



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Θέμα: « *Acinetobacter baumannii* με αντοχή στην κολιστίνη ».

Χαχούδη Βασιλική
ΤΕ Ιατρικών Εργαστηρίων

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Ευθυμία Πετεινάκη, Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας–Κλινικής Μικροβιολογίας.
- Γερμενής Αναστάσιος, Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας.
- Σίμος Γεώργιος, Καθηγητής Βιοχημείας.

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης
στ.....(10 pt)

Λάρισα, Ιούλιος, 2017



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

TITLE “*Acinetobacter baumannii* colistin resistant”

By
Chachoudi Vasiliki

TE Medical Laboratories

Three-membered examination committee :

- Eythimia Petinaki, Professor in Medical Biopathology – Clinical Microbiology.
- Germenis Anastasios. Professor in Laboratory Immunology.
- Simos Georgios, Professor in Biochemistry.

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in(10 pt)

Larissa, July, 2017

~ 2 ~

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περιεχόμενα	3
Ευχαριστίες	5
Περίληψη στα Ελληνικά.....	6
Abstract	7
Εισαγωγή	8
A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	9
1. Ιστορική αναδρομή του βακτηρίου του γένους <i>Acinetobacter baumannii</i>	10
2. Ταξινόμηση	10
3. Οικολογία	11
4. Φυσιολογία	12
5. Το βακτήριο <i>Acinetobacter baumannii</i>	13
5.A. Κυτταρική δομή και γονιδίωμα	13
5.B. Λοιμώξεις που προκαλούνται από το <i>Acinetobacter baumannii</i>	14
5.Γ. Παθογόνος δράση	15
6. Επιδημιολογία	17
7. Μηχανισμοί αντοχής	22
i) Αντοχή στις β-λακτάμες	23
ii) Αλλαγές στα OMPs και PBPs	26
iii) Αντλίες εκροής πολυανθεκτικότητας	26
iv) Αμινογλυκοσίδασες	28
v) Κινολόνες	29
vi) Τετρακυκλίνες και Γλυκυλ-γλυκίνες	29
vii) Πολυμυξίνες	30
viii) Ο ρόλος των ιντεγκρονίων	31
ix) Νησίδες ανθεκτικότητας	33
7.1. Θεραπευτική αντιμετώπιση	34
7.2. Αντοχή στα αντιβιοτικά	38
8. Πολυμυξίνες – Κολιστίνη	39
i. Ανακάλυψη της κολιστίνης και πρώιμη κλινική χρήση	39
ii. Χημική δομή	39
iii. Μηχανισμός δράσης	40
iv. Αντιμικροβιακό φάσμα	41
v. Μηχανισμοί αντοχής	41
vi. Φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες της κολιστίνης	44

9. Εργαστηριακή διάγνωση	45
9.A. Απομόνωση κλινικών δειγμάτων	45
9.B. Μοριακή τυποποίηση	46
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	49
A. Σκοπός της εργασίας	50
B. Υλικά και μέθοδοι	50
1. Κλινικά δείγματα	50
2. Χρώση κατά Gram	51
3. Μελέτη ευαισθησίας στελεχών και τυποποίηση	52
3.A. Ταυτοποίηση μικροοργανισμών με μοριακές μεθόδους	52
3.A.1. Εκχύλιση γενετικού υλικού	52
3.A.2. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	53
3.A.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	54
3.A.4. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR	56
3.A.5. Ανάλυση αλληλουχίας DNA (sequencing)	56
3.A.6. Σύγκριση αλληλουχιών DNA	59
3.B. Μοριακή τυποποίηση στελεχών	59
3.B.1. Τυποποίηση με MLST	59
4. Μελέτη της αντοχής στη κολιστίνη	61
E. Αποτελέσματα	62
Στ. Συζήτηση	72
Πηγές – Βιβλιογραφία	75

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα Καθηγήτρια κ. Πετεινάκη Ευθυμία, Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας – Κλινικής Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Διευθύντρια του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, η οποία με τίμησε και μου εμπιστεύτηκε την περάτωση αυτής της διπλωματικής εργασίας. Την ευχαριστώ ιδιαίτερος για την υπομονή και το χρόνο που αφιέρωσε για την ολοκλήρωση της εργασίας μου και κυρίως για τις συμβουλές της που αποτέλεσαν οδηγό στην πορεία της εργασίας αυτής.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τις Διδάκτορες του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Ιατρούς Βιοπαθολόγους – Μικροβιολόγους κ. Οικονόμου Όλγα και κ. Σάρρου Στυλιανή για την μεταλαμπάδευση γνώσεων και για την άψογη συνεργασία μας. Και τον Δρ Παπαγιαννίτη Κωνσταντίνο για τις καταλυτικές προσθήκες του για την ολοκλήρωση της εργασίας μου.

Παράλληλα, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου για την αμέριστη συμπαράσταση και την εξαιρετική συνεργασία των συμφοιτητριών μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα την Κούμπου Αλεξάνδρα και την Βουλγαρίδη Ιωάννα.

Και τέλος τίποτα από όλα αυτά δεν θα είχαν πραγματοποιηθεί αν δεν είχα την αμέριστη ηθική και υλική υποστήριξη του αδερφού μου. Και κυρίως στους δυό μου γονείς, που «έφυγαν» τόσο νωρίς, μα πάντα πίστευαν σε εμένα και στις δυνατότητες μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ

Τις τελευταίες δεκαετίες, μείζον κλινικό πρόβλημα υπήρξε η ανάδυση και η διασπορά πολυανθεκτικών βακτηρίων παγκοσμίως. Το *Acinetobacter baumannii* αποτελεί έναν μικροοργανισμό που μετατράπηκε από ευκαιριακό παθογόνο σε ανθεκτικό νοσοκομειακό παθογόνο.

Οι κυριότερες λοιμώξεις που προκαλούνται από το βακτήριο *Acinetobacter* εκδηλώνονται σε νοσοκομειακούς ασθενείς και καλύπτουν ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων (ουρολοιμώξεις, λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος, μηνιγγίτιδα και βακτηριαιμία). Οι συγκεκριμένες λοιμώξεις παρατηρούνται κυρίως σε ασθενείς των Μονάδων Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ), λόγω αυξημένης κατανάλωσης αντιμικροβιακών φαρμάκων και μη εφαρμογή της δέσμης μέτρων περιορισμού της διασποράς που ευνοούν την εμφάνισή τους (υγιεινή των χεριών). Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν η μελέτη των μηχανισμών αντοχής κλινικών στελεχών του *A.baumannii* με αντοχή στην κολιστίνη (πολυμυξίνες), όπως επίσης η μοριακή ταυτοποίηση των στελεχών αυτών.

Η θεραπεία για τις λοιμώξεις από *A.baumannii* με αντοχή στις καρβαπενέμες οδηγεί στη χρήση αντιμικροβιακών ουσιών όπως είναι η κολιστίνη και η τιγκεκυκλίνη.

Η κολιστίνη είναι ένα «παλαιό» αντιβιοτικό που ενώ είχε περιορισμένη χρήση για πολλά χρόνια εξαιτίας της τοξικότητάς της, πρόσφατα επανεισήχθη στην κλινική πράξη λόγω της επικράτησης καρβαπενεμών ανθεκτικών Gram-αρνητικών βακτηρίων και λόγω έλλειψης νέων αντιβιοτικών. Στη παρούσα μελέτη, ελέγχθηκαν οι μηχανισμοί στους οποίους οφείλεται η αντοχή του *A.baumannii* στην κολιστίνη. Προηγούμενες κλινικές μελέτες κατέληξαν ό,τι δύο μηχανισμοί πιθανόν εμπλέκονται και στην έκφραση αντοχής. Ο πρώτος είναι η τροποποίηση του λιπιδίου A του LPS ως αποτέλεσμα των μεταλλάξεων στο *pmrA/pmrB*. Ο δεύτερος μηχανισμός είναι η ολοκληρωτική απώλεια των LPSs είτε λόγω μεταλλάξεων είτε λόγω εισαγωγής απενεργοποιημένου λιπιδίου A. Στα στελέχη της εργασίας μας, η αντοχή στην κολιστίνη συσχετίστηκε με μεταλλάξεις στα γονίδια *pmrA* και *pmrC*. Εφαρμόζοντας μοριακές μεθόδους τυποποίησης, τα στελέχη της μελέτης βρέθηκε ό,τι τα περισσότερα ανήκαν στον κλώνο με ST101, ο οποίος αντιστοιχεί στον παγκόσιο κλώνο CC2, ο οποίος είναι ο πιο συχνά εμφανιζόμενος στην ευρύτερη περιοχή της Ελλάδας κλώνος.

ABSTRACT

Main problem, worldwide, remain the the emergence and the dissemination of multi-drug resistant bacteria, including *Acinetobacter baumannii*. This microorganism colonizes hospitalized patients and causes serious infections with high mortality. The wide use of carbapenems against Gram-negative bacteria led to the emergence of carbapenem-resistants *A.baumannii*.

Colistin is an “old” antimicrobial agent, that, today, is used for the treatment of infections caused by carbapenem-resistant bacteria. However, recently, colistin-resistant *A.baumannii* have been emerged. Research studies showed that two mechanisms are probably responsible for colistin-resistance in *A.baumannii*. The first is the modification of the LPS lipid A as a result of mutations in *pmrB*. The second is the total loss of the LPS, caused by mutation or by insertion of the de-activated lipid A.

Aim of this study was the investigation of mechanisms correlated with colistin resistance in *A.baumannii* isolated from clinical specimens in University Hospital of Larissa. Our results showed that their resistance was associated with mutations in the *pmrA* and *pmrC* genes. Interesting finding that no mutations in *pmrB* was found in our strains.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Βακτηρίδια του γένους *Acinetobacter* απαντώνται συχνά στο φυσικό περιβάλλον. Μερικά από αυτά, κυρίως το είδος *Acinetobacter baumannii*, είναι παθογόνα γιατί έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα στο νοσοκομειακό περιβάλλον και έχουν τη δυνατότητα να προκαλούν σοβαρές λοιμώξεις σε ασθενείς.

Το *Acinetobacter spp.* προκαλεί λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος, βακτηριαμία, μηνιγγίτιδα, λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, λοιμώξεις τραυμάτων κ.α. Αναφέρονται σπάνιες περιπτώσεις ενδοκαρδίτιδας μετά από οδοντικές εργασίες ή εγχειρήσεις ανοιχτής καρδιάς, οστεομυελίτιδα μετά από τραυματισμό των κάτω άκρων, λοιμώξεις του οφθαλμού μετά από τραυματισμό, ακόμα και σε άτομα που φορούν φακούς επαφής. Προδιαθεσικοί παράγοντες εμφάνισης λοίμωξης με *Acinetobacter* είναι η σοβαρή υποκείμενη νόσος, η ανοσοκαταστολή, τα εγκαύματα, οι μεγάλες χειρουργικές επεμβάσεις, κάθε είδους παρεμβατική ιατρική πράξη (κυρίως ο μηχανικός αερισμός, όπως και η προηγηθείσα χορήγηση αντιβιοτικής θεραπείας).

Η θεραπεία αυτών των λοιμώξεων γίνεται δύσκολη στις περιπτώσεις που το παθογόνο εμφανίζει αντοχή στα αντιμικροβιακά φάρμακα. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 30 ετών, στελέχη *Acinetobacter spp.* απέκτησαν σταδιακή αντοχή στις πενικιλίνες, στις κεφαλοσπορίνες, τις κινολόνες και τις αμινογλυκοσίδες. Οι καρβαπενέμες χρησιμοποιήθηκαν ως το αντιμικροβιακό φάρμακο επιλογής, κυρίως για τις σοβαρές λοιμώξεις που προκλήθηκαν από τα στελέχη *Acinetobacter spp.* Το γεγονός αυτό είχε ως συνέπεια την ανάδυση ανθεκτικών σε καρβαπενέμες στελεχών, τα οποία σύντομα εξαπλώθηκαν σε όλο τον κόσμο, πολλές φορές με την μορφή νοσοκομειακών επιδημιών.

Η επικράτηση πολυανθεκτικών Gram-αρνητικών μικροβίων σε συνδυασμό με την έλλειψη νέων αντιβιοτικών οδήγησε στην επανεισαγωγή στην κλινική πράξη ενός παλαιού αντιμικροβιακού παράγοντα, της κολιστίνης. Η κολιστίνη ανακαλύφθηκε το 1952 και χρησιμοποιούνταν μέχρι τις αρχές του '80. Παρότι το φάρμακο αυτό έχει ευρύ αντιμικροβιακό φάσμα έναντι των Gram-αρνητικών βακτηρίων και είναι αποτελεσματικό για στελέχη *Acinetobacter* και *Pseudomonas*, η χρήση του περιορίστηκε για τουλάχιστον δύο δεκαετίες, λόγω της αυξημένης συχνότητας εμφάνισης ανεπιθύμητων παρενεργειών, κυρίως νεφροτοξικότητας και νευροτοξικότητας.

Μείζον πρόβλημα παγκοσμίως αποτελεί η ανάδυση και η διασπορά πολυανθεκτικών βακτηρίων τα οποία είναι αιτία σοβαρών νοσοκομειακών λοιμώξεων, και είναι μείζον πρόβλημα παγκοσμίως. Η στοχευμένη αντιμικροβιακή θεραπεία μαζί με την εφαρμογή μέτρων υγιεινής των χεριών αποτελούν ουσιαστικά βήματα για τον περιορισμό της αντιμικροβιακής αντοχής.

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.

1. Ιστορική αναδρομή του βακτηρίου του γένους *Acinetobacter*.

Η ιστορία του βακτηρίου του γένους *Acinetobacter* χρονολογείται από τις αρχές του 20^{ου} αιώνα. Το 1911, ο Biejerinck, ένας Ολλανδός μικροβιολόγος, περιέγραψε έναν μικροοργανισμό που ονομάστηκε *Micrococcus calcoaceticus*, το οποίο απομονώθηκε από το έδαφος πλούσιο σε οξικό ασβέστιο και με ελάχιστα θρεπτικά συστατικά (14). Στις επόμενες δεκαετίες, περιγράφηκαν παρόμοιοι μικροοργανισμοί και προσδιορίστηκαν τα γένη και τα είδη, που περιλαμβάνουν τα : *Diplococcum mucosus*, *Micrococcus calcoaceticus*, *Algaligenes haemolysans*, *Mimapolymorpha*, *Moraxella lwoffii*, *Herellea vaginicola*, *Bacterium nitratum*, *Moraxella lwoffii* var. *glusicolytica*, *Neisseria winogradski*, *Achromobacter mucosus*.

Η τωρινή ονομασία του βακτηρίου του γένους *Acinetobacter* (προέρχεται από την ελληνική λέξη ακίνητος) αρχικά προτάθηκε από τους Brisou και Prevot το 1954 για να διαχωρίσουν τους ακίνητους από τους κινητούς μικροοργανισμούς, όπως επίσης και το γένος *Achromobacter* (22). Το 1968 αυτή η ονομασία έγινε ευρύτερα αποδεκτή (12). Οι Bauman et al. κατέληξαν ότι τα διαφορετικά είδη που είχαν περιγραφεί προηγουμένως ανήκαν σε ένα μόνο γένος, με το όνομα *Acinetobacter* (12). Με αυτά τα ευρήματα η Επιτροπή Ταξινόμησης της *Moraxellas* και των Συγγενικών Βακτηριδίων κατέληξε στην επίσημη αναγνώριση του γένους *Acinetobacter*, το 1971 (79). Το 1974 στην έκδοση του “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” (77), είχε καταχωρηθεί το γένος *Acinetobacter* με την περιγραφή ενός μόνο είδους του *Acinetobacter calcoaceticus* (ο τύπος του είδους τόσο για το γένος όσο και για την τάξη είναι *A. calcoaceticus* ATCC 23055) (14). Αντίθετα στο “Approved List of Bacterial Names”, είχαν περιληφθεί δύο διαφορετικά είδη τα : *A. calcoaceticus* και *A. lwoffii*, επειδή βασίστηκαν στην παρατήρηση ότι μερικά *Acinetobacter* μπορούσαν να οξειδώνουν την γλυκόζη ενώ άλλα δεν μπορούσαν (16).

2. Ταξινόμηση.

Το *Acinetobacter spp.* είναι ένα ακίνητο, αερόβιο Gram-αρνητικό κοκκοβακτηρίδιο, μη-απαιτητικό, καταλάση θετικό, οξειδάση αρνητικό το οποίο δεν ζυμώνει την γλυκόζη. Αποτελεί πρόκληση η ταξινόμηση του *Acinetobacter* σε είδη εξαιτίας της δύσκολης διάκρισης των σχεδόν όμοια σχετιζόμενων ειδών με τη χρήση φαινοτυπικών γνωρισμάτων και χημειοταξινομικών μεθόδων. Το πιο γνωστό παράδειγμα είναι το σύμπλεγμα *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*, που περιλαμβάνει το *A. calcoaceticus*, το *A. baumannii* και τα γονιδιακά είδη 3 και 13TU. Εξαιτίας

της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά και της κλινικής σημασίας των διαφορετικών ειδών η ταυτοποίηση των ειδών του *Acinetobacter* με μοριακές μεθόδους είναι απαραίτητη. Έχει προταθεί ένας αριθμός μεθόδων γονιδιακών αποτυπωμάτων, που περιλαμβάνει : την ηλεκτροφόρηση παλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου (PFGE), τον καθορισμό ριβοτύπου, την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) που βασίζεται σε τεχνικές αποτυπωμάτων, όπως είναι η τεχνική τυχαία ενισχυμένων πολυμορφικών τμημάτων DNA (RAPD), η PCR επαναλαμβανόμενων στοιχείων (rep-PCR), η ενισχυμένη περιοριστική ανάλυση του ριβοσωμικού DNA, το αποτύπωμα του σκελετού του RNA και η ανάλυση πολυμορφισμού μήκους ενισχυόμενων τμημάτων. Επιπροσθέτως, νέες μέθοδοι, όπως είναι ο ριβοσωμικός γενετικός τύπος του 16S-23S γονιδίου, το γονίδιο 16SrRNA, η ανάλυση αλληλούχησης με τα γονίδια *proB* και *gyrB*, έχουν αναπτυχθεί για την ταυτοποίηση των ειδών του *Acinetobacter* (85).

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

Πίνακας 1 : Η ανανεωμένη λίστα με τα επικυρωμένα ονόματα των ειδών του *A.baumannii*. (UhJ.K. etal.,2014).

3. Οικολογία.

Τα βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Acinetobacter* βρίσκονται παντού στη φύση δεδομένου ότι αναδύονται στο νερό, στο χώμα, στα φυτά και στα ζώα. Ως παθογόνο, το *Acinetobacter* στοχεύει σε υγρούς ιστούς όπως και σε βλεννώδεις μεμβράνες ή εκτεθειμένες περιοχές του δέρματος είτε από ατύχημα ή τραυματισμό. Παρά το συσχετισμό με τις δερματικές φλεγμονές, το *Acinetobacter* σπάνια αποτελεί μέρος της δερματικής χλωρίδας, αυτό έγινε φανερό σε μία μελέτη όπου εκτιμήθηκε πως μόνο το 3% (περίπου) του πληθυσμού νοσεί από το βακτηρίδιο.

Πέρα από τις δερματικές μολύνσεις με *Acinetobacter*, που είναι οι πιο συχνές, υπάρχει υψηλός αποικισμός στο αναπνευστικό και στις στοματοφαρυγγικές εκκρίσεις ιδιαίτερα σε νοσοκομειακούς ασθενείς. Όταν το βακτήριο εντοπιστεί σε νοσοκομειακό περιβάλλον, τίθεται σε πολύ μεγάλο κίνδυνο και συγκεκριμένα η μονάδα εντατικής θεραπείας, όπου πλήττει τους χρόνιους ασθενείς. Ομάδα υψηλού κινδύνου να νοσήσουν από *Acinetobacter* αποτελούν ανοσοκατασταλμένοι ασθενείς όπως και οι ασθενείς που χρησιμοποιούν τεχνητές συσκευές (καθετήρες, αναπνευστήρες, ράμματα κλπ.) μέσω των οποίων το *Acinetobacter* μπορεί να αναπτυχθεί εύκολα και να μεταδοθεί στους ασθενείς. Το *Acinetobacter* μπορεί να επιμολύνει ή να αποικίσει την αναπνευστική οδό, το αίμα, το πλευριτικό υγρό, το ουροποιητικό σύστημα, χειρουργικά τραύματα, το δέρμα και τα μάτια.

4. Φυσιολογία.

Το *Acinetobacter* είναι Gram-αρνητικό βακτηρίδιο ή κοκκοβακτηρίδιο, ακίνητο, κοντό και παχύ στη φάση του πολλαπλασιασμού και της διαίρεσης, ενώ στη φάση της στασιμότητας βρίσκεται υπό την μορφή κόκκων που είναι πολλές φορές διατεταγμένοι σε ζεύγη ή σε μικρές αλυσίδες. Έχει διαστάσεις 1,5-2,5 μm στο μήκος και 1-1,5 μm στο πλάτος (53).

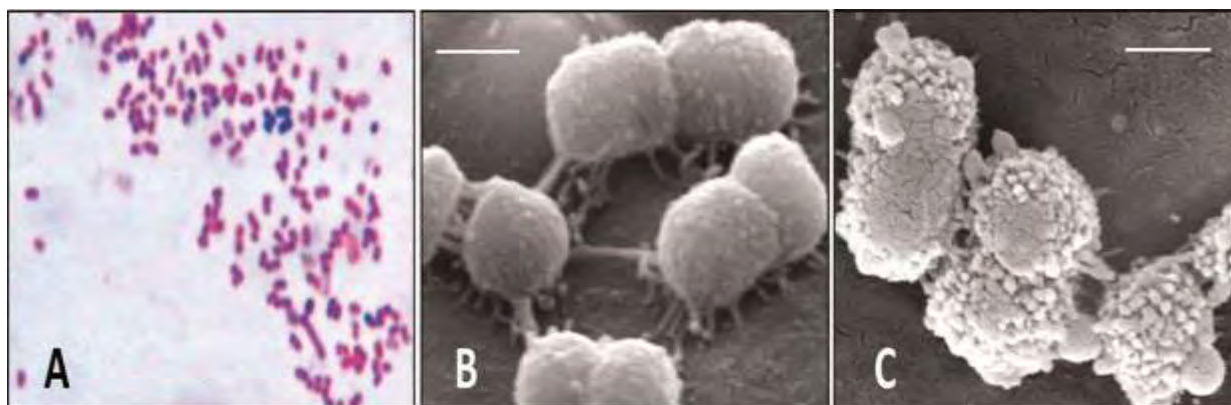
Δε φέρει βλεφαρίδες, έχει όμως πολικά ινίδια που του προσδίδουν τρομώδη κίνηση. Τα ινίδια είναι λεπτότατα νημάτια, πλάτους 0,1-1,5 μm και μήκους 4-8 μm, ευθεία, χωρίς κάμψεις και χρησιμεύουν στην προσκόλληση του μικροβίου σε επιφάνειες. Πολλά στελέχη φέρουν έλυτρο. Το έλυτρο ή κάψα περιβάλλει το κυτταρικό τοίχωμα, είναι πολύ λεπτό, δεν χρωματίζεται με τις συνήθεις χρωστικές και φαίνεται ως μία διαφανής ζώνη γύρω από το βακτηρίδιο. Αποτελείται από αδρανή σάκχαρα, αν και σε μερικά βακτηρίδια υπάρχει λεύκωμα ή και μουραμικό οξύ. Προστατεύει το βακτηρίδιο από τους αντιμικροβιακούς παράγοντες του περιβάλλοντος, όπως είναι η λυσοζύμη, οι βακτηριοφάγοι κλπ και από τη φαγοκυττάρωση (1,3,123).

