με έναν άλλο πιθανό μηχανισμό, η πολυκατιονική κολιστίνη συνδέεται με τα ανιονικά φωσφολιπίδια. Η εν λόγω αλληλεπίδραση προάγει την ανταλλαγή λιπιδίων μεταξύ εξωτερικής και εσωτερικής μεμβράνης που φέρει ως αποτέλεσμα την αλλοίωση της φωσφολιπιδιακής σύστασης καταλήγοντας σε απώλεια της ωσμωτικής ακεραιότητας των μεμβρανών και άρα τον κυτταρικό θάνατο (86).

Η κολιστίνη δρα επίσης και με άλλους μηχανισμούς, αναστέλλοντας τη δράση ενζύμων που συμμετέχουν στον κυτταρικό μεταβολισμό όπως το σύμπλεγμα νικοτινάμιδο-αδένινο δινουκλεοτίδιο (NADH)-κινόνης οξειδοοδουκτάσης στην εσωτερική μεμβράνη των βακτηρίων (89).



Εικόνα 4. Διαγραμματική αναπαράσταση του προτεινόμενου μηχανισμού δράσης της κολιστίνης: Η κολιστίνη συνδέεται με τον LPS στην εξωτερική μεμβράνη (1), μετατοπίζοντας τα κατιόντα που σχηματίζουν «γέφυρες» μεταξύ των μορίων LPS, γεγονός που οδηγεί σε αποσταθεροποίηση της μεμβράνης (2). Ως συνέπεια της αποδυνάμωσης των διαμοριακών δεσμών στον LPS, ο LPS απελευθερώνεται από την βακτηριακή επιφάνεια (3), επιτρέποντας στην κολιστίνη να καταστρέψει περαιτέρω την εξωτερική μεμβράνη μέσω της δράσης των λιπιδίων της κολιστίνης (4). Έτσι, η κολιστίνη αποκτά πρόσβαση στον περιπλασματικό χώρο, όπου αλληλοεπιδρά με τον LPS στην κυτταρική μεμβράνη (5). Με τη σειρά του ο LPS μεταφέρεται στην εξωτερική μεμβράνη από το σύμπλοκο LptABCDEFG. Όπως και στην εξωτερική μεμβράνη, η κολιστίνη που συνδέεται με τον LPS έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση της κυτταρικής μεμβράνης (6), την οποία διαπερνά (7), με αποτέλεσμα την απώλεια του κυτταροπλασματικού περιεχομένου, την κυτταρική λύση και τον βακτηριακό θάνατο (8) (90).

1.3 Βακτηριακή αντοχή στα αντιβιοτικά

1.3.1 Ορισμός

Η μικροβιακή αντοχή ορίζεται ως η μη θανάτωση των μικροοργανισμών από τα αντιβιοτικά. Είναι ένα φαινόμενο το οποίο παρατηρείται τόσο σε κλινικά όσο και σε περιβαλλοντικά βακτηριακά στελέχη. Εργαστηριακά ορίζεται ως αντοχή των μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά σύμφωνα με συγκεκριμένα όρια ευαισθησίας όπως καθορίζονται από CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Κλινικά ορίζεται ως η αποτυχία της αντιμικροβιακής θεραπείας (91).

Η αντοχή των βακτηρίων σε αντιβιοτικά διακρίνεται σε φυσική και επίκτητη. Η φυσική αντοχή αναφέρεται στην ενδογενή αντοχή του μικροοργανισμού. Αντίθετα, η επίκτητη αντοχή οφείλεται σε αλλαγές του γενετικού υλικού του βακτηρίου που μεταβάλλουν το φαινότυπο του.

Η αντιμικροβιακή αντοχή αποτελεί μείζων ζήτημα παγκόσμιας υγείας. Τα αντιμικροβιακά που σκοτώνουν ή αναστέλλουν μολυσματικές ασθένειες είναι απαραίτητα κλινικά εργαλεία καθώς η μικροβιακή αντοχή συνεχίζει να εμφανίζεται, να διαφοροποιείται και να εξαπλώνεται με γοργούς ρυθμούς.

Παγκοσμίως, λοιμώξεις που οφείλονται σε ανθεκτικά βακτήρια θανατώνουν τουλάχιστον 700.000 άτομα κάθε χρόνο. Προβλέπεται ότι εντός 30 ετών, οι λοιμώξεις από πολυανθεκτικά βακτήρια θα ευθύνονται για το θάνατο 10.000.000 ανθρώπων ετησίως, υπερβαίνοντας κατά πολύ τους θανάτους από καρκίνο (92). Εκτιμάται ότι έως το 2050 η αντοχή θα αποτελέσει την μεγαλύτερη πρόκληση στην υγειονομική περίθαλψη. Αυτή η κρίση θα έχει καταστροφικές συνέπειες για την ανθρώπινη κοινωνία, καθώς τόσο οι εξουθενωτικές όσο και οι θανατηφόρες ασθένειες αυξάνονται σε συχνότητα και σε πεδίο εφαρμογής. Δυο σημαντικοί παράγοντες καθορίζουν αυτήν την κρίση: α) η αυξανόμενη συχνότητα των AMR φαινοτύπων μεταξύ των μικροβίων η οποία υποδηλώνει μια εξελικτική πίεση λόγω της ευρείας και αλόγιστης χρήσης των αντιμικροβιακών σε όλους τους τομείς και β) η παγκοσμιοποίηση όπως επίσης και η ευκολία μετακίνησης του ανθρώπινου πληθυσμού που επιτρέπει στα παθογόνα να έχουν πρόσβαση σε οποιοδήποτε περιβάλλον (93).

1.3.2 Ενιαία Υγεία

Ορίζεται ως «η συνεργατική προσπάθεια πολλαπλών επαγγελματιών της επιστήμης της υγείας, μαζί με τους σχετικούς κλάδους - που συνεργάζονται σε τοπικό και διεθνές επίπεδο - για να επιτύχουν τη βέλτιστη υγεία για τους ανθρώπους, τα κατοικίδια ζώα, την άγρια φύση, τα φυτά και το περιβάλλον μας». Οι ρίζες της «ενιαίας υγείας» είναι αιώνων και βασίζονται στην αμοιβαία εξάρτηση ανθρώπων και ζώων και στην αναγνώριση ότι μοιράζονται όχι μόνο το ίδιο περιβάλλον, αλλά και πολλές μολυσματικές ασθένειες. Έχει εκτιμηθεί ότι το 75% των ανθρώπινων μολυσματικών ασθενειών που έχουν εμφανιστεί ή επανεμφανιστεί τις τελευταίες δεκαετίες είναι ζωνοσογόνοι δηλαδή, προέρχονταν από ζώα (94).

1.3.3 Φυσική αντοχή

Ορισμένοι μικροοργανισμοί δεν έχουν ευαισθησία σε κάποιο είδος αντιβιοτικού με αποτέλεσμα να μην επηρεάζονται από τη δράση του. Καθοριστική σημασία για το εάν ένας μικροοργανισμός ανταποκρίνεται στην αντιβιοτική θεραπεία είναι η παρουσία ή η απουσία στόχου δράσης του φαρμάκου. Όσον αφορά τα Gram αρνητικά βακτήρια, η παρουσία το φραγμού διαπερατότητας συμβάλλει στην τυποποίηση της ευαισθησίας τους. Προτέρημα της φυσική αντοχής θεωρείται το γεγονός ότι είναι εύκολο να προβλεφθεί από τους κλινικούς ιατρούς προκειμένου να δοθεί έγκαιρα η σωστή αντιμικροβιακή αγωγή. Το πρόβλημα της μικροβιακής αντοχής, αυτό δηλαδή που απασχολεί την επιστημονική κοινότητα, είναι επίκτητη αντοχή καθώς η φυσική είναι προκαθορισμένη (78).

1.3.4 Επίκτητη αντοχή

Ένα μείζον ζήτημα που κλονίζει την σημερινή επιστημονική κοινότητα είναι η εμφάνιση αντοχής σε φάρμακα που προηγουμένως ήταν ευαίσθητος ο μικροοργανισμός. Αυτό στην πράξη σημαίνει ο μικροοργανισμός να χάνει σταδιακά την ευαισθησία του σε ένα φάρμακο κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Σημαίνει ακόμη, ότι στις συγκεντρώσεις στις οποίες ευαισθητοποιούνταν έως τώρα το μικρόβιο, πλέον να είναι ανθεκτικό. Τρεις είναι οι κύριοι παράγοντες που ευνοούν την ανάπτυξη επίκτητης αντοχής: α) η ποσότητα του αντιβιοτικού που χρησιμοποιείται, β) η συχνότητά μεταλλαγών στο γονιδίωμα του μικροοργανισμού που ενδέχεται να οδηγήσουν σε αντοχή έναντι των αντιβιοτικών και γ) η ανταλλαγή πλασμιδίων μεταξύ μικροοργανισμών που ενδέχεται να μεταφέρουν γονίδια αντοχής σε αντιβιοτικά (78).

1.3.4.1 Χρωμοσωμικές μεταλλαγές

Τα βακτήρια με την πάροδο του χρόνου υφίστανται αλλαγές στο γονιδίωμα τους, μια διαδικασία που συμβαίνει αυτόματα και μπορεί οι νέες αλληλουχίες να οδηγήσουν το βακτήριο σε αντοχή σε κάποιο φάρμακο. Έτσι, το βακτήριο παραμένει ζωντανό παρά την χορήγηση κάποιου αντιβιοτικού. Βέβαια, δεν οδηγούν σε αντοχή όλες οι μεταλλαγές. Εξαρτάται από το βαθμό που επηρεάζεται η γονιδιακή έκφραση του μικροοργανισμού. Για παράδειγμα, σημειακές μεταλλάξεις υψηλής σημασίας που είναι σε θέση να τροποποιήσουν το στόχο δράσης του φαρμάκου και ταυτόχρονα να ασκεί τη βιολογική του δράση, έχει ως αποτέλεσμα να επιβιώνουν τα κύτταρα. Συχνότερα συναντάται ο τύπος της μεταλλαγής που αφορά αλλαγή στόχου του φαρμάκου και άρα μη σύνδεση του φαρμάκου σε αυτόν. Τότε απαιτείται μεγαλύτερη συγκέντρωση του φαρμάκου στη θεραπεία καθώς η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) αυξάνεται (95).

1.3.5 Μεταφερόμενη αντοχή στα αντιβιοτικά

Εκτός από το κύριο γενετικό υλικό που διαθέτουν τα βακτήρια δηλαδή το δίκλωνο κυκλικό DNA, η γονιδιακή τους έκφραση καθορίζεται και από μικρότερα ημιαυτόνομα δίκλωνα κυκλικά μόρια DNA που έχουν τη δυνατότητα να μεταφέρονται μεταξύ μικροοργανισμών και ονομάζονται πλασμίδια. Τα πλασμίδια είναι συνήθως φορείς γονιδίων αντοχής σε ποικιλία αντιβιοτικών γεγονός που τα καθιστά υπεύθυνα για την ολοένα και αυξανόμενη ανθεκτικότητα των βακτηρίων σε αντιβιοτικές ουσίες. Η μεταφορά πλασμιδίων διακρίνεται σε οριζόντια και κάθετη (96).

1.3.5.1 Κάθετη μεταφορά

Σε αυτού του τύπου την μεταφορά τα πλασμίδια και επομένως τα γονίδια αντοχής σε αντιβιοτικά μεταφέρονται από την μητρική γενιά στην θυγατρική μέσω της μίτωσης δηλαδή του διπλασιασμού του γενετικού υλικού και συμβάλλουν στην διατήρηση της ταυτότητας των ειδών (96).

1.3.5.2 Οριζόντια μεταφορά

Η οριζόντια μεταφορά γονιδίων (Horizontal Gene Transfer- HGT) είναι ένας ευρέως αναγνωρισμένος μηχανισμός προσαρμογής τόσο των βακτηρίων όσο και των αρχαίων. Η HGT

είναι η κοινή χρήση γενετικού υλικού μεταξύ βακτηρίων που δεν έχουν σχέση γονέα-απογόνου (97).

Η μεταφορά αυτού του τύπου αφορά τα πλασμίδια που μεταφέρονται μεταξύ βακτηρίων και χωρίζεται σε τρεις υποκατηγορίες: α) μετασηματισμός, β) μεταγωγή και γ) σύζευξη. Η σημαντικότερη για την αντοχή στα αντιβιοτικά θεωρείται η σύζευξη δηλαδή όταν δυο βακτήρια συνευρίσκονται και ανταλλάσσουν γενετικό υλικό (98). Ο λόγος έγκειται στο γεγονός ότι μπορούν να μεταφερθούν ταχέως σε έναν πληθυσμό και δεν περιορίζονται στο ίδιο γένος. Έτσι, η οριζόντια αντοχή προσθέτει μια σημαντική διάσταση σε μολυσματικές ασθένειες όπου ένα γονίδιο αντοχής στα αντιβιοτικά (Antibiotic Resistant Gene- ARG) μπορεί να είναι ο παράγοντας μιας εστίας μεταφέροντας παράγοντες αντοχής σε πολλαπλά άσχετα μεταξύ τους παθογόνα (99).

Για να αντιμετωπιστεί το αυξανόμενο πρόβλημα της αντιμικροβιακής αντοχής, πρέπει να γίνει αντιληπτό πώς τα βακτήρια αποκτούν και μεταδίδουν γονίδια αντοχής σε κλινικές συνθήκες. Η οριζόντια μεταφορά επιτρέπει στα μικροβιακά είδη να αποκτήσουν νέο γενετικό υλικό εκτός της κλωνικής τους γενιάς. Μέσω της HGT, τα μικρόβια μπορούν να μοιραστούν μια μεγάλη ομάδα γονιδίων, η οποία μπορεί να κωδικοποιεί χαρακτηριστικά που είναι χρήσιμα στο τοπικό τους περιβάλλον (100). Για παράδειγμα, όταν τα βακτήρια αντιμετωπίζουν ισχυρές επιλεκτικές πιέσεις, όπως η παρουσία αντιμικροβιακών, η οριζόντια απόκτηση γονιδίων αντοχής στα αντιβιοτικά επιτρέπει τη διαφοροποίηση του γονιδιώματος τους και δημιουργεί το έδαφος για βελτίωση της φυσικής τους κατάστασης. Πράγματι, η HGT μπορεί να είναι ταχύτερη από τις αυθόρμητες μεταλλάξεις προκειμένου να παρέχει γονίδια απαραίτητα για την επιβίωση (101). Η HGT συμβάλλει επίσης σε άνοδο των λοιμώξεων και των κλινικών εκδηλώσεων μιας ασθένειας με τη μεταφορά παθογόνων χαρακτηριστικών όπως γονιδίων μολυσματικότητας και της ικανότητας σχηματισμού βιομεμβρανών (102).

1.3.6 Μηχανισμοί αντοχής

Οι κύριοι μηχανισμοί με τους οποίους επιτυγχάνεται η αντιμικροβιακή αντοχή είναι λίγοι σε αριθμό. Ωστόσο, η γνώση αυτών των μηχανισμών είναι απαραίτητη για την κατανόηση των περιορισμών της χρήσης των αντιβιοτικών. Αξιοσημείωτο θεωρείται το βακτήριο *A. baumannii* που έχει αναπτύξει αντοχή με όλους τους πιθανούς μηχανισμούς που περιγράφονται παρακάτω. Οι μηχανισμοί είναι οι εξής: παρεμπόδιση της εισόδου του φαρμάκου στο κύτταρο, αδρανοποίηση του φαρμάκου μέσω ενζύμων, αλλαγή του στόχου

δράσης του φαρμάκου, μείωση της ενδοκυττάριας συσσώρευσης του φαρμάκου λόγω παρουσίας αντλιών που εξωθούν το φάρμακο από το κύτταρο (95) και τέλος ο σχηματισμός βιομεμβρανών (103).

1.3.6.1 Παρεμπόδιση διείσδυσης φαρμάκου

Τα Gram αρνητικά βακτήρια συνήθως είναι περισσότερο ανθεκτικά σε αντιβιοτικά χάρη στη φύση του κυτταρικού τους τοιχώματος που εμποδίζει την είσοδο πολλών υδρόφοβων ουσιών όπως τα αντιβιοτικά. Αυτή η παρεμπόδιση επιτυγχάνεται μέσω πρωτεϊνικών πόρων που βρίσκονται στην εξωτερική μεμβράνη των βακτηρίων και ονομάζονται πορίνες. Βακτηριακά στελέχη που έχουν μεταλλαχθεί και διαθέτουν τροποποιημένες πορίνες είναι σε θέση να μην επιτρέπουν τη είσοδο σε αντιβιοτικά που τους χορηγούνται. Παράδειγμα, η μείωση των πορινών OprD στην *P. aeruginosa* φέρει ως αποτέλεσμα την ελάττωση της εισόδου του αντιβιοτικού και άρα την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στην ιμιπενέμη. Αντίστοιχα η μείωση των πρωτεϊνών με M.W. 29 kD που ονομάζονται OMP σε πολλά Gram αρνητικά βακτήρια όπως το *A. baumannii* έχει ως αποτέλεσμα την αντοχή στην ιμιπενέμη (104).

1.3.6.2 Αλλαγή στόχου δράσης του φαρμάκου

Μερικά ανθεκτικά μικρόβια αποφεύγουν την αναγνώριση τους από τα αντιβιοτικά, τροποποιώντας τη θέση σύνδεσής τους. Αρκετά αντιβιοτικά όπως οι αμινογλυκοσίδες, οι τετρακυκλίνες και οι μακρολίδες έχουν στόχο δράσης την πρωτεϊνοσύνθεση που ουσιαστικά την αναστέλλουν σε αυτό το στάδιο (95). Μεταλλαγή της θέσης αυτής, θα μπλοκάρει τη δράση του αντιβιοτικού με αποτέλεσμα το βακτήριο να συνεχίσει να πραγματοποιεί τη πρωτεϊνοσύνθεση μένοντας σχεδόν ανεπηρέαστη από τους αντιμικροβιακούς παράγοντες (105).

Μεταλλαγές στα γονίδια που κωδικοποιούν τις πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες (PBPs), που είναι ένζυμα αγκυροβολημένα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και βοηθούν στο σχηματισμό του κυτταρικού τοιχώματος, έχουν ως αποτέλεσμα την έκφραση μοναδικών πενικιλινοδεσμευτικών πρωτεϊνών όπως την PBP2a στον *Staphylococcus aureus* (105). Η PBP2a έχει μειωμένη συγγένεια με τα β-λακταμικά αντιβιοτικά τα οποία κατά συνέπεια δεν μπορούν να εισέλθουν στα βακτηριακά κύτταρα και άρα συμβάλλει στην άνοδο των ανθεκτικών στελεχών *S. aureus* γνωστά και ως Ανθεκτικοί στην Μεθικιλίνη *S. aureus* (MRSA)

(106). Αξιοσημείωτο θεωρείται το γεγονός ότι οι MRSA απέκτησαν πλεονέκτημα έναντι της μεθικιλίνης μεταβάλλοντας τη θέση δέσμευσης της πενικιλίνης στην κυτταρική μεμβράνη χωρίς δηλαδή να παράγεται κάποιο νέο ένζυμο. Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά δρουν συνδεδεμένα με τις PBPs καταλήγοντας στην παρεμπόδιση της διασύνδεσης των μορίων της πεπτιδογλυκάνης και του σχηματισμού κυτταρικού τοιχώματος (95).

1.3.6.3 Ταχεία απάντηση του φαρμάκου

Τα βακτήρια προκειμένου να αυξήσουν την έξοδο του αντιβιοτικού από το εσωτερικό του κυττάρου (ή στον περιπλασματικό χώρο στα Gram αρνητικά βακτήρια) διαθέτουν ειδικές πρωτεΐνες στην κυτταρική μεμβράνη που λειτουργούν ως αντλίες εξώθησης του φαρμάκου (efflux pumps). Οι συγκεκριμένες αντλίες ονομάζονται αντλίες ενεργητικής αποβολής και ωθούν το φάρμακο προς τα έξω με αποτέλεσμα η συγκέντρωση του αντιβιοτικού που παραμένει εντός του κυττάρου να μην είναι επαρκής για να ασκήσει την αντιμικροβιακή του δράση (107). Οι πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από σύστημα γονιδίων τα οποία οργανώνονται σε ένα οπερόνιο. Ο μηχανισμός αυτός ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά στις τετρακυκλίνες αλλά είναι δραστήσιος έναντι κάθε είδους αντιβιοτικού (95). Έως σήμερα υπάρχουν πέντε οικογένειες αντλιών: α) η υπεροικογένεια του κύριου μεσολαβητή, β) η οικογένεια Small Multidrug Resistance (SMR), (γ) η οικογένεια Resistance-Nodulation-cell Division (RND), (δ) η οικογένεια ATP-binding cassette² και (ε) η οικογένεια Multidrug and Toxic compound Extrusion (MATE) (108).

1.3.6.4 Βιομεμβράνες

Η παθογόνος βιομεμβράνη θεωρείται παγκόσμια πρόκληση λόγω της εγγενούς αντιβιοτικής της δράσης (103). Αναφορικά με την κλινική κατάσταση μιας κοινωνίας, οι μικροοργανισμοί είναι υπεύθυνοι για σοβαρές και επικίνδυνες λοιμώξεις. Για την καταπολέμηση αυτών των μικροοργανισμών συνήθως απαιτούνται υψηλές δόσεις αντιβιοτικών για μεγάλο χρονικό διάστημα και αυτές οι προσεγγίσεις συχνά αποτυγχάνουν, συμβάλλοντας στην επιμονή της λοίμωξης (103). Εκτός από τους θεραπευτικούς περιορισμούς, οι βιομεμβράνες μπορεί να

² Η γονιδιακή κασέτα είναι ένας τύπος κινητού γενετικού στοιχείου που περιέχει ένα γονίδιο και μια ανασυνδυασμένη περιοχή. Κάθε κασέτα συνήθως περιέχει ένα μόνο γονίδιο και συνήθως έχει μήκος 500 έως 100 ζεύγη βάσεων.

είναι πηγή μολύνσεων όταν αναπτύσσονται σε ιατροτεχνολογικό εξοπλισμό. Οι συνεχείς προκλήσεις που επιφέρουν οι βιομεμβράνες έχουν κινητοποιήσει ερευνητές σε ολόκληρο τον κόσμο να προτείνουν και να αναπτύξουν εναλλακτικές λύσεις για τον αντιμικροβιακό έλεγχο (98).

Τα βακτήρια επιβιώνουν στη φύση σχηματίζοντας βιομεμβράνες σε επιφάνειες. Οι βιομεμβράνες είναι δομημένες συστάδες βακτηρίων ενσωματωμένες σε μια αυτοπαραγόμενη πολυμερή μήτρα αποτελούμενη από πολυσακχαρίτη, πρωτεΐνη και εξωκυτταρικό DNA. Οι βακτηριακές βιομεμβράνες είναι ανθεκτικές στα αντιβιοτικά, στα απολυμαντικά, στους φαγοκυτταρικούς μηχανισμούς και σε άλλα συστατικά της φυσικής και της επίκτητης φλεγμονώδους απόκρισης του ανθρώπινου σώματος (109). Είναι γνωστό, για παράδειγμα, ότι η επιμονή των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων που σχετίζονται με ξένα σώματα οφείλεται στο σχηματισμό βιομεμβρανών. Η χρόνια λοίμωξη των πνευμόνων από *P. aeruginosa* σε ασθενείς με κυστική ίνωση προκαλείται από βλεννοπαραγωγά στελέχη τα οποία με τη σειρά τους δημιουργούν τη βιομεμβράνη.

Οι βιομεμβράνες αναπτύσσονται σε φυσικά και βιομηχανικά περιβάλλοντα και είναι ανθεκτικές στους βακτηριοφάγους, στις αμοιβάδες και στα ποικίλα χημικά βιοκτόνα που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση διαφόρων ασθενειών σε βιομηχανικές διεργασίες (110). Θεωρούνται απειλή στον κλάδο της ιατρικής καθώς τα βακτηριακά κύτταρα που είναι οργανωμένα σε βιομεμβράνες μπορούν να αντέξουν σε ανοσοαποκρίσεις όταν προσβάλλονται από ξενιστή, ενώ ταυτόχρονα είναι πολύ λιγότερο ευαίσθητα στα αντιβιοτικά (111). Ο σχηματισμός βιομεμβρανών ωθεί τους μικροοργανισμούς να αποφεύγουν τις αντιμικροβιακές προκλήσεις με πολλούς μηχανισμούς.

Ένας μηχανισμός αντοχής των βιομεμβρανών σε αντιμικροβιακούς παράγοντες είναι η αποτυχία ενός αντιμικροβιακού να διεισδύσει σε όλο το βάθος της βιομεμβράνης. Πολυμερείς ουσίες όπως αυτές που αποτελούν τη μήτρα ενός βιοφίλμ είναι γνωστό ότι επιβραδύνουν τη διείσδυση των αντιβιοτικών (112), και οι διαλυμένες ουσίες διαχέονται γενικά με βραδύτερους ρυθμούς εντός των βιομεμβρανών από ότι στο νερό (113). Ορισμένα αντιβιοτικά, έχει αποδειχθεί ότι διαπερνούν ευκολότερα τις βιομεμβράνες ενώ άλλα δυσκολότερα. Επομένως εξαρτάται από τη σύσταση τόσο του αντιβιοτικού όσο και της βιομεμβράνης (114). Τα μαθηματικά μοντέλα προβλέπουν ότι εάν υπάρχει εμπόδιο διείσδυσης, ο αντιμικροβιακός παράγοντας απενεργοποιείται στα εξωτερικά στρώματα της βιομεμβράνης γρηγορότερα από ότι αυτός διαχέεται (115). Αυτό ισχύει για τα αντιδραστικά

οξειδωτικά όπως το υποχλωριώδες και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (116). Η ανεπαρκής διείσδυση αυτού του τύπου αντιμικροβιακών μπορεί εν μέρει να ευθύνεται για την αδυναμία των φαγοκυττάρων να καταστρέφουν τις βιομεμβράνες.

Μια δεύτερη υπόθεση για την εξήγηση μειωμένης ευαισθησίας των βιομεμβρανών στα αντιβιοτικά, θέτει ότι μερικά από τα κύτταρα σε μια βιομεμβράνη έχουν περιορισμένη πρόσβαση σε θρεπτικές ουσίες και επομένως διαβιώνουν σε κατάσταση αργής ανάπτυξης ή λιμοκτονίας (117). Τα κύτταρα με αργή ανάπτυξη ή καθόλου ανάπτυξη εμφανίζουν ελαττωμένη ευαισθησία σε πολλούς αντιμικροβιακούς παράγοντες. Η χωρική ετερογένεια που υφίσταται στα διάφορα μοντέλα βιομεμβρανών, όταν τα βακτήρια βρίσκονται σε φυσιολογική κατάσταση, έχει αποδειχθεί με μια ποικιλία μικροτομικών και μικροσκοπικών τεχνικών (118). Η ετερογένεια αποτελεί μια σημαντική στρατηγική επιβίωσης για αρκετά βακτήρια, που αντιπροσωπεύουν μια μεγάλη ποικιλία διαφορετικών μεταβολικών καταστάσεων. Κατά αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζουν την επιβίωση τους ακόμη και σε ακραίες μεταβολικές συγκυρίες (110).

Ένας τρίτος μηχανισμός μειωμένης ευαισθησίας στη βιομεμβράνη, ο οποίος είναι πιο θεωρητικός από τις προηγούμενες υποθέσεις, είναι ότι μερικά από τα κύτταρα σε μια βιομεμβράνη υιοθετούν έναν ξεχωριστό και προστατευμένο φαινότυπο. Αυτός ο φαινότυπος δεν είναι απάντηση στον περιορισμό των θρεπτικών ουσιών, αλλά είναι μια βιολογικά προγραμματισμένη απόκριση στην ανάπτυξη των βακτηρίων πάνω σε μια επιφάνεια (110).

Πιο συγκεκριμένα, το *A. baumannii* που είναι Gram αρνητικό ευκαιριακό παθογόνο μπορεί να σχηματίσει βιομεμβράνες και η αυξανόμενη αντοχή του σε αντιβιοτικούς παράγοντες αντιτάσσεται στον έλεγχο και την καταστολή των λοιμώξεων. Μια καλύτερη προσέγγιση του σχηματισμού βιομεμβρανών και της αντοχής στα αντιβιοτικά του περιβαλλοντικού *A. baumannii*, που εντοπίζεται σε νοσοκομεία, απαιτείται για αποτελεσματικότερο έλεγχο των λοιμώξεων (119). Για αυτόν τον λόγο μελετήθηκε ο σχηματισμός βιομεμβράνης από MDR θετικά στελέχη κλινικής προέλευσης. Τα περιβαλλοντικά MDR θετικά στελέχη με μειωμένη ικανότητα σχηματισμού βιομεμβρανών είχαν 2,7 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο για κυτταρικό θάνατο λόγω αφυδάτωσης σε σύγκριση με τα αντίστοιχα MDR αρνητικά στελέχη. Τα περιβαλλοντικά MDR θετικά στελέχη με αυξημένη ικανότητα σχηματισμού βιομεμβρανών είχαν 60% λιγότερες πιθανότητες για κυτταρικό θάνατο σε σύγκριση με τα αντίστοιχα στελέχη που έχουν μειωμένη ικανότητα σχηματισμού βιομεμβρανών. Ο MDR θετικός φαινότυπος κρίθηκε επιβλαβής για τα

περιβαλλοντικά στελέχη και ο φαινότυπος για αυξημένη ικανότητα βιοφίλμ ήταν κρίσιμος για την επιβίωση (120).