Οι αποικίες του *Acinetobacter spp.* είναι λείες, μερικές φορές βλεννώδης, με απαλό κίτρινο ή σχεδόν γκρι χρώμα σε στερεά θρεπτικά υλικά, αν και μερικά περιβαλλοντικά είδη παράγουν μια διάχυτη καφέ χρωστική. Το μέγεθος των αποικιών του μπορούν να συγκριθούν με αυτές των εντεροβακτηρίων. Το τεστ της αρνητικής οξειδάσης χρησιμοποιείται ως άμεσο διαγνωστικό για το διαχωρισμό του *Acinetobacter spp.* από άλλα παρόμοια μη απαιτητικά βακτήρια (16).

Πίνακας 2. Βιοχημικές ιδιότητες του ακινητοβακτηριδίου.

Οξειδάση	(-)
Κατάλαση	(+)
Νιτρικά	(-)
Γλυκόζη	(+/-) <i>A. baumannii</i> (+)
Ινδόλη	(-)
Υδρόθειο	(-)
Ακετοΐνη (V.P)	(-)
Ουρία	(-/ +)
Πηκτή	(-/ +)
Λυσίνη	(-)
Ορνιθίνη	(-)
Φαινιλαλανίνη	(-)
Αιμόλυση	(+/-) <i>A. haemolyticus</i> (+)

(Αρσένη 1994, Μανιάτης 1999, Schreckenberger et al. 2007).



Εικόνα 1. Μορφολογία και κατάλληλη χρώση του *Acinetobacter baumannii*. Α. χρώση κατά Gram σε ακίνητη φάση όπου τα κύτταρα φαίνονται κοκκοειδή και με στοιχεία κοκκοβάκκιλων κάποια από τα οποία χρωματίστηκαν μπλε επειδή διατήρησαν τη χρωστική του κρυσταλλικού ιώδους. Τα Β. και C. απεικονίζουν στελέχη του *A.baumannii* σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης. (Viscaetal., 2011).

5. Το βακτήριο *Acinetobacter baumannii*.

5.A. Κυτταρική δομή και γονιδίωμα.

Το *A.baumannii* είναι ένα Gram αρνητικό κοκκο-βακτηρίδιο. Χαρακτηριστικό της μορφολογίας του είναι ο κυτταρικός φάκελος με τα πολλαπλά στρώματα που περιλαμβάνουν μια εξωτερική και μια εσωτερική κυτταροπλασματική μεμβράνη, οι οποίες διαχωρίζονται από τον περιπλασματικό χώρο. Το συγκεκριμένο βακτήριο ξεχωρίζει για τον μικρό αριθμό πορινών της κυτταρικής του μεμβράνης. Στην μεμβράνη του υπάρχουν και αντλίες εκροής που επιτρέπουν την απομάκρυνση τόσο οργανικών ενώσεων όσο και αντιμικροβιακών ουσιών. Εκτός από τα

παραπάνω, στην κυτταρική μεμβράνη του *A.baumannii* υπάρχουν πρωτεϊνικά κανάλια καθώς και μεταφορείς που σχετίζονται με την πρόσληψη ξένου DNA.

Το γονιδίωμα του *A.baumannii* είναι ένα κυκλικό χρωμόσωμα που συνοδεύεται από δύο πλασμίδια, αν και ο αριθμός των πλασμιδίων μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το στέλεχος (68). Το γονιδίωμά του περιέχει 3.976.746 ζεύγη βάσεων που αποτελείται από 3830 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης.

5.B. Λοιμώξεις που προκαλούνται από το *Acinetobacter baumannii*.

Το *A.baumannii* προκαλεί μια ποικιλία σοβαρών νοσοκομειακών λοιμώξεων, στις οποίες περιλαμβάνονται μολύνσεις στο δέρμα και στο μαλακό ιστό, στα τραύματα, στο ουροποιητικό σύστημα, όπως επίσης προκαλείται και μηνιγγίτιδα (16,91,117). Ωστόσο, οι πιο σημαντικές λοιμώξεις, με τα υψηλότερα επίπεδα θνησιμότητας, συναντώνται στον αναπνευστήρα-όπου σχετίζονται με την πνευμονία και τις μολύνσεις του αίματος (41). Οι λοιμώξεις που προκαλούνται από το *A.baumannii* σχετίζονται συγκεκριμένα με εκτεταμένες περιόδους νοσηλείας στο νοσοκομείο και με την παρουσία ενδαγγειακών καθετήρων και μηχανικών αναπνευστήρων(105), κυρίως, όμως, σε ηλικιωμένους του ανδρικού φύλου (138).

Λιγότερο συχνά το *A.baumannii* μπορεί να προκαλέσει λοιμώξεις στη «κοινότητα», στις οποίες περιλαμβάνονται η πνευμονία (υπολογίζεται το 85% των αναφορών των λοιμώξεων της «κοινότητας» προκαλούνται από το *A.baumannii*) και η βακτηριαμία. Άλλες πιθανές λοιμώξεις αποκτηθείσες στην «κοινότητα» περιλαμβάνουν το δέρμα, τον μαλακό ιστό και τον οφθαλμό, η μηνιγγίτιδα και η ενδοκαρδίτιδα (30,46). Αυτές οι λοιμώξεις είναι πιο κοινές για τους άρρενες και σχετίζονται με την ηλικία, τον αλκοολισμό, το κάπνισμα, τον σακχαρώδη διαβήτη, την χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια και την νεφροπάθεια. Η αποκτηθείσα στην «κοινότητα» πνευμονία με *A.baumannii* είναι σοβαρότερη από τη νοσοκομειακή πνευμονία, είναι γενικά ραγδαία (επέρχεται ο θάνατος μέσα σε 8 μέρες από τη διάγνωση) και τα επίπεδα θνησιμότητας φτάνουν έως και το 60% των προσβληθέντων. Οι περισσότερες αναφορές της αποκτηθείσας στην «κοινότητα» πνευμονίας συμβαίνουν κατά τη διάρκεια των καλοκαιρινών μηνών και σε κλίματα τροπικά και υποτροπικά (48).

5.Γ. Παθογόνος δράση.

Το *Acinetobacter* παλαιότερα εθεωρείτο βακτηρίδιο του περιβάλλοντος χωρίς ιδιαίτερη κλινική σημασία (67). Τις τελευταίες τρεις δεκαετίες περίπου, το συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον της ιατρικής κοινότητας για το *Acinetobacter* προέρχεται από το γεγονός ότι όλο και περισσότερες λοιμώξεις, στην πλειονότητα ενδονοσοκομειακές, προκαλούνται από αυτό το βακτηρίδιο, αλλά και ότι τα στελέχη του αυτά παρουσιάζουν ευρεία αντοχή στα αντιβιοτικά και η αντιμετώπισή τους είναι δύσκολη. Οι λοιμώξεις αυτές είναι συχνά πολύ σοβαρές, με μεγάλο χρόνο νοσηλείας, υψηλό κόστος θεραπείας, ακόμη και θάνατο. Υπάρχουν αναφορές για επιδημίες στα διάφορα νοσοκομεία, τόσο της Ελλάδας (80,112) όσο και του εξωτερικού (135). Οι επιδημίες αυτές τις περισσότερες φορές αφορούν ασθενείς των ΜΕΘ, και αυτό συνδέεται τουλάχιστον εν μέρει, με τις όλο και περισσότερο παρεμβατικές διαγνωστικές και θεραπευτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται στις ΜΕΘ τις τελευταίες δύο δεκαετίες, όπως ο καθετηριασμός ουρήθρας, ο φλεβικός καθετηριασμός, η διασωλήνωση, η τραχειοστομία και οι παρακεντήσεις (16).

Προδιαθεσικοί παράγοντες θεωρούνται σοβαρά υποκείμενα νοσήματα, κακοήθη νοσήματα, ανοσοκαταστολή, εγκαύματα, μεγάλες εγχειρήσεις, κάθε είδους παρεμβατική διαγνωστική θεραπευτική πράξη, καθώς και η παρατεταμένη διαμονή στο νοσοκομείο. Μεγάλη σημασία έχει και η προηγούμενη θεραπεία με αντιμικροβιακά φάρμακα, η οποία αλλοιώνει τη φυσιολογική χλωρίδα του οργανισμού και βοηθά στην επιλογή ανθεκτικών στελεχών (15,16,24,27,34,87,103,189).

Αναφέρονται όμως λοιμώξεις και σε ασθενείς της «κοινότητας». Σε αυτές τις περιπτώσεις προδιαθεσικοί παράγοντες για την πρόκληση λοιμώξεων είναι η ανοσοκαταστολή, η ηλικία, ο αλκοολισμός, το κάπνισμα, τα χρόνια αναπνευστικά νοσήματα, ο σακχαρώδης διαβήτης, ενώ αναφέρεται και η πνευμονία της «κοινότητας» που οφειλόταν σε αρχική ακατάλληλη αντιβιοτική θεραπεία (9).

Εκτός από τους προαναφερθέντες προδιαθεσικούς παράγοντες, μεγάλη σημασία για την εγκατάσταση μιας λοίμωξης από *Acinetobacter* έχει και η λοιμογόνος ικανότητα του βακτηριδίου. Αυτή χαρακτηρίζεται από :

1. Την παρουσία ενός πολυσακχαριδικού ελύτρου που αποτελείται από L-ραμνόζη, D-γλυκόζη, D-γλυκουρονικό οξύ και D-μανόζη (68). Αυτό το έλυτρο, που πιθανόν κάνει την επιφάνεια του βακτηριδίου περισσότερο υδρόφιλη, βοηθά στην εγκατάσταση στελεχών *Acinetobacter* σε καθετήρες και ενδοτραχειακές συσκευές (68,119).

2. Την ικανότητα προσκόλλησης στα επιθηλιακά κύτταρα του ανθρώπινου είδους με την παρουσία ινιδίων (fibrae) ή/και των καψιδιακών πολυσακχαριτών (108,119,120).
3. Την παραγωγή ενζύμων που διασπούν τα λιπίδια των ιστών (111).
4. Την παραγωγή μιας λιποπολυσακχαριδικής ουσίας (όπως παρατηρείται και σε άλλα Gram-αρνητικά βακτήρια) υπεύθυνης για τη θανατηφόρο δράση στα ποντίκια, καθώς και την παραγωγή λιπιδίου A (10).

Όσον αφορά την παραγωγή βιομεμβρανών (biofilm) σε μία πρόσφατη μελέτη βρέθηκε ότι οι σχετιζόμενες με καθετήρες λοιμώξεις οφείλονταν σε στελέχη που παρήγαγαν βιομεμβράνες (118).

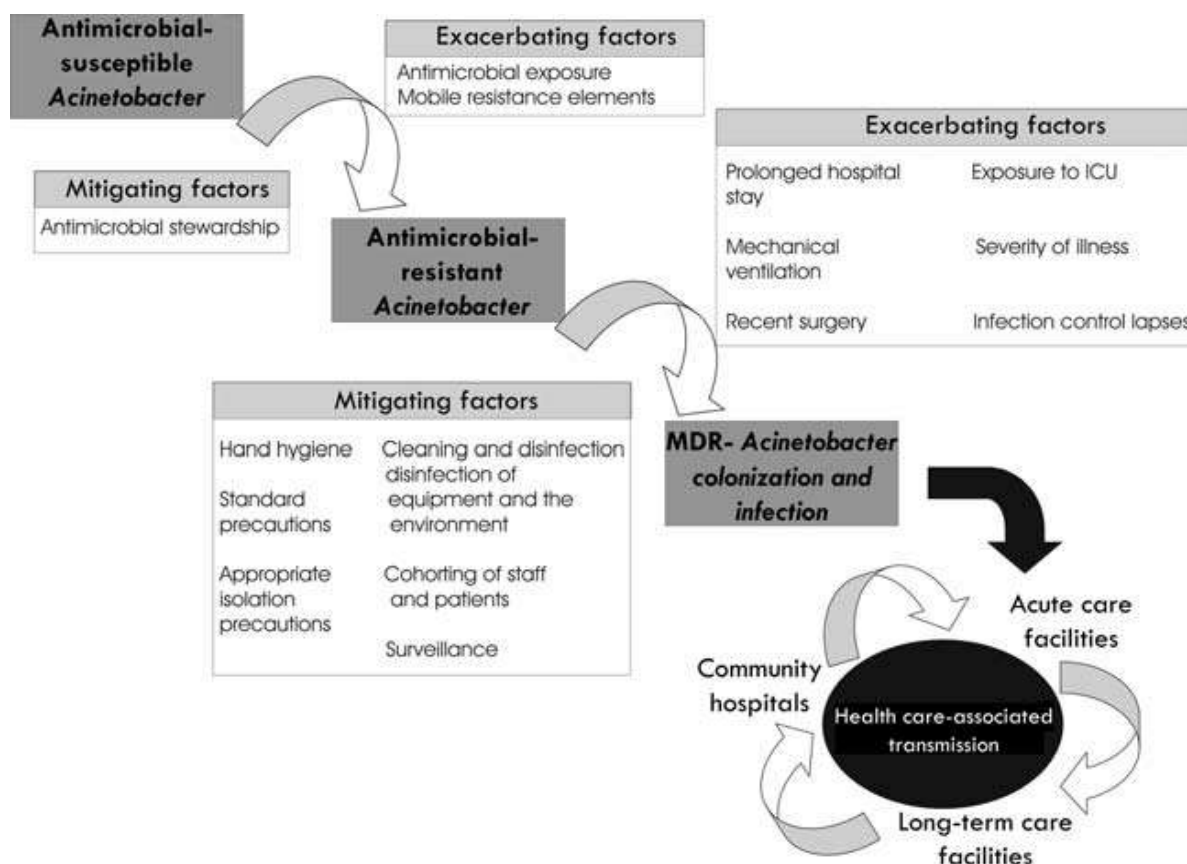
Καθοριστικός επίσης παράγοντας της λοιμογόνου ικανότητας του *Acinetobacter* είναι η ικανότητά του να προσλαμβάνει τον απαιτούμενο για την ανάπτυξή του σίδηρο από το ανθρώπινο σώμα, ενώ μερικά στελέχη παράγουν σιδηροφόρες ουσίες (4,43,126).

Τα τελευταία χρόνια, συνδυαστικές προσεγγίσεις που σχετίζονται με γονιδιακά, φαινοτυπικά και μοντέλα ανάλυσης λοιμώξεων έχουν βοηθήσει στην ταυτοποίηση των λοιμογόνων παραγόντων που είναι σημαντικοί για την παθογονικότητα του *A.baumannii*. Μέχρι τώρα, οι πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης, τα υδρολυτικά ένζυμα και οι πολυπαραγοντικοί φαινότυποι έχουν επιβεβαιωθεί ότι εμπλέκονται με την παθογονικότητα του *A.baumannii*. Η κύρια εξωτερική μεμβράνη της πρωτεΐνης OmpA σχετίζεται με την εισβολή στα επιθηλιακά κύτταρα και την απόπτωση (32). Οι φωσφολιπάσες C και D είναι υπεύθυνες για την επιβίωση στον ανθρώπινο ορό και στην εισβολή στα επιθηλιακά κύτταρα (26,61). Επιπροσθέτως, ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS) είναι ένα σημαντικό κυτταρικό συστατικό του περιβλήματος, το οποίο μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόκληση σηπτικού σοκ κατά την είσοδο του *A.baumannii* στην κυκλοφορία του αίματος. Μέχρι σήμερα, το LPS έχει λάβει μικρή προσοχή στις μελέτες της λοιμογόνου δράσης του *A.baumannii*, αλλά έχει γίνει κατανοητό ότι τα περισσότερα *Acinetobacter* LPS μόρια περιέχουν μια αλυσίδα O-πολυσακχαριδίου (O-αντιγόνο), το οποίο όπως έχει περιγραφεί, επηρεάζει την παθογονικότητα κι άλλων Gram-αρνητικών βακτηρίων (101). Επίσης, φαίνεται ότι υπάρχει ένα γενικό σύστημα O-γλυκοσυλίωσης το οποίο δείχνει να είναι σημαντικό για την μετατροπή της βιομεμβράνης και της λοιμογόνου δράσης και του καψιδιακού πολυσακχαριδίου (60).

6. Επιδημιολογία.

Τα *Acinetobacter* είναι κοινά βακτήρια του φυσικού περιβάλλοντος. Βρίσκονται παντού, τόσο στη φύση όσο και στο νοσοκομειακό περιβάλλον. Είναι το δεύτερο κατά σειρά αζυμωτικό βακτηρίδιο μετά την ψευδομονάδα που απομονώνεται σε νοσοκομεία (16,89,133). Έχει απομονωθεί από το νερό, τα φυτά, και τα διάφορα φυτικά και ζωικά τρόφιμα. Χαρακτηριστικά αναφέρεται η απομόνωσή του από παστεριωμένο γάλα, κατεψυγμένα τρόφιμα, πουλερικά του νοσοκομείου, πόσιμο νερό του δικτύου, κλιματιστικά συστήματα. Απομονώνεται από διάφορα υγειονομικά υλικά και νοσηλευτικά υγρά, ιατρικά εργαλεία και συσκευές, κυρίως αναπνευστήρες, δεδομένου ότι το υγρό περιβάλλον ευνοεί την εγκατάσταση και την ανάπτυξη τους (85).

Από το δέρμα των υγιών ανθρώπων απομονώνεται σε ποσοστό έως και 25%. Ενώ σε ποσοστό 7% αποτελεί μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του φάρυγγα (85). Ο αποικισμός του δέρματος των ασθενών κυρίως των ΜΕΘ έχει μεγάλη σημασία για την εξάπλωση των λοιμώξεων από το ακινητοβακτηρίδιο. Τα χέρια του προσωπικού αποτελούν τη σημαντικότερη πηγή πρόκλησης ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων μέσω διασποράς των συγκεκριμένων στελεχών(133).



Εικόνα 2 : Παράγοντες που οδηγούν στην εμφάνιση και την μετάδοση πολυανθεκτικών στα φάρμακα (MDR) ειδών του *A.baumannii*, στις ΜΕΘ (Μονάδα Εντατικής Θεραπείας). (Maragakis, Perl, 2008).

Από τις αρχές του 1980, οι εξάρσεις στα νοσοκομεία με λοιμώξεις από *Acinetobacter* στην Ευρώπη, και κυρίως στην Αγγλία, Γαλλία, Γερμανία, Ιταλία, Ισπανία και Ολλανδία είχαν διερευνηθεί με τη χρήση μοριακών επιδημιολογικών μεθόδων καθορισμού των κλώνων. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων, υπήρχε ένας με δύο τύπους σε ένα συγκεκριμένο επιδημιολογικό περιβάλλον. Η μετάδοση τέτοιων στελεχών παρατηρήθηκε στα νοσοκομεία, πιθανόν μέσω μεταφοράς των επιμολυσμένων ασθενών. Η εξάπλωση των πολυανθεκτικών στα φάρμακα *A.baumannii* δεν περιορίζονται στα νοσοκομεία μίας συγκεκριμένης πόλης, αλλά εξαπλώνονται και σε διεθνή κλίμακα. Παραδείγματα αποτελούν : η εξάπλωση του κλώνου Southeast και το OXA-23 των κλώνων 1 και 2 στην Νοτιοανατολική Αγγλία, η διασπορά του πολυανθεκτικού στα φάρμακα κλώνου του *A.baumannii* στην Πορτογαλία, την εξάπλωση σε όλα τα νοσοκομεία του VEB-1 που παράγει ESBL του κλώνου *A.baumannii* σε σύνολο 55 ιατρικών κέντρων στη βόρεια και νοτιοανατολική Γαλλία, και την εξάπλωση της ανθεκτικότητας στην αμικασίνη του κλώνου *A.baumannii* που παρατηρήθηκε σε 9 νοσοκομεία σε διάφορες περιοχές της Ισπανίας. Διεθνής μεταφορά επιμολυσμένων ασθενών οδήγησε στην εισαγωγή και έπειτα στην εξάπλωση των επιδημιών του πολυανθεκτικού στα φάρμακα στελέχους του *A.baumannii* στις Νότιες και Βόρειες Ευρωπαϊκές Χώρες, όπως το Βέλγιο και η Γερμανία (105).

Επιπλέον σε αυτές τις εξάρσεις στα διάφορα ιδρύματα, τρεις διεθνής κλώνοι του *A.baumannii* (οι οποίοι ονομάζονται και Ευρωπαϊκοί κλώνοι I, II και III) έχουν παρουσιαστεί σε νοσοκομεία της Βόρειας Ευρώπης (περιλαμβανομένων των νοσοκομείων του Βελγίου, της Δανίας, της Τσεχίας, της Γαλλίας, της Ολλανδίας και του Ηνωμένου Βασιλείου), όπως επίσης και σε νοσοκομεία των Νότιων Ευρωπαϊκών Χωρών (όπως η Ιταλία, η Ισπανία, η Ελλάδα και η Τουρκία) και στην Ανατολική Ευρώπη. Αρχικά ανιχνεύθηκαν μέσω της AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), τα συμπλέγματα τα οποία φτάνουν σε επίπεδο ομοιότητας >80%, η επιδημιολογική σχέση αυτών των κλώνων επιβεβαιώθηκε με τη χρήση μεθόδων όπως *ribotyping*, ηλεκτροφόρηση παλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου (PFGE) και τελευταία με τη χρήση τυποποίησης πολυτοπικής αλληλούχησης (MLST) (105).

Η ανθεκτικότητα στις καρβαπενέμες που παρουσιάζει το *A.baumannii* τώρα πια αποτελεί πρόβλημα σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες. Πληροφορίες για την επικράτηση της αντοχής στις καρβαπενέμες σε διάφορες ευρωπαϊκές περιοχές είναι δύσκολο να αποκτηθούν, αλλά φαίνεται από την βιβλιογραφία ότι καταγράφονται εξάρσεις υψηλότερων επιπέδων αντοχής στην Τουρκία, στην Ελλάδα, στην Ιταλία, στην Ισπανία και στην Αγγλία ενώ στη Γερμανία και την Ολλανδία είναι ακόμα χαμηλά τα επίπεδα. Σε μια έρευνα, χρηματοδοτούμενη από μία βιομηχανία (MYSTIC), καταγράφηκαν σε 48 νοσοκομεία κατά την περίοδο 2002-2004, ότι μόλις το 73,1% των δειγμάτων ήταν ευαίσθητα στη μεροπενέμη και το 69,9% ήταν ευαίσθητα

στην μιπενέμη. Η ευαισθησία που παρουσίασαν και στα άλλα αντιβιοτικά κυμαινόταν σε ποσοστά 32,4%, 34,0% και 47,6% στο cefazidime, στο ciprofloxacin και στη γενταμυκίνη αντίστοιχα (105).

Σε μια πρόσφατη δεκαετή μελέτη που έγινε στην Ελλάδα και περιλάμβανε στελέχη *A.baumannii* από 8 τριτοβάθμια νοσοκομεία, αναφέρθηκε πως τα πολυανθεκτικά στελέχη του *A.baumannii* σχετίζονταν με τους διεθνής κλώνους CC1 και CC2 και συχνά έφεραν το γονίδιο blaOXA-58.

Πολλές μελέτες έγιναν στο νοσοκομειακό περιβάλλον. Ανιχνεύθηκε κυρίως σε πατώματα, σιφόνια και νεροχύτες (106), σε δείγματα αναπνευστήρων και σε δείγματα αέρος από περιοχές που γειτονεύουν με αποικισμένους ασθενείς ή ασθενείς με λοίμωξη (105). Ανιχνεύθηκε επίσης στον εξοπλισμό των κρεβατιών των νοσοκομείων. Η μόλυνση του περιβάλλοντος και του αέρος σε μεγάλο βαθμό παρατηρείται σε περιόδους επιδημιών με πολυανθεκτικά στελέχη ακινητοβακτηριδίων η οποία παραμένει στον περιβάλλοντα χώρο έως και 13 ημέρες μετά την απομάκρυνση του ασθενούς φορέα (106).

Απομακρυσμένες γεωγραφικές εξάρσεις μελετήθηκαν για την προέλευση των προγονικών γενετικών δεξαμενών και την κλωνική τους καταγωγή. Με την τυποποίηση πολυτοπικής αλληλούχησης αναγνωρίστηκαν I έως III διεθνής κλώνοι, που ανταποκρίνονται στα δικά τους κλωνικά συμπλέγματα, και πολλά από τα δείγματα που προκαλούν εξάρσεις είναι ύποπτα φυλογενετικά και παρουσιάζονται σχεδόν συγγενικά με αυτά των κλωνικών ομάδων (106). Στις αναφορές παρουσιάζεται μια θετική συσχέτιση ανάμεσα στη μετατροπή της ικανότητας της βιομεμβράνης και την πολυανθεκτικότητα στα φάρμακα (MDR) για την κατάσταση του *A.baumannii*. τέτοιοι φαινότυποι έχουν την ικανότητα να μεσολαβούν στις εξάρσεις (72).

Ο Townner περιγράφει ότι η εξάρτηση από την περιοχή απομόνωσης και από τους πληθυσμούς των ειδών ή των στελεχών συσχετίζονται, με αυτό τον τρόπο το *Acinetobacter* μπορεί ευρέως να κατηγοριοποιηθεί σε τρεις ομάδες (72) : **1.** σε MDR (Multi Drug Resistant) δείγματα υπεύθυνα για τον αποικισμό και την επιμόλυνση νοσοκομειακών ασθενών, τα οποία συνήθως μεσολαβούν στις νοσοκομειακές εξάρσεις. Γενικά αυτό οφείλεται στο *A.baumannii*. Τα δείγματα αυτά ανήκουν σε ένα μόνο κλώνο ή σε περιορισμένους κλώνους. Οι μονάδες εντατικής θεραπείας αποτελούν «αποθήκες» για τέτοιου είδους εξάρσεις (περιστασιακά άλλες μονάδες μεσολαβούν επίσης στην εξάπλωσή τους). Και **2.** σε σχετικά λιγότερο ανθεκτικά, λιγότερο λοιμογόνα στελέχη που περιστασιακά προκαλούν εξάρσεις. Αυτά τα δείγματα μπορούν να είναι μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του δέρματος των ανθρώπων ή των ζώων ή να σχετίζονται με

τα αλλοιωμένα τρόφιμα. Παραδείγματα τέτοιων δειγμάτων είναι το *A.johnsonii*, το *A.lwoffii* και το *A.radioresistens*. Από περιβαλλοντικές πηγές δειγμάτων βρέθηκαν στελέχη που είναι ευαίσθητα σε πολλά αντιβιοτικά ρουτίνας και σπάνια προκαλούν εξάρσεις, ένα τέτοιο κλασικό παράδειγμα αποτελεί το *A.calcoaceticus*.

Σε πολλά Ασιατικά και Ευρωπαϊκά νοσοκομεία, η κλωνική εξάπλωση (μονός κλώνος) του *A.baumannii* έχει σημειωθεί είτε σε ένα ή σε πολλά νοσοκομεία και το στέλεχος αυτό ήταν ευαίσθητο μόνο στη κολιστίνη και στην τιγκεκυκλίνη. Οι επιδημιολογικές μέθοδοι για την τυποποίηση είναι συχνά χρήσιμες για τον καθορισμό της διασποράς των στελεχών που σχετίζονται με την έξαρση και μπορούν να διαφοροποιηθούν από τα στελέχη που δημιουργούν σποραδικές εξάρσεις. Έτσι, συνολικά η διαφορετικότητα του αποικισμού, η τάση να επιδεικνύουν αντιμικροβιακή αντοχή, η αντοχή στην αφυδάτωση, η ικανότητα μετατροπής της βιομεμβράνης και η τάση να προκαλούν εξάρσεις νοσοκομειακών λοιμώξεων είναι στοιχεία που κάνουν το *Acinetobacter* ένα σημαντικό μικροοργανισμό.

Από το 2004 έως το 2009 σημειώθηκαν παγκοσμίως θεαματικές αυξήσεις στην αντιμικροβιακή αντοχή. Τα υψηλότερα επίπεδα αντοχής καταγράφηκαν για το ceftriaxone (83,6%), το piperacillin-tazobactam (82,0%) και το ceftazidime (80,3%) στη Μέση Ανατολή. Αυξημένη ανθεκτικότητα σημειώθηκε σε όλες τις μικροβιακές απομονώσεις που συλλέχθηκαν από την Ασία-στις παράκτιες χώρες του Ειρηνικού, όπου η αύξηση στην αντοχή κυμαίνεται από 19,1% στο ceftazidime και 38,9% στο levofloxacin. Η αντοχή επίσης αυξήθηκε θεαματικά στην Αφρική (που περιλαμβάνει αντοχή στα : piperacillin-tazobactam, ceftriaxone, cefepime, amikacin, meropenem και levofloxacin) και στην Ευρώπη (που περιλαμβάνει αντοχή στα : piperacillin-tazobactam, ceftriaxone, ceftazidime, levofloxacin, amikacin, minocycline, meropenem και cefepime) (72).

Επιπροσθέτως, η επικράτηση του MDRAB (Multidrug Resistant *Acinetobacter Baumannii*) στη Ταϊβάν είναι κοινό στέλεχος για τα νοσοκομεία πολλών περιοχών του κόσμου, περιλαμβανομένων της Κορέας, του Βελγίου, της Ιταλίας, του Ιράκ, του Ισραήλ, της Ελλάδας και της Αμερικής. Επιπλέον, μία μελέτη, που διήρκεσε ένα έτος, έδειξε ότι τρεις κλώνοι του MDRAB εξαπλώθηκαν στα νοσοκομεία της Βραζιλίας. Σε ένα μόνο Ίδρυμα στο Κουήνσλαντ της Αυστραλίας, ο τύπος αλληλούχησης 92 (ST92) ήταν ο κυρίαρχος τύπος αλληλούχησης και ήταν παρόν για σχεδόν 9 χρόνια. Ακόμη, παρατηρήθηκε κλωνική διασπορά ανάμεσα σε τρία νοσοκομεία που τοποθετούνται σε δύο διαφορετικές πόλεις στην Κίνα, υποδεικνύοντας την πιθανότητα επιδημίας του MDRAB. Πολλοί κλώνοι πολυανθεκτικοί στα φάρμακα μπορούν να συνυπάρξουν ενδημικά σε ένα νοσοκομείο για πολλά χρόνια, και οι ίδιοι κλώνοι μπορούν να

εξαπλωθούν σε μικρή κλίμακα μέσα σε μικρή χρονική περίοδο ή μπορούν να ανιχνευθούν κατά τη διάρκεια μιας έξαρσης σε μία σχολαστική έρευνα για την επιδημιολογική προέλευση. Επιπλέον, τέτοιες εξάρσεις μπορούν να συμβούν κατά μήκος των εθνικών συνόρων. Για παράδειγμα, οι Wybo et al. περιέγραψαν μια MDRAB νοσοκομειακή λοίμωξη που σχετιζόταν προφανώς με 20 ασθενείς που νοσηλεύονταν στο πανεπιστημιακό νοσοκομείο του Βελγίου, οι οποίοι νόσησαν εξαιτίας της μεταφοράς δύο ασθενών από την Ελλάδα (106).



Εικόνα 3 : Παγκόσμια επιδημιολογία των στελεχών του *A.baumannii* που είναι ανθεκτικά στις καρβαπενέμες. Με κόκκινο χρώμα η ανθεκτικότητα κυμαίνεται $\geq 50\%$. Με λιγότερο έντονο κόκκινο χρώμα ο ρυθμός αντοχής κυμαίνεται σε $\geq 30\%$ αλλά $< 50\%$. Με ροζ χρώμα η ανθεκτικότητα κυμαίνεται σε $\geq 10\%$ αλλά $< 30\%$ και με γκρι χρώμα η ανθεκτικότητα κυμαίνεται στο $< 10\%$. (Uhet et al., 2014).

Επιπλέον, η αυξημένη βαρύτητα του MDRAB στις νοσοκομειακές λοιμώξεις, οι αυξημένες περιγραφές των εξάρσεων που προκλήθηκαν από το CRAB (*Colistin Resistant Acinetobacter Baumannii*) τα τελευταία χρόνια εξελίχθηκε σε μια τρομακτική πραγματικότητα.

Ο δείκτης αντοχής της μιπενέμης για το *A.baumannii* που βρέθηκε από την παγκόσμια συλλογή δειγμάτων που συλλέχθηκαν από το 2005 έως το 2009 έφτασαν τα επίπεδα αντοχής να είναι πάνω από 50%. Στο Μπρούκλιν της Νέας Υόρκης, η παρακολούθηση όλης της πόλης αποκάλυψε ότι περίπου 2 στα 3 δείγματα παρουσίαζε αντοχή στις καρβαπενέμες. Ένα επικρατές στελέχος του τύπου CRAB είχε αποδείχθει η επικράτησή του μετά την παρουσίασή του σε ένα πανεπιστημιακό νοσοκομείο στο Σικάγο το 2005. Ακόμα οι μοριακές επιδημιολογικές έρευνες των διαδοχικών εξάρσεων του *A.baumannii* στη ΜΕΘ ανέδειξαν την παρουσία αντοχής στις καρβαπενέμες στην Ιταλία από το 1999 έως το 2002. Η κλωνική εξάπλωση της αντοχής στην μιπενένη του *Acinetobacter spp.* συνοδεύεται από μία ευρεία διασπορά του OXA-23 των καρβαπενεμασών που βρέθηκε στην Κίνα. Η πρώτη έξαρση του CRAB καταγράφηκε στην Αμερική το 1991, η οποία ακολουθήθηκε από την παγκόσμια διασπορά του CRAB. Οι περισσότερες εξάρσεις που προκλήθηκαν από το CRAB συνέβησαν σε όλες τις εγκαταστάσεις των ΜΕΘ σε πολλές περιοχές. Μια έξαρση που προκλήθηκε από τα πολυανθεκτικά στα φάρμακα του στελέχους του *A.baumannii* είχε επίσης περιγραφεί σε μια παιδιατρική ΜΕΘ σε ένα νοσοκομείο της Ταϊβάν (72).

7. Μηχανισμοί αντοχής.

Μέχρι στιγμής, συγκεκριμένα στελέχη του *A.baumannii* παρουσίασαν υψηλή ανθεκτικότητα στα περισσότερα αντιβιοτικά που είναι διαθέσιμα στη κλινική πρακτική. Ένας μηχανισμός αντοχής για πολλές τάξεις αντιβιοτικών είναι γνωστό ότι υπάρχει στο *A.baumannii*, που περιλαμβάνει τις β-λακτάμες, τις αντλίες εκροής πολλών φαρμάκων, τα τροποποιητικά ένζυμα των αμινογλυκοσιδασών, τα ελαττώματα διαπερατότητας και την αλλαγή του χώρου στόχου. Οι περισσότεροι από αυτούς τους μηχανισμούς αντοχής μπορούν να στοχεύσουν διαφορετικές τάξεις αντιβιοτικών. Ωστόσο, αρκετοί διαφορετικοί μηχανισμοί μπορούν να συνεργαστούν για να συμβάλλουν στην αντοχή σε μία μόνο τάξη αντιβιοτικών. Για παράδειγμα, οι μηχανισμοί αντοχής του CRAB (Colistin Resistant *Acinetobacter Baumannii*) είναι ποικίλοι. Επιπροσθέτως, οι β-λακτάμες με την υδρολυτική τους δραστηριότητα στις καρβαπενέμες που είναι ο κύριος μηχανισμός αντοχής των καρβαπενεμασών, ο οποίος περιλαμβάνει την υδρόλυση καρβαπενεμών της τάξης D των β-λακταμών (CHDLs) και τις μεταλλο-β-λακτάμες (MBLs), τις πορίνες όπως η CarO και η τροποποίηση της πρωτεΐνης που δεσμεύει την πενικιλίνη μπορεί να σχετίζονται με την αντοχή στις καρβαπενέμες. Η εξάπλωση των πολυανθεκτικών φαρμάκων που είναι καθοριστικά για το *A.baumannii* γίνεται μέσω της σύζευξης του πλασμιδίου, της απόκτησης μεταθετών γονιδίων, της κινητοποίησης των ιντεγκρονίων ή και των νησιδίων

αντοχής για να αποκτήσουν συμπλέγματα γονιδίων που κωδικοποιούν την αντοχή σε πολλές οικογένειες αντιβιοτικών. Επιπλέον, η εισαγωγή λειτουργικών αλληλουχιών είναι σημαντικές για την ενίσχυση της αντιμικροβιακής αντοχής και την πλαστικότητα του γονιδίου (85).

i) Αντοχή στις β-λακτάμες.

Οι μηχανισμοί που υποδεικνύουν την αντοχή στις β-λακτάμες του *A.baumannii* είναι : **1.** η υδρόλυση των β-λακτάμες, **2.** οι αλλαγές στις πρωτεΐνες δέσμευσης της πενικιλίνης (PBPs) οι οποίες εμποδίζουν τη δράση τους, **3.** μετατροπές στη δομή και τον αριθμό των πρωτεϊνών πορίνης οι οποίες καταλήγουν με μειωμένη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης του βακτηριακού κυττάρου για τα αντιβιοτικά, και **4.** η δραστηριότητα της αντλίας εκροής που μειώνει επιπροσθέτως την συγκέντρωση των αντιβιοτικών εντός του βακτηριακού κυττάρου (106).

- Τάξη A των β-λακταμών. Αν και το TEM-1 των β-λακταμών που προκύπτει στο *A.baumannii*, η τάξη A που έχει εκτεταμένο φάσμα στις β-λακτάμες (ESBLs) έχει βρεθεί μόλις πρόσφατα. Τα στελέχη του *A.baumannii* περιθάλποντας το PER-1, ένα ESBL, παρουσιάζουν υψηλό επίπεδο αντοχής στις πενικιλίνες και ένα εκτεταμένο φάσμα στις κεφαλοσπορίνες (η ceftazidime με ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση [MIC], 256μg/ml. η cefepime με MIC 32μg/ml), αλλά ευτυχώς, το PER-1 των β-λακταμών δεν απονέμει αντοχή στις καρβαπενέμες για το *A.baumannii*. Το PER-1 είναι επικρατές ανάμεσα στα στελέχη *A.baumannii* που εμφανίζονται στην Τουρκία και στη Κορέα και αυτός ο μικροοργανισμός έχει επίσης περιγραφεί στη Γαλλία, στο Βέλγιο και στη Βολιβία. Μια πρόσφατη επιδημιολογική και μοριακή ανάλυση περιέγραψε το PER-1 στις Ηνωμένες Πολιτείες (106).

Το *A.baumannii* περιθάλποντας το μεταφερόμενο ιντεγκρόνιο του VEB-1, επίσης και του ESBL, προκάλεσε εξάρσεις στα Γαλλικά και Βέλγικα νοσοκομεία. Στην Κίνα, περιγράφηκε το στέλεχος του *A.baumannii* που παράγει SHV-12 στο ESBL. Επιπλέον, έχει δημοσιευθεί μια περιγραφή του SHV-12 και του TEM-116 του *A.baumannii* στην Ολλανδία. Ο *Endimiani* και οι συνεργάτες του βρήκαν το TEM-92 του ESBL σε απομονώσεις στελεχών του *A.baumannii* στην Ιταλία (106).

Από την στιγμή που η κλινική ανίχνευση των ESBLs στο *A.baumannii* δεν εναρμονίσθηκε και περιπλέχθηκε επιπλέον από την παρουσία των χρωμοσωμικών κεφαλοσπορινών, είναι αβέβαιο σε τι έκταση η τάξη A των ESBLs διαμοιράστηκε στο *A.baumannii*. Πολλά κλινικά δείγματα του *A.baumannii* ελέγχθηκαν για την αντοχή τους στις

ceftazidime και ceferime. Στο *Enterobacter spp.* και στην *Klebsiella pneumoniae*, η τάξη A των ESBLs σε ένα υπόβαθρο του AmpC σχετίζεται με την κλινική αποτυχία όταν χρησιμοποιείται το ceferime ως θεραπευτική αγωγή παρά την καταγεγραμμένη ευαισθησία αυτού του παράγοντα in vitro (106).

- Τάξη B των β-λακταμών. Η αύξηση του αριθμού των μεταλλο-β-λακταμών (MBLs) στο *A.baumannii* είναι μια δυσοίωνη εξέλιξη στην παγκόσμια εμφάνιση της αντοχής των β-λακταμών. Τα MBLs ανήκουν στην τάξη B των β-λακταμών που είναι ικανά να υδρολύσουν τις καρβαπενέμες όπως επίσης και οποιοδήποτε άλλο β-λακταμικό αντιβιοτικό με εξαίρεση την αζτρεονάμη. Διαφέρουν από τις τάξεις A και Δ των καρβαπενεμασών επειδή έχουν ένα μεταλλικό ιόν στην ενεργή πλευρά, συνήθως ψευδάργυρο, το οποίο συμμετέχει στην κατάλυση (106).

Το IMP των MBLs είχε περιγραφεί πρώτα σε ένα είδος *P.aeruginosa* που βρέθηκε στην Ιαπωνία το 1988. Αντικατοπτρίζοντας την εξάπλωση άλλων β-λακταμών, το IMP των MBLs βρέθηκε παντού στο κόσμο σε διαφορετικά γένη. Στο *A.baumannii* το IMP των MBLs συνήθως ανιχνεύεται ως μέρος της τάξης 1 του ιντεγκρονίου, καθώς πρώτα ανακαλύφθηκε στην Άπω Ανατολή. Αν και τα MBLs δεν είναι επικρατούντα στις καρβαπενεμάσες του *A.baumannii*, αρκετά είχαν περιγραφεί ως : IMP-1, IMP-2, IMP-4, IMP-5, IMP-6 και IMP-11. Ένα από τα πρώτα MBLs που περιγράφηκαν για το *A.baumannii* στην Αγγλία ανιχνεύθηκε σε έναν ασθενή που προερχόταν από την Ισπανία. Έχει ήδη περιγραφεί η παρουσία πολλών τύπων IMP των β-λακταμών του *A.baumannii* από την Ιαπωνία, αλλά όπως προέκυψε τελικά είχαν πρωτοεμφανιστεί στο Χονγκ-Κονγκ. Η αντοχή στην καρβαπενέμη με τη μεσολάβηση του τύπου-IMP των MBLs αποτελεί τώρα θανάσιμο πρόβλημα στη Κορέα και στις παράκτιες Χώρες του Ειρηνικού. Στην Αμερική, η μόνη περιγραφή MBL στο *A.baumannii* είναι από μια απομόνωση στελέχους που παράγει IMP από τη Βραζιλία. Στη Βερόνα το ιντεγκρόνιο που βρέθηκε και κωδικεύει το MBL (VIM-1), πρώτα ταυτοποιήθηκε στην Ιταλία το 1997 σε μία απομόνωση του στελέχους *P.aeruginosa*. Το *A.baumannii* περιθάλλει το VIM-2 το οποίο έχει περιγραφεί μόνο στη Κορέα (106).

Η ποικιλία των MBLs στις απομονώσεις των στελεχών του *A.baumannii* από την Κορέα τονίσθηκε από την πρόσφατη περιγραφή μιας ιμιπενεμάσης από τη Σεούλ (SIM-1), που είναι ένα καινούργιο MBL. Το SIM-1 είναι μέλος της B1-υποτάξης. Το ευρύ φάσμα της SIM-1 του MBL εμφανίζει κατά 69% ταυτοποίηση με το IMP-12 του MBL και 64% ομοιότητα με το IMP-9 του MBL. Υπάρχουν ενδιαφέρουσες γενετικές αποδείξεις που προτείνουν ότι η κασέτα του

blaSIM-1 μπορεί να προήλθε από την *Pseudomonas alcaligenes* με το υπεριντεγκρόνιο In55044 (106).