Λοίμωξη ή ασθένεια **Συνηθέστερα Gram αρνητικά βακτήρια που σχηματίζουν βιομεμβράνες**

Περιοδοντίτιδα	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus, Eikenella corrodens</i> (121)
Χοληφόρα αγγεία	Εντεροβακτηριακά (όπως <i>E. coli</i>) (110)
Βακτηριακή προστατίτιδα	Εντεροβακτηριακά (όπως <i>E. coli</i>) (110)
Μελιοειδίωση	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>
Πνευμονία σχετιζόμενη με Μονάδα Εντατικής Θεραπείας	<i>P. aeruginosa, Acinetobacter spp.</i> και <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (122)
Φακοί επαφής	<i>P. aeruginosa</i> (110)
Stent χοληφόρων	<i>E. coli, Klebsiella spp, Morganella morganii, Proteus spp, Serratia spp, Pseudomonas spp</i> (123)
Πνευμονία από κυστική ίνωση	<i>P. aeruginosa, Burkholderia cepacia</i> (110)
Καθετήρας ουροδόχου κύστης	<i>E. coli, Klebsiella spp, P. mirabilis, P. aeruginosa</i> (124)

Πίνακας 3. Οι Gram αρνητικοί μικροοργανισμοί που οδηγούν σε σχηματισμό βιομεμβρανών καθώς και το είδος της λοίμωξης που δημιουργούν (110).

1.3.7 Εξάπλωση και αίτια διασποράς της μικροβιακής αντοχής στα αντιβιοτικά

Η αντοχή των βακτηρίων σε αντιμικροβιακούς παράγοντες συνιστά ένα φυσικό βιολογικό φαινόμενο. Υπήρχε από πάντα αλλά τα τελευταία χρόνια έχει λάβει τεράστιες διαστάσεις λόγω της υπερβολικής χρήσης των αντιβιοτικών τα οποία ασκούν εξελικτική πίεση στους βακτηριακούς πληθυσμούς, ευνοώντας την επικράτηση των ανθεκτικών. Η κατάχρηση των αντιβιοτικών έχει διαταράξει την ισορροπία μεταξύ των ευαίσθητων και ανθεκτικών πληθυσμών με αποτέλεσμα ο ζυγός να γέρνει πως τα ανθεκτικά (125). Τα αίτια περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.



Εικόνα 5. Η διάδοση των παραγόντων αντοχής σε αντιβιοτικά σε έναν πληθυσμό βακτηρίων (126).

1.3.7.1 Υπέρμετρη συνταγογράφηση αντιβιοτικών

Η κύρια πηγή υπερβολικής χρήσης στην κλινική πράξη είναι η εμπειρική χορήγηση αντιμικροβιακών από κλινικούς ιατρούς. Αυτή η τυχαία εφαρμογή αντιμικροβιακών οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στο ότι η διάγνωση και ο αλγόριθμος προκειμένου να διαπιστωθεί το είδος του παθογόνου, και ίσως το πιο σημαντικό, η ευαισθησία του παθογόνου σε μια συγκεκριμένη αντιμικροβιακή θεραπεία, είναι μια χρονοβόρα διαδικασία. Γίνεται λοιπόν κατανοητό ότι, η παρουσία ενός ασθενούς με απειλητικά για τη ζωή συμπτώματα χρίζει άμεσης αντιμετώπισης. Συχνά, αυτή η δράση παίρνει τη μορφή της ταυτόχρονης χορήγησης πολλών διαφορετικών αντιμικροβιακών με την ελπίδα ότι θα είναι χρήσιμη στον περιορισμό των συμπτωμάτων της λοίμωξης. Η υπερβολική εφαρμογή αντιμικροβιακών συμβαίνει συνήθως σε ακραίες περιπτώσεις σε νοσοκομειακούς ασθενείς και έτσι είναι σχετικά ελεγχόμενη. Παρόλα αυτά, η ανάπτυξη μιας πιο ταχείας και ταυτόχρονα αξιόπιστης διάγνωσης θα βοηθούσε δυνητικά στην ελάττωση των ανθεκτικών στελεχών ανάμεσα στον πληθυσμό (127).

1.3.7.2 Μη συνταγογραφημένη αντιμικροβιακή αγωγή

Η ελεγχόμενη πρόσβαση σε αντιμικροβιακά δεν είναι παγκόσμια. Σε πολλές χώρες, η παραγωγή και η πώληση αντιμικροβιακών είναι μερικώς ή εντελώς ανεξέλεγκτη. Αυτό έχει

ως αποτέλεσμα, η πώληση θεραπευτικών προϊόντων να διατίθεται στον πληθυσμό τόσο σε προνομιακή τιμή όσο και σε μεγάλη ποσότητα. Πριν από την έλευση του διαδικτύου, η πρόσβαση στα αντιμικροβιακά σε χώρες του πρώτου κόσμου περιορίστηκε σε ταξιδιώτες που επιστρέφان. Ωστόσο, οι διαδικτυακές αγορές επέτρεψαν την ευρεία πρόσβαση ακόμη και σε περιορισμένης χρήσεως αντιβιοτικά, όπως η ριφαμπικίνη και η σιπροφλοξασίνη (128).

1.3.7.3 Πρόωρη διακοπή της αντιμικροβιακής θεραπείας

Η μη ολοκλήρωση της αντιμικροβιακής θεραπείας ενδέχεται να μην επηρεάσει αρνητικά την άμεση κλινική εικόνα του ασθενή. Ωστόσο, σε μια μελλοντική λοίμωξη, αυξάνεται σημαντικά η πιθανότητα εσφαλμένης εφαρμογής των αντιβιοτικών καθώς θα έχουν παραμείνει ανθεκτικά στελέχη λόγω της προηγούμενης λοίμωξης (93).

1.3.7.4 Υπέρμετρη χρήση αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία και την αλιεία

Η προστασία τόσο τα γεωργικών όσο και τα ζωικών προϊόντων από τα παθογόνα, έχει ως αποτέλεσμα η τελική τους απόδοση να αυξάνεται σημαντικά. Η επιβολή της χορήγησης αντιβιοτικών για την παραγωγή προϊόντων υψηλής ποιότητας είναι σαφής και δικαιολογείται όταν μεγάλο τμήμα της ανθρωπότητας συνεχίζει να βιώνει τον λιμό. Ωστόσο, ο αντίκτυπος μιας τέτοιας επιλεκτικής πίεσης που ασκείται στο φυσικό περιβάλλον μέσω της εφαρμογής των αντιμικροβιακών είναι σοβαρός. Τα στοιχεία για την άνοδο ποικίλων γονιδίων AMR σε αστικά, γεωργικά και παρθένα περιβάλλοντα, υποδηλώνουν ότι αυτές οι δραστηριότητες σε συνδυασμό με την οικιακή και κλινική χρήση αντιμικροβιακών έχουν ήδη βαθιές επιπτώσεις στη μικροβιακή οικολογία, καθιστώντας όλο και πιο περίπλοκη την αντιμετώπιση των εκάστοτε παθογόνων (129) (130) (131) (132).

1.3.7.5 Απουσία υγιεινής εκ μέρους της κοινωνίας

Εκτός από την αλόγιστη χρήση των αντιμικροβιακών, συνθήκες όπως ο υπερπληθυσμός και η κακή υγιεινή συμβάλλουν επίσης στην κυκλοφορία και τη διάδοση ανθεκτικών μικροοργανισμών. Η μετάδοση ανθεκτικών παθογόνων διευκολύνεται με την επαφή μεταξύ των ανθρώπων ή μέσω μολυσμένου νερού, τροφής ή φορέων. Η βελτίωση της βασικής υγιεινής θα μειώσει τη διάδοση ανθεκτικών οργανισμών (133).

1.3.7.6 Έλλειψη επιτήρησης δημόσιας υγείας σε νοσοκομεία και κλινικές

Η διαθεσιμότητα δοκιμών ρουτίνας αντιμικροβιακής ευαισθησίας για παροχή πληροφοριών σχετικά με την τάση των μικροβίων για αντίσταση (συμπεριλαμβανομένης της αναδυόμενης αντίστασης) σε αντιβιοτικούς παράγοντες, κρίνεται απαραίτητη για την κλινική πράξη και για την ανάπτυξη αποτελεσματικών πολιτικών. Ο έλεγχος ευαισθησίας κατά των μικροβίων συχνά παρακάμπτεται στα περισσότερα αποκεντρωμένα εργαστήρια λόγω έλλειψης αναλώσιμων και ειδικότερα αυτό το φαινόμενο παρατηρείται σε αναπτυσσόμενες χώρες. Τα δεδομένα μικροβιακής επιτήρησης σε μια κοινότητα μπορεί να είναι πολύ χρήσιμα για επαγγελματίες υγείας για τη θεραπεία λοιμώξεων με συγκεκριμένα ευαίσθητα αντιμικροβιακά. Μια τέτοια παρακολούθηση πρέπει να διεξάγεται τακτικά και συνεχώς, διότι τα ποσοστά αντίστασης, με την πάροδο του χρόνου, μπορεί να ποικίλλουν σε μια περιοχή μιας χώρας (134). Ακόμη, η βελτίωση της πρόληψης και του ελέγχου λοιμώξεων στα νοσοκομεία θα μειώσει τη νοσοκομειακή εξάπλωση βακτηρίων με επίκτητη αντοχή, όπως ο *Staphylococcus aureus*, η *E.coli*, η *K. pneumoniae* και η *P. aeruginosa* (134).

1.3.8 Αντοχή στην κολιστίνη

Ο έλεγχος της αντιμικροβιακής ευαισθησίας της κολιστίνης συνοδεύεται από πολλές δυσκολίες και σφάλματα. Από κοινού οι επιτροπές των EUCAST και CLSI εξέδωσαν συστάσεις που επιβεβαιώνουν ότι η μικροαραίωση ζωμού (Broth Microdilution- BMD) είναι μέχρι στιγμής η μόνη έγκυρη μέθοδος και ότι η μέθοδος της διάχυσης του αντιβιοτικού δίσκου δεν λειτουργεί λόγω της πτωχής διάχυσης του μεγάλου μορίου της κολιστίνης.

Η έκθεση δεν αξιολόγησε τις βαθμιδωτές δοκιμές για την κολιστίνη γνωστές και ως E-test καθώς αναφορές στη βιβλιογραφία αμφισβήτησαν την εγκυρότητα των MIC που αποκτήθηκαν με δοκιμή διαβάθμισης (135), (136).

Η ανάγκη για αυστηρό ποιοτικό έλεγχο οποιασδήποτε μεθόδου συνιστάται σε όλα τα εργαστήρια, όταν εκτελούν το προσδιορισμό της MIC της κολιστίνης περιλαμβάνει το ανθεκτικό στην κολιστίνη *E.coli* NCTC 13846 για έλεγχο ποιότητας. Η τιμή στόχου MIC για αυτό το στέλεχος είναι 4 mg / L και να κυμαίνεται περιστασιακά μεταξύ 2 και 8 mg /L (136).

Σε έρευνα της Βουρλή και των συνεργατών της (2018), τα πολύ σημαντικά σφάλματα που παρατηρούνται από αυτοματοποιημένες συσκευές ενδέχεται να έχουν σοβαρές επιπτώσεις στο σχηματισμό της θεραπείας. Η μείζων σημασία του ζητήματος ενισχύεται από την χαμηλή απόδοση των υπόλοιπων εμπορικά διαθέσιμων μεθόδων για προσδιορισμό της

ευαισθησίας των μικροβίων στην κολιστίνη. Συμπερασματικά, υπογραμμίζεται η ανάγκη για τον εξεύρεση της βέλτιστης μεθόδου για προσδιορισμό της ευαισθησίας στην κολιστίνη (137).

1.3.9 Όρια ευαισθησίας στην κολιστίνη

Σύμφωνα με την τελευταία έκθεση της EUCAST τα γένη *Enterobacterales*, *Pseudomonas spp.* και *Acinetobacter spp.* θεωρούνται ανθεκτικά στην κολιστίνη όταν η MIC είναι μεγαλύτερη από 2 mg/L και ευαίσθητα στην κολιστίνη όταν η MIC είναι μικρότερη ή ίση από 2 mg/L. Να σημειωθεί ότι για τα γένη *Pseudomonas spp.* και *Acinetobacter spp.* σπάνια εμφανίζεται αντοχή στην κολιστίνη. Ο προσδιορισμός των παραπάνω MIC πραγματοποιήθηκε με BMD για το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας το στέλεχος *E.coli* ATCC25922 ή το στέλεχος *P. aeruginosa* ATCC27853 και ως θετικός μάρτυρας το ανθεκτικό στην κολιστίνη *E.coli* NCTC 13846 (*mcr-1* θετικό) (138).

1.4 Γονίδια αντοχής στην κολιστίνη

Όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω η κολιστίνη χρησιμοποιούνταν ευρέως σε ασιατικές, ευρωπαϊκές χώρες καθώς και στην Βόρεια Αμερική ως κτηνιατρικό αντιμικροβιακό ενώ η χορήγηση της σε ανθρώπους περιορίστηκε λόγω της νευροτοξικότητας και της νεφροτοξικότητας που προκαλεί (139), (28), (140). Την τελευταία δεκαετία, παρατηρήθηκε ανησυχητική αύξηση των πολυανθεκτικών Gram αρνητικών βακτηρίων που φέρουν από αρκετούς κλινικούς ιατρούς και ερευνητές το χαρακτηρισμό «superbugs» (*Enterobacteriaceae*, *P. Aeruginosa* και *A. baumannii*), γεγονός που οδήγησε στην επαναφορά της χρήσης της κολιστίνης σε ανθρώπους (141).

Μέχρι πρόσφατα η αντοχή των μικροβίων στην κολιστίνη ήταν σπάνια και οφείλονταν κυρίως σε χρωμοσωμικές μεταλλαγές. Η ανακάλυψη χρωμοσωμικών μεταλλαγών στα *Enterobacteriaceae* που ευθύνονται για ανάπτυξη ανθεκτικότητας στην κολιστίνη προηγήθηκε της ανακάλυψης των μεταφερόμενων με πλασμίδια γονιδίων αντοχής. Οι χρωμοσωμικές μεταλλαγές αφορούν το σύστημα *pmrA/pmrB* που ρυθμίζουν τη σύνθεση και τη δομή του LPS (142).

Κρίνεται αναγκαίο να τονιστεί ότι, η παρουσία κινητών γενετικών στοιχείων που είναι φορείς γονιδίων ανθεκτικότητας στην κολιστίνη ενέχουν σημαντικό κίνδυνο για τη δημόσια υγεία, καθώς αυτά μπορούν να εξαπλωθούν ταχύτατα με οριζόντια μεταφορά και μπορεί να συνεπάγεται με χαμηλότερη τιμή αρμοστικότητας³ (143).

1.4.1 MCR-1

Το πρώτο μεταφερόμενο με πλασμίδιο γονίδιο αντοχής στην κολιστίνη αναφέρθηκε για πρώτη φορά το Νοέμβριο του 2015 και ανιχνεύθηκε σε στελέχη της *E. coli* σε χοίρο στην Κίνα όπως επίσης και σε άλλα στελέχη *E. coli* και *K. pneumoniae* σε δείγματα ζωικής και ανθρώπινης προέλευσης που συλλέχθηκαν κατά το χρονικό διάστημα 2011 έως 2014. Ονομάστηκε *mcr-1* (mobile colistin resistant gene 1) δηλαδή 1^ο κινητό γονίδιο αντοχής στην κολιστίνη⁴ και διαθέτει μήκος 1.626 bp (140). Το *mcr-1* κωδικοποιεί το γονίδιο για το ένζυμο φωσφοαιθανολαμινική τρανσφεράση, που βιολογικός της ρόλος είναι να τροποποιεί το

³Αρμοστικότητα (fitness): ο ρυθμός με τον οποίο ένας γονότυπος αυξάνει την παρουσία του στον πληθυσμό σε σχέση με τον ρυθμό ενός άλλου γονότυπου.

⁴ Ομοίως ονομάστηκαν και τα υπόλοιπα γονίδια *mcr-2*, *mcr-3* και ούτω καθεξής.

λιπίδιο A του LPS με αποτέλεσμα να μην μπορεί να συνδεθεί σε αυτό η κολιστίνη. Ειδικότερα, η τρανσφεράση αυτή προσθέτει μια ομάδα φωσφοαιθανολαμίνης στο (4') – φωσφορικό του ενός τμήματος της γλυκοζαμίνης του λιπιδίου A (144), (145). Η τροποποίηση αυτή μειώνει το καθαρό αρνητικό φορτίο του LPS και κατά συνέπεια μειώνει τη συγγένεια του λιπιδίου A με την κολιστίνη. Συνεπώς, αδυνατεί να ασκήσει την βακτηριοστατική της δράση και έτσι αποφεύγεται η κυτταρική λύση (146).

Παρόλο που ο συγκεκριμένος μηχανισμός ανακαλύφθηκε σχετικά πρόσφατα, υπάρχουν αναφορές από δείγματα που ανακτήθηκαν το 1980, στα πλασμίδια των οποίων εδρεύει το *mcr-1*, αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις ανευρίσκονται σε δείγματα που συλλέχθηκαν έως το 2009 (147).

Το *mcr-1* έχει επίσης παρατηρηθεί σε πλασμίδια που περιέχουν άλλα γονίδια μικροβιακής αντοχής όπως καρβαπενεμάσες και συγκεκριμένα τα γονίδια *bla_{NDM}* και *bla_{KPC}* (148), (149) και εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (150), (151), (152). Μέχρι σήμερα έχει βρεθεί σε πλασμίδια διαφόρων τύπων συμπεριλαμβανομένων των IncI2, IncHI2, και IncX417 (153).

Πρόσφατα, ορισμένοι άγνωστοι παράγοντες επιλεκτικής πίεσης τόσο σε κτηνοτροφικό όσο και σε ανθρώπινο επίπεδο θεωρήθηκαν ως εφελθτήριο για τη συνεχή εξέλιξη των γονιδίων *mcr*, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μεταλλακτών *mcr*. Παράδειγμα συνιστά, το γονίδιο *mcr-1* που έως σήμερα έχουν βρεθεί 13 παραλλαγές αυτού του γονιδίου (*mcr-1.1–mcr-1.13*) που διαφέρουν μεταξύ τους κατά ένα αμινοξύ.

Μεταλλάκτης <i>mcr-1</i>	Ανιχνεύθηκε σε^β	Διαφορά νουκλεοτιδίων σε σχέση με το <i>mcr-1.1</i>	Διαφορά αμινοξέων σε σχέση με την MCR-1.1
1.1	<i>E. coli, Escherichia fergusonii, S. enterica, Shigella, Klebsiella, Citrobacter, Enterobacter, Kluyvera ascorbata, Cronobacter</i>	-	-

	<i>sakazakii</i> , <i>Providencia alcalifaciens</i>		
1.2	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>	A8T	Gln3Leu
1.3	<i>E. coli</i>	AA111-2GG	Ile38Val
1.4	<i>E. coli</i>	G1318A	Asp440Asn
1.5	<i>E. coli</i>	C1354T	His452Tyr
1.6	<i>S. enterica</i>	G1263A, G1607A	Arg536His
1.7	<i>E. coli</i>	G643A	Ala215Thr
1.8	<i>E. coli</i>	A8G	Gln3Arg
1.9	<i>E. coli</i>	T1238C	Val413Ala
1.10	<i>Moraxella spp.</i> ^γ		
1.11 ^ε	<i>E. coli</i>	GTG19-21dup	Val7dup
1.12	<i>E. coli</i>	G9C	Gln3His
1.13	<i>E. coli</i>	G465A	Met155Ile

Πίνακας 4. Οι παραλλαγές του *mcr-1* καθώς και οι διαφορές στην αμινοξική και νουκλεοτιδική τους αλληλουχία (154).

^α Η αρίθμηση των μεταλλακτών που έχουν προσδιοριστεί από το NCBI αναγράφονται με **bold**.

^β Γένος/ είδος στο οποίο ανιχνεύθηκε ο μεταλλάκτης έως σήμερα.

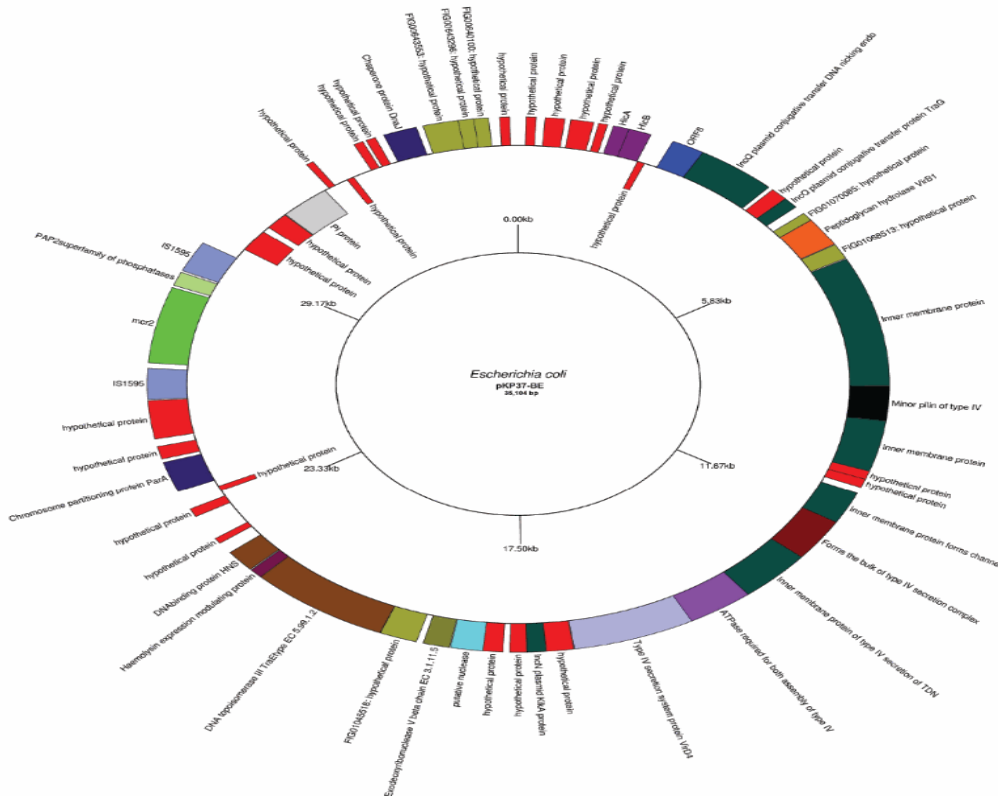
^γ Το *mcr-1.10* που βρίσκεται στη *Moraxella spp* και διαφέρει κατά 36 νουκλεοτίδια από το *mcr-1.1* και το *MCR-1.10* διαφέρει κατά 7 αμινοξέα από την *MCR-1*.

^δ Η λέξη *dup* (*duplication*) αναφέρεται στο διπλασιασμό των νουκλεοτιδίων/ αμινοξέων στις θέσεις που υποδεικνύονται.

1.4.2 MCR-2

Ύστερα από την ανακάλυψη του *mcr-1* ακολούθησε η ανακάλυψη και άλλων εννέα μέχρι σήμερα γονιδίων. Το *mcr-2* εντοπίστηκε στο πλασμίδιο pKP37-BE σε στέλεχος της *E. coli* ζωικής προέλευσης (πουλερικά και χοίρους) στο Βέλγιο. Διαθέτει μήκος 1.617 bp (155). Φυλογενετικές αναλύσεις έδειξαν ότι το *mcr-2* δεν σχετίζεται με το *mcr-1* και ότι ενδέχεται να έχει προέλθει από την *Moraxella catarrhalis*. Ο τελευταίος ισχυρισμός βασίζεται στο ότι το *mcr-2* μαζί με το γονίδιο της λιπιδιακής φωσφατάσης, που φαίνεται να έχει αυξημένη

ομολογία με την αντίστοιχη φωσφατάση της *Moraxella spp.*, βρίσκονται στο ίδιο γενετικό στοιχείο IS1595⁵ το οποίο πιθανώς να προήλθε από την *Moraxella spp.* (156).



Εικόνα 6. Γενετική οργάνωση και δομή του πλασμιδίου rKP37-BE από ένα ανθεκτικό σε κολιστίνη στέλεχος *Escherichia coli* που φιλοξενεί το γονίδιο *mcr-2* (155).

1.4.3 MCR-3

Το γονίδιο *mcr-3* με μήκος 1.626 bp, βρέθηκε για πρώτη φορά σε στελέχη *E. coli* σε χοίρους στην Κίνα. Το γονίδιο συνυπήρχε με 18 επιπλέον καθοριστικούς παράγοντες αντοχής στο πλασμίδιο pWJ1 τύπου IncHI2 με μήκος 261 kb. Έγινε σύγκριση της αλληλουχίας του με τα γονίδια *mcr-1* και *mcr-2* και διαπιστώθηκε ομολογία 45% και 47% αντίστοιχα. Δεδομένο που αποδεικνύει ότι το *mcr-3* δεν προήλθε από μεταλλαγή του *mcr-1* ή/και του *mcr-2*. Παράλληλα, διαπιστώθηκε ότι η αλληλουχία του *mcr-3* φέρει ομολογία 99,8 έως 100% και 75,6 έως 94,8% με την φωσφοαιθανολαμινική τρανσφεράση που βρίσκεται σε άλλα είδη *Enterobacteriaceae* και σε 10 είδη *Aeromonas* αντίστοιχα, από δείγματα που συλλέχθηκαν από κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα σε 12 χώρες. Επιπλέον ένα μεταθετό γενετικό

⁵ IS & αριθμός (Insertion Sequencing): αλληλουχία εισδοχής. Αναφέρεται σε μικρού μήκους τρανσποζόνια.

στοιχείο TnAs2 (τρανσποζόνιο), που έχει ταυτοποιηθεί μόνο σε είδη *Aeromonas salmonicida*, βρέθηκε στο pW1J σε αλληλουχία άνωθεν από εκείνη του *mcr-3* (157).

Το γενετικό στοιχείο ΔTnAs2-*mcr-3* αναγνωρίστηκε επίσης σε μια αλληλουχία *E. coli* χοίρων που απομονώθηκαν στη Μαλαισία, σε κλινικό δείγμα *K. pneumoniae* από την Ταϊλάνδη, και σε ένα ανθρώπινο δείγμα *Salmonella enterica* με ορότυπο *Typhimurium* που είχε απομονωθεί από τις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν την πιθανότητα ευρείας διάδοσης του γονιδίου *mcr-3* μεταξύ *Enterobacteriaceae* και *Aeromonas* (157).

Σε μελέτη των Yin και των συνεργατών του, συλλέχθηκαν 16 δείγματα κρέατος κοτόπουλου από 6 υπεραγορές και 3 αγροτικές αγορές στο Qingdao της επαρχίας Shandong στην Κίνα το 2015. Πραγματοποιήθηκε άμεσος έλεγχος και στα 16 δείγματα για την ανίχνευση του γονιδίου *mcr-3* και μόνο ένα δείγμα αναγνωρίστηκε ως θετικό. Το θετικό στο *mcr-3* στέλεχος με αριθμό 172 απομονώθηκε χρησιμοποιώντας BHI με 1 mg /L κολιστίνης και στη συνέχεια αναγνωρίστηκε ως *Aeromonas veronii* με ανάλυση αλληλουχίας 16S rRNA και MALDI-TOF MS (157). Ακολούθησε δοκιμή ευαισθησίας σε διάφορα είδη αντιβιοτικών, ανάμεσα τους και η κολιστίνη, στην οποία βρέθηκε οριακά ανθεκτική (2 mg/L). Το στέλεχος 172 *A. veronii* στη συνέχεια υποβλήθηκε σε Αλληλούχιση Ολόκληρου του Γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing-WGS). Αναγνωρίστηκαν δύο παραλλαγές του *mcr-3* οι οποίες έδειξαν 95,20% και 84,19% ταυτότητα νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στο αρχικό γονίδιο *mcr-3* και επομένως ονομάστηκαν *mcr-3.3* και μετάλλαγμα *mcr-3* αντίστοιχα, οι οποίες βρέθηκαν στο χρωμόσωμα της *A. veronii*. Για τον προσδιορισμό της λειτουργίας των γονιδίων *mcr-3*, τα θραύσματα DNA μεγέθους 1853-bp και 3558-bp, ενισχύθηκαν και κλωνοποιήθηκαν σε πλασμίδιο pET-28a.

Τα προϊόντα μετασχηματισμού που περιέχουν pET-*mcr-3* μεταλλάγματος δεν παρουσίασαν καμία αλλαγή στην MIC σε σύγκριση με εκείνα που περιέχουν μόνο pET28a (8 mg /L) , ενώ οι MIC των προϊόντων μετασχηματισμού που μεταφέρουν *mcr-3.3* αυξήθηκαν στα 16 mg/L υποδηλώνοντας ότι μόνο το *mcr-3.3* παρέχει αντίσταση στην κολιστίνη στο *E. coli*. Αυτά τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το *mcr-3.3*, αλλά όχι το μετάλλαγμα *mcr-3*, θα μπορούσε να προσδώσει αντίσταση στην κολιστίνη στα είδη *E. coli* και *Aeromonas*, το τελευταίο από τα οποία μπορεί όχι μόνο να χρησιμεύσει ως δεξαμενή για το μετάλλαγμα *mcr-3* αλλά και να έχει τη δυνατότητα να αναπτύξει έναν φαινότυπο υψηλής αντοχής στην κολιστίνη (157).

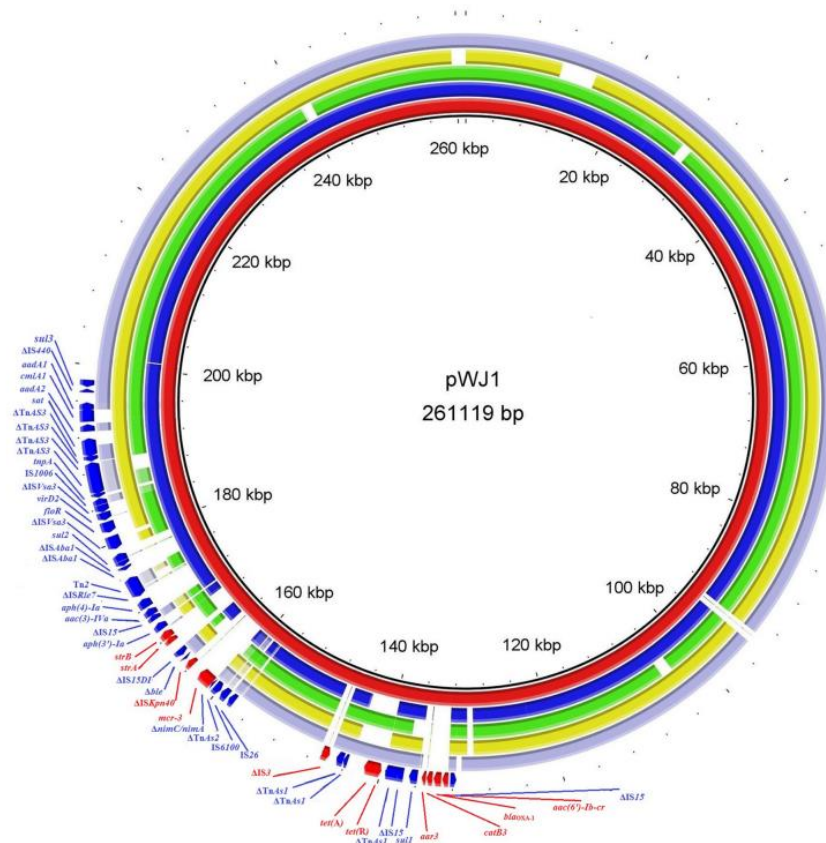
Μεταλλάκτης <i>mcr-3</i> ^β	Ανιχνεύθηκε σε ^γ	Διαφορά νουκλεοτιδίων σε σχέση με το <i>mcr-3.1</i> ή το <i>mcr-3.7</i>	Διαφορά αμινοξέων σε σχέση με την MCR-3.1 ή το MCR-3.7
3.1	<i>E. coli, K. pneumoniae, Salmonella Typhimurium, Shigella sonnei</i>	-	-
3.2	<i>E. coli, Shigella</i>	C1463T	Thr488Ile
3.4	<i>K. pneumoniae, S. sonnei</i>	G1118T	Gly373Val
3.5	<i>E. coli, Shigella</i>	A67G, C1370A, C1463T	Met23Val, Ala457Glu, Thr488Ile
3.11	<i>E. coli</i>	G1118T, CA1402-3AC	Gly373Val, Gln468Thr
3.7	<i>Aeromonas media</i>	-	-
3.12	<i>E. coli</i>	T380C+9 ακόμη διαφορές	Val127Ala

Πίνακας 5. Οι παραλλαγές του *mcr-3* καθώς και οι διαφορές στην αμινοξική και νουκλεοτιδική τους αλληλουχία (154)

^αΤα *mcr-3.3* και *mcr-3.6 – mcr-3.9* έχουν βρεθεί σε διάφορα *Aeromonas spp.* και έχουν 34-100 νουκλεοτιδικές διαφορές από το *mcr-3.1*, ενώ οι πρωτεΐνες MCR-3.3 και MCR-3.6-MCR-3.9 έχουν 11-27 διαφορές στην αμινοξική αλληλουχία από την MCR-3.1. Το *mcr-3.10* έχει βρεθεί στο *Aeromonas caniaae*, στην *E.coli* και στον *Proteus mirabilis* και έχει 19 νουκλεοτιδικές αλλαγές από το *mcr-3.1* και η MCR-3.10 έχει 7 αλλαγές αμινοξέων από το MCR-3.1.

^β Η αρίθμηση των μεταλλακτών που έχουν προσδιοριστεί από το NCBI αναγράφονται με *bold*

^γ Γένος/ είδος στο οποίο ανιχνεύθηκε ο μεταλλάκτης έως σήμερα.



Εικόνα 7. Ανάλυση BRIG του πλασμιδίου pWJ1 που φέρει το *mcr-3*. Συγκριτική ανάλυση του pWJ1 με τέσσερα στενά συνδεδεμένα πλασμίδια που φέρουν το *mcr-1*, από απομονώσεις *E.coli*, χρησιμοποιώντας το BLAST Ring Image Generator (157).

1.4.4 MCR-4

Το γονίδιο *mcr-4* με μήκος 1626 bp αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά στο *E. coli* και στη *S. enterica* με ορότυπο *Typhimurium* από χοίρους στην Ιταλία το 2013, όπως επίσης και σε στελέχη που απομονώθηκαν το χρονικό διάστημα 2015 έως 2016 στην Ισπανία και στο Βέλγιο (158). Πιο αναλυτικά το έτος 2013, ένα ανθεκτικό στην κολιστίνη (MIC= 8 mg/L⁶) στέλεχος της *S. enterica* με ορότυπο *Typhimurium* βρέθηκε σε περιεχόμενο τυφλού εντέρου χοίρου σε σφαγείο. Ο συγκεκριμένος χοίρος είχε προέλθει από μια μικρή αγέλη στην κεντρική Ιταλία (159).

Μελέτη επιτήρησης από τον Wang και τους συνεργάτες του (160) έδειξε ότι το *mcr-4* είναι ευρέως διαδεδομένο στους πληθυσμούς χοίρων και πουλερικών στην Κίνα και ότι

⁶ Η μέτρηση του MIC έγινε με τη μέθοδο του ζυμού μικροαραιώσεων (Broth Microdilution).

συχνά συνυπάρχει με τα γονίδια *mcr-1*, *mcr-3* ή *mcr-5*. Το *mcr-4* ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά σε πλασμίδιο τύπου ColE10⁷ μεγέθους 8.749 bp που μολύνει ευρείας κλίμακας βακτήρια και είναι ικανό να αντιγράφεται σε έναν μεγάλο αριθμό βακτηριακών ειδών.

Στο pMCR ένα μετάθετο στοιχείο IS₅ (ISKpn6)⁸ πλαισιώνει μια περιοχή που δείχνει 99% ομολογία με το γονιδίωμα της *Shewanella frigidimarina*. Η περιοχή της *Sh. frigidimarina* στο πλασμίδιο κωδικοποιεί μόνο μία μεγάλη πρωτεΐνη που διαθέτει αλληλουχία αμινοξέων με 82,0% και 99,0% ομολογία με φωσφοαιθανολαμινικές τρανσφεράσες που βρέθηκαν σε είδη *Shewanella* και 34,0%, 35,0% και 49,0% αμινοξική ταυτότητα με τις τρανσφεράσες που κωδικοποιούν τα *mcr-1*, *mcr-2* και *mcr-3* αντίστοιχα (143).

Επομένως, το *mcr-4* στη *Salmonella* πιθανόν να προέρχεται από τη *Sh. frigidimarina* (158) και συχνά συνυπάρχει με άλλους αντιμικροβιακούς παράγοντες όπως τους *aadA*, *tetA* και *sul* (161), τα οποία είναι κοινά σε βακτήρια που μολύνουν υδρόβια ζώα. Δεδομένου ότι η χρήση της κολιστίνης στην ιχθυοκαλλιέργεια είναι υποτιμημένη και ο αριθμός των *mcr-4* θετικών στελεχών αυξάνεται σταθερά, επικρατεί η υπόθεση ότι τα υδρόβια βακτήρια, όπως ορισμένα είδη *Shewanella*, μπορεί να είναι γενετικές δεξαμενές του *mcr-4*. Για την εξακρίβωση των παραπάνω υποθέσεων απαιτείται επιπλέον διερεύνηση (162).

Λίγο αργότερα κατά το χρονικό διάστημα Ιανουάριος 2016 έως Οκτώβριος 2017 έγινε συλλογή 106 ανθρώπινων δειγμάτων από ασθενείς που έπασχαν από γαστρεντερίτιδα εντεροβακτηριακής φύσεως από δυο νοσοκομεία της Ιταλίας. Τα δείγματα αυτά είχαν αρχικά επιλεχθεί με βάση τη μειωμένη ευαισθησία τους στην κολιστίνη (MIC \geq 2 mg /L). Μεταξύ των 67 στελεχών *E. coli*, 27 *K. pneumoniae*, 6 *Salmonella spp.* και 6 άλλων *Enterobacteriaceae* που συλλέχθηκαν, το γονίδιο *mcr-4* εντοπίστηκε σε δύο δείγματα *S. enterica* με ορότυπο *Typhimurium*. Ενώ δεν υπήρχε κάποια επιδημιολογική ή/και κοινωνική σύνδεση μεταξύ των δυο ασθενών η ανάλυση του γονιδίου με PFGE (Pulsed- Field Gel Electrophoresis) έδειξε ότι ανήκαν σε διαφορετικά υποείδη που όμως εμφάνιζαν αρκετές ομοιότητες μεταξύ τους, με μια band διαφορά. Μέχρι τα σημερινά δεδομένα αυτά τα δυο δείγματα ήταν τα πρώτα ανθρώπινα δείγματα στα οποία ανιχνεύθηκε το *mcr-4* (163).

Μια αλληλουχία μήκους 1.630 bp, πανομοιότυπη για τα δύο στελέχη ελήφθη και κατατέθηκε στην GenBank με αριθμό πρόσβασης MG581979. Η αλληλουχία MG581979

⁷ Γνωστό και ως pMCR

⁸ Το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο τρανσποζάση και συναντάται στην *Klebsiella pneumoniae*

βρέθηκε πανομοιότυπη με την αλληλουχία NG_055659.1, που ανιχνεύθηκε στους χοίρους σε σφαγείο της Ιταλίας (158), μήκους 1.629 bp, με έναν μονονουκλεοτιδικό πολυμορφισμό (Single nucleotide polymorphism-SNP) στη θέση 1.001 της αλληλουχίας MG581979 (G αντι A), προκαλώντας μετάλλαξη του Q (Γλουταμίνη) σε R (Αργινίνη) στο 331^ο αμινοξύ. Αυτή η μετάλλαξη καθορίζει το αλληλόμορφο που αναφέρεται ως *mcr-4.2* (163).

Όσον αφορά τη δομική ομοιότητα του ενζύμου MCR-1 με το MCR-4, περιέχει επίσης μια αμινοτελική διαμεμβρανική περιοχή η οποία μέσω ενός ευέλικτου συνδέτη συνδέεται με το καρβοξυτελικό του άκρο. Αξιοπρόσεκτο θεωρείται ότι, το *mcr-4* σχετίζεται περισσότερο με τον καθοριστικό παράγοντα αντοχής ErtA, που κωδικοποιείται από χρωμοσωμικό γονίδιο της *Neisseria* παρά με την οικογένεια των *mcr-1* γονιδίων. Ωστόσο, σε αντίθεση με την ErtA, τα ένζυμα *mcr-1* και *mcr-4* προσδίδουν 4 έως 8 φορές μεγαλύτερη αντίσταση στην κολιστίνη (MIC=16 µg /ml) σε έναν ευαίσθητο ξενιστή *E. coli*. Αυτό υποδηλώνει ότι έχουν ως ένα βαθμό ομοιότητες ως προς την λειτουργία παρόλο που διαφέρουν ως προς τη δομή τους. Στην πραγματικότητα, όλα τα είδη των ενζύμων MCR και ICR⁹ φαίνεται να μοιράζονται μια παρόμοια οργάνωση του ενεργού τους κέντρου και έναν κοινό μηχανισμό κατάλυσης που χαρακτηρίζεται ως «ring -rong»¹⁰ (164).

Μεταλλάκτης <i>mcr-4</i>^α	Ανιχνεύθηκε σε^β	Διαφορά νουκλεοτιδίων σε σχέση με το <i>mcr-4.1</i>	Διαφορά αμινοξέων σε σχέση με την MCR-4.1
4.1	<i>E. coli, Salmonella spp.</i>	-	-
4.2	<i>E.coli, Salmonella Typhimurium</i>	A992G	Gln331Arg
4.3	<i>Enterobacter cloacae</i>	T536G, G706T	Val179Gly, Val236Phe

⁹ Εγγενή γονίδια αντοχής στην κολιστίνη (Intrinsic Colistin Resistance- ICR), που υπάρχει στην *Moraxella osloensis*, τα οποία φυλογενετικά είναι κοντά στην οικογένεια MCR-1/2, επισημαίνοντας την εξέλιξη της μεταβιβάσιμης αντίστασης στην κολιστίνη (228).

¹⁰Αναφέρεται σε αντιδράσεις διπλής εκτόπισης ή πιγκ-πονγκ όπου απελευθερώνεται προϊόντα προτού προσδεθούν όλα τα υποστρώματα στο ένζυμο. Το χαρακτηριστικό σε αυτές τις αντιδράσεις είναι η ύπαρξη ενός υποκατεστημένου ενζυμικού ενδιάμεσου, στο οποίο τροποποιείται προσωρινά το ένζυμο (225).

4.4	<i>E. coli</i>	C613A, A992G	His205Asn, Gln331Arg
4.5	<i>E. coli</i>	C329T, A992G	Pro110Leu, Gln331Arg
4.6	<i>Salmonella Kedougou</i>	-	Val236Phe

Πίνακας 6 . Παραλλαγές του *mcr-4*, καθώς και οι διαφορές στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων και των αμινοξέων σε άλλα είδη εκτός της *Shewanella*.

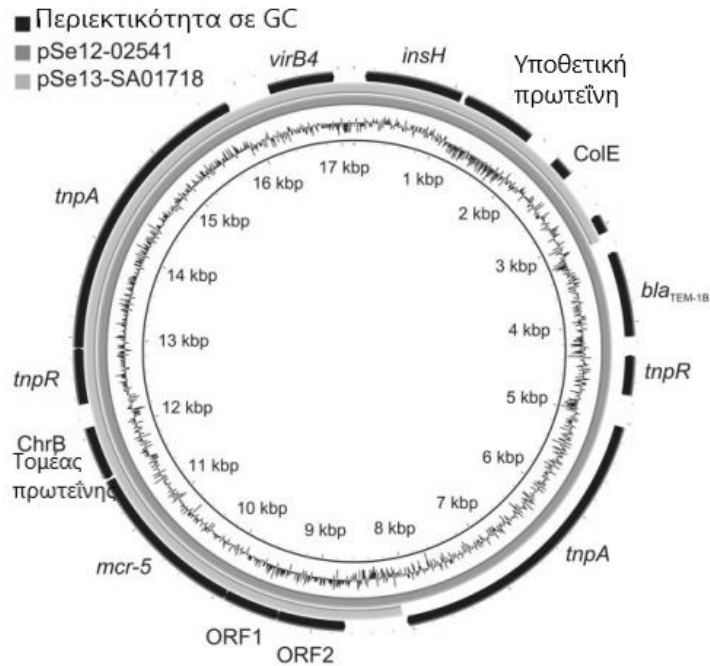
^α Η αρίθμηση των μεταλλακτών που έχουν προσδιοριστεί από το NCBI αναγράφονται με *bold*.

^β Γένος/ είδος στο οποίο ανιχνεύθηκε ο μεταλλάκτης έως σήμερα (154).

1.4.5 MCR-5

Το γονίδιο *mcr-5* (με αριθμό πρόσβασης στην GenBank: KY807921) βρέθηκε για πρώτη φορά στη *Salmonella Paratyphi B dTa+* σε πουλερικά στη Γερμανία σε δείγματα που απομονώθηκαν από το 2011 έως το 2013. Για τον εντοπισμό του εν λόγω γονιδίου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της Αλληλούχησης Ολόκληρου του Γονιδιώματος, η οποία έδειξε φαινότυπο μη wild-type δηλαδή μεταλλαγές που του προσφέρουν αντοχή στα παρακάτω αντιβιοτικά: αμπικιλίνη, σιπροφλοξασίνη, κολιστίνη, ναλιδιξικό οξύ, σουλφαμεθοξαζόλη, τετρακυκλίνη και τριμεθοπρίμη. Το *mcr-5* με μήκος 1.644 bp εντοπίστηκε σε ένα τρασποζόνιο οικογένειας Tn3 με μήκος 7.337 bp που βρίσκεται εντός πλασμιδίου τύπου ColE μεγέθους 12.201 bp που χαρακτηρίζεται ως pSE13- SA01718 (165).

Μετά από αυτά τα ευρήματα, 31 επιπλέον δείγματα *S. enterica* με ορότυπο *Paratyphi B dTa+* αποδείχτηκαν *mcr-1*, *mcr-2* και *mcr-3* αρνητικά (με MIC=2 mg /L για την κολιστίνη) που ελήφθησαν κατά τα χρονικά διαστήματα 2011 έως 2016 και προέρχονται από ζώα που προορίζονται για βρώση. Συνολικά 11 στελέχη με παρόμοιο φαινοτυπικό μοτίβο με το pSE13- SA01718 καθώς και δύο επιπλέον στελέχη (μη wild type φαινότυπος για σιπροφλοξασίνη, κολιστίνη, ναλιδιξικό οξύ και τριμεθοπρίμη) βρέθηκαν να είναι θετικά για το *mcr-5* (165).



Εικόνα 8. Δομή των πλασμιδίων *pSE13-SA01718* και *pSE12-02541* στα οποία εδράζεται το γονίδιο *mcr-5*. Τα πλασμίδια απομονωθήκαν από *Salmonella Paratyphi B dTa+* από τα στελέχη 13-SA01718 και 12-02541 (165).

1.4.6 MCR-6

Σε μελέτη του AbuOun και των συνεργατών του, εξετάστηκε η αρνητική κατά Gram χλωρίδα των χοίρων στη Μεγάλη Βρετανία από το 2014 έως το 2015 για την παρουσία γονιδίων που σχετίζονται με την αντοχή στην κολιστίνη, *mcr-1* και *mcr-2*, χρησιμοποιώντας WGS (166).

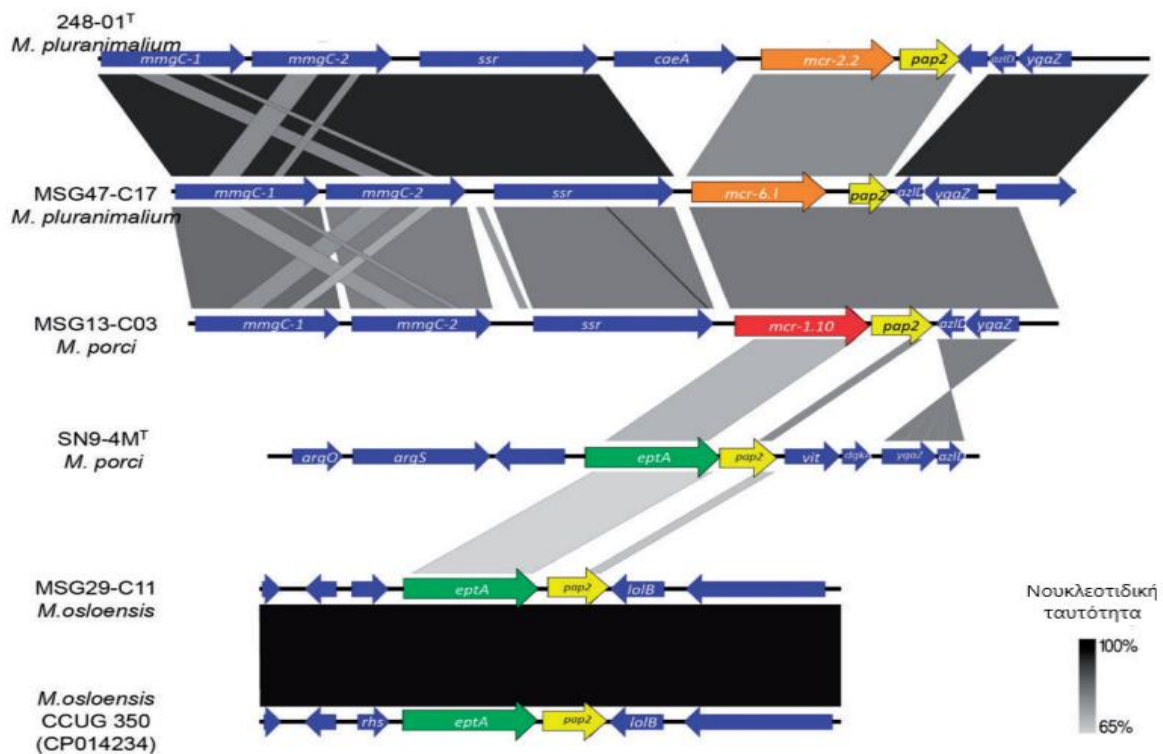
Συλλέχθηκαν συνολικά 657 Gram αρνητικά βακτήρια από υγιείς χοίρους σε 57 κτηνοτροφικές μονάδες. Οργανώθηκαν pool δειγμάτων από το τυφλό έντερο χοίρων. Τα βακτήρια που απομονώθηκαν τα οποία περιελάμβαναν είδη *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella* και *Moraxella*, καλλιεργήθηκαν σε Brilliance UTI Agar που περιείχε 1mg/L σεφοξίτινη, 1 mg/L σιπροφλοξασίνη ή δεν περιείχε κανένα αντιβιοτικό. Ως στελέχη αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν τα βακτήρια *Moraxella pluranimalium* (248-01T/DSM-22804) και *Moraxella porci* (SN9-4MT/ DSM-25326) από το Ινστιτούτο Leibniz DMSZ της Γερμανίας (166).

Τα είδη *Moraxella* είναι από τα λιγότερο κοινά Gram αρνητικά βακτήρια που αποικίζουν το έντερο, ενώ σπάνια προκαλούν μόλυνση στον άνθρωπο, παράδειγμα αποτελεί

η *Moraxella osloensis* ή στους χοίρους, παράδειγμα αποτελεί η *M. porci*, περιλαμβάνοντας όμως και συμβιωτικά είδη όπως η *M. pluranimalium* (166) (167) (168).

Από την αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος των 657 Gram αρνητικών βακτηρίων που βρέθηκαν σε χοίρους από κτηνοτροφικές μονάδες της Μεγάλης Βρετανίας απομονώθηκαν οκτώ στελέχη *Moraxella spp.* (έξι ταυτοποιημένα ως *M. osloensis*, ένα ως *M. Porci* και ένα ως *M. pluranimalium*) τα οποία διαπιστώθηκε ότι φιλοξενούν ομόλογα των *mcr* γονιδίων (166).

Η ανάλυση των στελεχών τύπου *M. pluranimalium* MSG47-C17 έδειξε μια μεταλλαγή της MCR-2 που αρχικά ονομάστηκε MCR-2.1 αλλά κατόπιν έλαβε το όνομα MCR- 6.1 (MF176239). Αναλύσεις της MCR-6.1 έδειξαν 65 υποκαταστάσεις αμινοξέων, δηλαδή 87,9% αμινοξική ταυτότητα σε σύγκριση με την MCR-2 που βρέθηκε σε *E. coli* και υποκαταστάσεις 66 αμινοξέων, δηλαδή 87,8% ταυτότητα αμινοξέων, σε σύγκριση με την MCR-2.2 από *M. pluranimalium* 248-01^T. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την MCR-6.1 βρέθηκε ότι είναι χρωμοσωμικής προέλευσης (166).



Εικόνα 9. Χρωμοσωμική διάταξη γονιδίων *eptA*, *mcr-1*, *mcr-2* και *mcr-6.1* σε είδη *Moraxella*. Απεικονίζονται γονίδια *mcr* και άλλα γονίδια. Τα υποθετικά γονίδια έχουν μείνει κενά. Τα σκιασμένα παραλληλόγραμμα μεταξύ κάθε αλληλουχίας υποδηλώνουν την νουκλεοτιδική ταυτότητα μεταξύ τους (166).

1.4.7 MCR-7

Το 2017 ομάδα ερευνητών στην Κίνα, εντόπισε ένα νέο κινητό γονίδιο φωσφοαιθανολαμινικής τρανσφεράσης που προκαλεί αντίσταση στην κολιστίνη, το *mcr-7.1* μήκους 1.620 bp σε στελέχη *K. pneumoniae* που απομονώθηκαν σε κοτόπουλα στην Κίνα. Το *mcr-7* βρέθηκε σε πλασμίδιο τύπου IncI2 το οποίο ονομάζεται pSC20141012. Ακόμη στο συγκεκριμένο πλασμίδιο διαπιστώθηκε ότι εδρεύει το γονίδιο β- λακταμάσης, *bla_{CTX-M-55}* (169).

Συνολικά, συλλέχθηκαν 183 δείγματα απο *K. pneumoniae* από το 2010 έως το 2015 σε πουλερικά σε 13 επαρχίες στην Κίνα. Αυτά τα προϊόντα απομόνωσης συλλέχθηκαν από διάφορα όργανα αλλά και από το πεπτικό σύστημα και από επιχρίσματα κοπράνων.

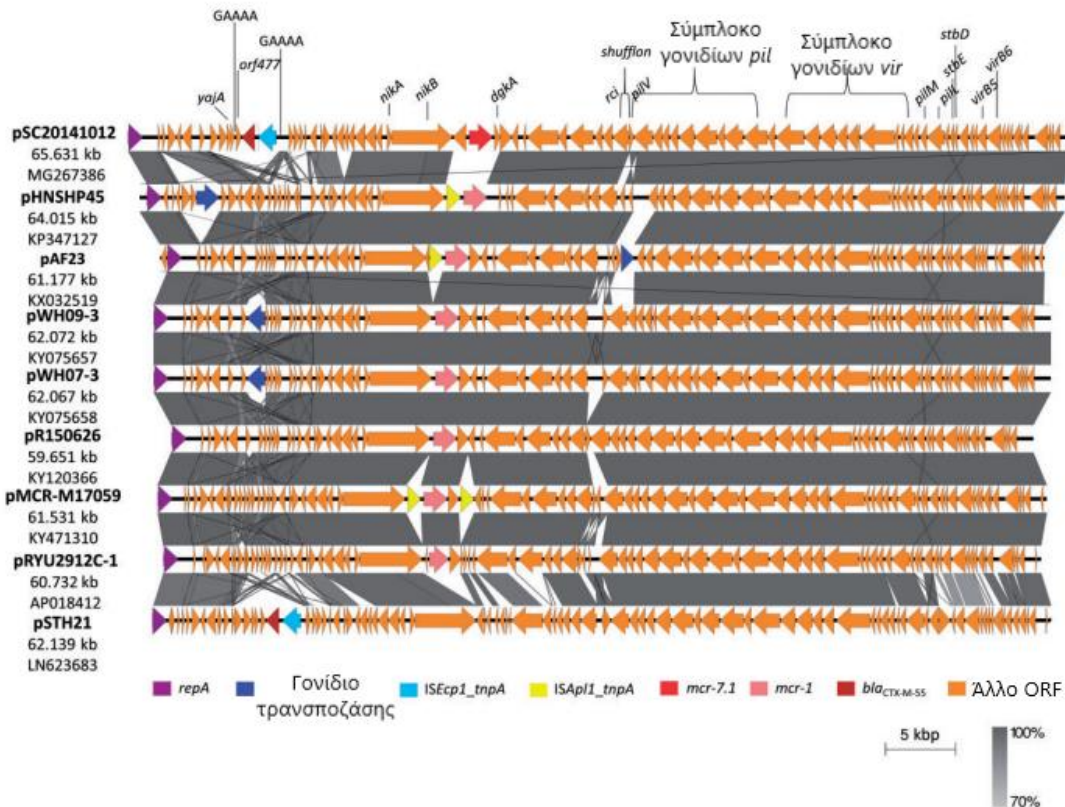
Όλα τα προϊόντα απομόνωσης εξετάστηκαν για ευαισθησία σε αντιμικροβιακούς παράγοντες, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο διάχυσης δίσκου και προσδιορισμού MIC για την ευαισθησία στην κολιστίνη σύμφωνα με τις οδηγίες του CLSI. Η MIC για τα ανθεκτικά στην κολιστίνη στελέχη προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας Broth Microdilution (170).