- Τάξη Γ των β-λακταμών. Στο *Acinetobacter spp.*, όπως και σε άλλους Gram-αρνητικούς μικροοργανισμούς, έχει κωδικευθεί χρωμοσωμικά η τάξη Γ των β-λακταμών. Πρόσφατη φυλογενετική ανάλυση βρήκε ότι τα χρωμοσωμικά γονίδια ampC ανήκουν σε στέλεχος του είδους του *Acinetobacter spp.* Πιθανόν προέρχονται από ένα κοινό προγονικό γονίδιο β-λακτάμης και είναι πιο κοντινός συγγενικά μεταξύ τους παρά με τα γονίδια ampC που βρίσκονται σε άλλα είδη βακτηρίων. Προτάθηκε ότι αυτά παρουσιάζουν μια ξεχωριστή οικογένεια β-λακταμών, όπως είναι το προερχόμενο-*Acinetobacter* από τις κεφαλοσπορίνες (ADCs). Τα γονίδια bla κωδικοποιούν την τάξη Γ των κεφαλοσπορινών που υδρολύουν τις πενικιλίνες και τις περιορισμένου και ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες, αλλά όχι το cefepime ή τις καρβαπενέμες. Έτσι, πολλές κλινικές απομονώσεις του *A.baumannii* έχουν αντοχή στο ceftazidime. Δεδομένης της γενετικής ποικιλίας του *Acinetobacter spp.*, είναι πιθανόν να προκύψουν περισσότερες παραλλαγές των ADCs. Μέχρι σήμερα, 28 γονίδια blaADC έχουν βρεθεί και έχουν καταγραφεί στο GenBank (106).

- Τάξη Δ των β-λακταμών. Η τάξη Δ των OXA β-λακταμών είναι συνήθως εύρωστες πενικιλινάσες (οξακιλινάσες). Μερικά OXAs (π.χ. OXA ESBLs) είναι επίσης ικανά να υδρολύσουν εκτεταμένου-φάσματος κεφαλοσπορίνες. Τα πιο ανησυχητικά είναι τα OXA των β-λακταμών που αδρανοποιούν τις καρβαπενέμες. Η πρώτη περιγραφή μιας τέτοιας OXA καρβαπενεμάσης στο στέλεχος *A.baumannii* ήταν η OXA-23, η οποία αποκτήθηκε από μία κλινική απομόνωση που βρέθηκε στη Σκωτία το 1985 πριν την παρουσίαση των καρβαπενεμασών. Από τότε, αυτό το πλασμίδιο που κωδικεύει ένζυμα, αρχικά ονομάστηκε ARI-1 (*Acinetobacter* Resistant to Imipenem) εντοπίστηκε στην Αγγλία, στη Βραζιλία, στη Πολυνησία, στη Σιγκαπούρη, στη Κορέα και στη Κίνα. Το OXA-58, ένα μεταφερόμενο-πλασμίδιο καρβαπενεμάσης, βρέθηκε στη Γαλλία, στην Αγγλία, στην Αργεντινή, στην Ισπανία, στη Τουρκία, στη Ρουμανία, στην Αυστρία, στην Ελλάδα, στη Σκωτία και στο Κουβέιτ. Η σημαντική συνεισφορά αυτών των ενζύμων στην αντοχή στις καρβαπενέμες του βακτηρίου *A.baumannii* έχουν γίνει φανερά, και συγκεκριμένα όταν συνοδεύονται από τα ISAbal και ISAbal3 στο φυσικώς προκύπτον πλασμίδιο (τα MICs για την ιμιπενέμη και την μεροπενέμη είναι $\geq 32\mu\text{g/ml}$) (106).

Οι υπόλοιπες καρβαπενέμες που υδρολύουν τις οξακιλινάσες πιστεύεται ότι είναι χρωμοσωμικά ενδιάμεσα ένζυμα. Μια σύγχρονη γενετική ανάλυση κατηγοριοποίησε τις OXA καρβαπενεμάσες σε 8 διαφορετικές ομάδες. Οι διαδομένες παρουσίες τους, αν και έχουν αρκετές

διαφορές για να επιτρέψουν τον διαχωρισμό σε ξεχωριστές υποομάδες, μπορεί να υποδεικνύουν ότι οι οξακιλινάσες είναι επίσης ένα αναγκαίο συστατικό της γενετικής σύνθεσης του *Acinetobacter spp.* Οι εξάρσεις του *A.baumannii* εμφανίζοντας τα ένζυμα OXA-40 και OXA-58 στις Ηνωμένες Πολιτείες αντανάκλαται η διασπορά και η εμφάνιση των OXA ενζύμων σε αυτό τον μικροοργανισμό στο Δυτικό Ημισφαίριο, αυξάνοντας το κύρος τους ως αναδυόμενες καρβαπενεμάσες. Τα OXA-51/69-like των β-λακταμών αξίζουν ιδιαίτερης αναφοράς ως ένα «φυσικώς ευρισκόμενο» χρωμοσωμικό ένζυμο στο *A.baumannii* τα οποία βρέθηκαν σε απομονώσεις στελεχών και από τις 4 ηπείρους, και η έκφραση τους ποικίλει σύμφωνα με την παρουσία του ISAbal. Είναι αξιοσημείωτο ότι ο πρόσφατος καθορισμός της κρυσταλλικής δομής του OXA-24 της καρβαπενεμάσης προτείνει ένα καινούργιο καταλυτικό ρόλο για τα Tyr112 και Met223 στις πλευρικές αλυσίδες (106).

ii) **Αλλαγές στα OMPs και στα PBPs.**

Κατανοώντας τη συμβολή των πουρινών ή των πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης (OMPs) στην αντοχή στα αντιβιοτικά του βακτηρίου *A.baumannii* ήταν μια ιδιαίτερη πρόκληση. Δυστυχώς, είναι δύσκολο να κάνουμε ακριβή σύγκριση της απώλειας των OMPs. Εργαστηριακές μελέτες αποκάλυψαν ότι υπάρχει μεταβλητότητα στον αριθμό των παρατηρούμενων OMPs. Μια παρόμοια εικόνα συμπλέγματος εμφανίστηκε για τα PBPs (106).

Η έρευνα της επιδημίας του MDR του βακτηρίου *A.baumannii* στη Νέα Υόρκη απέδειξε την παρουσία των ανθεκτικών στελεχών στις καρβαπενέμες που μείωσαν την έκφραση 37-, 44- και 47-kDa των OMPs και αύξησαν την έκφραση της τάξης Γ των κεφαλοσπορινών. Ομοίως, σε δείγματα από τη Μαδρίτη, η απώλεια των 22-kDa και 33- kDa από τα OMPs σε συνδυασμό με την παραγωγή του OXA-24 κατέληξαν σε αντοχή στις καρβαπενεμάσες (106).

Πρόσφατα, μια πρωτεΐνη 43kDa του βακτηρίου *A.baumannii* ταυτοποιήθηκε ως ομόλογη του OprD (μία πολύ καλά μελετημένη πορίνη που συχνά σχετίζεται με την αντοχή στην ιμιπενέμη του *P.aeruginosa*). Η οδός σχηματισμού του CarO έχει χαρακτηριστεί ορθά σε μία 29kDa OMP η οποία παρέχει αντοχή τόσο στην ιμιπενέμη όσο και στη μεροπενέμη στο βακτήριο *A.baumannii* (106).

Η αντοχή του βακτηρίου *A.baumannii* στις καρβαπενέμες έχει επίσης τεκμηριωθεί από την μειωμένη έκφραση του PBP-2, όπως περιγράφηκε σε δείγματα από τη Σεβίλλη της Ισπανίας. Σημειωτέων, αυτά τα στελέχη είχαν απώλεια των OMPs και παρήγαγαν β-λακταμάσες, διευκρινίζοντας την αλληλεπίδραση και άλλων μηχανισμών αντοχής κατά μίας τάξης

αντιβιοτικών. Αποδεικνύοντας έτσι τη σχετική συμβολή της δράσης των β-λακταμών, την εισχώρηση της β-λακτάμης μέσω των OMPs, και την αλληλεπίδραση με άλλους μηχανισμούς αντοχής, όπως και ο έλεγχος της έκφρασής τους παρουσιάζουν εντυπωσιακές προκλήσεις (106).

iii) Αντλίες εκροής πολυανθεκτικότητας.

Ενώ οι αντλίες εκροής πολυανθεκτικότητας στα φάρμακα έδειξαν ότι παίζουν ρόλο στη βακτηριακή παθογονικότητα, η συνεισφορά των αντλιών εκροής πολυανθεκτικότητας στα βακτηριακά φάρμακα περιγράφεται συχνά. Οι μηχανισμοί που βασίζονται στην εκροή είναι υπεύθυνοι για την αντοχή σε πολλές διαφορετικές τάξεις αντιβιοτικών, περιλαμβανομένου της αντοχής στη τιγκεκυκλίνη ή στην ιμιπενέμη του βακτηρίου *A.baumannii*. Επιπλέον, η γραμμική σχέση μεταξύ της αλλαγμένης καταγραφής των τιμών έκφρασης του AdeABC των γονιδίων της αντλίας εκροής και της αλλαγμένης καταγραφής των τιμών MIC είναι στατιστικά σημαντικά και υποδεικνύουν ότι η υπερέκφραση του AdeABC της αντλίας εκροής είναι ένας επικρατής μηχανισμός της μειωμένης ευαισθησίας στην τιγκεκυκλίνη. Το σημαντικό με τις αντλίες εκροής πολυανθεκτικότητας στα φάρμακα του βακτηρίου *A.baumannii* υποστηρίζεται από το γεγονός της παρουσίας των αναστολέων των αντλιών εκροής, όπως είναι η 1-(1-ναφθυλμεθυλ)-πιπεραζίνη, η φαινυλ-αργινίνη-β-ναφθυλαμίδη, ή η καρβονύλοκυανίδιο 3-χλωροφαινυλ-υδραζόνη, οι οποίοι μπορούν να αναστρέψουν το σχήμα αντοχής (85).

Τέσσερις κατηγορίες αντλιών εκροής, που περιλαμβάνουν την υπεροικογένεια διαχωρισμού των οζιδίων αντοχής (RND), την υπεροικογένεια των παραγόντων διευκόλυνσης (MFS), την οικογένεια των πολυανθεκτικών στα φάρμακα και εξώθησης της τοξικής ένωσης (MATE) και η μικρή οικογένεια των πολυανθεκτικών μεταφορέων στα φάρμακα (SMR), έχουν περιγραφεί ότι σχετίζονται με την αντιμικροβιακή αντοχή του βακτηρίου *A.baumannii*. Από τις διάφορες αντλίες, οι μεταφορείς RND και MFS αναφέρονται πιο συχνά. Το AdeABC, μια αντλία εκροής τύπου-RND με δομή τριών-συστατικών, δεν σχετίζεται μόνο με την αντοχή στις αμινογλυκοσίδες αλλά επίσης σχετίζεται με την μείωση της ευαισθησίας σε αρκετά αντιβιοτικά, όπως είναι η τιγκεκυκλίνη. Οι διαφορές στην έκφραση του AdeABC φάνηκαν ότι συμβάλλουν τόσο δια- όσο και ενδο-κλωνικά με μεταβολή των MICs της τιγκεκυκλίνης σε μία μελέτη των επιδημικών κλώνων του βακτηρίου *A.baumannii*. Τόσο η αύξηση της αντοχής στη τιγκεκυκλίνη κατά τη διάρκεια της θεραπείας όσο και η μείωση της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά μη-φλουοροκινολόνης κατά τη διάρκεια μιας έξαρσης διαμεσολαβήθηκε από την υπερρύθμιση του AdeABC στο βακτήριο *A.baumannii*. Η αντλία AdeABC στο ελεύθερο *A.baumannii* είναι κωδικοποιημένο σύμφωνα με αυστηρό έλεγχο από το σύστημα δύο-συστατικών του AdeRS.

Σημειακές μεταλλάξεις στα AdeS και AdeR ή με αποκοπή του AdeS εξαιτίας της εισαγωγής του ISAbal1 μπορεί να σχετίζονται με την υπερέκφραση του AdeABC, η οποία οδηγεί στην πολυανθεκτικότητα στα φάρμακα. Ωστόσο, η ύπαρξη της μη-ευαίσθητης τιγεκυκλίνης και του υπερεκφρασμένου-adeB στις κλινικές απομονώσεις του βακτηρίου *A.baumannii*, χωρίς να είναι γνωστές οι μεταλλάξεις στο AdeRS και η χαμηλή έκφραση του AdeABC στα κλινικά στελέχη του *A.baumannii* με την εισαγωγή του ISAbal1 στο οπερόνιο AdeRS, διαφαίνεται ότι η γονιδιακή ρύθμιση της έκφρασης του AdeABC είναι περίπλοκη. Επιπλέον, η εξαρτώμενη-πυκνότητα της κυτταρικής έκφρασης του AdeB προτείνει την παρουσία των παγκόσμιων ρυθμιστικών μηχανισμών για την έκφραση αυτού του γονιδίου στο βακτήριο *A.baumannii*. Το BaeSR, το οποίο λειτουργεί ως σύστημα απόκρισης φακέλου πίεσης σε εξωτερικά ερεθίσματα, σημειώθηκε ότι επηρεάζει την αντιγραφή του AdeAB που προσδίδει ευαισθησία στην τιγεκυκλίνη στο βακτήριο *A.baumannii* που λειτουργεί ως ρυθμιστής της παγκόσμιας αντιγραφής (85).

Ακόμη στην αντλία εκροής AdeABC, η αδρανοποίηση άλλων αντλιών εκροής τύπου-RND, που περιλαμβάνουν τα AdeFGH και AdeIJK, αποδεικνύεται η συμβολή τους στην πολυανθεκτικότητα στα φάρμακα του βακτηρίου *A.baumannii*. Τα AdeABC και AdeIJK συστήματα εκροής μπορούν να συμβάλλουν συνεργειακά στην αντοχή στην τιγεκυκλίνη. Ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης που κωδικοποιεί ένα τύπου-LysR μεταγραφικό ρυθμιστή, που ονομάζεται AdeL, τοποθετείται προς την αντίθετη πλευρά του οπερονίου AdeFGH και είναι υπεύθυνο για την υπερέκφραση του AdeFGH ενώ η έκφραση του AdeIJK στο βακτήριο *A.baumannii* ρυθμίζεται από το AdeN, που είναι ένας ρυθμιστής τύπου-Tet-R. Αν και η αντλία εκροής RND του AdeDE είχε αρχικά αναγνωρισθεί ως στέλεχος του *Acinetobacter* της γονιδιακής ομάδας 3, το AdeE βρέθηκε αργότερα ότι συνυπάρχει με το AdeB σε κάποιες κλινικές απομονώσεις του βακτηρίου *A.baumannii* (85).

Ένας αριθμός αντλιών εκροής MFS, που περιλαμβάνει τους : TetA, CmIA, MdfA, CraA και AmnA, όπου μεσολαβείται η αντοχή στους διαφορετικούς τύπους αντιβιοτικών για το βακτήριο *A.baumannii* έχουν περιγραφεί. Η AbeM, είναι μία συζευγμένη αντλία-H που ανήκει στην οικογένεια MATE, σημειώθηκε ότι είναι παρούσα στις κλινικές απομονώσεις του βακτηρίου *A.baumannii* σε πολλές μελέτες και απονείμει αντοχή στις φλουοροκινολόνες ή στην ιμιπενέμη για το βακτήριο *A.baumannii*. Το βακτήριο *A.baumannii* με μία μεταλλαγμένη AbeS της αντλίας SMR παρουσιάζει αντοχή στην ερυθρομυκίνη και στη χλωραμφενικόλη (85).

iv) Αμινογλυκοσιδάσες.

Η παρουσία των γονιδίων κωδίκευσης των ενζύμων μετατροπής-αμινογλυκοσιδίων μέσω των ιντεγκρονίων της τάξης 1 είναι υψηλά επικρατούντα στα είδη του βακτηρίου *A.baumannii* που είναι πολυανθεκτικά στα φάρμακα. Όλες οι μεγάλες τάξεις ενζύμων περιγράφηκαν, περιλαμβανομένου των ακετυλτρανσφερασών, νουκλεοτιδυλ-τρανσφερασών και φωσφοτρανσφερασών. Πιο πρόσφατα, με την 16S rRNA μεθυλίωση περιγράφηκαν τα στελέχη του βακτηρίου *A.baumannii* (agmA) από την Ιαπωνία, τη Κορέα και τις Ηνωμένες Πολιτείες. Αυτός ο προβαλλόμενος μηχανισμός αντοχής καταστρέφει το δεσμό της αμινογλυκοσιδίου με το πεδίο στόχου της και παρέχει υψηλού-επιπέδου αντοχή σε όλες τις κλινικά χρήσιμες αμινογλυκοσιδάσες, που περιλαμβάνουν την γενταμυκίνη, την τομπραμυκίνη και την αμικασίνη. Περιέργως, το γενετικό περιβάλλον του agmA εμφανίζεται παρόμοιο ανάμεσα στους Gram-αρνητικούς μικροοργανισμούς, αφού είναι ένα μεταφερόμενο πλασμίδιο και βρίσκεται μέσα σε ένα μεταθετόνιο (105).

Εκτός από την αντλία εκροής AdeABC, η οποία μεταφέρει λιγότερο αποτελεσματικά την αμικασίνη και την καναμυκίνη σύμφωνα με την δική τους πιο υδροφυλική φύση, οι αμινογλυκοσιδίες (γενταμυκίνη και καναμυκίνη) αποτελούν επίσης υποστρώματα της προσφάτως περιγραφόμενης αντλίας AbeM, που είναι μέλος της οικογένειας των πολυανθεκτικών στα φάρμακα, και της εξώθησης της τοξικής ένωσης (MATE) (105).

v) Κινολόνες.

Οι τροποποιήσεις της DNA γυράσης ή της τοποϊσομεράσης IV μέσω των μεταλλάξεων στα γονίδια gyrA και parC έχουν περιγραφεί εκτενώς για το βακτήριο *A.baumannii*. Αυτές οι μεταλλάξεις επεμβαίνουν στο πεδίο στόχου του δεσμού. Ομοίως με τις αμινογλυκοσιδάσες, όπου πολλές από τις κινολόνες είναι επίσης υποστρώματα για τις αντλίες εκροής πολυανθεκτικότητας, που περιλαμβάνουν την τύπου-RND αντλία του AdeABC και την MATE αντλία του AdeM. Μέχρι στιγμής, το πλασμίδιο μεσολάβησης της αντοχής στις κινολόνες, το οποίο διαμεσολαβεί από τα γονίδια qnr, δεν έχει περιγραφεί για το βακτήριο *A.baumannii* (105).

vi) Τετρακυκλίνες και Γλυκυλ-κυκλίνες.

Η αντοχή στις τετρακυκλίνες και στα παράγωγά τους μπορεί να μεσολαβηθεί από εκροή ή ριβοσωμική προστασία. Οι ειδικές τετρακυκλίνες με αντλίες εκροής περιλαμβάνουν αυτές που κωδικοποιούνται από το tet(A) στον καθοριστικό παράγοντα tet(E), που συχνά βρίσκονται μέσα σε Gram-αρνητικούς μικροοργανισμούς, ενώ ο καθοριστικός παράγοντας tet(K) βρίσκεται στον *Staphylococcus aureus*. Μέχρι τώρα, οι καθοριστικοί παράγοντες tet(A) και tet(B) περιγράφηκαν για το βακτήριο *A.baumannii*, το tet(A) βρέθηκε σε ένα μεταθετό στοιχείο όμοιο με το Tn1721, σε σχέση με το στοιχείο IS, το tet(A) παρέχει αντοχή για τις τετρακυκλίνες αλλά όχι για τις μινοκυκλίνες, και είναι ένας παράγοντας με μεγάλη δραστηριότητα κατά του βακτηρίου *A.baumannii*. Παρέχεται ριβοσωμική προστασία από τους καθοριστικούς παράγοντες tet(M) και tet(O), επίσης το tet(M) σπάνια περιγράφεται σε σχέση με το βακτήριο *A.baumannii*. Επιπλέον, ο καθοριστικός παράγοντας tet(M) ήταν πανομοιότυπος με αυτόν που περιγράφηκε για το βακτήριο *S.aureus* (105).

Εκτός από τις αντλίες εκροής των ειδικών-τετρακυκλινών, σε αυτή τη τάξη των αντιβιοτικών παρουσιάζεται ευαισθησία στα συστήματα εκροής πολυανθεκτικών στα φάρμακα, όπως είναι η αντλία AdeABC. Φυσικά, η τιγκεκυκλίνη, που είναι η πρώτη της νέας τάξης των τροποποιημένων αντιβιοτικών τετρακυκλίνης επίσης γνωστή ως γλυκυλ-κυκλίνη, επιπλέον αποτελεί ένα υπόστρωμα για αυτό το προβαλλόμενο σύστημα εκροής. Εκτελώντας τη real-time PCR με το γονίδιο *adeB* σε κλινικά και εργαστηριακά εκτιθέμενα δείγματα με αυξημένα MICs στη τιγκεκυκλίνη, ταυτοποιήθηκε η αυξημένη έκφραση του γονιδίου *adeB*. Ήταν ανησυχητικό ότι η αύξηση του MIC της τιγκεκυκλίνης συνέβη ραγδαία με πέρασμα *in vitro*, υπογραμμίζοντας ότι η έκφραση αυτής της αντλίας εκροής πολυανθεκτικότητας μπορεί να αυτορυθμιστεί ραγδαίως σε απόκριση μέσα σε εκλεκτική πίεση. Ο ρόλος της αντλίας εκροής του *adeABC* στη μείωση της ευαισθησίας της τιγκεκυκλίνης επιβεβαιώθηκε από την αρχική αδρανοποίηση του γονιδίου *adeB*, το οποίο οδήγησε σε μια σημαντική πτώση του MIC της τιγκεκυκλίνης (από 4μg/ml σε 0,5μg/ml). Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι με προσοχή πρέπει να χρησιμοποιηθεί η θεραπεία με τιγκεκυκλίνη σε λοιμώξεις του βακτηρίου *A.baumannii* σε θέσεις όπου τα επίπεδα φαρμάκων μπορεί να είναι αναντίστοιχα, όπως είναι η κυκλοφορία του αίματος (105).

vii) Πολυμυξίνες.

Η πολυμυξίνη Β και η πολυμυξίνη Ε (κολιστίνη, που δίδεται ενδοφλεβίως ως νατριούχο κολιστιμεθάτη) είναι πεπτιδικά αντιβιοτικά που απομονώθηκαν πρώτα το 1947 και όλο και

περισσότερο χρησιμοποιούνται ως «τελευταία επιλογή» θεραπεία για λοιμώξεις που προκλήθηκαν από το MDR του βακτηρίου *A.baumannii*. Δυστυχώς, υπάρχουν περιγραφές ανάπτυξης αντοχής στη κολιστίνη από τα στελέχη του *A.baumannii* οι οποίες είναι πολύ ανησυχητικές. Το 2001, οι Urban et al., περιέγραψαν ένα περιστατικό αντοχής στην πολυμυξίνη Β του βακτηρίου *A.baumannii*. Η ετεροαντοχή (υποπληθυσμοί των γενετικά ίδιων υποκλώνων που είναι πιο ανθεκτικά από τον αρχικό πατρικό κλώνο) είναι μια ιδιαίτερος τρομακτική εξέλιξη που πρόσφατα περιγράφηκε για το βακτήριο *A.baumannii*. Η επίδραση της ετεροαντοχής θα πρέπει να εκτιμηθεί και να παρακολουθηθεί με έναν ενδεικνυόμενο τρόπο αφού οι κλινικοί γιατροί ξεκινήσουν να μελετούν τα αποτελέσματα των ασθενών που βρίσκονται υπό θεραπεία με κολιστίνη (106).

Ο μηχανισμός αντοχής στη κολιστίνη πιθανόν να ανήκει στη μετατροπή του λιποπολυσακχαριδίου του βακτηρίου *A.baumannii* (π.χ. εξαιτίας της οξύνισης, της ακυλίωσης ή της παρουσίας των αντιγόνων που εμπλέκονται με τη δέσμευση των αντιβιοτικών στη κυτταρική μεμβράνη). Υπάρχει ο φόβος ότι η αντοχή στη κολιστίνη θα εξαπλωθεί περισσότερο όσο η χρήση των πολυμυξινών θα αυξάνεται (106).

viii) Ο ρόλος των ιντεγκρονίων.

Η οριζόντια μεταφορά των γονιδίων αντοχής είναι ένας επιτυχής μηχανισμός για τη μετάδοση και τη διασπορά της καταλυτικής πολυανθεκτικότητας στα φάρμακα ανάμεσα στα βακτηριακά παθογόνα. Τα ιντεγκρόνια τα οποία τοποθετούνται είτε στα βακτηριακά χρωμοσώματα ή στα πλασμίδια, αποτελούν μια πλατφόρμα συγκέντρωσης όπου συνεργάζονται με τα εξωγενή ORFs από την ειδική θέση ανασυνδυασμού και για την μετατροπή τους σε λειτουργικά γονίδια, εξασφαλίζοντας τη σωστή έκφρασή τους. Τα ιντεγκρόνια μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά π.χ. : ένα γονίδιο κωδικοποιεί μια ιντεγκράση, μια ειδική θέση ανασυνδυασμού που αναγνωρίζεται από την ιντεγκράση και μέσα στην οποία εισέρχονται οι κασέτες, και ένας οργανωτής που καθοδηγεί την μεταγραφή των κασετών κωδίκευσης των γονιδίων. Τελευταία έχουν αναγνωρισθεί τέσσερις τάξεις ιντεγκρονίων, η τάξη 1 των ιντεγκρονίων είναι η πιο κοινή στα βακτήρια (85).

Ο ρόλος των ιντεγκρονίων στην ανάπτυξη της πολυανθεκτικότητας βασίζεται στη μοναδική τους ικανότητα να συγκεντρώνονται σε ομάδες και να εκφράζουν γονίδια με αντοχή στα φάρμακα. Πολλές μελέτες θεωρούν τα ιντεγκρόνια ως καταφύγιο των διαφορετικών τύπων γονιδίων αντοχής που έχουν περιγραφεί παγκοσμίως τις τελευταίες δεκαετίες. Η τάξη 1 των

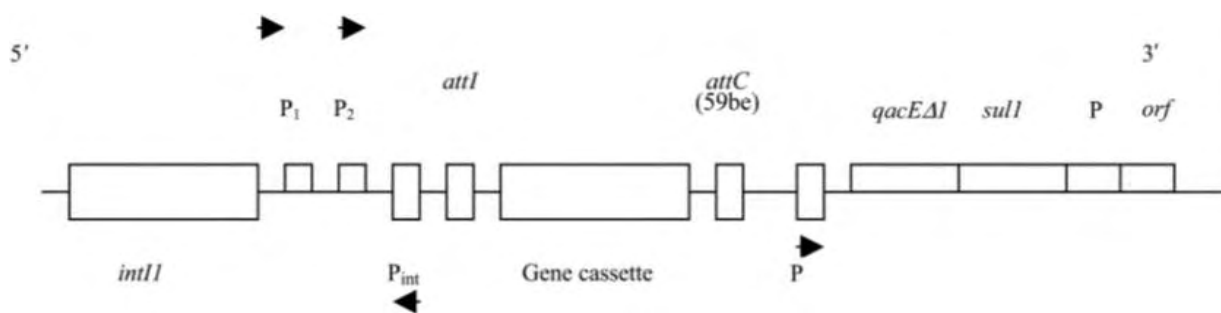
ιντεγκρονίων ανιχνεύθηκε στο 52,8% των στελεχών του βακτηρίου *A.baumannii* στην περιοχή Νατζίγκ της Κίνας το 2007, όπου μια επιδημία, με μεταφερόμενο-ιντεγκρόνιο τάξης 1 στον κλώνο του MDRAB βρέθηκε ότι εξαπλώθηκε στην Ταϊβάν την ίδια χρονιά. Τέσσερις διαφορετικές δομές ιντεγκρονίων ανιχνεύθηκαν στο 84% όλων των δειγμάτων των στελεχών του *A.baumannii* που συλλέχθηκαν σε μια Ισπανική μελέτη. Ωστόσο, καμία ξεκάθαρη διαφορά στο αντιβιογράμμα δεν μπορεί να συσχετισθεί με την παρουσία ή απουσία των δομών των ιντεγκρονίων όπως φάνηκε στην Ισπανική μελέτη, άλλες περιγραφές πρότειναν ότι τα ιντεγκρόνια παίζουν κύριο ρόλο στην αντοχή στην πολυανθικτικότητα στα φάρμακα του βακτηρίου *A.baumannii*. Επιπροσθέτως, τα επιδημικά στελέχη του *A.baumannii* βρέθηκαν να περιέχουν σημαντικά περισσότερα ιντεγκρόνια από τα μη-επιδημικά στελέχη. Έτσι, τα ιντεγκρόνια θεωρούνται χρήσιμοι δείκτες για τα επιδημικά είδη του βακτηρίου *A.baumannii*, και ο καθορισμός του είδους τους μπορεί να παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για τις επιδημιολογικές μελέτες (85).

Σε μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Ιταλία βρέθηκε ότι το 44% των επιδημιολογικά μη-σχετιζόμενων δειγμάτων στελεχών *A.baumannii* που συγκεντρώθηκαν σε μία περίοδο άνω των 11 χρόνων, ήταν θετικά στα ιντεγκρόνια. Τα περισσότερα στελέχη που είναι θετικά στα ιντεγκρόνια μεταφέρουν το ίδιο σύνολο σε κασέτες, παρά τη σημαντική γενετική τους ποικιλία που ταυτοποιήθηκε μέσω ανάλυσης ribotyping, υποδηλώνοντας την οριζόντια μεταφορά ολόκληρης της δομής του ιντεγκρονίου ή όπως προέκυψε από ένα αρχαίο απόκτημα. Ακόμη, ενώ το ίδιο ιντεγκρόνιο μπορεί να είναι παρόν σε μη σχετιζόμενα στελέχη, στα συγγενικά στελέχη μπορεί να έχουν διαφορετικά ιντεγκρόνια (85).

Αν και διαφορετικές σχέσεις υπάρχουν ανάμεσα στις ποικίλες τάξεις των αντιβιοτικών και των ιντεγκρονίων, οι περισσότερες μελέτες έδωσαν έμφαση στο συσχετισμό των ιντεγκρονίων με τα γονίδια κασέτας και την αντοχή στις αμινογλυκοσιδάσες. Η ποικιλία των γονιδίων που κωδικεύουν AMEs και η σχέση τους με τα ιντεγκρόνια 1ης τάξης παρατηρήθηκαν σε μία μελέτη που σχετίζεται με τρεις παν-Ευρωπαϊκούς κλώνους στελεχών του *A.baumannii*. Έξι διαφορετικά ιντεγκρόνια 1ης τάξης μεταβλητών περιοχών ανιχνεύθηκαν στο 74% των στελεχών που συλλέχθηκαν. Επιπλέον, οι Huang et al., συνέλεξαν 283 δείγματα MDRAB από τρία ιατρικά κέντρα στη Ταϊβάν, από το 1996 έως το 2004, και βρέθηκαν 7 τύποι γονιδιακών κασετών, τα περισσότερα από τα οποία περιείχαν AMEs, περιλαμβανομένων των : aacA4, aacC1, aa(6)-II, aadA1, aadA2, aadA4, και aadDA1 (85).

Τα μεταβλητά γονίδια CHDL, που περιλαμβάνουν τα : blaOXA-3, blaOXA-10, blaOXA-20, blaOXA-21 και blaOXA-37, έχουν περιγραφεί για τα ιντεγκρόνια. Επίσης έχουν καταγραφεί

τα ιντεγκρόνια που σχετίζονται με την αντοχή στην ιμιπενέμη του βακτηρίου *A.baumannii*. Τα γονίδια που κωδικεύουν καρβαπενεμάσες, όπως είναι τα MBLs με τα blaVIM, blaIMP και blaSIM βρέθηκαν στα ιντεγκρόνια. Τα ιντεγκρόνια που μεταφέρουν τα : blaVIM-1 και blaVIM-2 παρατηρήθηκαν στην Ελλάδα και στη Κορέα, αντιστοίχως. Στη Ταϊβάν, η εξάπλωση του γονιδίου από τη διαμεσολάβηση του ιντεγκρονίου παρουσιάστηκε σε νοσοκομεία, κυρίως σε μια μονάδα με υψηλή αντιβιοτική εκλεκτική πίεση. Το blaVIM-11 που μεταφέρει ιντεγκρόνια έχει επίσης ταυτοποιηθεί σε MDRAB δείγματα, και αυτό το γονίδιο MBL διατυπώθηκε ότι εξαπλώνεται ανάμεσα στα στελέχη της *Pseudomonas aeruginosa* και του *A.baumannii*. Άλλες περιγραφές των MBLs περιλάμβαναν τα : blaIMP-1, blaIMP-2, blaIMP-4, blaIMP-5, blaIMP-8, και blaSIM-1. Τα γονίδια για την αντοχή στη χλωραμφενικόλη των ιντεγκρονίων του βακτηρίου *A.baumannii* είναι τα : catB2, catB3 και catB8 (85).



Εικόνα 4 : Απλοποιημένη αναπαράσταση ενός ιντεγκρονίου τάξης 1. (BonomoandSzabo, 2006).

ix) Νησίδες ανθεκτικότητας.

Πέρα από τη μεγάλη διαφορετικότητα των μηχανισμών αντοχής που εμφανίζονται στα βακτηριακά δείγματα του *A.baumannii*, αυτός ο μικροοργανισμός είναι ικανός να συγκεντρώσει πολλαπλούς παράγοντες αντοχής σε περιοχές που έχουν καθοριστεί ως «νησίδες ανθεκτικότητας». Οι νησίδες ανθεκτικότητας είναι συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος που φιλοξενούνται σε μεγάλα συμπλέγματα ομάδων οριζόντια μεταφερόμενων τμημάτων DNA που περιλαμβάνουν μεγάλο αριθμό γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Τέτοιες περιοχές παρέχουν ασφάλεια στα κινητά στοιχεία εφόσον η εισαγωγή σε αυτήν την θέση είναι απίθανο να προκαλέσει βλάβη στο κύτταρο ξενιστή. Συχνά εισάγονται στην ίδια θέση του χρωμοσώματος του *A.baumannii* και συντίθενται από διακριτά γονίδια ή ομάδες γονιδίων τα οποία συνήθως σχετίζονται με κινητά στοιχεία (IS και Tn), με ιντεγκρόνια ή και με τα δύο (85).

Η πρώτη νησίδα ανθεκτικότητας που περιγράφηκε για το βακτήριο *A.baumannii* βρέθηκε σε πολυανθεκτικό στέλεχος AYE, στο οποίο τελικά αποδόθηκε ο όρος AbaR1. Η AbaR1 αποτελείται από μία περιοχή 86 kb που είναι ενσωματωμένη μέσα στο γονίδιο *comM* και περιέχει έως και 45 γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά και στα βαρέα μέταλλα. Μέχρι στιγμής έχουν περιγραφεί περισσότερες από 22 νησίδες αντοχής και μόνο με τρεις εξαιρέσεις όλες έχουν βρεθεί ότι εισέρχονται εντός του γονιδίου *comM* (85). Παρακάτω δίδεται ο πίνακας με τις 22 νησίδες αντοχής που έχουν περιγραφεί για το *A.baumannii* (Πίνακας 3).

AbaR-type	Size (kb)	Strain	European Clone lineage	<i>comM</i> Insertion	Reference
<i>AbaR1</i>	86	AYE	<i>I</i>	+	Fournier et al (2006)
<i>AbaR2</i>	17	ACICU	<i>II</i>	+	Iacono et al (2008)
<i>AbaR3</i>	63	AB0057	<i>I</i>	+	Adams et al (2008)
<i>AbaR4</i>	18	AB0057	<i>I</i>	-	Adams et al (2008)
<i>AbaR5</i>	56	3208	<i>I</i>	+	Post and Hall, (2009)
<i>AbaR6</i>	27	D2	<i>I</i>	+	Post et al (2010)
<i>AbaR7</i>	20	A92	<i>I</i>	+	Post et al (2010)
<i>AbaR8</i>	29	D13	<i>I</i>	+	
<i>AbaR9</i>	39	AB056	<i>I</i>	+	Adams et al (2010)
<i>AbaR10</i>	30	AB058	<i>I</i>	+	Adams et al (2010)
<i>AbaR11</i>	20	NIPH470	<i>I</i>	+	Krizova et al (2011)
<i>AbaR12</i>	38	LUH 6013	<i>I</i>	+	Krizova et al (2011)
<i>AbaR13</i>	45	LUH6015	<i>I</i>	+	Krizova et al (2011)
<i>AbaR14</i>	21	LUH5881	<i>I</i>	+	Krizova et al (2011)
<i>AbaR15</i>	55	LUH6125	<i>I</i>	+	Krizova et al (2011)
<i>AbaR16</i>	39	LUH7140	<i>I</i>	+	Krizova et al (2011)
<i>AbaR17</i>	58	LUH8592	<i>I</i>	+	Krizova et al (2011)
<i>AbaR18</i>	52	NIPH2713	<i>I</i>	+	Krizova et al (2011)
<i>AbaR19</i>	30	NIPH2554	<i>I</i>	+	Krizova et al (2011)
<i>AbaR21</i>	64	RUH875	<i>I</i>	+	Nigro et al (2011b)
<i>AbaR22</i>	39	MDR-ZJ06	<i>II</i>	+	Zhou et al (2011)
Δεν έχει προσδιοριστεί	Δεν έχει βρεθεί	A473	<i>I</i>	-	Rose (2010)
Δεν έχει προσδιοριστεί	Δεν έχει βρεθεί	A473	<i>I</i>	-	Rose (2010)

Πίνακας 3 : Νησίδες αντοχής που έχουν αναγνωρισθεί για το *A.baumannii*.

Ο συνδυασμός των αλληλουχιών παρεμβολής, των τρανσποζονίων, των ιντεγκρονίων, των πλασμιδίων σύζευξης και των νησίδων ανθεκτικότητας συνυπολογίζονται στην μεγάλη

γονιδιακή πλαστικότητα του *A.baumannii* και μερικώς εξηγείται η επιτυχής εμφάνιση αυτού του μικροοργανισμού ως φοβερού νοσοκομειακού παθογόνου. Πρόσφατες μελέτες που συνέκριναν τις αλληλουχίες ολόκληρου του γονιδιώματος των διαφόρων ειδών του *A.baumannii* επέδειξαν ένα μοναδικό γενετικό ρεπερτόριο σε όρους όπως των : IS, πλασμιδίων και AbaRs, ακόμα και για στελέχη του *A.baumannii* που ανήκουν στον ίδιο τύπο αλληλούχησης (ST) (85).

7.1. Θεραπευτική αντιμετώπιση.

Τα περισσότερα στελέχη του *A.baumannii* είναι ανθεκτικά σε αντιβιοτικά όπως η πενικιλίνη, η αμπικιλίνη, οι μακρολίδες, και οι δεύτερης- και τρίτης-γενιάς κεφαλοσπορίνες, η σιπροφλοξασίνη και η χλωραμφενικόλη. Λοιμώξεις, που προκαλούνται από τα στελέχη του *Acinetobacter* που είναι ευαίσθητα στα αντιβιοτικά, μπορούν να θεραπευθούν με ceftazidime, καρβαπενέμες, σουλβακτάμη, piperacillin/tazobactam, αμινογλυκοσίδες και κινολόνες (π.χ. levofloxacin/ciprofloxacin) ή cefepime, είτε χορηγούνται μόνα τους ή σε συνδυασμό. Θεραπευτική αγωγή μόνο με αμινογλυκοσίδες γενικά δεν συνιστώνται εξαιτίας των υψηλών επιπέδων αποτυχίας στις λοιμώξεις που προκαλούνται από *Pseudomonas aeruginosa* (56). Ωστόσο, το ποσοστό των λοιμώξεων που προκαλούνται από ανθεκτικά στελέχη *Acinetobacter* αυξάνεται και έχουν καταγραφεί εξάρσεις με στελέχη PDR (Pan-Drug Resistant) (134). Τα επίπεδα αντοχής του *Acinetobacter* στις αμινογλυκοσίδες και στο piperacillin/tazobactam είναι υψηλότερα στις Ασιατικές και Ευρωπαϊκές χώρες παρά στις Η.Π.Α. (47).

- Θεραπεία βασισμένη στη σουλβακτάμη.

Ένας αριθμός μελετών κατέγραψαν πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα προσβλέποντας στην αποτελεσματικότητα της σουλβακτάμης κατά των λοιμώξεων από στελέχη *A.baumannii*. Όντως σε περιπτώσεις όπου το *A.baumannii* παρουσιάζει ευαισθησία στη σουλβακτάμη τελικά αποτελεί και τη συνιστώμενη φαρμακευτική αγωγή (33,127). Για τις λοιμώξεις από *A.baumannii* που είναι ανθεκτικά στις καρβαπενέμες, η σουλβακτάμη είναι πιο αποτελεσματική από ότι οι πολυμυξίνες (99). Στις περισσότερες μελέτες η συνιστώμενη δοσολογία σουλβακτάμης είναι 8 με 9g ανά ημέρα σε πολλές δόσεις, υποθέτοντας ότι υπάρχει φυσιολογική νεφρική λειτουργία (17,99). Η σουλβακτάμη συνήθως παράγεται ως συστατικό με την αμπικιλίνη με προκαθορισμένο λόγο 2:1. Αν και η σουλβακτάμη φαίνεται να είναι αποτελεσματική κατά των λοιμώξεων από στελέχη *A.baumannii* που παρουσιάζουν αντοχή στις καρβαπενέμες, όμως έχει απομονωθεί ένας μεγάλος αριθμός στελεχών που έχουν αντοχή στη σουλβακτάμη. Μια

πρόσφατη μελέτη στη Ταϊβάν παρουσίασε ότι το 70% των κλινικών δειγμάτων ήταν ανθεκτικά στη σουλβακτάμη (139).

- Θεραπεία βασισμένη στην τιγκεκυκλίνη.

Το 2004, καταγράφηκε ότι η τιγκεκυκλίνη έχει καλή *in vitro* βακτηριοστατική επίδραση κατά του *A.baumannii*, συμπεριλαμβανομένων των στελεχών που είναι ανθεκτικά στην μιπενέμη. Άλλη μία *in vitro* μελέτη που χρησιμοποίησε τη δοκιμασία χρόνου θανάτωσης, έδειξε τον πιθανό ρόλο της τιγκεκυκλίνης στη θεραπεία του βακτηρίου *A.baumannii* και προτάθηκε ότι η doxycycline μπορεί να είναι κατάλληλη επιλογή θεραπείας σε ορισμένες περιπτώσεις και είναι επίσης και οικονομικά αποδοτική. Η αποτελεσματικότητα της τιγκεκυκλίνης φάνηκε ότι συσχετίζεται με την καμπύλη της MIC της ελεύθερης συγκέντρωσης-με το χρόνο σε ένα μοντέλο ποντικού που νοσεί από *Acinetobacter spp.* Επιπροσθέτως, αρκετές περιπτώσεις συνδέονται με σοβαρές λοιμώξεις από MDRAB οι οποίες είχαν θεραπευθεί επιτυχώς με τη χρήση τιγκεκυκλίνης από την πλευρά των κλινικών και μικροβιολογικών αποτελεσμάτων (85).

Η τιγκεκυκλίνη ήταν λιγότερο δραστική από την μιπενέμη στη θεραπεία της πνευμονίας, που έχει προκληθεί από μη-IRAB στελέχη σε ένα μοντέλο πνευμονίας σε ποντικό. Σε μια μελέτη που αποτελούνταν από 34 ασθενείς με MDRAB λοιμώξεις, τα επίπεδα θνησιμότητάς τους έφτασαν μέχρι και 41%. Στην παραπάνω μελέτη βρέθηκε ότι η συσχέτιση των κλινικών και μικροβιολογικών αποτελεσμάτων ήταν ελλιπή και συμέραναν ότι η τιγκεκυκλίνη είχε άριστη *in vitro* κινητικότητα κατά του MDRAB, αλλά η κλινική του αποτελεσματικότητα ήταν ακόμα αβέβαιη. Μία από τις πιθανές αιτίες για την ασυμφωνία των αποτελεσμάτων της θεραπείας μπορεί να οφείλεται στα ποικίλα MICs της τιγκεκυκλίνης. Ο καθορισμός του MIC της τιγκεκυκλίνης πριν τη θεραπεία, μαζί με τη μέθοδο της αραίωσης σε ζωμό έχουν προτιμηθεί έτσι ώστε να αυξήσουν την κλινική επιτυχία. Τα δείγματα του βακτηρίου *A.baumannii* που έχουν MICs τιγκεκυκλίνης $\geq 2\text{mg/L}$ σχετίζονται με τα υψηλά επίπεδα θνησιμότητας. έτσι, η θεραπεία με β-λακταμάσες ή καρβαπενέμες προτιμώνται έναντι της τιγκεκυκλίνης. Αυτή η κίνηση υποστηρίχθηκε περισσότερο από μία ομάδα μελέτης στη Ταϊβάν όπου ασχολήθηκε με την αποτελεσματικότητα της θεραπείας που βασίζεται στην τιγκεκυκλίνη έναντι αυτής που βασίζεται στην κολιστίνη για την αντιμετώπιση της πνευμονίας που προκλήθηκε από το MDRAB. Τα επιπλέον επίπεδα θνησιμότητας του 16,7% στην ομάδα της τιγκεκυκλίνης σε σύγκριση με την ομάδα της κολιστίνης έχουν αποδοθεί κυρίως σε υποκειμένα με MIC $> 2\mu\text{g/mL}$ (85).