Η δυνατότητα μεταφοράς των πλασμιδίων διερευνήθηκε με τη διεξαγωγή πειραμάτων σύζευξης. Απομονώσεις που εμφάνιζαν αντίσταση στην κολιστίνη χρησίμευσαν ως δότες και το *E. Coli J53Az'* χρησίμευσε ως δέκτης. Επιλέχθηκαν διασυζευγμένα στελέχη σε τρυβλία Mueller – Hinton άγαρ που περιείχαν κολιστίνη σε συγκέντρωση 2 mg /L. Τα θετικά στο *mcr-7.1* επιβεβαιώθηκαν με δοκιμή αντιμικροβιακής ευαισθησίας και αλληλούχιση κατά Sanger (171).

Εν συνεχεία, διερευνήθηκε η έκφραση του *mcr-7.1* χρησιμοποιώντας έναν φορέα έκφρασης. Ως φορέας έκφρασης χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *E. Coli* BL21 (DE3). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η MCR-7.1 εκφράστηκε και είχε κατά προσέγγιση μοριακή μάζα 60 kDa. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που φέρει *mcr-7.1* σε *E. Coli* BL21, το οποίο έδωσε MIC 4 mg /L, παρουσίασε μια 8-πλάσια αύξηση σε σύγκριση με τον κενό φορέα (0,5 mg /L).

Το pSC20141012 αναλύθηκε για να διερευνηθεί το γενετικό υπόβαθρο του *mcr-7.1*. Δεν βρέθηκε κινητό στοιχείο στις πλευρικές περιοχές του. Είναι πιθανό ότι το *mcr-7.1* «ακινητοποιήθηκε» στο πλασμίδιο μετά την απώλεια των πλευρικών στοιχείων IS. Η ανάλυση BLAST αποκάλυψε ότι μια περιοχή 3.264 bp που ευθύνεται για τη μεταφορά του *mcr-7.1*, άνωθεν της αλληλουχίας *nikB* στο pSC20141012, δεν ταιριάζει με τη συνηθισμένη δομή του IncI2 και ότι ένα τμήμα του (2.000 bp) ταιριάζει με το αντίστοιχο τμήμα της *Aeromonas*, με ταυτότητα 77% (169).

Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι, όπως η MCR-3, έτσι και η MCR-7.1 προέρχονται από είδη *Aeromonas*. Ο έλεγχος για το γονίδιο *mcr-7.1* στα ζώα, το περιβάλλον και τους ανθρώπους είναι απαραίτητος για την κατανόηση της διάδοσής του σε όλο τον κόσμο (169).



Εικόνα 10. Ευθυγράμμιση πλασμιδίων τύπου IncI2 που φέρουν γονίδια *mcr* και / ή *bla_{CTX-M-55}*. Οι σκιασμένες περιοχές με γκρι χρώμα δείχνουν ομόλογες περιοχές με νουκλεοτιδική ταυτότητα 70% - 100%. Τα ORF απεικονίζονται με βέλη για να δείξουν την κατεύθυνση της μεταγραφής και χρωματίζονται με βάση τις προβλεπόμενες γονιδιακές τους λειτουργίες (169).

1.4.8 MCR-8

Η ταχεία αύξηση της αντοχής στην καρβαπενέμη μεταξύ αρνητικών κατά Gram βακτηρίων έχει στρέψει το ενδιαφέρον στα αντιβιοτικά των πολυμιξινών. Ωστόσο, η πρόσφατη εμφάνιση γονιδίων αντοχής στην κολιστίνη μεταφερόμενων από πλασμίδια ειδικά το *mcr-1* που εντοπίζεται κυρίως σε ανθεκτικά στην καρβαπενέμη *Enterobacteriaceae* αποτελεί μια σοβαρή απειλή για την παγκόσμια υγεία (172).

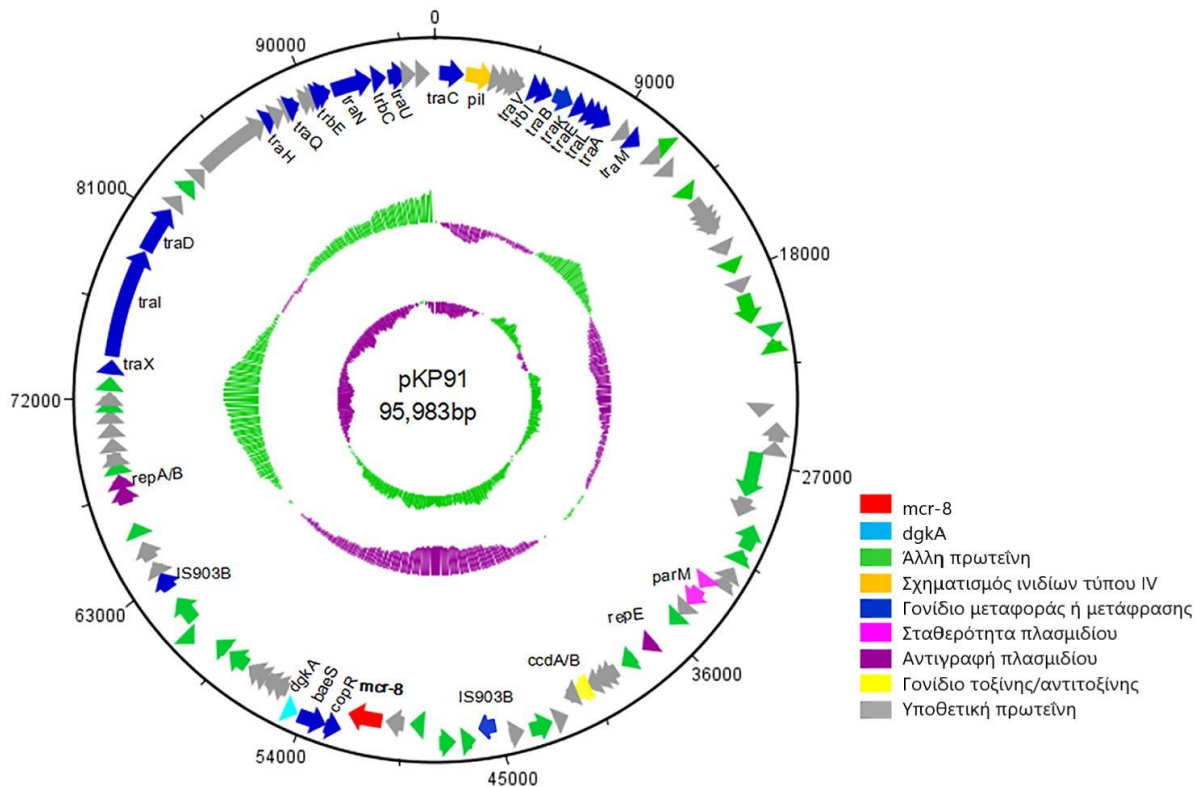
Κατά την περίοδο από το 2015 έως το 2017, μελέτες επιτήρησης στην Κίνα έδειξαν αυξημένο αριθμό στελεχών *K. pneumoniae* που εμφανίζουν αντοχή στην κολιστίνη, τα οποία όμως ελέγχθηκαν για τα γονίδια *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* και *mcr-5* και απουσίαζαν.

Απομονώθηκε γενετικό στοιχείο από στέλεχος *K. pneumoniae*, ονομαζόμενο ως KP91, από δείγμα κοπράνων χοίρων. Το προϊόν απομόνωσης παρουσίασε προφίλ αντοχής σε πολλαπλά αντιβιοτικά, συμπεριλαμβανομένης της αντοχής στην κολιστίνη (MIC=16 µg /ml). Αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος ανέδειξε ότι το KP91 ανήκε στην κατηγορία πλασμιδίων ST42 και περιείχε πολλαπλά γονίδια αντιμικροβιακής αντοχής, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων ανθεκτικότητας σε β-λακτάμες (*bla_{SHV-1}* και *bla_{CTX-M-14}*), γονίδια αντοχής σε αμινογλυκοσίδες (*strA*, *strB*, *armA* και *aph (4) -Ia*), γονίδια αντοχής σε μακρολίδες (*mph (E)* και *msr (E)*), γονίδια αντοχής σε κινολόνες (*oqxA* και *qnrB4*), γονίδια ανθεκτικότητας σε σουλφοναμίδες (*sul1*, *sul2* και *sul3*), γονίδια αντοχής σε τετρακυκλίνη (*tet (A)*, *tet (B)* και *tet (34)*), και γονίδιο ανθεκτικότητας στην τριμεθοπρίμη (*dfrA12*). Επιπλέον, το KP91 έφερε επίσης πολλά γονίδια μολυσματικότητας, συμπεριλαμβανομένων των *kfuC*, *mrkABCDF*, *irp2*, *iucA* και *iucB*, τα οποία έχουν συσχετιστεί με λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, σηψαιμία και πνευμονία (173)· (174)· (175).

Για να χαρακτηριστούν οι καθοριστικοί παράγοντες που προσφέρουν αντίσταση στην κολιστίνη, χρησιμοποιήθηκε η μονομοριακή αλληλούχιση πραγματικού χρόνου (Single-Molecule Real Time Sequencing- SMRT Sequencing). Έτσι αποκαλύφθηκε η πλήρης αλληλουχία του πλασμιδίου που απομονώθηκε από το συζευγμένο J53-pKP91. Η αλληλουχία SMRT αποκάλυψε ότι το πλασμίδιο pKP91 είχε μέγεθος 95.983 bp. Η ανάλυση BLAST αναγνώρισε ένα πλαίσιο ανοιχτής ανάγνωσης (Open Reading Frame- ORF) 1.698 bp που κωδικοποιεί μια πιθανή τρανσφεράση φωσφοαιθανολαμίνης, η οποία έδειξε 50,23% ταυτότητα νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στην αντίστοιχη περιοχή του *mcr-3*. Η αλληλουχία αμινοξέων αυτού του ORF έδειξε 31.08%, 30.26%, 39.96%, 37.85%, 33.51%, 30.43% και 37.46% ταυτότητα αλληλουχίας αμινοξέων με MCR-1, MCR-2, MCR-3, MCR- 4, MCR-5, MCR-6 και MCR-7, αντίστοιχα. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι το γονίδιο *mcr-8* μπορεί να κωδικοποιεί μια λειτουργική φωσφοαιθανολαμινική τρανσφεράση που προσφέρει αντοχή έναντι της κολιστίνης τόσο στην *K. pneumoniae* όσο και στην *E.coli*. Επιπλέον, η έκφραση αυτού του απλού ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης στα *E. Coli* DH5a και *K. Pneumoniae* ATCC13883 είχε ως αποτέλεσμα τέσσερις και οκτώ φορές αύξηση, αντίστοιχα, στην MIC της κολιστίνης, η οποία επιβεβαίωσε περαιτέρω τη λειτουργία του γονιδίου. Αυτό το γονίδιο χαρακτηρίστηκε ως *mcr-8* (172).

Η ανάλυση BLAST του *mcr-8* αποκάλυψε ότι αυτό το γονίδιο υπήρχε σε στέλεχος *K. Pneumoniae* (WCHKP1845) ανθεκτικό σε κολιστίνη και καρβαπενέμη που απομονώθηκε από

τα πύελα ενός ασθενούς με συμπτώματα πνευμονίας στη ΜΕΘ ενός νοσοκομείου το 2016 στην Κίνα. Ευρήματα έδειξαν ότι το *mcr-8* υπάρχει εδώ και αρκετό διάστημα και έχει διαδοθεί μεταξύ στελεχών *K. pneumoniae* ζωικής και ανθρώπινης προέλευσης, αυξάνοντας περαιτέρω το βάρος της δημόσιας υγείας για την αντιμικροβιακή αντοχή (176).



Εικόνα 11. Οι κύκλοι παρουσιάζουν το πλασμίδιο pKP91 από έξω προς τα μέσα: α) το μέγεθος σε bp και β) τους γενετικούς τόπους των μεταγραφόμενων αλληλουχιών σε δεξιόστροφο προσανατολισμό (172).

1.4.9 MCR-9

Το 2019 αναφέρεται για πρώτη φορά το νέο ομόλογο *mcr*, το *mcr-9*, το οποίο αναγνωρίστηκε σε έναν ορότυπο *Salmonella enterica* Typhimurium (177).

Το *mcr-9* αρχικά ανιχνεύθηκε σε γονιδίωμα πολυανθεκτικού στελέχους *S. Typhimurium* HUM_TYRH_WA_10_R9_3274 το οποίο απομονώθηκε από έναν ασθενή στην πολιτεία της Ουάσιγκτον το 2010. Προτού βρεθεί σε αυτό το στέλεχος το γονίδιο *mcr-9*, είχε ελεγχθεί στο παρελθόν για αντιμικροβιακή αντοχή σε ένα πάνελ 12 αντιβιοτικών, που δεν περιελάμβανε

όμως την κολιστίνη (178). Με την συμβολή του ABRicate¹¹ προσδιορίστηκαν 20 γονίδια αντοχής σε αντιβιοτικά χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων ResFinder με ελάχιστη ταυτότητα και κάλυψη 75% και 50% αντίστοιχα (179), κανένα από τα οποία δεν προσέδιδε την αντοχή στην κολιστίνη. Τέσσερα αντίγραφα πλασμιδίου, συμπεριλαμβανομένων των IncHI2 και IncHI2A, ανιχνεύθηκαν με τουλάχιστον 80% ταυτότητα και 60% κάλυψη χρησιμοποιώντας το ABRicate και το PlasmidFinder (180).

Η αλληλουχία αμινοξέων του *mcr-9* ομοιάζει με εκείνη των *mcr-3* και *mcr-7*. Η ανάλυση translated nucleotide BLAST (181) φανέρωσε το *mcr-3.17* ως το αλληλόμορφο που φέρει τις περισσότερες κοινές περιοχές με το *mcr-9*, με ταυτότητα αμινοξέων 64,5% και κάλυψη 99,5%. Ωστόσο, το *S. Typhimurium* στο οποίο ανιχνεύθηκε το *mcr-9*, δεν βρέθηκε ανθεκτικό στην κολιστίνη σε συγκέντρωση 2 mg /L όταν χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος BMD, σύμφωνα με τα πρότυπα που ορίζει η EUCAST (177) .

Το *mcr-9* παρέχει αντίσταση στην κολιστίνη όταν κλωνοποιείται σε ευαίσθητο στην κολιστίνη *E. coli* NEB5. Οι περιοχές του γονιδιώματος που κωδικοποιούν τα γονίδια *mcr-9* και *mcr-3* κλωνοποιήθηκαν υπό τον έλεγχο του IPTG (ισοπροπυλο β-d-1-θειογαλακτοπυρανοσίδιο)¹² που προκαλείται από τον χειριστή SPAC / lacOid και εκφράζεται σε *E.coli* NEB5 (177).

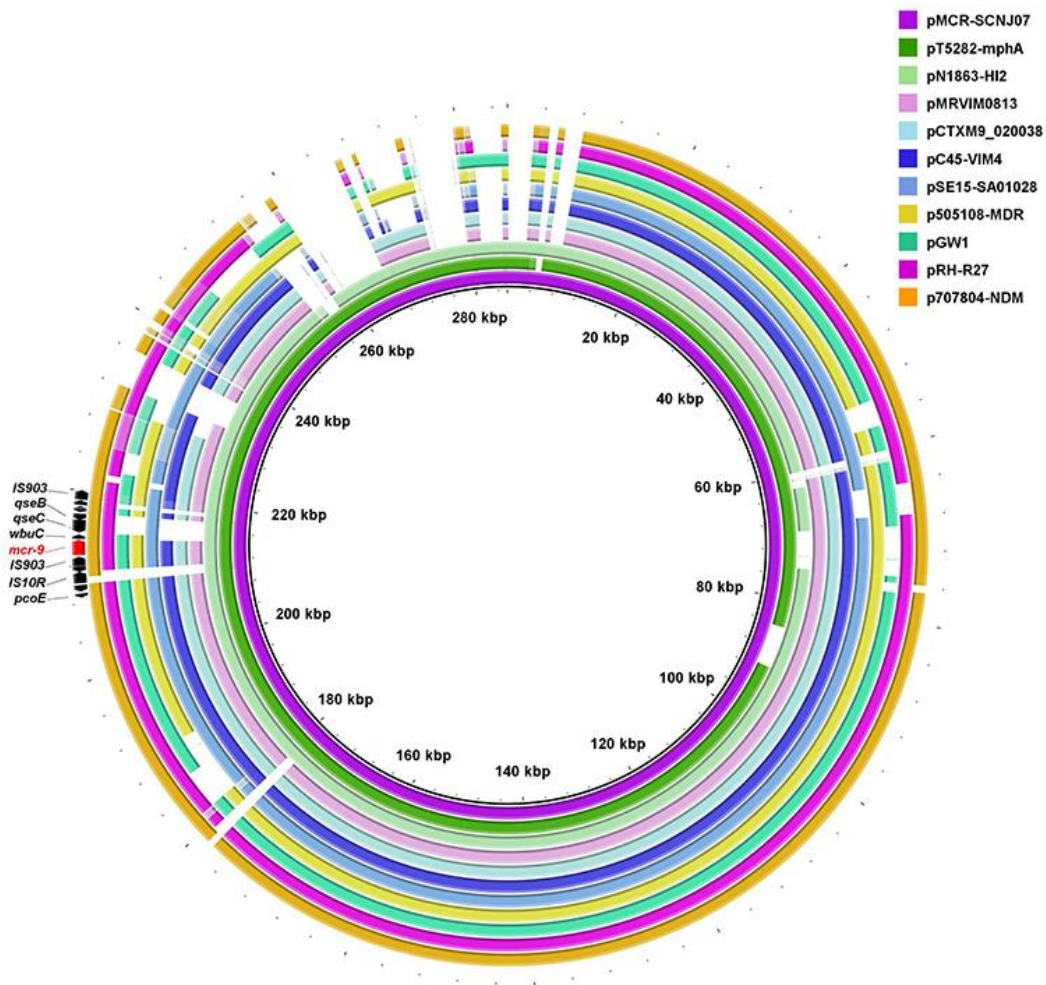
Διεξήχθησαν δοκιμές θανάτωσης σε κολιστίνη με επώαση του *E. coli* που περιείχε τον κενό φορέα rLIV2 (αρνητικός μάρτυρας), rLIV2 με *mcr-3* (θετικός μάρτυρας) ή rLIV2 με *mcr-9* με διαφορετικές συγκεντρώσεις κολιστίνης (0, 1, 2, 2.5, και 5 mg /L). Κύτταρα *E. coli* που έφεραν τον κενό φορέα απέτυχαν να επιβιώσουν σε όλες τις δοκιμασμένες συγκεντρώσεις κολιστίνης > 0 mg /L. Ενώ η έκφραση *mcr-3* παρείχε κλινικά επίπεδα αντοχής της *E. coli* στην κολιστίνη (δηλαδή, πέρα από το όριο αντοχής των 2 mg /L όπως ορίζει η EUCAST) σε όλες τις δοκιμασμένες συγκεντρώσεις. Η έκφραση *mcr-9* παρείχε κλινική αντοχή στα 1, 2 και 2,5 mg /L, αλλά όχι στα 5 mg /L κολιστίνης (177).

¹¹ Μαζικός έλεγχος αλληλουχιών για ύπαρξη γονιδίων αντιμικροβιακής αντοχής ή μολυσματικότητας. Συνοδεύεται από επτά βάσεις δεδομένων: Resfinder, CARD, ARG-ANNOT, NCBI BARRGD, NCBI, EcoH, PlasmidFinder και VFDB.

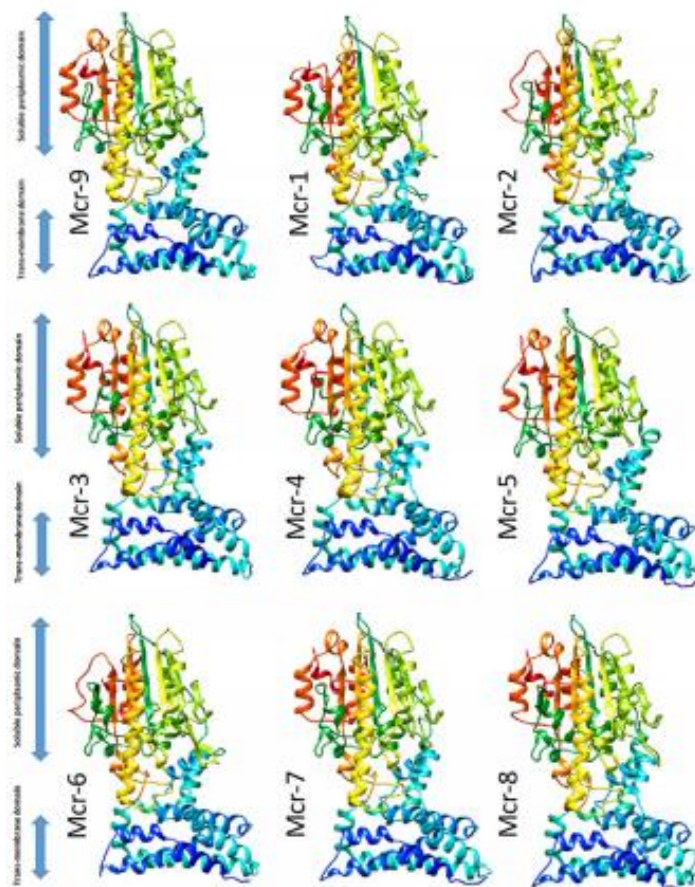
¹²Η ένωση αυτή είναι μοριακός μιμητής της αλλολακτόζης, ενός μεταβολίτη λακτόζης που ενεργοποιεί τη μεταγραφή του οπερονίου lac, και επομένως χρησιμοποιείται για την πρόκληση έκφρασης πρωτεΐνης όπου το γονίδιο είναι υπό τον έλεγχο του χειριστή lac (229)

Οι πολλαπλές αναζητήσεις του *mcr-9* στη βάση δεδομένων NCBI αποκάλυψαν ότι το *mcr-9* ήταν παρόν σε ποικίλα γένη *Enterobacteriaceae*. Το *mcr-9* ανιχνεύθηκε σε 335 γονιδιώματα που συνδέονται με τις ίδιες πρωτεϊνικές ομάδες στην NCBI (Identical Protein Groups- IPGs). Η ανάλυση του υποκινητή του *mcr-9* σε 321 από αυτά τα γονιδιώματα έδειξε συντηρημένες αλληλουχίες. Το συντηρημένο μοτίβο DNA στον υποκινητή *mcr-9* είναι πιθανώς μια αλληλουχία αναγνώρισης για έναν παράγοντα μεταγραφής, υποδηλώνοντας ότι ενδέχεται να απαιτούνται πρόσθετοι παράγοντες ή αλλαγές στις συνθήκες επαγωγής /καταστολής για πλήρη έκφραση του wild type *mcr-9*. Η παραλλαγές του υποκινητή (182) και οι συνθήκες της μεταγραφής (183) (184) έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν την έκφραση των *mcr* γονιδίων ακολούθως και την MIC της κολιστίνης, το οποίο μπορεί να εξηγήσει γιατί το στέλεχος *S. Typhimurium* στο οποίο αρχικά ανιχνεύθηκε το *mcr-9* ήταν ευαίσθητο στην κολιστίνη υπό τις συνθήκες που ορίζει η EUCAST (177).

Από τα 335 γονιδιώματα στα οποία ανιχνεύθηκε το *mcr-9*, τα 65 είχαν τουλάχιστον ένα αντίγραφο πλασμιδίου τα οποία ανιχνεύθηκαν χρησιμοποιώντας ABRicate και PlasmidFinder. Σε 59 από αυτά τα 65 γονιδιώματα, τα αντίγραφα IncHI2 και / ή IncHI2A ανιχνεύθηκαν στην ίδια συνεχόμενη αλληλουχία με το *mcr-9*. Σε 32 από τα 37 κλειστά πανγονιδιώματα στα οποία ανιχνεύθηκε, το *mcr-9* εδράζονταν σε πλασμίδιο. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το *mcr-9* δύναται να μειώσει την ευαισθησία στην κολιστίνη, έως και πέρα από το όριο αντοχής της EUCAST, και μπορεί να βρεθεί εξωχρωμοσωμικά σε πολλά είδη *Enterobacteriaceae*, καθιστώντας το απειλή για τη δημόσια υγεία (177).



Εικόνα 12. Κυκλική σύγκριση πλασμιδίων *IncHI2* που φέρουν το γονίδιο *mcr-9*. Η πλήρης αλληλουχία του *pMCR-SCNJ07* χρησιμοποιήθηκε ως αναφορά. Τα βέλη δείχνουν τα συναγόμενα ORF και τους προσανατολισμούς τους. Το γονίδιο *mcr-9* υποδεικνύεται με κόκκινο χρώμα. Οι κύκλοι δημιουργήθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα BRIG. Τα πλασμίδια από έξω προς τα μέσα είναι τα εξής: *pMCR-SCNJ0*, *pT5282-mphA*, *pN1863-HI2*, *pMRVIM0813*, *pCTXM9_020038*, *pC45-VIM4*, *pSE15-SA01028*, *p505108-MDR*, *pGW1*, *pRH-R27* και *p707804-NDM* (185).



Εικόνα 13. Δομικά μοντέλα των πρωτεϊνών MCR-1 έως MCR-9 με βάση τον λιποολιγοσακχαρίτη φωσφοαιθανολαμινική τρανσφεράση (*EptA*). Τα μοντέλα κατασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας τον διακομιστή *Rhyge2*, και οι δομές επεξεργάστηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα *UCSF Chimera*. Τα δομικά μοντέλα δείχνουν τη διατήρηση ανάμεσα σε δύο περιοχές της *EptA*: τις διαμεμβρανικά αγκυροβολημένες και τις διαλυτές περιπλασματικές περιοχές (177).

1.4.10 MCR-10

Το 2020 εντοπίστηκε ένα νέο γονίδιο *mcr* στο στέλεχος 090065 του *Enterobacter roggenkampii*. Το *mcr-10* παρουσίασε αυξημένη ομολογία νουκλεοτιδίων (79,69%) με το γονίδιο *mcr-9* και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη MCR-10 με 82,93% ομοιότητα στην αμινοξική αλληλουχία της MCR-9. Το *mcr-10* παρέχει τετραπλάσια αύξηση στην MIC της κολιστίνης (από 1 έως 4 mg /L) όταν κλωνοποιείται σε ένα ευαίσθητο στέλεχος *E. roggenkampii*. Αυτό υποδηλώνει ότι το *mcr-10* αποτελεί ένα γονίδιο αντοχής στην κολιστίνη. Αξίζει να σημειωθεί ότι το στέλεχος 090065 που φέρει το *mcr-10* ήταν ευαίσθητο στην κολιστίνη (MIC= 2 mg /L), ενώ το αρχικά ευαίσθητο σε κολιστίνη στέλεχος *E. roggenkampii* έγινε ανθεκτικό στην

κολιστίνη (MIC= 4 mg /L) μετά τη κλωνοποίηση του με *mcr-10*. Η απόκλιση στην ευαισθησία στην κολιστίνη είναι πιθανό να οφείλεται στο ότι η έκφραση του *mcr-10* φέρεται από ένα μεγάλο πλασμίδιο που απαντάται φυσικά στο στέλεχος 090065 αλλά κλωνοποιήθηκε σε φορέα μικρού μεγέθους pBC SK στο στέλεχος 120033, εύρημα που δημιουργεί την ανάγκη για περαιτέρω έρευνα. Αποκαλύφθηκε ακόμη ότι το *mcr-10* πλαισιώνονταν από το IS903 σε ένα πλασμίδιο IncFIA στο στέλεχος 090065, υποδεικνύοντας ότι το *mcr-10* έχει τη δυνατότητα να είναι κινητό. Βρέθηκε επίσης ότι το *mcr-10* υπήρχε σε μερικά γένη της οικογένειας *Enterobacteriaceae* με παγκόσμια κατανομή (186).

Η πρώτη αντιστοιχία του *mcr-10* στην GenBank ήταν το πλασμίδιο pOZ172 ενός κλινικού στελέχους *Citrobacter freundii*, το οποίο ανακτήθηκε το 1998 στο Guangzhou της νότιας Κίνας, γεγονός που σημαίνει ότι το *mcr-10* μεταφέρεται σε πλασμίδια μεταξύ ειδών *Enterobacteriaceae* για δεκαετίες (186).

Όπως η MCR-9 (177) (187) έτσι και η MCR-10 δείχνει σημαντική αμινοξική ταυτότητα με χρωμοσωμικά κωδικοποιημένες φωσφοαιθανολαμινικές τρανσφεράσες διαφόρων ειδών *Buttiauxella*, που ονομάζονται MCR-B, από 79,04% με αυτές της *Buttiauxella agrestis* έως 83,67% με εκείνες της *Buttiauxella gaviniae*. Ο μεγάλος αριθμός και η διάχυτη κατανομή των παραλλαγών των αμινοξέων μεταξύ των πρωτεϊνών MCR-10 και MCR-B υποδηλώνουν ότι το MCR-10 δεν προέρχεται άμεσα από αυτά τα είδη *Buttiauxella* αλλά μπορεί να προήλθε από ένα είδος που δεν έχει ακόμη εντοπιστεί και σχετίζεται με γνωστά είδη *Buttiauxella* (186)

1.5 Εντόπιση γονιδίων *mcr* σε παγκόσμια κατανομή

Η ταχεία εξάπλωση γονιδίων τύπου *mcr* δημιούργησε μια βαθιά ανάγκη για επαγρύπνηση, καθώς αυτά τα γονίδια έχουν εντοπιστεί σε διαφορετικές πηγές, συμπεριλαμβανομένων ανθρώπων, ζώων, τροφίμων και του περιβάλλοντος (188), (189). Η εμφάνιση γονιδίων τύπου *mcr* καθιστά απαραίτητη την επιδημιολογική επιτήρηση (190).

Επειδή η κολιστίνη χρησιμοποιήθηκε ελάχιστα στην ιατρική από το 1970 έως το 1994 (191), αλλά συνήθως χρησιμοποιούνταν στην κτηνοτροφία για περισσότερα από 50 χρόνια, είναι σαφές ότι η επιλεκτική πίεση για την κολιστίνη εξελίχθηκε λόγω κτηνιατρικής χρήσης (141), (192). Βιβλιογραφικά δεδομένα δείχνουν ότι σε όλο τον κόσμο, οι άνθρωποι και ειδικότερα τα ζώα αποικίζονται από κοινά και δυνητικά παθογόνα που είναι ανθεκτικά στην κολιστίνη περιέχοντας ενδεχομένως γονίδια αντοχής στην κολιστίνη (193), (194), (195). Η

ταχεία παγκόσμια εξάπλωση των παθογόνων αυτών είχε ως αντίκτυπο να περιοριστούν οι θεραπευτικές επιλογές, όπως η τιγκεκυκλίνη.

Στην Ασία, οι επιφάνειες σε κτηνοτροφικές μονάδες αναφέρθηκαν ως δεξαμενές των γονιδίων αντοχής. Δύο μη παθογόνα στελέχη που φέρουν *mcr-1* εντοπίστηκαν μεταξύ 9 προϊόντων απομόνωσης *E. coli* από φράχτες σε χοιροστάσια στην Κίνα, υποδηλώνοντας ότι τα ζώα ενδέχεται να μολύνουν το άμεσο περιβάλλον τους με *mcr*. Τα απόβλητα των ζώων (ούρα και κόπρανα), τα άγρια ζώα (τρωκτικά, έντομα), το μολυσμένο νερό και οι ζωοτροφές, τα χέρια των ατόμων που επισκέπτονται/ εργάζονται στις μονάδες είναι πιθανές πηγές μόλυνσης των επιφανειών σε ένα αγροτικό περιβάλλον (196).

Το περιβάλλον είναι ζωτικής σημασίας για τη μελέτη της διάδοσης των γονιδίων αντοχής (197), (198). Τα δυνητικά παθογόνα που προέρχονται από οποιοδήποτε οικοσύστημα μπορούν να κινηθούν με σχετική ευκολία σε ένα άλλο χωρίς εμπόδια (197), (199). Οι ειδικοί συμφωνούν ότι ο έλεγχος της εξάπλωσης των ARG δεν μπορεί να επιτευχθεί χωρίς να αντιμετωπιστεί αυτό το πρόβλημα από το περιβάλλον (197). Διαπιστώνεται ότι η επιλεκτική πίεση στο περιβάλλον προκύπτει λόγω των απεκκρίσεων από ανθρώπους και ζώα (που περιέχουν μη μεταβολισμένα αντιμικροβιακά σε κόπρανα και ούρα), νοσοκομεία, βιομηχανίες και απορρίμματα και απο καλλιεργήσιμες εκτάσεις, ιδίως όπου χρησιμοποιούνται βιοκτόνα. Οι πιθανές πηγές MGCB στο περιβάλλον περιλαμβάνουν τις απεκκρίσεις ανθρώπων και ζώων, νερό από ιχθυοκαλλιέργειες, απορρίμματα και λύματα από νοσοκομεία και εργαστήρια (200), (201), (202).

Το νοσοκομειακό περιβάλλον περιέχει συχνά πολλά αντιβιοτικά που ίσως διεγείρουν την αντίσταση στην κολιστίνη (203). Έτσι, τα νοσοκομειακά λύματα αποτελούν πιθανή πηγή παν-ανθεκτικών στελεχών στο νερό και στο οικοσύστημα του εδάφους (204). Η πιο ανησυχητική κατάσταση σχετικά με την αντίσταση στην κολιστίνη είναι η παρουσία άλλων αντιμικροβιακών παραγόντων (συμπεριλαμβανομένων των απολυμαντικών και των μετάλλων) σε ένα περιβάλλον, που θα μπορούσε να διεγείρει την επιλεκτική πίεση στην κολιστίνη και το γονίδιο *mcr* συχνά συσχετίζονται με πολλαπλές AMR (οι πιο ανησυχητικές είναι οι καρβαπενεμάσες, οι εκτεταμένου φάσματος Β-λακταμάσες [ESBL], και γονίδια που προσφέρουν ανθεκτικότητα σε κινολόνη (PMQR) μεσολαβούμενη από πλασμίδια) και γονίδια μολυσματικότητας που εδράζονται σε πλασμίδια (205).

Τα λύματα και τα απορρίμματα περιέχουν θρεπτικά συστατικά που υποστηρίζουν την ανάπτυξη βακτηριδίων ενώ όλο και περισσότερο αναγνωρίζονται ως πηγές νέων αναδυόμενων παθογόνων, ανθεκτικών στα αντιβιοτικά (206).

Η μεγαλύτερη ανησυχία για τις μονάδες επεξεργασίας λυμάτων είναι η ποιότητα του νερού που επεξεργάζεται καθώς και η δυνατότητα του για επαναχρησιμοποίηση (206). Αντικείμενο 14 μελετών ήταν η διερεύνηση του γονιδίου *mcr* σε συνολικά 185 δείγματα που απομονώθηκαν από λύματα. Βρέθηκε ότι 63 από αυτά (57 *E. coli*, 3 *Kluyvera*, 2 *K. pneumoniae* και 1 μη καθορισμένο προϊόν απομόνωσης) περιείχαν το *mcr-1*.

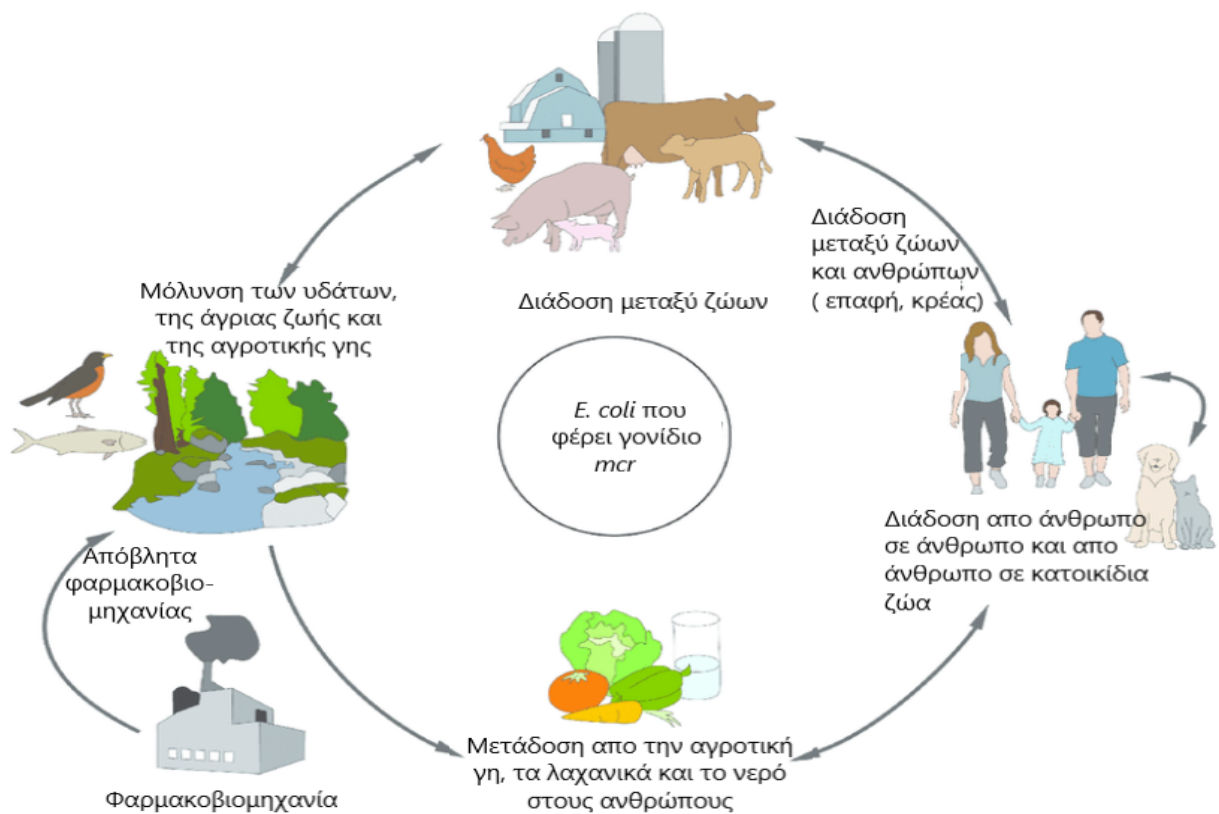
Στην Ευρώπη, τα λύματα αναφέρονται ως δεξαμενές του *mcr-1*. Σε μια γερμανική μελέτη, το *mcr-1* εντοπίστηκε σε ύδατα εισροής και εκροής σε τρεις από τις επτά μονάδες επεξεργασίας λυμάτων που ερευνήθηκαν [79]. Είναι αξιοσημείωτο ότι μια από τις μονάδες στις οποίες εντοπίστηκε *mcr-1* δεν είχε λάβει ποτέ λύματα από νοσοκομεία, κτηνοτροφικές μονάδες ή βιομηχανία τροφίμων, υποδηλώνοντας έτσι ότι τα οικιακά λύματα (από τουαλέτες και μπάνια) ή άγρια ζώα (τρωκτικά, έντομα, πουλιά, αμφίβια, σκώληκες) μπορεί να είναι οι δεξαμενές του γονιδίου σε αυτές τις μονάδες (207).

Στην Ασία έχει αναφερθεί η εξάπλωση των ανθεκτικών στη κολιστίνη μικροβίων στο υδάτινο οικοσύστημα λόγω της ελλιπούς υγιεινής. Οκτώ στελέχη *P. mirabilis* ανθεκτικά σε πολλαπλά φάρμακα που μετέφεραν *mcr-1*, απομονώθηκαν από νερά αποχέτευσης στα στρατόπεδα προσφύγων της Συρίας στον Λίβανο, επιβεβαιώνοντας περαιτέρω ότι τα είδη *Proteus* είναι δυνητικά παθογόνοι μικροοργανισμοί που χρίζουν προσοχής. Απαιτούνται επιπλέον μελέτες για τη διερεύνηση του *mcr* σε προϊόντα απομόνωσης από ανθεκτικούς στην κολιστίνη *Proteus* από διάφορα οικοσυστήματα. Υπήρχε ένας καθοριστής β-λακτάμης καθώς και ιντρόνια κατηγορίας 1 στα στελέχη, υποδεικνύοντας ότι διαφορετικά κινητά γενετικά στοιχεία διευκολύνουν την εξάπλωση του *mcr-1* σε υδρόβια οικοσυστήματα. Είναι ενδιαφέρον ότι τα στελέχη *Proteus* ανέπτυξαν βιομεμβράνες που σημαίνει ότι μπορούν δυνητικά να παραμείνουν στο περιβάλλον του καταυλισμού καθιστώντας πρακτικά αδύνατο να εξαλειφθεί το *mcr-1*. Η παρουσία των *mcr-1* θετικών *Proteus* σε στρατόπεδα προσφύγων απαιτεί επείγουσα παρέμβαση, επειδή αυτοί οι οργανισμοί μπορούν να προκαλέσουν εξαιρετικά σημαντικές κλινικές εκδηλώσεις (όπως βακτηραιμία, ουροποιητικές, αναπνευστικές και οφθαλμικές λοιμώξεις) που επηρεάζουν κυρίως ανοσοκατεσταλμένα άτομα (όπως παιδιά, γυναίκες και άτομα με σοβαρές ασθένειες) που κυριαρχούν στα στρατόπεδα (208).

Σε μια μελέτη από την Ταϊλάνδη, *mcr-1* και *mcr-3* ανιχνεύθηκαν σε 16 μύγες που συλλέχθηκαν από αστικές περιοχές και κτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις (11 *E.coli*, 2 *Enterobacter aerogenes*, 4 *Enterobacter cloacae*) (209). Σε μια άλλη μελέτη επίσης στην Ταϊλάνδη 48 εντεροβακτήρια (17 ST43 *K. pneumoniae* και 31 *E. coli*) που φέρουν *mcr-1* στο πλασμίδιο IncX4 απομονώθηκαν από 300 μύγες (*Chrysomya megacephala*) (16%) που συλλέχθηκαν από μια τοπική αγορά σε μια αστική κοινότητα, μια αγροτική περιοχή και ένα προάστιο της πόλης, υποδηλώνοντας ότι τα ανθεκτικά βακτήρια διασπείρονται ευρέως στο ανθρώπινο περιβάλλον στην Ταϊλάνδη και ότι το IncX πλασμίδιο είναι ο κύριος φορέας του *mcr-1* σε στελέχη από μύγες. Δυστυχώς, το *mcr-8* ήταν επίσης παρόν στο όλα τα στελέχη *K. pneumoniae*, υποδηλώνοντας ότι οι μύγες μεταδίδουν δυνητικά μολυσματικούς κλώνους *K. pneumoniae* (210).

Μόλις το 2019 έγινε η πρώτη μέχρι σήμερα ανακάλυψη του *mcr-1* γονιδίου σε πλασμίδια ανθεκτικών στελεχών *P. aeruginosa* και *A. baumannii* σε κλινικά δείγματα (ούρα και αίμα αντίστοιχα) στο Πακιστάν (211). Προηγουμένως, είχε εντοπιστεί το *mcr-5* στο χρωμοσωμικής προέλευσης σε στέλεχος *P. aeruginosa* (212)

Σε πρόσφατη έρευνα (2020) που μελέτησε την αντοχή των βακτηρίων σε ζωολογικό κήπο στην Βραζιλία ανευρέθηκαν *mcr* γονίδια σε 5/27 δείγματα που είχαν προέλθει από κόπρανά ρακούν *Procyon lotor* (*mcr-1*), το έδαφος (*mcr-3*) και το νερό αλιγάτορα (*mcr-7*). Ένα οικοσύστημα όπως αυτό του ζωολογικού κήπου είναι χαρακτηριστικό παράδειγμα της κυκλικής διάδοσης γονιδίων αντοχής σε αντιβιοτικά (213).



Εικόνα 14. Διάδοση *E. coli* που φέρει γονίδιο *mcr* μεταξύ ζώων, περιβάλλοντος, τροφίμων και ανθρώπων (28).

1.6 Επιδημιολογικά δεδομένα για την Ελλάδα

1.6.1 *Klebsiella pneumoniae*

Από το 2014 έως το 2017, 288 κλινικά στελέχη ανθεκτικά στην καρβαπενέμη συγκεντρώθηκαν από μια συλλογή 973 δειγμάτων που συλλέχθηκαν από οκτώ διαφορετικά νοσοκομεία στην Ελλάδα. Ο έλεγχος των γονιδίων ανθεκτικότητας σε καρβαπενέμη και κολιστίνη πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας PCR (214).

Η κολιστίνη μέχρι πρότινος χρησιμοποιούνταν για την θεραπεία λοιμώξεων προκαλούμενων από βακτήρια ανθεκτικά στην καρβαπενέμη. Ωστόσο, ακολούθησε γρήγορα η εμφάνιση αντίστασης. Στην τρέχουσα μελέτη, μεταξύ των 973 στελεχών *K. pneumoniae* αναφέρθηκε ένα συνολικό ποσοστό αντίστασης στην κολιστίνη 21,9% και ένα ποσοστό 73,9% αντίστασης μεταξύ στελεχών *K. pneumoniae* ανθεκτικών στην καρβαπενέμη (214).

Κανένα από τα γονίδια *mcr* δεν ανιχνεύθηκε, γεγονός που επιβεβαιώνει τα δεδομένα στη βιβλιογραφία που δείχνουν ότι ο επιπολασμός των γονιδίων *mcr* παγκοσμίως είναι πολύ

υψηλότερος σε στελέχη ζώων και χαμηλότερος σε στελέχη ανθρώπινης προέλευσης. Αυτό προϋποθέτει ότι η δεξαμενή τους βρίσκεται τουλάχιστον στα ζώα και στο περιβάλλον, μετά τη σημαντική χρήση της κολιστίνης στην κτηνοτροφία και τη γεωργία (215). Στην Ελλάδα, σε αντίθεση με άλλες χώρες, η μαζική χρήση κολιστίνης στην κλινική πρακτική μετά την εξάπλωση των *Enterobacteriaceae* που παράγουν καρβαπενεμάση οδήγησε στην εξάπλωση ανθεκτικών σε πολλαπλά φάρμακα βακτηρίων σε νοσοκομεία (214).

Οι τρέχουσες στατιστικές αναλύσεις της μελέτης έχουν δείξει ότι η αντίσταση στην κολιστίνη συσχετίστηκε σημαντικά με τον φαινότυπο αντοχής στην καρβαπενέμη και ειδικότερα συσχετίστηκε με την παραγωγή γονιδίων καρβαπενεμάσης KPC και NDM στην *K. pneumoniae*, συμβάλλοντας στους πολυανθεκτικούς φαινοτύπους τους. Συμπερασματικά, η τρέχουσα μελέτη ανέφερε υψηλό ποσοστό αντοχής στην κολιστίνη (70%) σε ανθεκτικά στην καρβαπενέμη κλινικά στελέχη *K. pneumoniae*. Αυτό πιθανότατα οφειλόταν σε χρωμοσωμικές μεταλλάξεις των γονιδίων στόχων, ιδιαίτερα στην απενεργοποίηση του *mgrB* γονιδίου με παρεμβολές αλληλουχίας, και όχι με την εξάπλωση κινητών γονιδίων *mcr*. Αυτό το εύρημα υποστηρίζει σαφώς την ιδέα ότι η επιλεκτική πίεση της κολιστίνης σε ανθρώπους και ζώα οδήγησε στην επιλογή διαφορετικών βακτηριακών κλώνων, με παραλλαγές των *mcr* σε ζώα και περιβάλλον και συγκεκριμένους κλώνους με χρωμοσωμικές μεταλλάξεις σε ανθρώπους.

Τέλος, η παρούσα μελέτη δείχνει ότι η αντίσταση στην κολιστίνη γίνεται ενδημική στην Ελλάδα σε ανθεκτικά σε καρβαπενέμη ανθρώπινα στελέχη *K. pneumoniae*. Ο επιπολασμός της αντοχής στα καρβαπενέμη και την κολιστίνη στην Ελλάδα θα πρέπει να εξεταστεί και θα πρέπει να αξιολογηθούν και να χρησιμοποιηθούν νέες θεραπευτικές στρατηγικές, συμπεριλαμβανομένων των παλαιών φαρμάκων στην Ελλάδα. Μεταξύ των διαφορετικών αντιβιοτικών που εξετάστηκαν, η φωσφομυκίνη μπορεί να είναι μια έγκυρη εναλλακτική λύση για τη θεραπεία βακτηρίων ανθεκτικών στην καρβαπενέμη και στην κολιστίνη στην Ελλάδα (214).

1.6.2 *Escherichia coli*

Έρευνα που διεξήχθη το 2015 έως 2016 και δημοσιεύτηκε το 2020 από την επιστημονική ομάδα του Φιλιούση, εξετάζει την αντοχή των *E. coli* σε δείγματα που συλλέχθηκαν από αγελάδες με μαστίτιδα για την παρουσία εκτεταμένου φάσματος β-λακταμασών (ESBL). Δείγματα γάλακτος που λήφθηκαν από 400 αγελάδες σε 23 ελληνικές αγέλες

γαλακτοπαραγωγής με ιστορικό μαστίτιδας προκαλούμενης από *E. coli*, υποβλήθηκαν σε επεξεργασία για την απομόνωση των *E. coli* που παράγει ESBL (216).

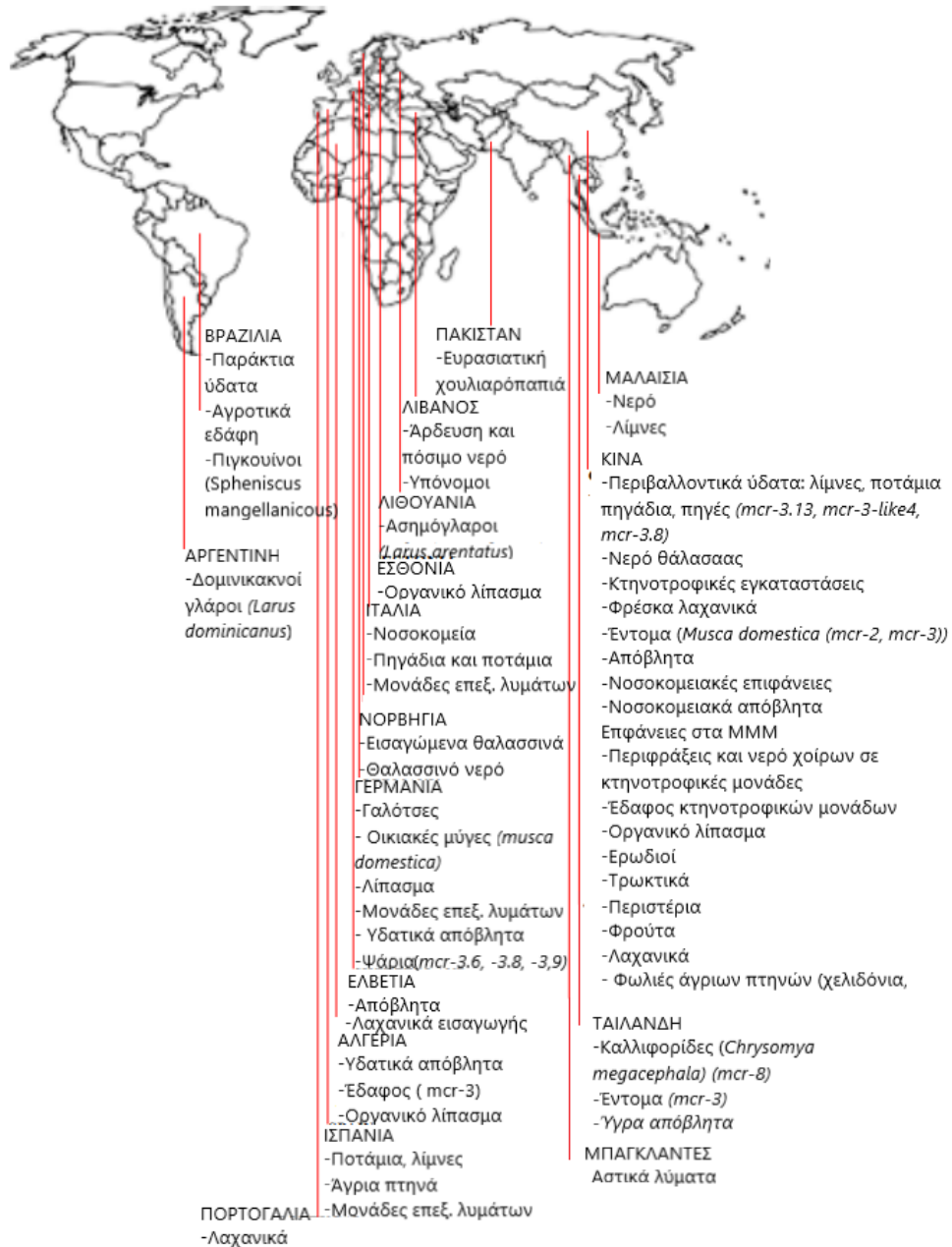
Η αντιμικροβιακή ευαισθησία των απομονωμένων προϊόντων ESBL αναλύθηκε χρησιμοποιώντας διάχυση δίσκου άγαρ, και οι ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις κολιστίνης προσδιορίστηκαν με Broth Microdilution. Χρησιμοποιήθηκε PCR για την ανίχνευση γονιδίων β-λακταμάσης και *mcr-1*. Συνολικά τα 89 από τα 400 (22,25%) προϊόντα απομόνωσης ήταν *E. coli* από 12 στα 23 (52%) αγροκτήματα. Έξι στελέχη που προέρχονταν από 6 αγελάδες σε ένα μόνο αγρόκτημα βρέθηκαν να παράγουν ESBL και ήταν ανθεκτικά σε πληθώρα αντιβιοτικών, μεταξύ τους και η κολιστίνη. Μέχρι σήμερα αυτή είναι η πρώτη αναφορά ενδημικής μαστίτιδας των βοοειδών που προκαλείται από *E.coli* που παράγει ESBL θετικό σε *mcr-1*. Οι MIC των στελεχών για την αντοχή στην κολιστίνη, κυμαίνονταν μεταξύ 0,03 και 256 mg /L ενώ το όριο ευαισθησίας ήταν τα 2 mg/L σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της EUCAST. Ως στελέχη αναφοράς *E. coli* χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη ATCC 25922 και NCTC13846 (216).

Ο επιπολασμός αυτών των στελεχών δεν είναι γνωστός και απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την εκτίμηση των επιδράσεων του *mcr1* θετικού *E.coli* που κυκλοφορεί στα γαλακτοκομικά βοοειδή. Τα αποτελέσματα υπογραμμίζουν επίσης τη χρησιμότητα της ενεργού παρακολούθησης της αντίστασης που δεν τίθεται συνήθως σε εφαρμογή από τα διαγνωστικά εργαστήρια, για την έγκαιρη ανίχνευση νέων ανθεκτικών στελεχών (216).

Το ίδιο έτος η μελέτη των Daforoulou και της επιστημονικής της ομάδας, αποκάλυψε τα δυο πρώτα κλινικά στελέχη με αντοχή στην κολιστίνη που ανακτήθηκαν από δυο νοσοκομεία της Αττικής. Η αντίσταση στην κολιστίνη συσχετίστηκε με μεταλλάξεις στο σύστημα δύο συστατικών του *pmrA/pmrB*. Παρόλο που βρέθηκαν μόνο δύο περιπτώσεις επιδημιολογικά μη σχετιζόμενης αντοχής σε *E. coli*, αυτά τα ευρήματα προκαλούν ανησυχία λόγω της υπερβολικής χρήσης κολιστίνης στη χώρα μας, κυρίως για τη θεραπεία ανθεκτικών σε καρβαπενέμη προϊόντων *K. pneumoniae*, *A. baumannii* και *Pseudomonas aeruginosa*. Είναι επίσης πολύ ανησυχητικό το ότι η αντίσταση στην κολιστίνη έχει προκύψει στον εξαιρετικά μολυσματικό κλώνο ST131 H30Rx, το οποίο είναι επίσης ανθεκτικό σε πολλά αντιβιοτικά. Δεδομένης της υψηλής συχνότητας εμφάνισης λοιμώξεων από *E. coli*, υπάρχει επιτακτική ανάγκη για επιτήρηση και εφαρμογή μέτρων ελέγχου των λοιμώξεων για την πρόληψη της εξάπλωσης της αντίστασης στην κολιστίνη σε αυτό το βακτηριακό είδος (217).

1.6.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Τα ανθεκτικά στελέχη *P. aeruginosa* είναι μία από τις κύριες αιτίες τόσο των νοσοκομειακών λοιμώξεων όσο και των λοιμώξεων της κοινότητας. Παρόλα αυτά δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα που να περιγράφουν την αντοχή στην κολιστίνη στην Ελλάδα για το συγκεκριμένο παθογόνο. Μέχρι πρόσφατα, η διεθνής βιβλιογραφία; αναφέρει ένα στέλεχος που να φέρει *mcr-1* πλασμιδικά (Πακιστάν) και ένα που να φέρει το *mcr-5* χρωμοσωμικά (Ουάσιγκτον). Συνεπώς, γίνεται αντιληπτό ότι η αντοχή στην κολιστίνη επιτυγχάνεται μέσω άλλων μηχανισμών στην *P. aeruginosa* όπως οι μεταλλάξεις στα ρυθμιστικά συστήματα δύο συστατικών όπως PhoPQ, PmrAB, ParR/S, ColR/S, και CprR/S (218). Απαιτείται επιδημιολογική μελέτη που να αφορά την Ελλάδα τόσο σε κλινικό όσο και σε περιβαλλοντικό επίπεδο.



Εικόνα 15. Χώρες στις οποίες το γονίδιο *mcr-1*, συμπεριλαμβανομένων και άλλων τύπων γονιδίων *mcr*, έχουν ανιχνευθεί σε περιβαλλοντικές δεξαμενές όπως νερά, ιχθυοκαλλιέργειες, έδαφος, φυτά, λύματα, υδατικά απόβλητα και πανίδα [184].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2- ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας Τροφίμων, Υδάτων & Περιβάλλοντος της Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης ελέγχθηκαν 60 βακτηριακά στελέχη, και συγκεκριμένα 33 περιβαλλοντικά στελέχη *E. coli* και 27 στελέχη *P. aeruginosa*, για την ύπαρξη των γονιδίων αντοχής στην κολιστίνη *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* και *mcr-5*. Τα στελέχη απομονώθηκαν κατά το χρονικό διάστημα 2011 έως 2020 σε περιοχές της περιφέρειας Κρήτης και φυλάσσονται στο αρχείο βιολογικών δειγμάτων του εργαστηρίου αυτού.