Σε μια μετα-ανάλυση της αποτελεσματικότητας και της ασφαλούς χρήσης της τιγκεκυκλίνης, η κλινική αποτυχία, η πολλαπλή λοίμωξη και τα δυσμενή γεγονότα έγιναν πιο συχνά με την χρήση της τιγκεκυκλίνης. Οι συγγραφείς πρότειναν στους θεράποντες ιατρούς να αποφεύγουν την χορήγηση μόνο της τιγκεκυκλίνης για την θεραπεία σοβαρών λοιμώξεων που προκλήθηκαν από MDRAB στελέχη και ότι θα έπρεπε να την χρησιμοποιούν ως αντιβιοτικό έκτακτης ανάγκης. Δεν αναπτύχθηκε κανένας ανταγωνισμός όταν χρησιμοποιήθηκε η τιγκεκυκλίνη σε συνδυασμό με άλλα αντιβιοτικά που είναι δραστικά κατά των Gram-αρνητικών βακτηρίων. Ωστόσο, η θεραπεία που βασίζεται στην τιγκεκυκλίνη για τις λοιμώξεις από MDRAB δεν είναι ικανοποιητική. Σε μία έρευνα 266 ασθενών με ιατροφαρμακευτική περίθαλψη που σχετίζεται με λοιμώξεις από MDRAB, το επίπεδο θνησιμότητας δεν ήταν σημαντικά διαφορετικό ανάμεσα σε εκείνους που λάμβαναν θεραπεία με τιγκεκυκλίνη και σε εκείνους που δεν λάμβαναν (85).

Εφόσον η τιγκεκυκλίνη έχει ένα εκτεταμένο φάσμα αντιμικροβιακής δραστηριότητας και μια συνεργειακή επίδραση με κάποιες τάξεις αντιβιοτικών, όπως είναι η αμικασίνη, προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι το βακτήριο του *A.baumannii* εμφάνισε αντοχή στη τιγκεκυκλίνη και σχετίζεται με τα συστήματα εκροής φαρμάκων, κυρίως με την υπερέκφραση της αντλίας *adeABC*. Η αυξημένη έκφραση του οπερονίου *adeABC* μπορεί να βρεθεί σε κλινικά δείγματα του *A.baumannii* μετά από θεραπεία με τιγκεκυκλίνη. Τα υψηλά επίπεδα αντοχής και τα υψηλά MICs της τιγκεκυκλίνης των πολλαπλών κλώνων του MDRAB καταγράφηκαν σε ένα ιατρικό κέντρο στο Ισραήλ. Αυτό το φαινόμενο οδήγησε σε ανησυχία σχετικά με την χρήση της τιγκεκυκλίνης ως μία από τις λίγες επιλογές θεραπείας για λοιμώξεις που προκλήθηκαν από MDRAB (85).

- Θεραπεία βασισμένη στην κολιστίνη.

Η κολιστίνη έχει καταγραφεί ως θεραπεία τελευταίας εκλογής για το MDRAB, και αυτό το φάρμακο συχνά χρησιμοποιείται σε συνδυαστική θεραπεία. Σε μία αναφορά της κλωνικής εξάπλωσης του MDRAB στην ανατολική Ταϊβάν, ο έλεγχος ευαισθησίας των αντιβιοτικών έδειξε ότι τα στελέχη του MDRAB ήταν κατά 10,4%, 47,8% και 45,5% ανθεκτικά στη κολιστίνη, στη ριφαμπικίνη και τιγκεκυκλίνη αντίστοιχα, το οποίο συνεπάγεται ότι η κολιστίνη ήταν ο μόνος αντιμικροβιακός παράγοντας που μπορούσε να χορηγηθεί για τη θεραπεία των MDRAB στην περιοχή αυτή. Επιπλέον, στην ενδοφλέβια χρήση της για τις λοιμώξεις από MDRAB, η κολιστίνη μπορεί να χορηγηθεί μέσω ενδοκοιλιακών και ενδοραχιαίων οδών για τη μηνιγγίτιδα και μέσω νεφελοποιητή για την πνευμονία (85).

Δυστυχώς, τα στελέχη *A.baumannii* με αντοχή στη κολιστίνη έχουν περιγραφεί σε όλο τον κόσμο το οποίο αποδόθηκε στην απώλεια του λιποπολυσακχαριδίου ή/και της φωσφοαιθανολαμίνης στη μετατροπή του λιπιδίου A με τη μεσολάβηση του συστήματος των δύο-συστατικών του *pmrAB*. Επειδή η θεραπεία μόνο με κολιστίνη δεν είναι ικανή να περιορίσει την εμφάνιση της αντοχής, η συνδυαστική θεραπεία που βασίζεται στην κολιστίνη μπορεί να είναι η βέλτιστη στρατηγική. Ο συνδυασμός της κολιστίνης με διαφορετικές τάξεις αντιβιοτικών, περιλαμβανομένου των : τιγκεκυκλίνης, cefoperazone/sulbactam ή piperacillin/tazobactam, αποκάλυψε συνεργειακές επιδράσεις σε κάποια στελέχη CRAB. Οι δοκιμασίες χρόνου θανάτωσης έδειξαν ότι τα κολιστίνη/μεροπενέμη, κολιστίνη/ριφαμπικίνη και κολιστίνη/μινοκυκλίνη είναι συνεργειακές *in vitro* κατά των στελεχών XDRAB. Με την εφαρμογή συνδυαστικής θεραπείας, που περιλαμβάνει κολιστίνη/καρβαπενέμη και κολιστίνη/σουλβακτάμη, για λοιμώξεις XDRAB στην κυκλοφορία του αίματος οδήγησαν σε υψηλότερη αντιμικροβιακή εξολόθρευση και χαμηλότερα επίπεδα θνησιμότητας σε σύγκριση με την θεραπεία μόνο με κολιστίνη. Η συνδυαστική θεραπεία της κολιστίνης και της τιγκεκυκλίνης έχει προταθεί ως μια εύλογη επιλογή θεραπείας για την πνευμονία από XDRAB, και συγκριμένα στις πρώτες 48 ώρες, το οποίο εφαρμόστηκε σε ένα μοντέλο πνεύμονα ποντικού. Ενδιαφέρον παρουσίασε, η σημαντική συνεργειακότητα που παρατηρήθηκε στον συνδυασμό της κολιστίνης με την τεϊκοπλανίνη κατά του MDRAB *in vitro* (85).

- Άλλες αντιμικροβιακές θεραπείες.

Η ντοριπενέμη είναι μια καινούργια ευρέως φάσματος καρβαπενέμη, που έχει παρουσιάσει *in vitro* συνεργειακή δραστηριότητα με την τιγκεκυκλίνη, την κολιστίνη και την αμικασίνη κατά των στελεχών MDRAB που εμφάνισαν αντοχή στη ντοριπενέμη. Μία πρόσφατη Ισπανική μελέτη δεν υποστηρίζει τον συσχετισμό της συνδυαστικής θεραπείας με την μειωμένη θνησιμότητα στις MDRAB λοιμώξεις. Παρόλ'αυτά η επιλογή της συνδυαστικής θεραπείας θα πρέπει να λάβει υπόψιν πολλούς σημαντικούς παράγοντες όπως είναι ο φαινότυπος της αντιμικροβιακής αντοχής, οι μηχανισμοί αντοχής και τα MICs (85).

7.2. Αντοχή στα αντιβιοτικά.

Η υπεροχή της προέλευσης συγκεκριμένων στελεχών του *A.baumannii* σχετίζεται με το φαινότυπο MDR των μολυσματικών στελεχών (40). Ωστόσο, δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο εάν συγκεκριμένα επιδημικά στελέχη απέκτησαν τον φαινότυπο MDR ή εάν ο φαινότυπος MDR

είναι απαραίτητος στα μεμονωμένα στελέχη για να γίνουν επιδημικά. Η αντιμικροβιακή αντοχή του βακτηρίου *A.baumannii* έχει σταδιακά αυξηθεί από το 1970, όπου την συγκεκριμένη περίοδο η πλειονότητα των στελεχών ήταν ευαίσθητα στα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά. Από το 2007, το 70% των στελεχών από συγκεκριμένο περιβάλλον ήταν MDR (εξαρτώνται από : την περιοχή, το νοσοκομείο, το ιατρικό τμήμα και το κλινικό δείγμα), και συμπεριλαμβάνουν την αντοχή στις καρβαπενέμες, οι οποίες κάποτε θεωρούνταν κατάλληλες για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων MDR στελεχών του *A.baumannii* (71). Δεν προκαλεί έκπληξη, ότι η αντοχή στις καρβαπενέμες παρατηρήθηκε σε δείγματα από στρατιωτικές όπως επίσης και από πολιτικές εγκαταστάσεις (70,95).

Προς το παρόν, η κολιστίνη μοιάζει να είναι το πιο αποτελεσματικό φάρμακο *in vitro* κατά των MDR στελεχών του *A.baumannii*, αλλά η χρήση της κολιστίνης έχει συσχετισθεί με έναν αριθμό παρενεργειών και γι'αυτό δεν θεωρείται ιδανική για την θεραπεία όλων των τύπων των λοιμώξεων (49). Υπάρχουν επίσης αναφορές παγκοσμίως για την αντοχή στη κολιστίνη (25), με αυτό τον τρόπο αναδεικνύονται τα στελέχη που είναι ανθεκτικά σε όλα τα γνωστά αντιβιοτικά κατά γεωγραφική περιοχή (7).

Συνολικά, το βακτήριο *A.baumannii* απέκτησε αντοχή σε ένα ευρύ φάσμα αντιβιοτικών τις τελευταίες δεκαετίες. Αυτή η ικανότητα μερικώς οφείλεται στην ιδιότητα αυτού του βακτηριδίου να αποκτά ανθεκτικά γονίδια, συχνά μέσω οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς (8). Πρόσφατες μελέτες ισχυρίζονται ότι η εμφάνιση του MDR φαινοτύπου είναι καθοριστικός παράγοντας για την επικράτηση του *A.baumannii* ως νοσοκομειακού παθογόνου (59).

8. Πολυμυξίνες – Κολιστίνη.

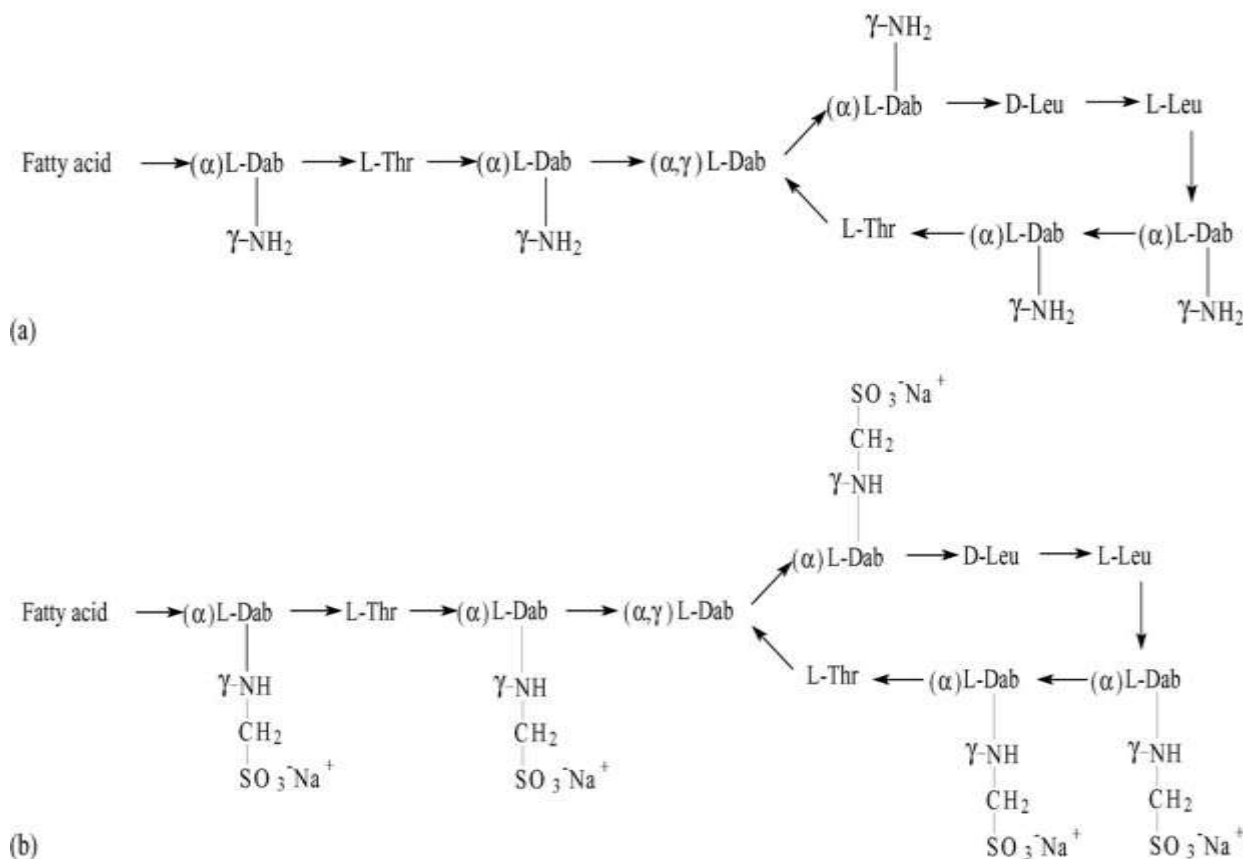
i) Ανακάλυψη της κολιστίνης και πρόωμη κλινική χρήση.

Η κολιστίνη ανακαλύφθηκε το 1949, ως προϊόν σύνθεσης από το στέλεχος *Bacillus polymyxa*, το υποείδος *colistinus* (75,76). Τη δεκαετία του '50 χρησιμοποιήθηκε θεραπευτικά τόσο στην Ιαπωνία και στην Ευρώπη όσο και στην Αμερική υπό τη μορφή της νατριούχου κολιστιμεθάτης (colistimethatesodium, CMS) (116). Ωστόσο, οι ενδοφλέβιες μορφές της κολιστίνης και της πολυμυξίνης Β εγκαταλείφθηκαν σταδιακά στα περισσότερα μέρη του κόσμου, στις αρχές της δεκαετίας του 1980, λόγω της αναφερόμενης αυξημένης συχνότητας εμφάνισης νεφροτοξικότητας (23,73,121). Έτσι, η ενδοφλέβια χρήση της κολιστίνης περιορίστηκε, κυρίως τις τελευταίες δύο δεκαετίες, στη θεραπεία ασθενών με κυστική ίνωση που έπασχαν από λοιμώξεις του αναπνευστικού λόγω πολυανθεκτικών Gram-αρνητικών βακτηρίων (37,38,78).

Τελευταία, η εμφάνιση των πολυανθεκτικών στα φάρμακα *Pseudomonas aeruginosa* και *Acinetobacter spp.* σε πολλά έθνη με επιδημικές διαστάσεις ήταν αναγκαία η επανεξέταση των θεραπειών με πολυμυξίνη με τον επακόλουθο ακριβή έλεγχο της ευαισθησίας με μεθόδους αναφοράς και τυποποίησης (65).

ii) Χημική δομή.

Η κολιστίνη αποτελείται από ένα κατιονικό κυκλικό δεκαπεπτίδιο που συνδέεται με μια αλυσίδα λιπαρών οξέων (69). Το μοριακό της βάρος είναι 1750 Dalton. Τα αμινοξέα που περιλαμβάνονται στο μόριο της κολιστίνης είναι η D-λευκίνη, η L-θρεονίνη και το L-α-γ-διαμινοβουτυρικό οξύ. Το τελευταίο είναι συνδεδεμένο με την αλυσίδα των λιπαρών οξέων, η οποία έχει αναγνωρισθεί ως το 6-μεθυλ-οκτανοϊκό οξύ (κολιστίνη A) ή το 6-μεθυλ-επτανοϊκό οξύ (κολιστίνη B) (128). Διαφορετικά φαρμακευτικά σκευάσματα κολιστίνης μπορεί να περιέχουν ποικίλα ποσά αυτών των δύο στοιχείων (κολιστίνη A ή B) (39,100).



Εικόνα 4 : α) η δομή της κολιστίνης A και B, β) δομή της νατριούχου κολιστίνης A και B μεθανοσουλφονικής. (LiJ. et al., 2005).

Δύο μορφές κολιστίνης είναι εμπορικά διαθέσιμες, το θειϊκό άλας της κολιστίνης (colistinsulfate, CS) και η νατριούχος κολιστιμεθάτη (colistimethatesodium, CMS). Η CMS είναι λιγότερο ισχυρή αλλά και λιγότερο τοξική σε σύγκριση με το CS. Παράγεται από την αντίδραση της κολιστίνης με τη φορμαλδεΐδη και θειώδες νάτριο (11,18). Το CS χορηγείται από το στόμα (υπό τη μορφή δισκίων ή σιροπιού) για την προεγχειρητική αποστείρωση του εντέρου και τοπικά ως σκόνη για τη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων του δέρματος. Η CMS είναι διαθέσιμη σε παρεντερική μορφή και μπορεί να χορηγηθεί ενδοφλεβίως, ενδομυϊκώς ή σε νεφελοποιημένη μορφή (45).

iii) Μηχανισμός δράσης.

Οι περισσότερες έρευνες για τον μηχανισμό της αντιμικροβιακής δράσης των πολυμυξινών διεξήχθησαν με τη πολυμυξίνη Β, η οποία θεωρείται σύνθετο μοντέλο των πολυμυξινών. Η κολιστίνη, που έχει όμοια δομή με τη πολυμυξίνη Β, πιστεύεται ότι παρουσιάζει και πανομοιότυπο μηχανισμό δράσης (128). Η πολυμυξίνη Β αλληλεπιδρά ηλεκτροστατικά με την εξωτερική μεμβράνη των Gram-αρνητικών βακτηρίων και αντικαθιστά ανταγωνιστικά δισθενή κατιόντα (όπως το ασβέστιο και το μαγνήσιο) στις αρνητικά φορτισμένες φωσφατιδικές ομάδες των μεμβρανικών λιπιδίων (42). Ο δεσμός της πολυμυξίνης Β και της κολιστίνης στις μεμβράνες μπορεί να ανταγωνιστεί τις υψηλές συγκεντρώσεις των δισθενών κατιόντων (31,122). Η προσθήκη των πολυμυξινών διασπά την εξωτερική μεμβράνη και απελευθερώνεται το λιποπολυσακχαρίδιο (107). Τα αποτελέσματα του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου απέδειξαν ότι η κυστική μεμβράνη αναδύεται από την επιφάνεια των Gram-αρνητικών βακτηρίων με την παρουσία της πολυμυξίνης Β (74,86). Οι Hancock και Chapple παρουσίασαν ένα δικής τους επινόησης μοντέλο για να εξηγήσουν τον λεπτομερή αντιμικροβιακό μηχανισμό των κατιονικών πεπτιδίων (88). Άλλο ένα χαρακτηριστικό της κολιστίνης, το οποίο πιθανόν είναι ωφέλιμο, είναι η μοναδική του ενδοτοξική δραστηριότητα, που είναι ικανή να εξουδετερώσει τα βακτηριακά λιποπολυσακχαρίδια (44,51,52). In vitro παρατηρήθηκε ότι η κολιστίνη σχημάτιζε μονές στρώσεις με φωσφολιπίδια και συνυπήρχε σε ανάμικτα μικκύλια (137).

iv) Αντιμικροβιακό φάσμα.

Η κολιστίνη έχει άριστη βακτηριοκτόνο δράση έναντι αρκετών Gram-αρνητικών αερόβιων βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένου των στελεχών *Acinetobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Escherichia coli*, *Yersinia*

pseudotuberculosis, *Morganella morganii* και *Haemophilus influenza*. Επιπρόσθετα, έχει αποδειχθεί ότι διαθέτει σημαντική in vitro δραστηριότητα έναντι στελεχών *Stenotrophomonas maltophilia* (83-88% των απομονωθέντων στελεχών ήταν ευαίσθητα στην κολιστίνη όπως φάνηκε σε δύο πρόσφατες μελέτες) (50,57,97). Επίσης έχει περιγραφεί ότι η κολιστίνη είναι δυναμικά ενεργή in vitro έναντι διαφόρων ειδών μυκοβακτηριδίων, όπως είναι το *Mycobacterium tuberculosis*, το *Mycobacterium intracellulare*, το *Mycobacterium xenopi*, το *Mycobacterium fortuitum*, το *Mycobacterium phlei* και το *Mycobacterium smegmatis* (113,114,115).

Εντούτοις, στελέχη όπως είναι τα : *Proteus*, *Providencia*, *Serratia*, *Edwardsiella*, *Brucella* και *Burkholderia cepacia* εμφανίζουν ενδογενή αντοχή στη κολιστίνη. Επίσης, η κολιστίνη δεν είναι δραστική έναντι των Gram-αρνητικών και θετικών αερόβιων κόκκων, των Gram-θετικών αερόβιων βακτηρίων, όλων των αναερόβιων μικροβίων, των μυκήτων και των παρασίτων (28,128).

v) Μηχανισμοί αντοχής.

Τα βακτήρια χρησιμοποιούν αρκετά μέσα για να προστατευτούν από δυσμενή περιβαλλοντικά ερεθίσματα, που περιλαμβάνουν την έκθεση σε κατιοντικά αντιμικροβιακά πεπτίδια, όπως είναι η πολυμυξίνη Β και η κολιστίνη. Αυτές οι στρατηγικές συμπεριλαμβάνουν αλλαγές των λιποπολυσακχαριδίων τους (LPSs), τα οποία συνολικά έχουν αρνητικά φορτία και είναι οι αρχικοί στόχοι των πολυμυξινών (94).