Ειδικότερα τα στελέχη *E. coli* προέρχονται από νερά δικτύου και τρόφιμα ενώ τα στελέχη *P. aeruginosa* προέρχονται από νερά δικτύου, εμφιαλωμένα νερά, περιβαλλοντικά ύδατα και πισίνες.

Για το σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας, τα δείγματα παραλήφθηκαν από φύλαξη στους -80° C που διατηρούνταν σε BHI (Brain Heart Infusion) με γλυκερόλη 20%.

2.1 Υλικά

	Αντιδραστήρια	Αναλώσιμα	Εξοπλισμός
<i>Καλλιέργεια βακτηρίων</i>	Θρεπτικό υλικό Chromogenic Coliform Agar (ISO), VWR Chemicals BDH® <hr/> Θρεπτικό υλικό Pseudomonas agar base (ISO), VWR Chemicals BDH® <hr/> Supplement CN	Τρυβλία petri <hr/> Κρίκος εμβολιασμού 10 μL	Φλόγιστρο βουτανίου, ELGAZ <hr/> Vortex, LABINCO <hr/> Επωαστικός κλίβανος, memmert
<i>Εξαγωγή DNA</i>	PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, ThermoFischer -PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer -PureLink™ Genomic Digestion Buffer -PureLink™ Genomic Wash Buffer 1 -PureLink™ Genomic Wash Buffer 2 -PureLink™ Genomic Elution Buffer -Proteinase K (20 mg/ml) -PureLink™ Spin Columns with Collection Tubes	Filter tips 2-200 μL, Biosphere® <hr/> Filter tips 100- 1000 μL, ClearLine®	Heat Block, BIOLine <hr/> Μικροφυγόκεντρος, Thermo SCIENTIFIC <hr/> Vortex, ISOLAB GmbH <hr/> Πιπέτα 1000 μL, erpendorf <hr/> Πιπέτα 20-200 μL

*Αλυσιδωτή
Αντίδραση
Πολυμεράσης
(PCR)*

-PureLink™ Collection Tubes (2.0 ml)		
Ethanol absolute 99,8%, Fischer BioReagents		
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/μl), ThermoFisher SCIENTIFIC	Filter tips 0,1-10 μL, Biosphere®	Vortex, ISOLAB GmbH
10X PCR buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), ThermoFisher SCIENTIFIC	Filter tips 2-20 μL, Biosphere®	Πιπέτα 1000 μL, eppendorf
Magnesium Chloride (50 mM), ThermoFisher SCIENTIFIC	Filter tips 2-200 μL, Biosphere®	
Distilled H ₂ O	Filter tips 100- 1000 μL, ClearLine®	
dNTPs		
Primer Forward, Technical University of Denmark - DTU		
Primer Reverse, DTU		
<i>Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR</i>	Αγαρόζη, SeaKem®, WVR	Filter tips 0,1-10 μL, Biosphere®
		Πιπέτα 0,1-10 μL, AHN pipet4u® pro

Ζυγός, KERN 440-33N		Συσκευή ηλεκτροφόρησης, APELEX PS 608
50 X TAE Buffer AccuGENE™		Λάμπα UV ακτινοβολίας, VILBER LOURMAT
6X DNA Loading Dye, Fermentas		Κωνική φιάλη Jena Glas 300 mL, Schott AG
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder 0,5 µg/µL, Fermentas		Φούρνος μικροκυμάτων, SAMSUNG
Διάλυμα Ethidium Bromide		

Πίνακας 7. Συγκεντρωτικός πίνακας υλικών/ αναλώσιμων, αντιδραστηρίων και εργαστηριακών εξοπλισμών Πανεπιστημίου Κρήτης που χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες της παρούσας διπλωματικής.

2.2 Αρχή μεθόδου

Απομόνωση βακτηριακού DNA μέσω kit

Spin Column Invitrogen

Προετοιμασία λύσης κυττάρων. Αφορά Gram αρνητικά βακτήρια.

Διαλέγω περισσότερα από 2×10 Gram αρνητικά* (αντιστοιχεί σε ~1 mL αποικίες *E. coli*) και φυγοκεντρώ. [Υγρές κ/α] + 180 µL Water for Injection

- Κάνω ανασύσταση του κυτταρικού ελαιωρήματος σε 180 µL Digestion Buffer. Προσθέτω 20 µL Πρωτεΐνάσης K (συμπεριλαμβάνεται στο kit) για να λύσει το κύτταρο. Ανακατεύω καλά με τη βοήθεια vortex.

- Επιάζω το σωληνάριο στους 55°C (υδατόλουτρο) και ανά διαστήματα κάνω vortex για περίπου 1 ώρα.

- Προσθέτω 20 μL RNAασης A (συμπεριλαμβάνεται στο kit) στο μίγμα λύσης. Ανακατεύω καλά με σύντομο vortex και επωάζω σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
- Προσθέτω 200 μL Lysis/ Binding Buffer και ανακατεύω με vortex για να γίνει ομοιογενές το διάλυμα.
- Προσθέτω 200 μL 96-100% αιθανόλη στο μίγμα λύσης. Ανακατεύω καλά με vortex για 5 δευτερόλεπτα για να γίνει ομοιογενές το διάλυμα.

Σημείωση: Όταν προετοιμάζω πολλά δείγματα, μπορώ να φτιάξω ένα Mastermix (Buffer/ Αιθανόλη) προσθέτοντας 200 μL Lysis/ Binding Buffer και 200 μL 96-100% αιθανόλη για κάθε δείγμα.

*0,1 → 10^8 κύτταρα/mL

1 → 10^9

$x \rightarrow 2 \times 10^9$ $x \times 10^9 = 2 \times 10^9 \Rightarrow x = 2$ O.D.

2×10^9 κύτταρα → 2.0 O.D. στα 600 nm.

Δέσμευση του DNA

-> Πριν το ξεκίνημα της μεθόδου προσθέτω 96-100% αιθανόλη στο Wash Buffer 1 και στο Wash Buffer 2 σύμφωνα με τις οδηγίες σε κάθε ετικέτα. Αναδεύω καλά. Μαρκάρω τις ετικέτες όταν έχει προστεθεί η αιθανόλη. Φυλάσσω και τα 2 διαλύματα πλύσης με την αιθανόλη σε θερμοκρασία δωματίου.

- Αφαιρώ μια στήλη φυγοκέντρησης σε ένα σωληνάριο συλλογής από τη συσκευασία.
- Προσθέτω το μίγμα λύσης (~640 μL) που είναι προετοιμασμένο με Lysis/ Binding Buffer και αιθανόλη στη στήλη φυγοκέντρησης.
- Φυγοκεντρώ τη στήλη στις $10.000 \times g$ για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απορρίπτω το σωληνάριο συλλογής και τοποθετώ τη στήλη φυγοκέντρησης σε ένα καθαρό σωληνάριο συλλογής που συμπεριλαμβάνεται στο kit.

Έκπλυση του DNA

- Προσθέτω 500 μL Wash Buffer 1 που έχει προετοιμαστεί με αιθανόλη στη στήλη.
- Φυγοκεντρώ τη στήλη σε θερμοκρασία δωματίου στις $10.000 \times g$ για 1 λεπτό.
- Απορρίπτω το σωληνάριο συλλογής και τοποθετώ τη στήλη φυγοκέντρωσης σε ένα καθαρό σωληνάριο συλλογής που συμπεριλαμβάνεται στο kit.
- Προσθέτω 500 μL Wash Buffer 2 που έχει προετοιμαστεί με αιθανόλη στη στήλη.
- Φυγοκεντρώ τη στήλη στη μέγιστη ταχύτητα για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Απορρίπτω το σωληνάριο συλλογής.

Έκλυση του DNA

- Τοποθετώ τη στήλη φυγοκέντρωσης σε ένα αποστειρωμένο eppendorf των 1,5 ml (σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης)
- Προσθέτω 25-200 μL (100 μL) Elution Buffer στη στήλη.
- Επιάζω σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό. Φυγοκεντρώ τη στήλη στη μέγιστη ταχύτητα για 1 λεπτό ($\sim 12.300 \text{ rpm}$) σε θερμοκρασία δωματίου. Το σωληνάριο περιέχει καθαρό γενωμικό DNA.
- Για να ανακτήσω περισσότερο DNA, επαναλαμβάνω ένα δεύτερο βήμα έκλυσης χρησιμοποιώντας τον ίδιο όγκο διαλύματος έκλυσης όπως στην πρώτη έκλυση σε ένα άλλο αποστειρωμένο eppendorf των 1,5 ml (σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης).
- Φυγοκεντρώ τη στήλη στη μέγιστη ταχύτητα για 1,5 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Το σωληνάριο περιέχει καθαρό DNA. Αφαιρώ και απορρίπτω τη στήλη.

Φύλαξη του DNA

- Φυλάσσω το καθαρό DNA στους -20°C ή χρησιμοποιώ το DNA απευθείας για την επιθυμητή εφαρμογή.
- Για μακροχρόνια φύλαξη, φυλάσσω το καθαρό DNA σε Elution Buffer στους -20°C καθώς το DNA αν φυλαχτεί σε νερό θα υποστεί όξινη υδρόλυση.
- Για να αποφευχθεί το επαναλαμβανόμενο πάγωμα και ξεπάγωμα του DNA, φυλάσσω το καθαρό DNA στους 4°C για άμεση χρήση ή κλασματοποιώ το DNA και το φυλάσσω στους -20°C για μακροχρόνια φύλαξη.

Πρωτόκολλο PCR για γονίδια αντοχής *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*

PCR Mastermix		
Συστατικό	Συγκέντρωση	Ποσότητα
Buffer	10X	2,5 μ L
MgCl ₂	50 mM	1 μ L
dNTPs	10mM	0,5 μ L
Primer R	10 μ M	1 μ L (each)
Primer F	10 μ M	1 μ L (each)
H ₂ O		8,3 μ L
Taq pol	5 u/ μ L	0,2 μ L
DNA		2,5 μ L
Σύνολο		25 μ L

Πίνακας 8. Τα συστατικά, οι συγκεντρώσεις και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του PCR Mastermix που αντιστοιχούν σε μια αντίδραση.

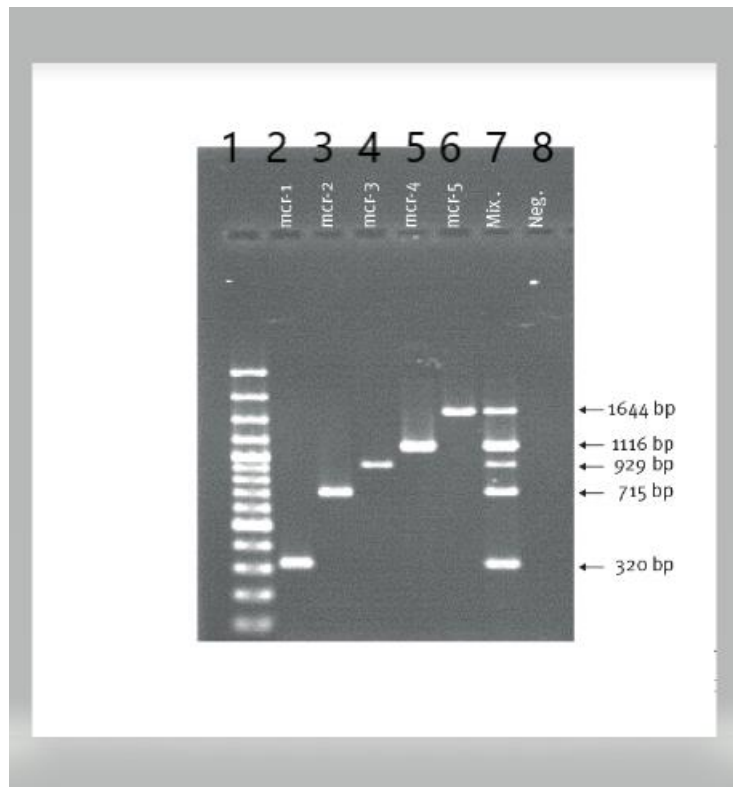
Ρύθμιση προγράμματος PCR στον θερμικό κυκλοποιητή

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	94	15 min	1
Αποδιάταξη	94	30 sec	
Υβριδισμός εκκινητών	58	90 sec	25
Επιμήκυνση	72	60 sec	
Τελική επιμήκυνση	72	10 min	1

Πίνακας 9. Απεικονίζονται οι συνθήκες στις οποίες γίνεται η αντίδραση PCR στον θερμικό κυκλοποιητή.

Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR

- 1) Παρασκευή gel αγαρόζης 1% w/v με σύσταση 2 × TAE 100 ml και αγαρόζη 1 g σε μια κωνική φιάλη. Συνιστάται ήπια ανάδευση.
- 2) Βρασμός διαλύματος μέχρι να διαυγάσει.
- 3) Τοποθέτηση του διαλύματος gel αγαρόζης στο ειδικό stand αφού έχει τοποθετηθεί το κατάλληλο χτενάκι για την εναπόθεση του δείγματος. Παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου να γίνει συμπαγές gel. Προσοχή να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες.
- 4) Τοποθέτηση του gel στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία περιέχει διάλυμα 2×TAE.
- 5) Προσθήκη σε κάθε well του gel 5 μL δείγματος με 2 μL loading dye 6X και τέλος 3,5 μL Ladder γνωστών μοριακών βαρών (μάρτυρας) 1kb με 2 μL loading dye 6X.
- 6) Τοποθετείται καπάκι της συσκευής.
- 7) Σύνδεση των ηλεκτροδίων στους αντίστοιχους πόλους.
- 8) Ρύθμιση τάσης στα 90 V και χρόνου στα 90 λεπτά
- 9) Έναρξη λειτουργίας τροφοδοτικού. Η παρατήρηση φυσαλίδων στα πλάγια της συσκευής σημαίνει ότι η μέθοδος δουλεύει.
- 10) Έλεγχος ύστερα από 15 λεπτά για το αν έχουν «τρέξει» τα δείγματα και αν ο ladder έχει «ανοίξει».
- 11) Μετά το πέρας της διαδικασίας, κλείνεται το τροφοδοτικό
- 12) Τοποθέτηση του gel σε διάλυμα με βρωμιούχο αιθίδιο για 30 λεπτά προκειμένου να ενισχυθεί το σήμα της αντίδρασης.
- 13) Προσθήκη gel κάτω από λάμπα UV για ανάγνωση του αποτελέσματος.



Εικόνα 16. Στη θέση 1 μπορούμε να διακρίνουμε τον ladder γνωστών μοριακών βαρών. Στη θέση 2 μπορούμε να διακρίνουμε το γονίδιο *mcr-1* μεγέθους 320 bp, στη θέση 3 το γονίδιο *mcr-2* μεγέθους 715 bp, στη θέση 4 το γονίδιο *mcr-3* μεγέθους 929 bp, στη θέση 5 φαίνεται το γονίδιο *mcr-4* μεγέθους 1116 bp, στη θέση 6 το γονίδιο *mcr-5* μεγέθους 1644 bp, στη θέση 7 το δείγμα που περιέχει όλα τα παραπάνω γονίδια ανθεκτικότητας στην κολιστίνη και στη θέση 8 το αρνητικό δείγμα ελέγχου (146).

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία (5'→3')	Γονίδιο στόχος	Μέγεθος (bp)	Γένος θετικού control
mcr1_320bp_fw	AGTCCGTTTGTTCCTTGTCG	<i>mcr-1</i>	320	<i>E. coli</i> 2012-60-1 176-27, NEQAS
mcr1_320bp_rev	AGATCCTTGGTCTCGGCTTG			
mcr2_700bp_fw	CAAGTGTGTTGGTCGCAGTT	<i>mcr-2</i>	715	<i>E. coli</i> KP37, DTU
mcr2_700bp_rev	TCTAGCCCGACAAGCATACC			

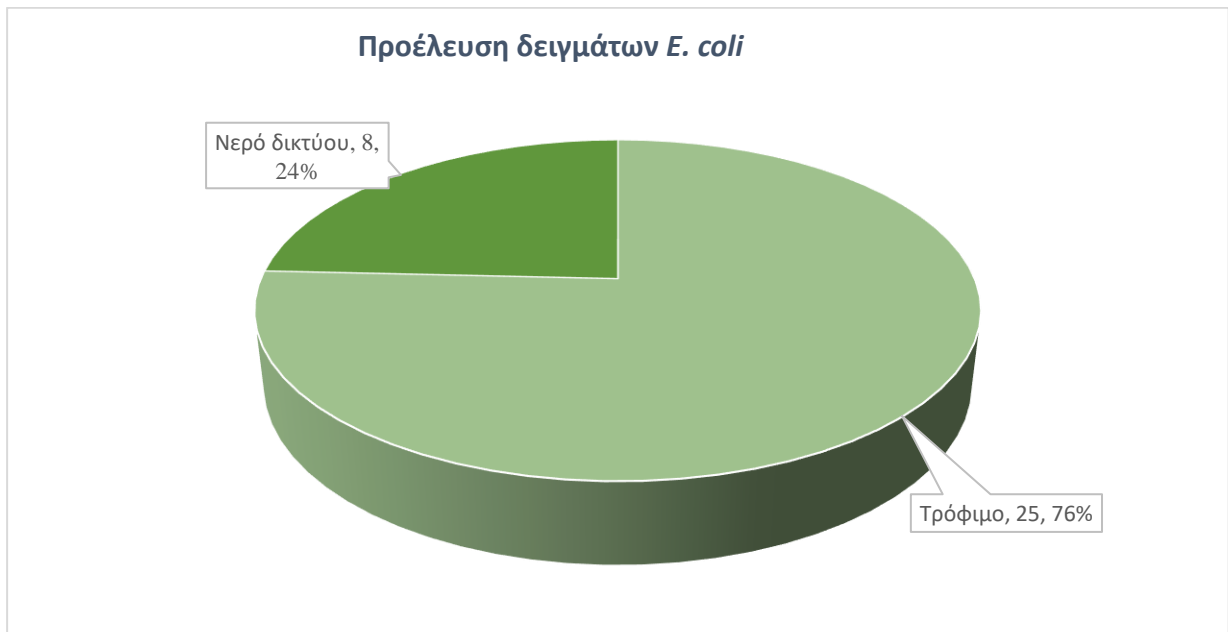
mcr3_900bp_fw	AAATAAAAATTGTTCCGCTTATG	<i>mcr-3</i>	929	<i>E. coli</i> 2013- SQ352, DTU
mcr3_900bp_rev	AATGGAGATCCCCGTTTTT			
mcr4_1100bp_fw	TCACTTTCATCACTGCGTTG	<i>mcr-4</i>	1116	<i>E. coli</i> DH5α, DTU
mcr4_1100bp_rev	TTGGTCCATGACTACCAATG			
MCR5_fw	ATGCGGTTGTCTGCATTTATC	<i>mcr-5</i>	1644	<i>Salmonella</i> 13- SA01718, DTU
MCR5_rev	TCATTGTGGTTGTCCTTTTCTG			

Πίνακας 10. Απεικονίζονται τα ζεύγη εκκινητών (*forward* και *reverse*) που χρησιμοποιούνται στην PCR για τη ανίχνευση των γονιδίων *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* και *mcr-5*, η αλληλουχία τους (5'→3') και το γένος βακτηρίου από το οποίο απομονώθηκαν (*θετικό control*) (146).

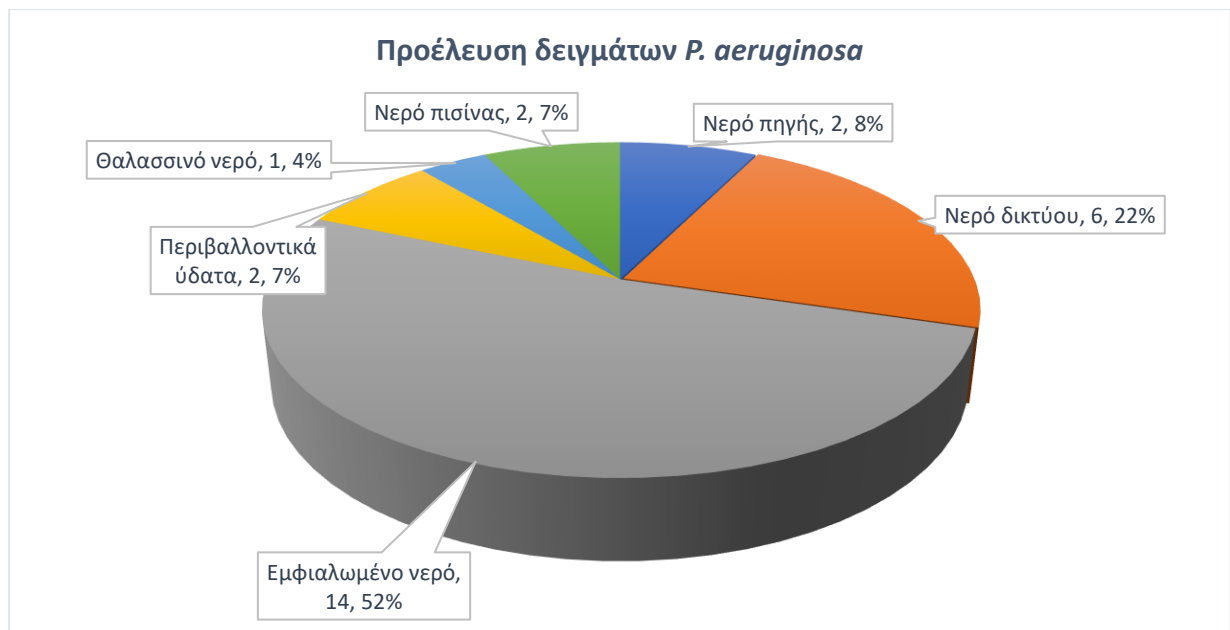
2.3 Πειραματική πορεία

Το αρχικό μέλημα κατά την έναρξη της παρούσας εργαστηριακής έρευνας ήταν ο έλεγχος των πέντε πρότυπων στελεχών που το καθένα περιέχει ένα από τα γονίδια *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* και *mcr-5*. Τα πρότυπα στελέχη παραλήφθηκαν σε φιαλίδια με Brain Heart Infusion (BHI) που φυλάσσονταν στους -80° C. Τα στελέχη καλλιεργήθηκαν και αναπτύχθηκαν σε Nutrient Agar στους 37° C για 24 ώρες. Την επόμενη μέρα έγινε επιλογή των κατάλληλων αποικιών από τα τρυβλία και ακολούθησε εξαγωγή του DNA των βακτηρίων (DNA extraction). Κατόπιν, έγινε πολυμερισμός του γενετικού υλικού των βακτηρίων με τη μέθοδο της κλασικής PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές που αναφέρονται στον πίνακα 10. Είναι απαραίτητο να επισημανθεί ότι για κάθε πρότυπο στέλεχος χρησιμοποιήθηκε μόνο το ζεύγος των εκκινητών που αντιστοιχεί στο *mcr* γονίδιο που φέρει το κάθε στέλεχος. Τα προϊόντα της PCR «έτρεξαν» σε gel αγαρόζης 1% w/v. Στον Πίνακα 10 φαίνεται το στέλεχος από το οποίο απομονώθηκε το κάθε γονίδιο για τον σκοπό αυτής της έρευνας.

Ύστερα από τον έλεγχο των πρότυπων στελεχών, σειρά είχε η διαλογή των περιβαλλοντικών δειγμάτων από στελέχη *E. coli* και *P. aeruginosa* που φυλάσσονταν στην κατάψυξη στους -80° C. Καταγράφηκαν οι κωδικοί που αντιστοιχούν σε κάθε δείγμα καθώς και η προέλευση τους (τρόφιμο, νερό και άλλα) σε αρχείο excel. Σε αυτήν την φάση, συγκεντρώθηκαν 33 στελέχη *E. coli* και 27 στελέχη *P. aeruginosa*. Επομένως, συνολικά συγκεντρώθηκαν 60 στελέχη προς μελέτη.



Κυκλικό διάγραμμα 1. Στατιστική ανάλυση προέλευσης στελεχών *E. coli*. Η προέλευση είναι κυρίως τροφιμογενής σε ποσοστό 76% και υδατογενής σε ποσοστό 24% (νερό δικτύου).



Κυκλικό διάγραμμα 2. Στατιστική ανάλυση προέλευσης στελεχών *P. aeruginosa*. Η προέλευση είναι εξολοκλήρου υδατογενής. Ειδικότερα τα περισσότερα αφορούν εμφιαλωμένο νερό (52%) και ακολουθούν νερό δικτύου (22%), νερό πηγής (8%), περιβαλλοντικά ύδατα (7%), νερό πισίνας (7%) και τέλος θαλασσινό νερό (4%).

Ακολούθησε εξαγωγή DNA στα στελέχη καθώς και PCR σε αυτά, ξεχωριστά για κάθε γονίδιο *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* και *mcr-5*. Η ποιοτική παρατήρηση των αποτελεσμάτων έγινε με ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 1% w/v.

Δεν ανιχνεύτηκε κανένα από τα γονίδια *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* και *mcr-5* στα 60 περιβαλλοντικά στελέχη που απομονώθηκαν και αρχειοθετήθηκαν από το Πανεπιστήμιο Κρήτης κατά το χρονικό διάστημα 2011 έως το 2020 στην Περιφέρεια της Κρήτης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ/ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από τον μοριακό έλεγχο των 60 περιβαλλοντικών στελεχών για τα γονίδια *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* και *mcr-5* που πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστήμιο Κρήτης με στελέχη που απομονωθήκαν κατά το χρονικό διάστημα 2011-2020 δεν βρέθηκε σε κανένα στέλεχος κάποιο από τα εν λόγω γονίδια.

Το αποτέλεσμα αυτό δεν αναιρεί το γεγονός ότι ορισμένα από αυτά τα στελέχη πιθανώς να εμφανίζουν αντοχή έναντι της κολιστίνης η οποία να οφείλεται σε ενδογενείς μηχανισμούς των βακτηρίων λόγω επιλεκτικής πίεσης όπως είναι η ύπαρξη αντλιών εκροής που εξωθούν το αντιβιοτικό, η ελάττωση των πορινών στην εξωτερική μεμβράνη και η ύπαρξη άλλων γονιδίων αντοχής πλασμιδιακής ή χρωμοσωμικής προέλευσης.

Επομένως χρήσιμος κρίνεται ένας πρωταρχικός έλεγχος της ευαισθησίας των στελεχών *E. coli* και *Ps. aeruginosa* που μελετήσαμε, μέσω του Broth Microdilution (BMD), μέθοδος αναφοράς (gold standard) για την ευαισθησία στην κολιστίνη όπως ορίζουν τα διεθνή (CLSI) και ευρωπαϊκά (EUCAST) πρότυπα (135).

Βιβλιογραφικά δεδομένα τονίζουν ότι η ανεύρεση *mcr* γονιδίων είναι παρούσα κυρίως σε μέρη που διαβιούν οικόσιτα ζώα όπως χοίροι και πουλερικά και λιγότερο σε κλινικά, υδάτινα περιβάλλοντα και σε τρόφιμα ενώ μέχρι σήμερα οι δημοσιευμένες έρευνες που αναφέρουν γονίδια *mcr* στην *Ps. aeruginosa* είναι ελάχιστες και αφορούν κλινικά δείγματα σε Πακιστάν και Ουάσιγκτον (196) (160) (166) (218).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην σύγχρονη εποχή, τόσο στον κλάδο της ιατρικής όσο και της κτηνιατρικής/κτηνοτροφίας, ιχθυοκαλλιέργειες, γεωργίας, πιο επίκαιρη από ποτέ θεωρείται η άνοδος των ανθεκτικών στελεχών σε αντιβιοτικά γεγονός που απασχολεί ιδιαίτερα την επιστημονική κοινότητα. Η άνοδος αυτή συνεπάγεται αύξηση των θανάτων σε ανθρώπινο και ζωικό επίπεδο, καθώς κατά αυτό τον τρόπο περιορίζεται το εύρος των διαθέσιμων αντιμικροβιακών που είναι ικανά να εκριζώσουν τις υπεύθυνες λοιμώξεις. Η ενδεδειγμένη μελέτη των αντοχών σε αντιβιοτικά, έχει αναγκάσει τους επιστήμονες να κάνουν λόγο για την «Ενιαία υγεία» ή διεθνώς γνωστή ως «One health», η οποία πραγματεύεται την σύνδεση που υπάρχει ανάμεσα στους ανθρώπους, τα ζώα και το φυσικό περιβάλλον και πως μια αλλαγή σε κάποιο από αυτά τα μικροβιώματα, λόγω επιλεκτικής πίεσης, είναι σε θέση να επηρεάσει αλυσιδωτά ένα από τα υπόλοιπα. Στην πράξη, μελετάται η ανταλλαγή χλωρίδας που ενδεχομένως να φέρει παράγοντες που προσδίδουν αντοχή σε κάποιο από τα διαθέσιμα αντιβιοτικά. Έτσι αναδεικνύεται η προέλευση και η σχέση μεταξύ τους προκειμένου οι επιστήμονες να κατανοήσουν και να εξαλείψουν το πρόβλημα.

Την τελευταία εικοσαετία ανησυχητική είναι η άνοδος των ανθεκτικών στην κολιστίνη Gram αρνητικών βακτηρίων. Γύρω στα 1970 είχε εγκαταλειφθεί η χρήση της επειδή υπήρχαν αναφορές από κλινικά περιστατικά για νεφροτοξικότητα και νευροτοξικότητα. Επανήλθε όμως η χρήση της στις αρχές του 2000 ως αντιβιοτικό «έσχατης ανάγκης» σε λοιμώξεις από πολυανθεκτικά μικρόβια. Η αλόγιστη χρήση της στον κλάδο της κτηνοτροφίας- κτηνιατρικής κυρίως στην Κίνα οδήγησε σε αύξηση των ανθεκτικών στελεχών σε είδη όπως *Enterobacteriaceae*. Πλέον η αντοχή στην κολιστίνη επεκτείνεται σε όλη την υφήλιο όχι μόνο σε περιβαλλοντικά στελέχη αλλά και σε κλινικά.

Η ανησυχία για την αντοχή στην κολιστίνη ενισχύθηκε ύστερα από την ανακάλυψη των 10 κινητών γονιδίων αντοχής (*mcr-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, 8-, 9-, 10*) και των ομολόγων τους από το 2015 έως το 2020. Τα γονίδια αυτά ανευρίσκονται σε πλασμίδια τα οποία με οριζόντια μεταφορά (HGT) μπορούν να μεταδοθούν με μεγάλη ευκολία σε βακτηριακούς πληθυσμούς.

Παρατηρήθηκε ότι η αρχική ανακάλυψη αυτών των γονιδίων αφορούσε απομονώσεις κυρίως σε χοίρους και επιφάνειες κτηνοτροφικών μονάδων. Από αυτό συμπεραίνουμε ότι τα χοιροστάσια και τα σφαγεία οικόσιτων ζώων θεωρούνται πιθανές δεξαμενές (reservoir)

γονιδίων *mcr* που με τη σειρά τους μπορούν να διαδοθούν στο περιβάλλον (ξηρό και υδάτινο) αλλά και στην κοινότητα.

Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες και εφαρμογή πολιτικών επιτήρησης. Συνιστάται η βελτίωση εργαστηριακών μεθόδων για τη σωστή αξιολόγηση της φαινοτυπικής αντίστασης στην κολιστίνη, παραδείγματος χάρη με χρήση τεχνικών βασισμένων σε BMD ως δοκιμή ευαισθησίας (screening test) και επιδημιολογικές αναλύσεις σε τοπικό και διεθνές επίπεδο, με βάση τη μοριακή ανίχνευση γονιδίων αντοχής σε αντιβιοτικά (Multiplex PCR). Οι μέχρι στιγμής διαθέσιμες μοριακές τεχνικές διαθέτουν αρκετά μειονεκτήματα και παρουσιάζουν μειωμένη ειδικότητα ενώ δεν καλύπτουν όλα τα γονίδια αντοχής στην κολιστίνη (219). Όλα τα παραπάνω κρίνονται απαραίτητα για την κατανόηση της πολυπλοκότητας και έκταση της διάδοσης των διαφόρων γονιδίων *mcr* και των επιπτώσεών τους στην δημόσια υγεία (163).

Πέρα όμως, από τον έλεγχο της ευαισθησίας των Gram αρνητικών μικρόβιων στην κολιστίνη, θα πρέπει το ενδιαφέρον των ερευνητών να στραφεί στην ανάπτυξη νέων τεχνολογιών/ αντιβιοτικών τα οποία να καλύπτουν όλο το εύρος των βακτηρίων που πλέον έχουν αναπτύξει αντοχή στα υπάρχοντα αντιβιοτικά.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Morens, D. M., Folkers, G. K., & Fauci, A. S. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature*. 2004, Τόμ. 430, 6996, σσ. 242-249.
2. Walsh, C., & Wencewicz, T. (2020). *Antibiotics: challenges, mechanisms, opportunities*. s.l. : John Wiley & Sons, 2020.
3. Ocampo, P. S., Lázár, V., Papp, B., Arnoldini, M., Zur Wiesch, P. A., Busa-Fekete, R., ... & Bonhoeffer, S. Antagonism between bacteriostatic and bactericidal antibiotics is prevalent. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014, Τόμ. 58, 8, σσ. 4573-4582.
4. Aminov, R. History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. *Biochemical pharmacology*. 2017, Τόμ. 133, σσ. 4-19.
5. Burke, E. T. The arseno-therapy of syphilis; stovarsol, and tryparsamide. *British Journal of Venereal Diseases*. 1925, Τόμ. 1, 4, σ. 321.
6. Fleming, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British journal of experimental pathology*. 1929, Τόμ. 10, 3, σ. 226.
7. Domagk, G. Ein beitrag zur chemotherapie der bakteriellen infektionen. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 1935, Τόμ. 61, 07, σσ. 250-253.
8. TREFOUEL, J. Activité du p-aminophénylsulfonamide sur les infections streptococciques expérimentales de la souris et du lapin. *CR Soc Biol (Paris)*. 1935, Τόμ. 120, σσ. 756-758.
9. Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., & Connolly, L. E. Aminoglycosides: an overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2016, Τόμ. 6, 6, σ. a027029.
10. Kushner, B., Allen, P. D., & Crane, B. T. Frequency and demographics of gentamicin use. *Otology & neurotology: official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology*. 2016, Τόμ. 37, 2, σ. 190.
11. Aminov, R. I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in microbiology*. 2010, Τόμ. 1, σ. 134.
12. Rose, W. E., & Rybak, M. J. Tigecycline: first of a new class of antimicrobial agents. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 2006, Τόμ. 26, 8, σσ. 1099-1110.
13. Aminov, R. I. Evolution in action: dissemination of tet (X) into pathogenic microbiota. *Frontiers in microbiology*. 2013, Τόμ. 4, σ. 192.

14. Dinos, G. P., Athanassopoulos, C. M., Missiri, D. A., Giannopoulou, P. C., Vlachogiannis, I. A., Papadopoulos, G. E., ... & Kalpaxis, D. L. Chloramphenicol derivatives as antibacterial and anticancer agents: historic problems and current solutions. *Antibiotics*. 2016, Τόμ. 5, 2, σ. 20.
15. Eliakim-Raz, N., Lador, A., Leibovici-Weissman, Y., Elbaz, M., Paul, M., & Leibovici, L. Efficacy and safety of chloramphenicol: joining the revival of old antibiotics? Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2015, Τόμ. 70, 4, σσ. 979-996.
16. Raza, W., Yang, W., & Shen, Q. R. Paenibacillus polymyxa: antibiotics, hydrolytic enzymes and hazard assessment. *Journal of Plant Pathology*. 2008, σσ. 419-430.
17. Brockmann, H., & Henkel, W. Pikromycin, ein neues Antibiotikum aus Actinomyceten. *NW*. 1950, Τόμ. 37, 6, σσ. 138-139.
18. Kittendorf, J. D., & Sherman, D. H. The methymycin/pikromycin pathway: a model for metabolic diversity in natural product biosynthesis. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2009, Τόμ. 17, 6, σσ. 2137-2146.
19. Wentland, M. P. (1993). In memoriam: George Y. Leshner. Quinolone antimicrobial agents. *ed.* 1993, σ. 2.
20. Administration, Food and Drug. *Fluoroquinolone antibacterial drugs: drug safety communication—FDA advises restricting use for certain uncomplicated infections*. 2017.
21. Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. Antibiotics: Past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*. 2019, Τόμ. 51, σσ. 72-80.
22. Τσαγκαδούρας, Α. *Αντιβιοτικά-Μηχανισμός δράσης. Υπολογιστική πρόβλεψη αναστολής της DNA γύρασης του E. Coli από νέες χημικές ενώσεις με τη μέθοδο Docking*. s.l. : ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ, 2020.
23. El-Sayed Ahmed, M. A. E. G., Zhong, L. L., Shen, C., Yang, Y., Doi, Y., & Tian, G. B. Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000–2019). *Emerging Microbes & Infections*. 2020, Τόμ. 22, 1, σσ. 868-885.
24. Loho, T., Dharmayanti, A. (2015). Colistin: an antibiotic and its role in multiresistant Gram-negative infections. *Acta Medica Indonesiana*, 47(2). Colistin: an antibiotic and its role in multiresistant Gram-negative infections. *Acta Medica Indonesiana*. 2015, Τόμ. 47, 2.
25. Gurjar, M. Colistin for lung infection: an update. *Journal of intensive care*. 2015, Τόμ. 3, 1, σ. 3.

26. Das, P., Sengupta, K., Goel, G., & Bhattacharya, S. Colistin: Pharmacology, drug resistance and clinical applications. *Journal of The Academy of Clinical Microbiologists*. 2017, Τόμ. 19, 2, σ. 77.
27. Falagas, M. E., Kasiakou, S. K., & Saravolatz, L. D. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clinical infectious diseases*. 2005, Τόμ. 40, 9, σσ. 1333-1341.
28. Rhouma, M., Beaudry, F., Theriault, W., & Letellier, A. Colistin in pig production: chemistry, mechanism of antibacterial action, microbial resistance emergence, and one health perspectives. *Frontiers in microbiology*. 2016, Τόμ. 7, σ. 1789.
29. Orwa, J. A., GOVAERIS, C., Busson, R., Roets, E., Van Schepdael, A., & Hoogmartens, J. Isolation and structural characterization of colistin components. *The Journal of antibiotics*. 2001, Τόμ. 54, 7, σσ. 595-599.
30. Barnett, M., Bushby, S. R. M., & Wilkinson, S. Sodium sulphomethyl derivatives of polymyxins. *British journal of pharmacology and chemotherapy*. 1964, Τόμ. 23, 3, σσ. 552-574.
31. Berlana, D., Llop, J. M., Fort, E., Badia, M. B., & Jodar, R. Use of colistin in the treatment of multiple-drug-resistant gram-negative infections. *American journal of health-system pharmacy*. 2005, Τόμ. 62, 1, σσ. 39-47.
32. Beveridge, E. G., & Martin, A. J. Sodium sulphomethyl derivatives of polymyxins. *British journal of pharmacology and chemotherapy*. 1967, Τόμ. 29, 2, σ. 125.
33. Bergen, P. J., Li, J., Rayner, C. R., & Nation, R. L. Colistin methanesulfonate is an inactive prodrug of colistin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006, Τόμ. 50, 6, σσ. 1953-1958.
34. Li, J., Milne, R. W., Nation, R. L., Turnidge, J. D., & Coulthard, K. Stability of colistin and colistin methanesulfonate in aqueous media and plasma as determined by high-performance liquid chromatography. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003, Τόμ. 6, 9, σ. 4.
35. Landman, D., Georgescu, C., Martin, D. A., & Quale, J. Polymyxins revisited. *Clinical microbiology reviews*. 2008, Τόμ. 21, 3, σσ. 449-465.
36. Grégoire, N., Aranzana-Climent, V., Magréault, S., Marchand, S., & Couet, W. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Colistin. *Clinical Pharmacokinetics*. 2017, Τόμ. 56, 12, σσ. 1441–1460.
37. Η ορθολογική χρήση των αντιβιοτικών απο τον νοσοκομειακό ιατρό: Η κολιστίνη. Καραϊσκος, Η. Δράμα : Ελληνική Εταιρεία Χημειοθεραπείας, 2018.

38. Li, J., Nation, R. L., Turnidge, J. D., Milne, R. W., Coulthard, K., Rayner, C. R., & Paterson, D. L. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *The Lancet infectious diseases*. 2006, Τόμ. 6, 9, σσ. 589-601.
39. Craig, W. A. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clinical infectious diseases*. 1998, Τόμ. 26, 1, σσ. 1-10.
40. *Plasma binding of colistin involves multiple proteins and is concentration dependent: potential clinical implications*. Dudhani, R. V., Li, J., & Nation, R. L. San Francisco : s.n., 2009. In Forty-ninth Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. σ. 41.
41. Li, J., Turnidge, J., Milne, R., Nation, R. L., & Coulthard, K. In Vitro Pharmacodynamic Properties of Colistin and Colistin Methanesulfonate against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Patients with Cystic Fibrosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001, Τόμ. 45, 3, σσ. 781-785.
42. Poudyal, A., Howden, B. P., Bell, J. M., Gao, W., Owen, R. J., Turnidge, J. D., ... & Li, J. In vitro pharmacodynamics of colistin against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008, Τόμ. 62, 6, σσ. 1311-1318.
43. Kanellaki, V. K. *Φαρμακοκινητική μελέτη εισπνεόμενης κολιστίνης μετά τη χορήγηση μεθανοσουλφονικής κολιστίνης(CMS) μέσω νεφελοποιητή Aeroneb® Professional Nebulizer System σε διασωληνωμένους ασθενείς με λοίμωξη του αναπνευστικού*. Αθήνα : Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ), 2017.
44. Nation, R. L., Li, J., Cars, O., Couet, W., Dudley, M. N., Kaye, K. S., ... & Tsuji, B. T. Framework for optimisation of the clinical use of colistin and polymyxin B: the Prato polymyxin consensus. *The Lancet infectious diseases*. 2015, Τόμ. 15, 2, σσ. 225-234.
45. Couet, W., Gregoire, N., Gobin, P., Saulnier, P. J., Frasca, D., Marchand, S., & Mimoz, O. Pharmacokinetics of colistin and colistimethate sodium after a single 80-mg intravenous dose of CMS in young healthy volunteers. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2011, Τόμ. 89, 6, σσ. 875-879.
46. Plachouras, D., Karvanen, M., Friberg, L. E., Papadomichelakis, E., Antoniadou, A., Tsangaris, I., ... & Cars, O. Population pharmacokinetic analysis of colistin methanesulfonate and colistin after intravenous administration in critically ill patients with infections caused by gram-negative bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009, Τόμ. 53, 8, σσ. 3430-3436.

47. Mohamed, A. F., Karaikos, I., Plachouras, D., Karvanen, M., Pontikis, K., Jansson, B., ... & Cars, O. Application of a loading dose of colistin methanesulfonate in critically ill patients: population pharmacokinetics, protein binding, and prediction of bacterial kill. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012, Τόμ. 56, 8, σσ. 4241-4249.
48. Karaikos, I., Friberg, L. E., Pontikis, K., Ioannidis, K., Tsagkari, V., Galani, L., ... & Giamarellou, H. Colistin population pharmacokinetics after application of a loading dose of 9 MU colistin methanesulfonate in critically ill patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015, Τόμ. 59, 12, σσ. 7240-7248.
49. Garonzik, S. M., Li, J., Thamlikitkul, V., Paterson, D. L., Shoham, S., Jacob, J., ... & Nation, R. L. Population pharmacokinetics of colistin methanesulfonate and formed colistin in critically ill patients from a multicenter study provide dosing suggestions for various categories of patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011, Τόμ. 55, 7, σσ. 3284-3294.
50. Karvanen, M., Plachouras, D., Friberg, L. E., Paramythiotou, E., Papadomichelakis, E., Karaikos, I., ... & Giamarellou, H. Colistin methanesulfonate and colistin pharmacokinetics in critically ill patients receiving continuous venovenous hemodiafiltration. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013, Τόμ. 57, 1, σσ. 668-671.
51. Cheah, S. E., Wang, J., Nguyen, V. T. T., Turnidge, J. D., Li, J., & Nation, R. L. (2015). New pharmacokinetic/pharmacodynamic studies of systemically administered colistin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in mouse thigh and lung infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2015, Τόμ. 70, 12, σσ. 3291-3297.
52. Tran, T. B., Velkov, T., Nation, R. L., Forrest, A., Tsuji, B. T., Bergen, P. J., & Li, J. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and polymyxin B: are we there yet? *International journal of antimicrobial agents*. 2016, Τόμ. 48, 6, σσ. 592-597.
53. Ziaka, M., Markantonis, S. L., Fousteri, M., Zygoulis, P., Panidis, D., Karvouniaris, M., ... & Zakynthinos, E. Combined intravenous and intraventricular administration of colistin methanesulfonate in critically ill patients with central nervous system infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013, Τόμ. 57, 4, σσ. 1938-1940.
54. Yapa, S. W., Li, J., Patel, K., Wilson, J. W., Dooley, M. J., George, J., ... & Nation, R. L. Pulmonary and systemic pharmacokinetics of inhaled and intravenous colistin methanesulfonate in cystic fibrosis patients: targeting advantage of inhalational administration. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014, Τόμ. 58, 5, σσ. 2570-2579.

55. Boisson, M., Jacobs, M., Grégoire, N., Gobin, P., Marchand, S., Couet, W., & Mimoz, O. (2014). Comparison of intrapulmonary and systemic pharmacokinetics of colistin methanesulfonate (CMS) and colistin after aerosol delivery and intravenous administration of CMS in critically ill patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014, Τόμ. 58, 12, σσ. 7331-7339.
56. Guyonnet, J., Manco, B., Baduel, L., Kaltsatos, V., Aliabadi, M. H. F. S., & Lees, P. (2010).. Research in veter. Determination of a dosage regimen of colistin by pharmacokinetic/pharmacodynamic integration and modeling for treatment of GIT disease in pigs. *Research in veterinary science*. 2010, Τόμ. 88, 2, σσ. 307-314.
57. Saidel-Odes, L., Polachek, H., Peled, N., Riesenber, K., Schlaeffer, F., Trabelsi, Y., ... & Borer, A. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of selective digestive decontamination using oral gentamicin and oral polymyxin E for eradication of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* carriage. *Infection control and hospital epidemiology*. 2012, Τόμ. 33, 1, σσ. 14-19.
58. Zavascki, A. P., Goldani, L. Z., Cao, G., Superti, S. V., Lutz, L., Barth, A. L., ... & Li, J. Pharmacokinetics of intravenous polymyxin B in critically ill patients. *Clinical Infectious Diseases*. 2008, Τόμ. 47, 10, σσ. 1298-1304.
59. Azad, M. A., Huang, J. X., Cooper, M. A., Roberts, K. D., Thompson, P. E., Nation, R. L., ... & Velkov, T. Structure–activity relationships for the binding of polymyxins with human α -1-acid glycoprotein. *Biochemical pharmacology*. 2012, Τόμ. 84, 3, σσ. 278-291.
60. Kremer, J. M., Wilting, J. A. A. P., & Janssen, L. H. Drug binding to human alpha-1-acid glycoprotein in health and disease. *Pharmacological reviews*. 1988, Τόμ. 40, 1, σσ. 1-47.
61. Al-Khayyat, A. A., & Aronson, A. L. Pharmacologic and toxicologic studies with the polymyxins. II. Comparative pharmacologic studies of the sulfate and methanesulfonate salts of polymyxin B and colistin in dogs. *Chemotherapy*. 1973, Τόμ. 19, 2, σσ. 82-97.
62. Huang, J. X., Blaskovich, M. A., Pelingon, R., Ramu, S., Kavanagh, A., Elliott, A. G., ... & Cooper, M. A. Mucin binding reduces colistin antimicrobial activity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015, Τόμ. 59, 10, σσ. 5925-5931.
63. Καραϊσκος, Η. Μελέτη της φαρμακοκινητικής της κολιμυκίνης και μελέτη της φαρμακοκινητικής μετά από χορήγηση δόσης φόρτισης στους ασθενείς της μονάδας εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ). s.l.: Doctoral dissertation, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2014.

64. Kadota, Y., Horio, H., Mori, T., Sawabata, N., Goto, T., Yamashita, S. I., ... & Iwasaki, A. Perioperative management in myasthenia gravis: republication of a systematic review and a proposal by the guideline committee of the Japanese Association. Perioperative management in myasthenia gravis: republication of a systematic review and a proposal by the guideline committee of the Japanese Association. *General Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2015, Τόμ. 63, 4, σσ. 201-215.
65. Γαληνός Οδηγός Φαρμάκων. <https://www.galinos.gr>. [Ηλεκτρονικό] <https://www.galinos.gr/web/drugs/main/substances/colistin/precautions>.
66. Berg, J. R., Spilker, C. M., & Lewis, S. A. Effects of polymyxin B on mammalian urinary bladder. *The Journal of membrane biology*. 1996, Τόμ. 154, 2, σσ. 119-130.
67. —. Modulation of polymyxin B effects on mammalian urinary bladder. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 1998, Τόμ. 275, 2, σσ. F204-F215.
68. Lewis, J. R., & Lewis, S. A. Colistin interactions with the mammalian urothelium. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2004, Τόμ. 286, 4, σσ. 913-922.
69. Spapen, H., Jacobs, R., Van Gorp, V., Troubleyn, J., & Honoré, P. M. Renal and neurological side effects of colistin in critically ill patients. *Annals of intensive care*. 2011, Τόμ. 1, 1, σ. 14.
70. Koch-Weser, J. A. N., SIDEL, V. W., FEDERMAN, E. B., KANAREK, P., FINER, D. C., & EATON, A. E. Adverse effects of sodium colistimethate: manifestations and specific reaction rates during 317 courses of therapy. *Annals of internal medicine*. 1970, Τόμ. 72, 6, σσ. 857-868.
71. Parisi, A. F., & Kaplan, M. H. Apnea during treatment with sodium colistimethate. *JAMA*. 1965, σσ. 298-299.
72. Falagas, M. E., & Kasiakou, S. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. *Critical care*. 2006, Τόμ. 40, 1.
73. Kaye, K. S., Pogue, J. M., Tran, T. B., Nation, R. L., & Li, J. Agents of last resort: polymyxin resistance. *Infectious disease clinics of North America*. 2016, Τόμ. 30, 2, σ. 391.
74. Dijkmans, A. C., Wilms, E. B., Kamerling, I. M., Birkhoff, W., Ortiz-Zacarias, N. V., van Nieuwkoop, C., ... & Touw, D. J. Colistin: revival of an old polymyxin antibiotic. *Therapeutic drug monitoring*. 2015, Τόμ. 37, 4, σσ. 419-427.
75. Bialvaei, A. Z., & Samadi Kafil, H. Colistin, mechanisms and prevalence of resistanc. *Current medical research and opinion*. 2015, Τόμ. 31, 4, σσ. 707-721.
76. Zgurskaya, H. I., Lopez, C. A., & Gnanakaran, S. Permeability barrier of Gram-negative cell envelopes and approaches to bypass it. *ACS infectious diseases*. 2015, Τόμ. 1, 11, σσ. 512-522.

77. Silipo, A., & Molinaro, A. The diversity of the core oligosaccharide in lipopolysaccharides. In *Endotoxins: Structure, Function and Recognition*. 2010, σσ. 66-69.
78. Greenwood, D., Slack, R., Peutherer, J., & Barer, M. Γενετική Μικροβίων. *Ιατρική Μικροβιολογία. Μικροβιακές λοιμώξεις: Παθογένεια, Ανοσία, Εργαστηριακή Διερεύνηση & Θεραπεία*. Εδιμβούργο : BROKEN HILL PUBLISHER LTD, 2016, σσ. 91-94.
79. Raetz, C. R., & Whitfield, C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual review of biochemistry*. 2002, Τόμ. 71, 1, σσ. 635-700.
80. Rittig, M. G., Kaufmann, A., Robins, A., Shaw, B., Sprenger, H., Gemsa, D., ... & Dornand, J. (2003). Smooth and rough lipopolysaccharide phenotypes of *Brucella* induce different intracellular trafficking and cytokine/chemokine release in human monocytes. *Journal of leukocyte biology*. 2003, Τόμ. 74, 6, σσ. 1045-1055.
81. Tsujimoto, H., Gotoh, N., & Nishino, T. Diffusion of macrolide antibiotics through the outer membrane of *Moraxella catarrhalis*. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 1999, Τόμ. 5, 4, σσ. 196-200.
82. Hershberger, C., & Binkley, S. B. Chemistry and Metabolism of 3-Deoxy-d-mannooctulosonic Acid I. STEREOCHEMICAL DETERMINATION. *ournal of Biological Chemistry*. 1968, Τόμ. 243, 7, σσ. 1578-1584.
83. Tzeng, Y. L., Datta, A., Kolli, V. K., Carlson, R. W., & Stephens, D. S. Endotoxin of *Neisseria meningitidis* composed only of intact lipid A: inactivation of the meningococcal 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid transferase. *Journal of Bacteriology*,. 2002, σσ. 2379-2388.
84. Khan, M. M., Ernst, O., Sun, J., Fraser, I. D., Ernst, R. K., Goodlett, D. R., & Nita-Lazar, A. Mass spectrometry-based structural analysis and systems immunoproteomics strategies for deciphering the host response to endotoxin. *Journal of molecular biology*. 2018, Τόμ. 413, 17, σσ. 2641-2660.
85. Pagès, J. M., James, C. E., & Winterhalter, M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*. 2008, Τόμ. 6, 12, σσ. 893-903.
86. Velkov, T., Thompson, P. E., Nation, R. L., & Li, J. Structure– activity relationships of polymyxin antibiotics. *Journal of medicinal chemistry*. 2010, Τόμ. 53, 5, σσ. 1898-1916.
87. Gales AC, Jones RN, Sader HS. . Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY

- antimicrobial surveillance programme (2001-2004). *Clinical microbiology and infection*. 2006, Τόμ. 12, 4, σσ. 315-321.
88. Nation, R. L., & Li, J. Colistin in the 21st century. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2009, σσ. 535–543.
89. Deris, Z. Z., Akter, J., Sivanesan, S., Roberts, K. D., Thompson, P. E., Nation, R. L., ... & Velkov, T. A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity. *The Journal of antibiotics*. 2014, Τόμ. 67, 2, σσ. 147-151.
90. Sabnis, A., Klöckner, A., Becce, M., Evans, L. E., Furniss, R. C. D., Mavridou, D. A., ... & Edwards, A. M. Colistin kills bacteria by targeting lipopolysaccharide in the cytoplasmic membrane. *bioRxiv*. 2019, σ. 479618.
91. Κοντοπίδου, Φ. Αντοχή των μικροβίων στα Αντιβιοτικά. Αντιμικροβιακή αντοχή. s.l. : Γραφείο Νοσοκομειακών Λοιμώξεων και Μικροβιακής Αντοχής. Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας., 2019.
92. O’Neill, J. Review on antimicrobial resistance. *Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations*. 2014, Τόμ. 2014, 4.
93. Michael, C. A., Dominey-Howes, D., & Labbate, M. (2014). . 2, 145. The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management. *Frontiers in public health*. 2014, Τόμ. 2, σ. 145.
94. McEwen, S. A., & Collignon, P. J. Antimicrobial resistance: a one health perspective. *Antimicrobial resistance in bacteria from livestock and companion animals*. σσ. 521-547.
95. Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. Βακτηριακή Αντοχή στα Αντιβιοτικά. *Εισαγωγή στη μικροβιολογία*. Αθήνα : Εκδόσεις Πασχαλίδης, 2017, σσ. 602-603.
96. Lorenzo-Díaz, F., Fernández-López, C., Lurz, R., Bravo, A., & Espinosa, M. Crosstalk between vertical and horizontal gene transfer: plasmid replication control by a conjugative relaxase. *Nucleic acids research*. 2017, Τόμ. 45, 13, σσ. 7774-7785.
97. Soucy, S. M., Huang, J., & Gogarten, J. P. Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nature Reviews Genetics*. 2015, Τόμ. 16, 8, σσ. 472-482.
98. Munita, J. M., & Arias, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance. *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*. 2016, σσ. 481-511.
99. Lerminiaux, N. A., & Cameron, A. D. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian journal of microbiology*. 2019, Τόμ. 65, 1, σσ. 34-44.

100. Sørensen, S. J., Bailey, M., Hansen, L. H., Kroer, N., & Wuertz, S. Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nature Reviews Microbiology*. 2005, Τόμ. 3, 9, σσ. 700-710.
101. Charpentier, X., Polard, P., & Claverys, J. P. Introduction of competence for genetic transformation by antibiotics: convergent evolution of stress responses in distant bacterial species lacking SOS? *Current opinion in microbiolog*. 2012, Τόμ. 15, 5, σσ. 570-576.
102. Hiller, N. L., Ahmed, A., Powell, E., Martin, D. P., Eutsey, R., Earl, J., ... & Ehrlich, G. D. (2010). . Generation of genic diversity among *Streptococcus pneumoniae* strains via horizontal gene transfer during a chronic polyclonal pediatric infection. *PLoS Pathog*. 2010, Τόμ. 6, 9, σ. e1001108.
103. Ribeiro, S. M., Felício, M. R., Boas, E. V., Gonçalves, S., Costa, F. F., Samy, R. P., ... & Franco, O. L. New frontiers for anti-biofilm drug development. *Pharmacology & Therapeutics*. 2016, Τόμ. 160, σσ. 133-144.
104. Santajit, S., & Indrawattana, N. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *BioMed research international*, 2016. 2016.
105. Pucci, M. J., & Dougherty, T. J. Direct quantitation of the numbers of individual penicillin-binding proteins per cell in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 2002, Τόμ. 184, 2, σσ. 588-591.
106. Tang, S. S., Apisarnthanarak, A., & Hsu, L. Y. Mechanisms of β -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community-and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. *Advanced drug delivery reviews*. 2014, Τόμ. 78, σσ. 3-13.
107. Sun, J., Deng, Z., & Yan, A. Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014, Τόμ. 453, 2, σσ. 254-267.
108. Piddock, L. J. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clinical microbiology reviews*. 2006, Τόμ. 19, 2, σσ. 382-402.
109. Høiby, N., Ciofu, O., Johansen, H. K., Song, Z. J., Moser, C., Jensen, P. Ø., ... & Bjarnsholt, T. The clinical impact of bacterial biofilms. *International journal of oral science*. 2011, Τόμ. 3, 2, σσ. 55-65.
110. Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999, Τόμ. 284, 5418, σσ. 1318-1322.