Η ενεργοποίηση των συστημάτων δύο-συστατικών (TCSs), με τη συμμετοχή των PhoP/PhoQ και PmrA/PmrB, προκαλείται από περιβαλλοντικά ερεθίσματα και συγκεκριμένες μεταλλάξεις μέσα στα TCSs που καταλήγουν στη βασική τους ενεργοποίηση και στην επακόλουθη υπερέκφραση των γονιδίων του τροποποιημένου-LPS. Η ενεργοποίηση του PmrA/PmrB TCS οδηγεί στην αυξορρύθμιση του pmrCAB και του οπερονίου arnBCADTEF-pmrE (που επίσης ονομάζεται και pmrHFIJKLM-ugd) όπου μεσολαβούν στη σύνθεση και μεταφορά των PEtN και L-Ara4N, αντίστοιχα, στο λιπίδιο A (98).

Δύο βασικοί μηχανισμοί που παρέχουν αντοχή στη κολιστίνη έχουν περιγραφεί για το *A.baumannii* μέχρι σήμερα. Ο πρώτος είναι η τροποποίηση του μισού λιπιδίου A του LPS με το PEtN ως αποτέλεσμα των μεταλλάξεων στο pmrA/pmrBTCS. Ο δεύτερος μηχανισμός είναι η ολοκληρωτική απώλεια των LPSs που προκλήθηκαν είτε από μεταλλάξεις είτε την εισαγωγή απενεργοποιημένου λιπιδίου A στη βιοσύνθεση των γονιδίων (110).

Οι *Moffatt et al.* και οι *Henry et al* περιέγραψαν την υπόθεση απώλειας του LPS που οδηγεί στην αντοχή στη πολυμυξίνη (54,94,95). Αρχικά, ανακάλυψαν την αδρανοποίηση του λιπιδίου A που βιοσυνθέτει γονίδια – τα *lpxA*, *lpxC* ή *lpxD* – όπου καταλήγουν στην ολοκληρωτική απώλεια της παραγωγής του LPS στο βακτήριο *A.baumannii*. Τα στελέχη που έχασαν το LPS ελέγχθηκαν εάν παρουσιάζουν αντοχή στη κολιστίνη. Επιπλέον, βρήκαν την προσθήκη της αλληλουχίας ISAbal1 είτε στο *lpxA* ή στο *lpxC*, που έχει ως αποτέλεσμα την ολοκληρωτική απώλεια της παραγωγής του LPS και την υψηλή αντοχή στην κολιστίνη. Ως απόκριση στην ολική απώλεια του LPS, το βακτήριο *A.baumannii* αλλάζει την έκφραση των συστημάτων έκφρασης και μεταφοράς που σχετίζονται με τη διαμόρφωση της σύνθεσης και της δομής της βακτηριακής επιφάνειας. Ένα στέλεχος το οποίο έχει ανεπαρκές LPS, είναι ανθεκτικό στη κολιστίνη και έχει ένα λιγότερο αρνητικό φορτίο μπορεί αυτός να είναι και ο λόγος για την απώλεια προτίμησης της κολιστίνης (25).

Πρόσφατες αναλύσεις στελεχών *A.baumannii* που είναι ανθεκτικά στην πολυμυξίνη B έδειξαν την παρουσία καινούργιων μεταλλάξεων στα γονίδια *lpxC* και *lpxD*, επιπλέον στις μεταλλάξεις βρέθηκε ότι το γονίδιο *lpsB* κωδικεύει γλυκοσυλτρανσφεράση (η οποία σχετίζεται με τη σύνθεση του πυρήνα του LPS) το οποίο επίσης εμπλέκεται στην αντοχή στην κολιστίνη του βακτηρίου *A.baumannii*. Επειδή το λιπίδιο A είναι ο αρχικός στόχος της κολιστίνης, η απουσία του καταλήγει στην απώλεια της περιοχής-στόχου της κολιστίνης και την εμφάνιση των υψηλών επιπέδων της ανθεκτικότητας του βακτηρίου *A.baumannii* (98).

Οι *Adams et al.* πρώτοι περιέγραψαν το σύστημα δύο συστατικών του *PmrAB* το 2009. Με τη σύγκριση των αλληλουχιών DNA που κωδικεύουν τα *PmrA* και *PmrB* ανάμεσα στα στελέχη που είναι ανθεκτικά και ευαίσθητα στη κολιστίνη, φάνηκε ότι οι μεταλλάξεις στα γονίδια *PmrA* και *PmrB* συνδέονται με την αντοχή στη κολιστίνη του βακτηρίου *A.baumannii* (6). Οι *Park et al.* επίσης διερεύνησαν τη σχέση των *PmrA* και *PmrB* με την αντοχή στη κολιστίνη. Ωστόσο, τα αποτελέσματά τους υποδεικνύουν ότι η αυξημένη έκφραση του συστήματος *PmrAB* είναι παρούσα στην αντοχή στην κολιστίνη του βακτηρίου *A.baumannii*, αλλά οι μετατροπές του αμινικού οξέος μπορεί να μην είναι αναγκαίες για την ανθεκτικότητα (102). Οι πιο πρόσφατες έρευνες έδειξαν αποτελέσματα εις βάθος. Με την ανάλυση του *PmrCAB* σε μια ποικίλη συλλογή κλινικών δειγμάτων και εργαστηριακών μεταλλαγμένων στελεχών *A.baumannii*, έδειξαν ότι η αντοχή στη κολιστίνη απαιτεί τουλάχιστον δύο ξεχωριστά γενετικά γεγονότα : **i)** τουλάχιστον ένα αμινικό οξύ να αλλάζει στο *PmrB*, και **ii)** την υπερρύθμιση της έκφρασης των *PmrA* και *PmrB*. Το πιο σημαντικό μετά την ανάλυση της σύνθεσης του λιπιδίου A από τα ανθεκτικά και ευαίσθητα δείγματα, βρέθηκε ότι είναι η προσθήκη της φωσφοαιθανολαμίνης στο επτά-ακυλιωμένο λιπίδιο A. Αυτού του τύπου η

μετατροπή του LPS μπορεί να οδηγήσει απευθείας στην αντοχή στη κολιστίνη, αυτή η αλλαγή έχει περιγραφεί προηγουμένως ότι σχετίζεται με την αντοχή της *Salmonella* στις πολυμυξίνες (25).

Η αντοχή στη κολιστίνη του βακτηρίου *A.baumannii* μπορεί ανεξάρτητα να παρουσιαστεί και σε ευαίσθητα στελέχη, και σε μερικά στελέχη που έχουν την τάση να γίνουν ανθεκτικά. Σε μερικές περιπτώσεις, το βακτήριο *A.baumannii* κατέχει ένα βοηθητικό γονίδιο τύπου-*pmrC* (που ονομάζεται *ertA*), και μερικά στελέχη μπορεί να έχουν περισσότερα από ένα αντίγραφα αυτού του γονιδίου. Αποδείχθηκε ότι η έκφραση αυτού του γονιδίου τύπου-*pmrC* αυξάνεται αισθητά στα στελέχη που είναι ανθεκτικά στη κολιστίνη. Είναι ενδιαφέρον επίσης ότι αυτό το γονίδιο βρέθηκε να είναι τοποθετημένο κοντά σε κινητά στοιχεία (προφάγος ή ιντεγκράση), δείχνοντας έτσι την πιθανότητα της οριζόντιας μεταφοράς. Ο ρόλος αυτής της φωσφοαιθανολαμίνης του γονιδίου κωδίκευσης της τρανσφεράσης που βρίσκεται στο βακτήριο *A.baumannii* που είναι ανθεκτικό στη κολιστίνη είναι ακόμη άγνωστος (98).

vi) Φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες της κολιστίνης.

Τα δεδομένα που σχετίζονται με τις φαρμακοκινητικές και τις φαρμακοδυναμικές ιδιότητες της κολιστίνης περιγράφηκαν σε παλαιότερες μελέτες που χρησιμοποίησαν κυρίως μικροβιολογικές μεθόδους για τις μετρήσεις των συγκεντρώσεων του φαρμάκου και των παραγώγων του. Αυτές οι μέθοδοι είχαν έλλειψη ικανότητας να διαφοροποιούν τη νατριούχο κολιστιμεθάτη από την κολιστίνη. Επιπλέον, ένα σημαντικό τμήμα των φαρμακοκινητικών και φαρμακοδυναμικών μελετών έγιναν σε ασθενείς με κυστική ίνωση. Επίσης, η προπαρασκευή της κολιστίνης από διάφορους κατασκευαστές ή ακόμα και σε διαφορετικές παρτίδες του ίδιου κατασκευαστή μπορεί να περιέχουν διαφορετικές ποσότητες της κολιστίνης A και B (45).

Οι HCS και CMS δεν απορροφώνται από το γαστρεντερικό σύστημα μετά από λήψη από το στόμα. Σε υδατικά διαλύματα, η CMS υδρολύεται σε κολιστίνη και σε άλλα παράγωγα (92). Υπό διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και χρόνου, διαφορετικό ποσοστό CMS υδρολύεται σε κολιστίνη. Σε μια πρόσφατη *in vitro* μελέτη, σε ποσοστό 31,2% της CMS υδρολύθηκε σε κολιστίνη στον ανθρώπινο ορό σε 4 ώρες και σε θερμοκρασία 37°C (81).

Πρωταρχική οδός απέκκρισης της CMS είναι ο νεφρός μέσω της σπειραματικής διήθησης, ενώ η οδός απέκκρισης της υδρολυόμενης κολιστίνης δεν έχει περιγραφεί πλήρως (82,83). Επίσης, δεν έχει περιγραφεί η χολική απέκκριση του φαρμάκου. Σε ασθενείς με διαταραχή της νεφρικής λειτουργίας, η απέκκριση της CMS από τους νεφρούς πιθανόν να

μειώνεται, με αποτέλεσμα μεγαλύτερο ποσοστό της χορηγούμενης δόσης CMS να υδρολύεται σε κολιστίνη. Αυτό εξηγεί την ανάγκη τροποποίησης της δοσολογίας του φαρμάκου σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια που δεν υποβάλλονται σε θεραπεία υποκατάστασης (35,36).

Οι πληροφορίες της διαθέσιμης βιβλιογραφίας σχετικά με τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες του CS και του CMS στις επιμέρους εστίες λοίμωξης, μετά από ενδοφλέβια χορήγηση, είναι σχετικά ελλιπείς. Σύμφωνα με παλαιότερες μελέτες, η διείσδυση των φαρμάκων αυτών είναι περιορισμένη στην υπεζωκοτική κοιλότητα, στο πνευμονικό παρέγχυμα, στα οστά και στον εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Σε μια πρόσφατα δημοσιευμένη περίπτωση ενός ασθενούς που έπασχε από μηνιγγίτιδα από MDR στέλεχος *A.baumannii*, του χορηγήθηκε ενδοφλέβια 1 εκατομμύριο (IU) CMS κάθε 6 ώρες και είχε ως αποτέλεσμα την ίασή του. Η συγκέντρωση της CMS στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό βρέθηκε να είναι ίση με το 25% της συγκέντρωσης του ορού (63).

Σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς με πολυοργανική ανεπάρκεια και σοβαρές λοιμώξεις λόγω MDR μικροοργανισμών, οι θεραπευτικές επιλογές είναι ιδιαίτερα περιορισμένες. Η κολιστίνη παραμένει 'επιλογή τελευταίας γραμμής' για αυτούς τους ασθενείς. Πρόσφατα στοιχεία έχουν δείξει ότι η φαρμακοκινητική της CMS σε βαριά ασθενείς διαφέρει από αυτή που έχει περιγραφεί στο παρελθόν σε ασθενείς με κυστική ίνωση (96). Αν και ο χρόνος ημίσειας ζωής της κολιστίνης σε ασθενείς με κυστική ίνωση έχει βρεθεί ότι είναι περίπου 4 ώρες, σε βαριά ασθενείς είναι μεγαλύτερος (περίπου 14,4 ώρες) και ο ρυθμός σχηματισμού κολιστίνης από CMS είναι διαφορετικός από αυτόν που έχει περιγραφεί σε προηγούμενες μελέτες (109). Επιπλέον, σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς με σήψη, παρατηρήθηκε μεγαλύτερος όγκος κατανομής και χαμηλότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού (90).

9. Εργαστηριακή Διάγνωση.

9.A. Απομόνωση κλινικών δειγμάτων.

Τα στελέχη του *Acinetobacter* μπορούν να αναπτυχθούν εύκολα σε κοινά εργαστηριακά θρεπτικά υλικά όπως είναι το θρεπτικό άγαρ και το άγαρ σόγιας τρυπτόνης, αν και έχουν χρησιμοποιηθεί για συγκεκριμένους σκοπούς καθορισμένα θρεπτικά υλικά που αποτελούνται από ανόργανες βάσεις που περιέχουν αμμώνιο ή νιτρικά άλατα και μία ή περισσότερες πηγές άνθρακα (16).

Για την περιβαλλοντική επιλογή, κυρίως σε περιοχές όπου τα στελέχη του *Acinetobacter* παρευρίσκονται μόνο σε μικρούς αριθμούς, ο εμπλουτισμός της καλλιέργειας με κάποιο μέσο

είναι επίσης χρήσιμος. Δείγματα που επιμολύνθηκαν με μία ποικιλία μικροοργανισμών μπορούν να εμβολιαστούν σε ένα υγρό ανόργανο θρεπτικό υλικό που περιέχει έναν μόνο άνθρακα ως πηγή ενέργειας και αμμώνιο ή νιτρικά άλατα ως πηγή αζώτου, με τελικό pH 5.5 με 6,0. Είναι αναγκαία η δυνατή ανάδευση κατά τη διάρκεια της επώασης έτσι ώστε όποιο στέλεχος του *Acinetobacter* είναι παρόν να μπορέσει να αναπτυχθεί περισσότερο έναντι των ψευδομονάδων. Έπειτα από επώαση 24 με 48 ωρών, παίρνουμε από το καλλιεργητικό υλικό με έναν κρίκο δείγμα και το εμβολιάζουμε σε ένα εκλεκτικό μέσο και οι πιθανές αποικίες του *Acinetobacter* που θα αναπτυχθούν θα αναγνωρισθούν επιπροσθέτως. Αυτή η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί για να ανακτηθούν στελέχη *Acinetobacter* από δείγματα κοπράνων και από άλλα περιβαλλοντικά και κλινικά δείγματα (16).

Κλινικά δείγματα, που ανήκουν κυρίως στο γονιδιακό είδος 2 (*A.baumannii*), στο 3, ή στο 13TU, αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες άνω των 37°C, αλλά κάποια άλλα γονιδιακά είδη αναπτύσσονται μόνο σε χαμηλές θερμοκρασίες. Προτάθηκε μια γενική θερμοκρασία καλλιέργειας γύρω στους 30°C, αλλά και μια χαμηλότερη θερμοκρασία ή συνδυασμός θερμοκρασιών μπορεί να είναι ενδεδειγμένη, βέβαια εξαρτάται τόσο από τον τύπο όσο και από την προέλευση του δείγματος (16).

9.B. Μοριακή Ταυτοποίηση.

Από τις λίγες μεθόδους που έχουν χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση των στελεχών του *Acinetobacter*, είναι ο DNA-DNA υβριδισμός που παραμένει ως μέθοδος αναφοράς. Το σύστημα της φαινοτυπικής ταυτοποίησης, που προτάθηκε από τους Bouvet και Grimont το 1986, βασίζεται σε 28 φαινοτυπικά τεστ. Αυτό το σύστημα ταυτοποίησης επανακαθορίστηκε το 1987 από τους ίδιους συγγραφείς και περιλαμβάνει ανάπτυξη στους 37°, 41° και 44°C· παραγωγή οξέος από τη γλυκόζη· υδρόλυση της ζελατίνης· και απορρόφηση 14 διαφορετικών πηγών άνθρακα (20). Ενώ αυτό το απλοποιημένο σύστημα ταυτοποίησης επιτρέπει τη διάκριση ανάμεσα στα 11 από τα 12 γονιδιακά είδη που είχαν περιγραφεί αρχικά, ταυτοποιήθηκαν ορθά έως και 95,6% σε επίπεδο είδους τα 136 στελέχη του *Acinetobacter* που ανακτήθηκαν από δείγματα ανθρώπινου δέρματος, βέβαια τα πιο πρόσφατα γονιδιακά είδη δεν μπορούν να ταυτοποιηθούν. Συγκεκριμένα, τα πιο συναφή και κλινικά πιο σχετικά είδη του *A.baumannii* και του *Acinetobacter* του γονιδιακού είδους 13TU δεν μπορούν να διακριθούν, ενώ το *A.calcoaceticus* και το *Acinetobacter* του γονιδιακού είδους 3 μπορούν μόνο να διαχωριστούν από τις συνθήκες ανάπτυξης σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Δυστυχώς, απλά φαινοτυπικά τεστ

που χρησιμοποιούνται στη ρουτίνα των διαγνωστικών εργαστηρίων για την ταυτοποίηση του βακτηριακού γένους στο επίπεδο του είδους είναι ακατάλληλα για την ξεκάθαρη ταυτοποίηση των κοινών ειδών του *Acinetobacter* (105).

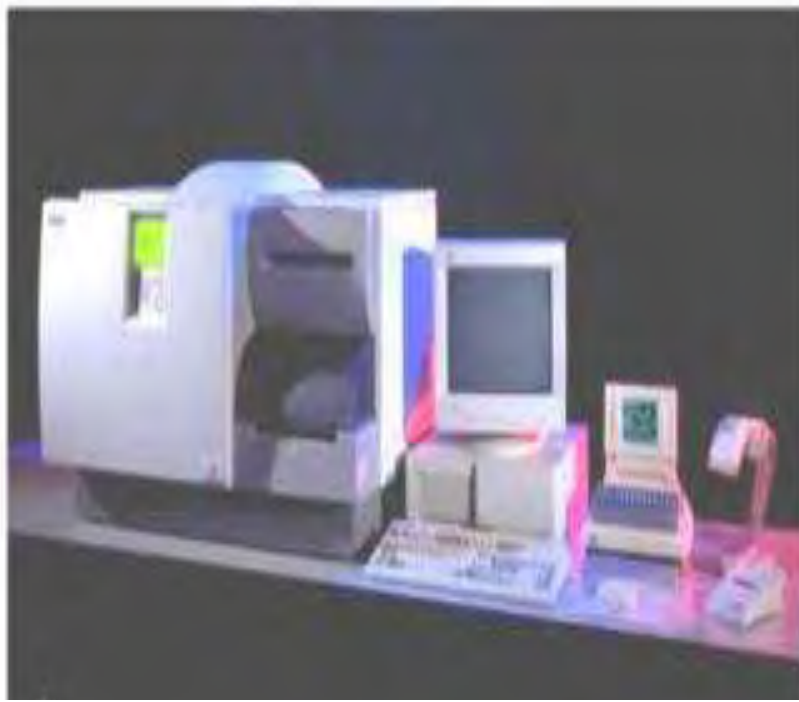
Τόσο ο DNA-DNA υβριδισμός όσο και το φαινοτυπικό σύστημα ταυτοποίησης των Bouvet και Grimont είναι πολύπλοκα και απέχουν πολύ από το να είναι ιδανικά για εξετάσεις ρουτίνας σε μικροβιολογικό εργαστήριο. Στην πραγματικότητα αυτές οι μέθοδοι είναι διαθέσιμες παγκοσμίως μόνο σε εργαστήρια αναφοράς. Οι μοριακές μέθοδοι που αναπτύχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των στελεχών του *Acinetobacter* περιλαμβάνουν την ενισχυμένη περιοριστική ανάλυση του 16SrRNA (ARDRA), υψηλή ανάλυση αποτυπωμάτων μέσω πολυμορφισμού μήκους ενισχυμένων τμημάτων (AFLP), ribotyping, αποτύπωση του σκελετού του tRNA, περιοριστική ανάλυση του 16S-23SrRNA αλληλούχησης των μεσογονιδιακών σκελετών, ανάλυση της αλληλουχίας του 16S-23SrRNA της περιοχής του γονιδιακού σκελετού και αλληλούχηση του γονιδίου *rpoB* (β-υπομονάδα της RNA πολυμεράσης) και των πλευρικών του σκελετών. Οι αναλύσεις ARDRA και AFLP πρόσφατα αποτέλεσαν τις πιο ευρέως αποδεκτές και έγκυρες αναλύσεις για την ταυτοποίηση των ειδών του *Acinetobacter*, έχοντας διαθέσιμη μία μεγάλη βιβλιοθήκη με προφίλ τόσο στελεχών αναφοράς όσο και κλινικών στελεχών ενώ η αποτύπωση του tRNA, αν και γενικά είναι κατάλληλη για την ταυτοποίηση των ειδών, δεν μπορεί όμως να ξεχωρίσει το *A.baumannii* από το *Acinetobacter* του γονιδιακού είδους 13TU. Τόσο το ribotyping όσο και η ανάλυση αλληλούχησης του 16S-23SrRNA της περιοχής του γονιδιακού σκελετού βρέθηκαν ότι μπορούν να ξεχωρίσουν τα είδη του συμπλέγματος *A.calcoaceticus*-*A.baumannii* αλλά δεν έχουν εφαρμοστεί σε άλλα είδη του *Acinetobacter* και η αλληλούχηση του *rpoB*, αν και είναι πολλά υποσχόμενη, χρειάζεται επιπλέον τεκμηρίωση. Όλες αυτές οι μέθοδοι συνέβαλαν στην καλύτερη κατανόηση της επιδημιολογίας και της κλινικής σημασίας των ειδών του *Acinetobacter* τα τελευταία χρόνια, αλλά είναι περίπλοκες για να εφαρμοστούν στην καθημερινή διαγνωστική μικροβιολογία και η μέχρι τώρα χρήση τους περιορίζεται κυρίως στα εργαστήρια αναφοράς (105).

Οι πιο πρόσφατες εξελίξεις περιλαμβάνουν την τυποποίηση του *A.baumannii* με την ανίχνευση του ενδογενούς γονιδίου καρβαπενεμάσης τύπου *bla_{OXA-51}* σε αυτό το είδος, με το σπεκτρόμετρο φασματομετρίας μάζας ιονισμού-PCR (PCR-ESI-MS), και με μία απλή μέθοδο που βασίζεται στην PCR όπως περιγράφηκε από τους Higgins et al. (55) όπου αξιοποιεί τις διαφορές στα αντίστοιχα τους γονίδια *gyrB* έτσι ώστε ταχύτατα να διαφοροποιηθεί το *A.baumannii* από το *Acinetobacter* του γονιδιακού είδους 13TU. Με τη MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight MS) αποκομίστηκαν πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα για την τυποποίηση των ειδών όπου από τα 552 χαρακτηριστικά στελέχη του

Acinetobacter, απεικονίζονται 15 διαφορετικά είδη. Η MALDI-TOF επιτρέπει την ταυτοποίηση των ειδών σε λιγότερο από 1 ώρα, αλλά απαιτεί ακριβό εξοπλισμό και χρειάζεται περαιτέρω αξιολόγηση (105).