111. Nickel, J. C., Ruseska, I., Wright, J. B., & Costerton, J. W. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1985, Τόμ. 27, 4, σσ. 619-624.
112. Cheema, M. S., Rassing, J. E., & Marriott, C. The diffusion characteristics of antibiotics in mucus glycoprotein gels. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1986, Τόμ. 38, 12, σ. 53.
113. Stewart, P. S. Diffusion in biofilms. *Journal of bacteriology*. 2003, Τόμ. 185, 5, σσ. 1485-1491.
114. Hoyle, B. D., Alcantara, J., & Costerton, J. W. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm as a diffusion barrier to piperacillin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1992, Τόμ. 36, 9, σσ. 2054-2056.
115. Stewart, P. S., & Raquepas, J. B. Implications of reaction-diffusion theory for the disinfection of microbial biofilms by reactive antimicrobial agents. *Chemical Engineering Science*. 1995, Τόμ. 50, 19, σσ. 3099-3104.
116. De Beer, D., Srinivasan, R., & Stewart, P. S. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*. 1994, Τόμ. 60, 12, σσ. 4339-4344.
117. Brown, M. R., ALLISON, D. G., & GILBERT, P. Resistance of bacterial biofilms to antibiotics a growth-rate related effect? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1988, Τόμ. 22, 6, σσ. 777-780.
118. Kinniment, S. L., Wimpenny, J. W., Adams, D., & Marsh, P. D. Development of a steady-state oral microbial biofilm community using the constant-depth film fermenter. *Microbiology*. 1996, Τόμ. 142, 3, σσ. 631-638.
119. Greene, C., Vadlamudi, G., Newton, D., Foxman, B., & Xi, C. 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, Τόμ. 44, 5, σσ. e65-e71.
120. Frieri, M., Kumar, K., & Boutin, A. Antibiotic resistance. *Journal of infection and public health*. 2017, Τόμ. 10, 4, σσ. 369-378.
121. Page, R. C., & Kornman, K. S. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology 2000*. 1997, Τόμ. 14, 1, σσ. 9-11.
122. Koenig, S. M., & Truwit, J. D. Ventilator-associated pneumonia: diagnosis, treatment, and prevention. *Clinical microbiology reviews*. 2006, Τόμ. 19, 4, σσ. 637-657.

123. Donelli, G., Guaglianone, E., Di Rosa, R., Fiocca, F., & Basoli, A. Plastic biliary stent occlusion: factors involved and possible preventive approaches. *Clinical Medicine & Research*. 2007, Τόμ. 5, 1, σσ. 53-60.
124. Nicolle, L. E. Catheter associated urinary tract infections. *Antimicrobial resistance and infection control*,. 2014, Τόμ. 3, 1, σσ. 1-8.
125. Llor, C., & Bjerrum, L. Antimicrobial resistance: risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem. *Therapeutic advances in drug safety*. 2014, Τόμ. 5, 6, σσ. 229-241.
126. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>. [Ηλεκτρονικό]
127. Kuehn, B. M. Excessive antibiotic prescribing for sore throat and acute bronchitis remains common. *JAMA*. 2013, Τόμ. 310, 20, σσ. 2135-2136.
128. Duong, D. V., Binns, C. W., & Le, T. V. Availability of antibiotics as over-the-counter drugs in pharmacies: a threat to public health in Vietnam. *Tropical medicine & international health*. 1997, Τόμ. 2, 12, σσ. 1133-1139.
129. Wright, G. D. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Current opinion in microbiology*,. 2010, Τόμ. 13, 5, σσ. 589-594.
130. Baquero, F., Martínez, J. L., & Cantón, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current opinion in biotechnology*. 2008, Τόμ. 19, 3, σσ. 260-265.
131. Nesme, J., Cécillon, S., Delmont, T. O., Monier, J. M., Vogel, T. M., & Simonet, P. Large-scale metagenomic-based study of antibiotic resistance in the environment. *Current biology*. 2014, Τόμ. 24, 10, σσ. 1096-1100.
132. Zhu, Y. G., Johnson, T. A., Su, J. Q., Qiao, M., Guo, G. X., Stedtfeld, R. D., ... & Tiedje, J. M. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013, Τόμ. 110, 9, σσ. 3435-3440.
133. Smith, M. A., Garbharran, H., Edwards, M. J., & O'Hara-Murdock, P. Health promotion and disease prevention through sanitation education in South African Zulu and Xhosa women. *Journal of Transcultural Nursing*. 2004, Τόμ. 15, 1, σσ. 62-68.
134. Ayukekbong, J. A., Ntemgwa, M., & Atabe, A. N. The threat of antimicrobial resistance in developing countries: causes and control strategies. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 2017, Τόμ. 6, 1, σ. 47.

135. EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial susceptibility testing of colistin—problems detected with several commercially available products. EUCAST warnings concerning antimicrobial susceptibility testing products o. *Växjö: EUCAST*. 2017.
136. Matuschek, E., Åhman, J., Webster, C., & Kahlmeter, G. Antimicrobial susceptibility testing of colistin—evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. *Clinical Microbiology and Infection*. 2018, Τόμ. 24, 8, σσ. 865-870.
137. Vourli, S., Dafopoulou, K., Vrioni, G., Tsakris, A., & Pournaras, S. Evaluation of two automated systems for colistin susceptibility testing of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017, Τόμ. 72, 9, σσ. 2528-2530.
138. EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0, 2020*. 2020.
139. Catry, B., Cavaleri, M., Baptiste, K., Grave, K., Grein, K., Holm, A., ... & Magiorakos, A. P. Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *International journal of antimicrobial agents*. 2015, Τόμ. 46, 3, σσ. 297-306.
140. Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., ... & Yu, L. F. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet infectious diseases*. 2016, Τόμ. 16, 2, σσ. 161-168.
141. Skov, R. L., & Monnet, D. L. Plasmid-mediated colistin resistance (mcr-1 gene): three months later, the story unfolds. *Eurosurveillance*. 2016, Τόμ. 21, 9.
142. McPhee, J. B., Lewenza, S., & Hancock, R. E. Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology*. 2003, Τόμ. 50, 1, σσ. 205-217.
143. Carattoli, A. Plasmids and the spread of resistance. *International Journal of Medical Microbiology*. 2013, Τόμ. 303, 6-7, σσ. 298-304.
144. Xu, Y., Wei, W., Lei, S., Lin, J., Srinivas, S., & Feng, Y. .. , 9(2). An evolutionarily conserved mechanism for intrinsic and transferable polymyxin resistance. *MBio*. 2018, Τόμ. 9, 2.

145. Sun, J., Zhang, H., Liu, Y. H., & Feng, Y. Towards understanding MCR-like colistin resistance. *Trends in microbiology*. 2018, Τόμ. 26, 9, σσ. 794-808.
146. Rebelo, A. R., Bortolaia, V., Kjeldgaard, J. S., Pedersen, S. K., Leekitcharoenphon, P., Hansen, I. M., ... & Battisti, A. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes. *Eurosurveillance*. 2018, Τόμ. 23, 6.
147. Shen, Z., Wang, Y., Shen, Y., Shen, J., & Wu, C. Early emergence of mcr-1 in Escherichia coli from food-producing animals. *The Lancet infectious diseases*. 2016, Τόμ. 16, 3, σ. 293.
148. Poirel, L., Kieffer, N., Liassine, N., Thanh, D., & Nordmann, P. Plasmid-mediated carbapenem and colistin resistance in a clinical isolate of Escherichia coli. *The Lancet Infectious Diseases*. 2016, Τόμ. 16, 3, σ. 281.
149. Du, H., Chen, L., Tang, Y. W., & Kreiswirth, B. N. Emergence of the mcr-1 colistin resistance gene in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *The Lancet infectious diseases*. 2016, Τόμ. 16, 3, σσ. 287-288.
150. Zhang, X. F., Doi, Y., Huang, X., Li, H. Y., Zhong, L. L., Zeng, K. J., ... & Tian, G. B. Possible transmission of mcr-1–harboring Escherichia coli between companion animals and human. *Emerging infectious diseases*. 2016, Τόμ. 22, 9, σ. 1679.
151. Falgenhauer, L., Waezsada, S. E., Yao, Y., Imirzalioglu, C., Käsbohrer, A., Roesler, U., ... & Chakraborty, T. Colistin resistance gene mcr-1 in extended-spectrum β -lactamase-producing and carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Germany. *The Lancet infectious diseases*. 2016, Τόμ. 16, 3, σσ. 282-283.
152. Haenni, M., Poirel, L., Kieffer, N., Châtre, P., Saras, E., Métayer, V., ... & Madec, J. Y. Co-occurrence of extended spectrum β lactamase and MCR-1 encoding genes on plasmids. *The Lancet infectious diseases*. 2016, Τόμ. 16, 3, σσ. 281-282.
153. Matamoros, S., Van Hattem, J. M., Arcilla, M. S., Willemsse, N., Melles, D. C., Penders, J., ... & Goorhuis, A. Global phylogenetic analysis of Escherichia coli and plasmids carrying the mcr-1 gene indicates bacterial diversity but plasmid restriction. *Scientific reports*. 2017, Τόμ. 7, 1, σσ. 1-9.
154. Partridge, S. R., Di Pilato, V., Doi, Y., Feldgarden, M., Haft, D. H., Klimke, W., ... & Xavier, B. B. Proposal for assignment of allele numbers for mobile colistin resistance (mcr) genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018, Τόμ. 73, 10, σσ. 2625-2630.

155. Xavier, B. B., Lammens, C., Ruhai, R., Kumar-Singh, S., Butaye, P., Goossens, H., & Malhotra-Kumar, S. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*. *Eurosurveillance*. 2016, Τόμ. 21, 27.
156. P. Siguier, J. Perochon, L. Lestrade, J. Mahillon, M. Chandler. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Research*. 2006, Τόμ. 34, σσ. 32-36.
157. Yin, W., Li, H., Shen, Y., Liu, Z., Wang, S., Shen, Z., ... & Wang, Y. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *MBio*. 2017, Τόμ. 8, 3.
158. Carattoli, A., Villa, L., Feudi, C., Curcio, L., Orsini, S., Luppi, A., ... & Magistrali, C. F. Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Eurosurveillance*. 2017, Τόμ. 22, 31.
159. Pesciaroli, M., Cucco, L., De Luca, S., Massacci, F. R., Maresca, C., Medici, L., ... & Magistrali, C. F. Association between pigs with high caecal *Salmonella* loads and carcass contamination. *International journal of food microbiology*. 2017, Τόμ. 242, σσ. 82-86.
160. Chen, L., Zhang, J., Wang, J., Butaye, P., Kelly, P., Li, M., ... & Li, J. Newly identified colistin resistance genes, *mcr-4* and *mcr-5*, from upper and lower alimentary tract of pigs and poultry in China. *PloS one*. 2018, Τόμ. 13, 3.
161. Cabello, F. C., Tomova, A., Ivanova, L., & Godfrey, H. P. Aquaculture and *mcr* colistin resistance determinants. *MBio*. 2017, Τόμ. 8, 5.
162. Zhang, H., Hou, M., Xu, Y., Srinivas, S., Huang, M., Liu, L., & Feng, Y. Action and mechanism of the colistin resistance enzyme MCR-4. *Communications biology*. 2019, Τόμ. 2, 1, σσ. 1-14.
163. Carretto, E., Brovarone, F., Nardini, P., Russello, G., Barbarini, D., Pongolini, S., ... & Sarti, M. Detection of *mcr-4* positive *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in clinical isolates of human origin, Italy, October to November 2016. *Eurosurveillance*. 2018, Τόμ. 23, 2, σσ. 17-00821.
164. Coates, K., Walsh, T. R., Spencer, J., & Hinchliffe, P. 1.12 Å resolution crystal structure of the catalytic domain of the plasmid-mediated colistin resistance determinant MCR-2. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*. 2017, Τόμ. 73, 8, σσ. 443-449.
165. Borowiak, M., Fischer, J., Hammerl, J. A., Hendriksen, R. S., Szabo, I., & Malorny, B. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017, Τόμ. 72, 12, σσ. 3317-3324.

166. AbuOun, M., Stubberfield, E. J., Duggett, N. A., Kirchner, M., Dormer, L., Nunez-Garcia, J., ... & Anjum, M. F. *mcr-1* and *mcr-2* variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017, Τόμ. 72, 10, σσ. 2745-2749.
167. Hays, J. Studies into the Genetic Diversity and Complement Resistance Phenotype of *Moraxella catarrhalis*. 2006.
168. Vela, A. I., Sanchez-Porro, C., Aragon, V., Olvera, A., Dominguez, L., Ventosa, A., & Fernandez-Garayzabal, J. F. *Moraxella porci* sp. nov., isolated from pigs. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. Τόμ. 60, 10, σσ. 2446-2450.
169. Yang, Y. Q., Li, Y. X., Lei, C. W., Zhang, A. Y., & Wang, H. N. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018, Τόμ. 73, 7, σσ. 1791-1795.
170. Wayne, P. A. Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 2011.
171. Poirel, L., Lagrutta, E., Taylor, P., Pham, J., & Nordmann, P. Emergence of metallo- β -lactamase NDM-1-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* in Australia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010, Τόμ. 54, 11, σσ. 5914-4916.
172. Wang, X., Wang, Y., Zhou, Y., Li, J., Yin, W., Wang, S., ... & Wang, Y. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerging microbes & infections*. 2018, Τόμ. 7, 1, σσ. 1-9.
173. Bailey, D. C., Drake, E. J., Grant, T. D., & Gulick, A. M. Structural and functional characterization of aerobactin synthetase *lucA* from a hypervirulent pathotype of *Klebsiella pneumoniae*. *Biochemistry*. 2016, Τόμ. 55, 25, σσ. 3559-3570.
174. Melo, R. D. C. A., de Barros, E. M. R., Loureiro, N. G., de Melo, H. R. L., Maciel, M. A. V., & Lopes, A. C. S. Presence of *fim H*, *mrk D*, and *irp 2* Virulence Genes in KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Recife-PE, Brazil. *Current microbiology*. 2014, Τόμ. 69, 6, σσ. 824-831.
175. Huang, Y. J., Liao, H. W., Wu, C. C., & Peng, H. L. *MrkF* is a component of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. *Research in Microbiology*. 2009, Τόμ. 160, 1, σσ. 71-79.
176. Yao, Z., Feng, Y., Lin, J., & Zong, Z. Draft genome sequence of a colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical strain carrying the *bla*NDM-1 carbapenemase gene. *Genome announcements*. 2017, Τόμ. 5, 7.

177. Carroll, L. M., Gaballa, A., Guldimann, C., Sullivan, G., Henderson, L. O., & Wiedmann, M. (2019). Identification of novel mobilized colistin resistance gene mcr-9 in a multidrug-resistant, colistin-susceptible *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolate. *MBio*. 2019, Τόμ. 10, 3.
178. Carroll, L. M., Wiedmann, M., den Bakker, H., Siler, J., Warchocki, S., Kent, D., ... & Pereira, R. V. Whole-genome sequencing of drug-resistant *Salmonella enterica* isolates from dairy cattle and humans in New York and Washington states reveals source and geographic associations. *Applied and environmental microbiology*. 2017, Τόμ. 83, 12.
179. Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., ... & Larsen, M. V. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012, Τόμ. 67, 11, σσ. 2640-2644.
180. Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Larsen, M. V., Lund, O., Villa, L., ... & Hasman, H. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014, Τόμ. 58, 7, σσ. 3895-3903.
181. Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. BLAST+: architecture and applications. *BMC bioinformatics*. 2009, Τόμ. 10, 1, σσ. 1-9.
182. Huang, B., He, Y., Ma, X., Cai, R., Zeng, J., Lu, Y., ... & Chen, L. Promoter variation and gene expression of mcr-1-harboring plasmids in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from a Chinese hospital. *Antimicrobial agent and chemotherapy*. 2018, Τόμ. 62, 5.
183. Zhang, H., Miao, M., Yan, J., Wang, M., Tang, Y. W., Kreiswirth, B. N., ... & Du, H. Expression characteristics of the plasmid-borne mcr-1 colistin resistance gene. *Oncotarget*. 2017, 8, σ. 107596.
184. Gwozdzinski, K., Azarderakhsh, S., Imirzalioglu, C., Falgenhauer, L., & Chakraborty, T. An improved medium for colistin susceptibility testing. *Journal of clinical microbiology*. 2018, Τόμ. 56, 5.
185. Yuan, Y., Li, Y., Wang, G., Li, C., Xiang, L., She, J., ... & Zhang, L. Coproduction of MCR-9 and NDM-1 by colistin-resistant *Enterobacter hormaechei* isolated from bloodstream infection. *Infection and drug resistance*. 2019, Τόμ. 12, σ. 2979.
186. Wang, C., Feng, Y., Liu, L., Wei, L., Kang, M., & Zong, Z. Identification of novel mobile colistin resistance gene mcr-10. *Emerging microbes & infections*. 2020, Τόμ. 9, 1, σσ. 508-516.

187. Kieffer, N., Royer, G., Decousser, J. W., Bourrel, A. S., Palmieri, M., De La Rosa, J. M. O., ... & Poirel, L. mcr-9, an inducible gene encoding an acquired phosphoethanolamine transferase in *Escherichia coli*, and its origin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2019, Τόμ. 63, 9.
188. Wang, X., Zhai, W., Li, J., Liu, D., Zhang, Q., Shen, Z., ... & Wang, Y. Presence of an mcr-3 variant in *Aeromonas caviae*, *Proteus mirabilis*, and *Escherichia coli* from one domestic duck. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2018, Τόμ. 62, 2.
189. Wise, M. G., Estabrook, M. A., Sahm, D. F., Stone, G. G., & Kazmierczak, K. M.. Prevalence of mcr-type genes among colistin-resistant Enterobacteriaceae collected in 2014-2016 as part of the INFORM global surveillance program. *PLoS One*. 2018, Τόμ. 13, 4, σ. e0195281.
190. Dos Santos, L. D. R., Furlan, J. P. R., Ramos, M. S., Gallo, I. F. L., de Freitas, L. V. P., & Stehling, E. G. Co-occurrence of mcr-1, mcr-3, mcr-7 and clinically relevant antimicrobial resistance genes in environmental and fecal samples. *Archives of microbiology*. 2020, Τόμ. 202, σσ. 1795-1800.
191. Shen, Y., Yin, W., Liu, D., Shen, J., & Wang, Y. Reply to Cabello et al., "Aquaculture and mcr colistin resistance determinants". *MBio*. 2018, Τόμ. 9, 4.
192. Liu, Y., & Liu, J. H. Monitoring colistin resistance in food animals, an urgent threat. *Expert review of anti-infective therapy*. 2018, Τόμ. 16, 6, σσ. 443-446.
193. Al-Tawfiq, J. A., Laxminarayan, R., & Mendelson, M. How should we respond to the emergence of plasmid-mediated colistin resistance in humans and animals? *International Journal of Infectious Diseases*. 2017, Τόμ. 54, σσ. 77-84.
194. Sun, J., Zeng, X., Li, X. P., Liao, X. P., Liu, Y. H., & Lin, J. Plasmid-mediated colistin resistance in animals: current status and future directions. *Animal health research reviews*. 2017, Τόμ. 18, 2, σ. 136.
195. Nang, S. C., Li, J., & Velkov, T. The rise and spread of mcr plasmid-mediated polymyxin resistance. *Critical reviews in microbiology*. 2019, Τόμ. 45, 2, σσ. 131-161.
196. Anyanwu, M. U., Jaja, I. F., & Nwobi, O. C. Occurrence and characteristics of mobile colistin resistance (mcr) gene-containing isolates from the environment: a review. *International journal of environmental research and public health*. 2020, Τόμ. 17, 3, σ. 1028.
197. Wang, R., van Dorp, L., Shaw, L. P., Bradley, P., Wang, Q., Wang, X., ... & Balloux, F. The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene mcr-1. *Nature communications*. 2018, Τόμ. 9, 1, σσ. 1-9.

198. Zhang, H., Wei, W., Huang, M., Umar, Z., & Feng, Y. Definition of a family of nonmobile colistin resistance (NMCR-1) determinants suggests aquatic reservoirs for MCR-4. *Advanced science*. 2019, Τόμ. 6, 11, σ. 1900038.
199. Tiedje, J. M., Fang, W. A. N. G., Manaia, C. M., Virta, M., Sheng, H., Liping, M. A., ... & Edward, T. O. P. P. Antibiotic resistance genes in the human-impacted environment: A One Health perspective. *Pedosphere*. 2019, Τόμ. 29, 3, σσ. 273-282.
200. Gaze, W. H., Krone, S. M., Larsson, D. J., Li, X. Z., Robinson, J. A., Simonet, P., ... & Timinouni, M. Influence of humans on evolution and mobilization of environmental antibiotic resistome. *Emerging infectious diseases*. 2013, Τόμ. 19, 7.
201. Singer, A. C., Shaw, H., Rhodes, V., & Hart, A. Review of antimicrobial resistance in the environment and its relevance to environmental regulators. *Frontiers in microbiology*. 2016, Τόμ. 7, σ. 1728.
202. Shen, Y., Lv, Z., Yang, L., Liu, D., Ou, Y., Xu, C., ... & Wang, Y. Integrated aquaculture contributes to the transfer of mcr-1 between animals and humans via the aquaculture supply chain. *Environment international*. 2019, Τόμ. 130, σ. 104708.
203. Caselli, E., D'Accolti, M., Soffritti, I., Piffanelli, M., & Mazzacane, S. Spread of mcr-1–Driven Colistin Resistance on Hospital Surfaces, Italy. *Emerging infectious diseases*. 2018, Τόμ. 24, 9, σ. 1752.
204. Rodriguez-Mozaz, S., Chamorro, S., Marti, E., Huerta, B., Gros, M., Sànchez-Melsió, A., ... & Balcázar, J. L. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water research*. 2015, Τόμ. 69, σσ. 234-242.
205. Dalmolin, T. V., de Lima-Morales, D., & Barth, A. L. Plasmid-mediated colistin resistance: what do we know? *Journal of Infectiology*. 2018, Τόμ. 1, 2.
206. Lood, R., Ertürk, G., & Mattiasson, B. Revisiting antibiotic resistance spreading in wastewater treatment plants–bacteriophages as a much neglected potential transmission vehicle. *Frontiers in microbiology*. 2017, Τόμ. 8, σ. 2298.
207. Kneis, D., Berendonk, T. U., & Hess, S. High prevalence of colistin resistance genes in German municipal wastewater. *Science of The Total Environment*. 2019, Τόμ. 694, σ. 133454.
208. Kassem, I. I. First report of the plasmid-borne colistin resistance gene (mcr-1) in *Proteus mirabilis* isolated from domestic and sewer waters in Syrian refugee camps. *Travel medicine and infectious disease*. 2020, Τόμ. 33, σ. 101482.

209. Fukuda, A., Usui, M., Okubo, T., Tagaki, C., Sukpanyatham, N., & Tamura, Y. Co-harboring of cephalosporin (bla)/colistin (mcr) resistance genes among Enterobacteriaceae from flies in Thailand. *FEMS microbiology letters*. 2018, Τόμ. 365, 16, σ. fny178.
210. Yang, Q. E., Tansawai, U., Andrey, D. O., Wang, S., Wang, Y., Sands, K., ... & Niumsup, P. R. Environmental dissemination of mcr-1 positive Enterobacteriaceae by *Chrysomya* spp.(common blowfly): An increasing public health risk. *Environment international*. 2019, Τόμ. 122, σσ. 281-290.
211. Hameed, F., Khan, M. A., Muhammad, H., Sarwar, T., Bilal, H., & Rehman, T. U. Plasmid-mediated mcr-1 gene in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: first report from Pakistan. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2019, σ. 52.
212. Snesrud, E., Maybank, R., Kwak, Y. I., Jones, A. R., Hinkle, M. K., & McGann, P. Chromosomally encoded mcr-5 in colistin-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2018, Τόμ. 62, 8.
213. Dos Santos, L. D. R., Furlan, J. P. R., Ramos, M. S., Gallo, I. F. L., de Freitas, L. V. P., & Stehling, E. G. Co-occurrence of mcr-1, mcr-3, mcr-7 and clinically relevant antimicrobial resistance genes in environmental and fecal samples. *Archives of microbiology*. 2020, Τόμ. 202, σσ. 795-1800.
214. Hamel, M., Chatzipanagiotou, S., Hadjadj, L., Petinaki, E., Papagianni, S., Charalampaki, N., ... & Rolain, J. M. Inactivation of mgrB gene regulator and resistance to colistin is becoming endemic in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Greece: A nationwide study from 2014 to 2017. *International journal of antimicrobial agents*. 2020, Τόμ. 55, 4, σ. 105930.
215. Kempf, I., Jouy, E., & Chauvin, C. Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. *International journal of antimicrobial agents*. 2016, Τόμ. 48, 6, σσ. 598-606.
216. Filioussis, G., Kachrimanidou, M., Christodoulopoulos, G., Kyritsi, M., Hadjichristodoulou, C., Adamopoulou, M., ... & Grinberg, A. Bovine mastitis caused by a multidrug-resistant, mcr-1-positive (colistin-resistant), extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* clone on a Greek dairy farm. *Journal of dairy science*. 2020, Τόμ. 103, 1, σσ. 852-857.
217. Dafopoulou, K., Xavier, B. B., Zarkotou, O., Orfanidou, M., Goossens, H., Tsakris, A., ... & Pournaras, S. Detection of colistin resistance in the highly virulent *Escherichia coli* ST131 H30Rx clone in Greece. *Journal of global antimicrobial resistance*. 2020, Τόμ. 20, σσ. 31-32.

218. Chung, E. S., Lee, J. Y., Rhee, J. Y., & Ko, K. S. Colistin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* that is not linked to *arnB*. *Journal of medical microbiology*. 2017, Τόμ. 66, 6, σσ. 833-841.
219. Lei, S., Lv, J., Gao, S., Srinivas, S., & Feng, Y. Developing an efficient multiplex PCR method to detect *mcr*-like genes. *Science China Life Sciences*. 62, 2019, Τόμ. 5, σσ. 705-707.
220. Maciucă, E. I., Cummins, M. L., Cozma, A., Rimbu, C., Guguianu, E., Panzaru, C., ... & Timofte, D. Genetic features of *mcr*-1 mediated colistin resistance in CMY-2-producing *Escherichia coli* from Romanian poultry. *Frontiers in microbiology*. 2019, Τόμ. 10, σ. 226.
221. Zavascki, A. P., Goldani, L. Z., Cao, G., Superti, S. V., Lutz, L., Barth, A. L., ... & Li, J. Pharmacokinetics of intravenous polymyxin B in critically ill patients. *Clinical Infectious Diseases*. 2008, Τόμ. 47, 10, σσ. 1298-1304.
222. Dudhani, R. V., Turnidge, J. D., Coulthard, K., Milne, R. W., Rayner, C. R., Li, J., & Nation, R. L. Elucidation of the pharmacokinetic/pharmacodynamic determinant of colistin activity against *Pseudomonas aeruginosa* in murine thigh and lung infection models. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010, Τόμ. 54, 3, σσ. 1117-112.
223. Li, J., Rayner, C. R., Nation, R. L., Owen, R. J., Spelman, D., Tan, K. E., & Liolios, L. Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006, Τόμ. 50, 9, σσ. 2946-2950.
224. Laurin, E., Thakur, K., Mohr, P. G., Hick, P., Crane, M. S. J., Gardner, I. A., ... & Ernst, I. To pool or not to pool? Guidelines for pooling samples for use in surveillance testing of infectious diseases in aquatic animals. *Journal of fish diseases*. *Journal of fish diseases*. 2019, Τόμ. 42, 11, σσ. 1471-1491.
225. Stryer, L. *BIOXHMEIA ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ*. s.l. : BROKEN HILL Publishers Ltd, 2019.
226. Ovejero, C. M., Delgado-Blas, J. F., Calero-Caceres, W., Muniesa, M., & Gonzalez-Zorn, B. Spread of *mcr*-1-carrying Enterobacteriaceae in sewage water from Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017, Τόμ. 72, 4, σσ. 1050-1053.
227. Fernandes, M. R., Moura, Q., Sartori, L., Silva, K. C., Cunha, M. P., Esposito, F., ... & Lincopan, N. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr*-1 gene. *Eurosurveillance*. 2016, Τόμ. 21, 17, σ. 30214.

228. Wei, W., Srinivas, S., Lin, J., Tang, Z., Wang, S., Ullah, S., ... & Feng, Y. Defining ICR-Mo, an intrinsic colistin resistance determinant from *Moraxella osloensis*. *PLoS genetics*. 2018, Τόμ. 14, 5, σ. e1007389.

229. Marbach, A., & Bettenbrock, K. lac operon induction in *Escherichia coli*: systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA. *Journal of biotechnology*. 2012, Τόμ. 157, 1, σσ. 82-88.

Εικόνα εξωφύλλου:

<https://www.sciencenews.org/article/new-antibiotic-uses-sneaky-tactics-kill-drug-resistant-superbugs>