Η ταυτοποίηση των ειδών με χειρονακτικά ή με ημιαυτόματα εμπορικά συστήματα ταυτοποίησης που πρόσφατα χρησιμοποιήθηκαν στη διαγνωστική μικροβιολογία, όπως είναι το API 20NE, το Vitek2, το Phoenix και το Micro Scan Walk Away Systems, παραμένουν αβέβαια. Κατά ένα μέρος αυτό μπορεί να εξηγηθεί από την περιορισμένη βάση δεδομένων, αλλά επίσης και εξαιτίας των υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των βακτηριακών ειδών, η οποία δεν είναι προσαρμοσμένη ειδικά στην αναγνώριση των στελεχών του *Acinetobacter*. Συγκεκριμένα, τα τρία κλινικά συναφή μέλη του συμπλέγματος *A.calcoaceticus-A.baumannii* προς το παρόν δεν μπορούν να διαχωριστούν με τα διαθέσιμα εμπορικά συστήματα ταυτοποίησης· επιπλέον, το *A.baumannii*, το *Acinetobacter* του γονιδιακού είδους 3 και το *Acinetobacter* του γονιδιακού είδους 13TU έχουν όμοια ταυτοποιηθεί ως *A.baumannii* από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα συστήματα ταυτοποίησης. Αναφερόμενοι σε αυτά τα είδη, φαίνεται συνετό να χρησιμοποιηθεί ο όρος ομάδα του *A.baumannii* αντί για το σύμπλεγμα *A.calcoaceticus-A.baumannii*. Αυτό ανακλά του γεγονός ότι το *A.baumannii*, το *Acinetobacter* του γονιδιακού είδους 3 και το *Acinetobacter* του γονιδιακού είδους 13TU μοιράζονται σημαντικά κλινικά και επιδημιολογικά χαρακτηριστικά και επίσης εξαλείφει την επακόλουθη σύγχυση από την ενσωμάτωση των περιβαλλοντικών ειδών του *A.calcoaceticus* (105).

Η αναγκαιότητα της ταυτοποίησης των ειδών του *Acinetobacter* στη ρουτίνα των κλινικών εργαστηρίων έχει αμφισβητηθεί από κάποιους ερευνητές. Από ένα σύστημα ελέγχου των κλινικών λοιμώξεων, προκύπτει η αναγκαία διάκριση ανάμεσα στην ομάδα του *A.baumannii* και των *Acinetobacters*, εκτός από τα στελέχη του *A.baumannii* όλα τα υπόλοιπα στελέχη σπάνια έχουν επιπτώσεις στον έλεγχο της λοίμωξης. Επιπροσθέτως, αυτοί οι μικροοργανισμοί είναι συνήθως ευαίσθητοι σε μια ποικιλία αντιβιοτικών, και οι λοιμώξεις που προκλήθηκαν από αυτούς τους μικροοργανισμούς είναι συχνά ήπιες. Σε αντίθεση, από την ερευνητική άποψη, οι κλινικές μελέτες χρησιμοποιούν κατάλληλες μεθόδους για την ταυτοποίηση των ειδών των *Acinetobacters*, περιλαμβανομένων και αυτών της ομάδας του *A.baumannii*, και είναι επιτακτικό να αποκτήσουμε πρόσθετες γνώσεις για την επιδημιολογία, την παθογονικότητα και τον κλινικό αντίκτυπο των ποικίλων ειδών αυτού του ποικιλόμορφου γένους (105).



E

ικόνα 5 : Το αυτοματοποιημένο σύστημα VITEK 2 με τις κασέτες ταυτοποίησης μίας χρήσης.

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.

A. Σκοπός της εργασίας.

1) Οι λοιμώξεις που οφείλονται σε πολυανθεκτικούς Gram-αρνητικούς μικροοργανισμούς συνιστούν ένα παγκόσμιο κλινικό πρόβλημα, που προκαλεί σημαντική νοσηρότητα και θνητότητα σε όλο τον κόσμο (58). 2) Η εμφάνιση Gram-αρνητικών βακτηρίων που αναπτύσσουν ανθεκτικότητα στα περισσότερα διαθέσιμα αντιβιοτικά, σε συνδυασμό με την έλλειψη ανάπτυξης νέων αντιμικροβιακών παραγόντων, οδήγησε την ιατρική κοινότητα στην επαναξιολόγηση της κολιστίνης. 3) Η αρχική κλινική εμπειρία, τη δεκαετία του '70, με το συγκεκριμένο αντιβιοτικό ανέδειξε υψηλή συχνότητα εμφάνισης τοξικότητας, κυρίως νεφροτοξικότητας (73,121,130,140). Κατά τη διάρκεια των δύο τελευταίων δεκαετιών, η κλινική χρήση του συγκεκριμένου αντιβιοτικού ήταν ιδιαίτερα περιορισμένη (58).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών αντοχής στις πολυμυξίνες, και συγκεκριμένα στην κολιστίνη (αφού τώρα πια αποτελεί λύση έκτακτης ανάγκης η χρήση της), των πολυανθεκτικών κλινικών στελεχών *A.baumannii* που απομονώθηκαν στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, συγκεκριμένα κυρίως στη ΜΕΘ και λιγότερο σε άλλες κλινικές όπως η Ορθοπαιδική, Πνευμονολογική, Ογκολογική, Αγγειοχειρουργική, Νευροχειρουργική, Νεφρολογική και στις Παθολογικές (ΠΠΑ και ΠΠΒ).

Το σχεδιάγραμμα της μελέτης ακολούθησε τα παρακάτω βήματα :

A) την ανίχνευση των ανθεκτικών στη κολιστίνη κλινικών στελεχών του *A.baumannii* με φαινοτυπικές μεθόδους.

B) Μελέτη των μηχανισμών αντοχής στη κολιστίνη.

Γ) Μοριακή τυποποίηση των στελεχών για την επιδημιολογική μελέτη με τη χρήση της μεθόδου MLST (Multi Locus Sequence Typing) για την ανεύρεση των πιθανώς κυκλοφορούντων κλώνων που απομονώθηκαν στο νοσοκομείο.

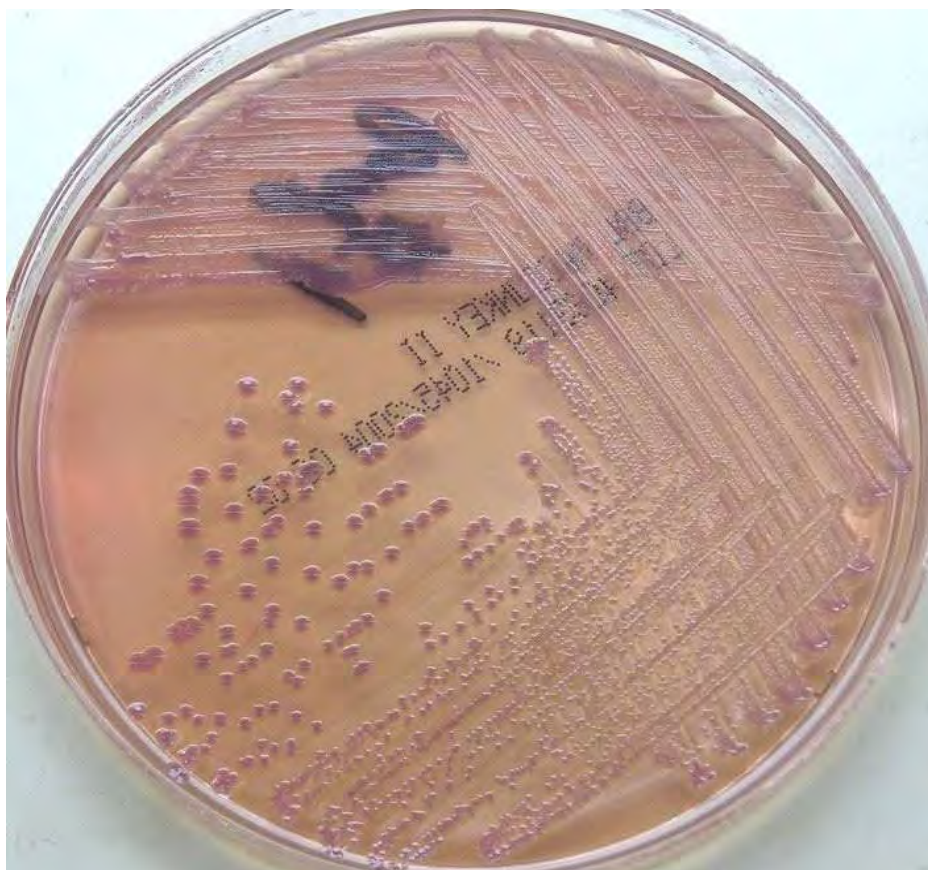
B. Υλικά και Μέθοδοι.

1. Κλινικά Δείγματα.

Τα κλινικά δείγματα που χρησιμοποιήσαμε στη μελέτη μας συλλέχθηκαν από ασθενείς του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (ΠΓΝΛ) κατά την περίοδο 1-1-2014 έως 31-1-2015. Τα δείγματα αυτά προήλθαν από διάφορες κλινικές του ΠΓΝΛ και αφορούσαν αίμα,

ούρα, βρογχικές εκκρίσεις, πτύελα, πύο τραύματος, βιολογικά υγρά (πλευριτικό, δωδεκαδακτυλικό), καθετήρες (αρτηριακοί, περιτοναϊκοί, φλεβικοί) και ιστούς.

Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν, απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα που είχαν συντηρηθεί μέσα σε θρεπτικό ζωμό Tryptic Soy Broth με περιεκτικότητα γλυκερόλης (Sigma-Aldrich) 10% στους -80°C , από όπου επανακαλλιεργήθηκαν σε MacConkey Agar No 3. Μετά την καλλιέργεια των κλινικών δειγμάτων τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο ανεστραμμένα στους 37°C για 24 ώρες υπό αερόβιες συνθήκες.



Εικόνα 6 : Τρυβλίο με θρεπτικό υλικό MacConkey Agar στο οποίο είναι ευδιάκριτη η ανάπτυξη του *Acinetobacter baumannii*.

2. Χρώση κατά Gram.

Η χρώση κατά Gram αποτελεί την πιο σημαντική χρώση στη βακτηριολογία και χρησιμοποιείται για τη διαφοροποίηση βακτηρίων με βάση τις φυσιολογικές ιδιότητες του κυτταρικού τους τοιχώματος (Moyes *et al*, 2009). Για τη χρώση κατά Gram των υπό μελέτη στελεχών χρησιμοποιήθηκε το Gram Color Kit σύμφωνα με το εγχειρίδιο της κατασκευάστριας εταιρίας (Liofilchem).

3. Ταυτοποίηση, μελέτη ευαισθησίας στελεχών και τυποποίηση.

Όλα τα στελέχη που χρησιμοποιήσαμε έχουν ελεγχθεί βάσει του αυτοματοποιημένου συστήματος VITEK 2 (bioMerieux, Inc). Το VITEK 2 αποτελεί το αυτοματοποιημένο σύστημα το οποίο χρησιμοποιείται στη ρουτίνα για την ταυτοποίηση των μικροβίων στα περισσότερα μικροβιολογικά εργαστήρια των νοσοκομείων. Βασίζεται στην ανίχνευση γνωστών βιοχημικών και φυσιολογικών ιδιοτήτων δίνοντας αποτέλεσμα σε κάτι λιγότερο από 10 ώρες. Διαθέτει ένα εκτενές σύστημα ταυτοποίησης στελεχών και παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία διάκρισης των ειδών. Σε στελέχη τα οποία δεν έγινε εφικτή η ταυτοποίηση βάσει φαινοτυπικών χαρακτηριστικών ακολούθησε μοριακή ταυτοποίηση όπως περιγράφεται παρακάτω.

3.A. Ταυτοποίηση Μικροοργανισμών με Μοριακές Μεθόδους.

3.A.1. Εκχύλιση Γενετικού Υλικού.

Για την διεξαγωγή όλων των πειραματικών διαδικασιών χρειαζόμαστε DNA ως πρώτη ύλη. Το λαμβάνουμε μετά την απελευθέρωσή του σε διαλυτή μορφή μετά από ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών καθώς και μεμβρανών υποκυτταρικών οργανιδίων όπως είναι οι πυρήνες. Μπορούμε να εκχυλίσουμε το γενετικό υλικό είτε με μηχανική διάρρηξη είτε με εφαρμογή χημικών ή ενζύμων, έτσι ώστε να λυθούν τα κύτταρα για να τμηματοποιηθεί το βακτηριακό κύτταρο και να διατηρηθεί ακέραιο το DNA.

Η εκχύλιση του DNA διενεργήθηκε με τη χρήση του Quick-gDNA MiniPrep Kit, σύμφωνα με το εγχειρίδιο της κατασκευάστριας εταιρίας (Zymo Research Corp). Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι σχεδιασμένο για 200μl δείγματος το οποίο πρώτα έχουμε προετοιμάσει (200μl ομογενούς εναιωρήματος 3 McFarland (9×10^8 cfu/ml) έκαστου στελέχους σε WFI). Τα βήματα της διαδικασίας είναι τα εξής :

- i. Προσθέτουμε 800μl από το Genomic Lysis Buffer στα 200μl του υγρού δείγματός μας. Το αναδεύουμε ελαφρώς στο vortex και το αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 5-10 λεπτά.
- ii. Μεταφέρουμε το μίγμα σε μία στήλη Zymo-Spin εντός ενός Collection Tube. Φυγοκεντρούμε στις 10,000 xg για ένα λεπτό. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο από Collection Tube.
- iii. Μεταφέρουμε τη στήλη Zymo-Spin σε ένα καθαρό Collection Tube. Προσθέτουμε 200μl από το DNA pre-Wash Buffer στη στήλη Zymo-Spin. Φυγοκεντρούμε στις 10,000 xg για ένα λεπτό.

- iv. Προσθέτουμε 500μl από το g-DNA Wash Buffer στη στήλη Zymo-Spin. Φυγοκεντρούμε στις 10,000 xg για ένα λεπτό.
- v. Μεταφέρουμε τη στήλη Zymo-Spin σε ένα καθαρό σωληνάκι μικροφυγόκεντρου. Προσθέτουμε ≥ 50 μl DNA Elution Buffer ή νερό. Το αφήνουμε να επωαστεί για 2-5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα φυγοκεντρούμε στην μέγιστη ταχύτητα για 30 δευτερόλεπτα για να εκπλυθεί το DNA. Το εκπλυμένο DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα σε μοριακές τεχνικές ή να αποθηκευθεί στους $\leq -20^{\circ}$ C για μελλοντική χρήση.

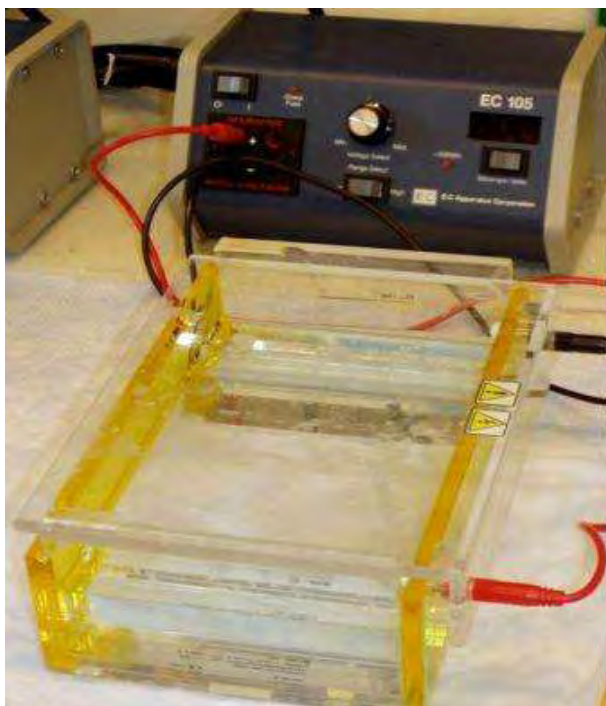
Τέλος, για την ανίχνευση της παρουσίας και την ποσοτικοποίηση γενετικού υλικού στο διήθημα (~50 μl) ακολούθησε ηλεκτροφόρηση 5 μl του διηθήματος σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8 % (w/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE και φωτογράφιση.

3.A.2. Ηλεκτροφόρηση σε Πήκτωμα Αγαρόζης.

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό και την αναγνώριση τμημάτων DNA, είναι μία μέθοδος απλή, γρήγορη και μπορεί να διαχωρίσει μίγματα τμημάτων DNA που δεν μπορούν να διαχωριστούν με άλλες τεχνικές.

Σύμφωνα με αυτή την τεχνική, τα τμήματα DNA αναγκάζονται να κινηθούν μέσω των πόρων που σχηματίζονται σε πήκτωμα αγαρόζης υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στο πήκτωμα αγαρόζης εξαρτάται κυρίως από τέσσερις παραμέτρους: το μέγεθος του DNA, τη συγκέντρωση της αγαρόζης, τη στερεοδιάταξη του DNA και την ένταση του ρεύματος. Η θέση του DNA στο πήκτωμα προσδιορίζεται υπό υπεριώδες φως με τη χρήση μικρής συγκέντρωσης βρωμιούχου αιθιδίου, μιας φθορίζουσας χρωστικής που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις αζωτούχες βάσεις του DNA.

Το πήκτωμα αγαρόζης που χρησιμοποιήσαμε, φτιάχτηκε με συγκέντρωση 0,8% (w/v) (Lonza) σε διάλυμα TBE 1X (Lonza). Πριν στερεοποιηθεί το πήκτωμα αγαρόζης είχε προστεθεί 0,6% διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (Sigma-Aldrich) συγκέντρωσης 10 mg/ml. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε οριζόντια συσκευή. Στα δείγματα του DNA έγινε προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης 6X (1:5, Fermentas) και στη συνέχεια φορτώθηκαν στα διαμορφωμένα πηγαδάκια του πηκτώματος. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν στα 80 V για 45 περίπου λεπτά της ώρας. Ακολούθησε παρατήρηση του πηκτώματος σε συσκευή με υπεριώδη ακτινοβολία και φωτογράφησή του.

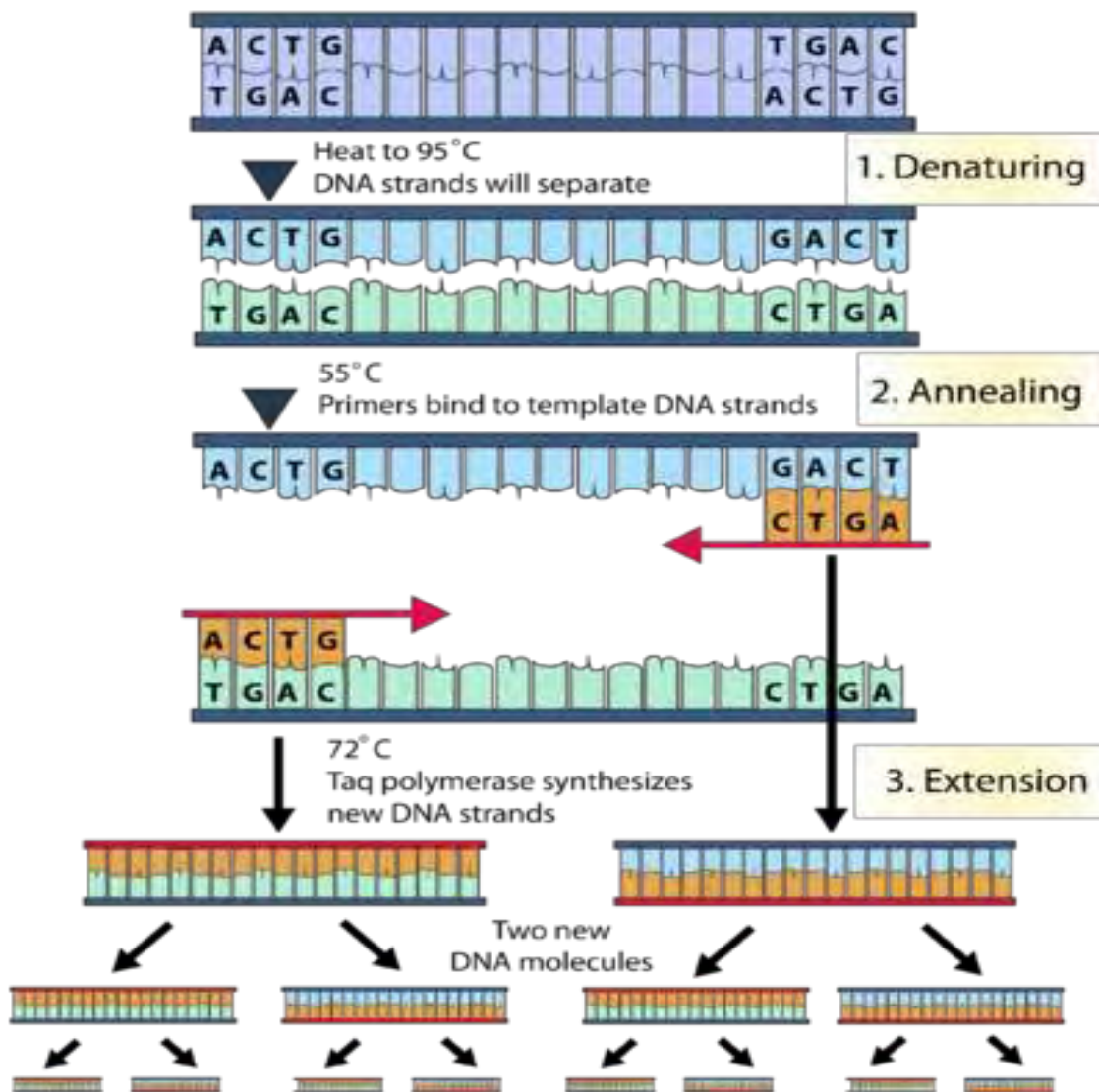


Εικόνα 7 : Συσκευή ηλεκτροφόρησης του πηκτώματος της αгарόζης.

3.A.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Η PCR (Polymerase Chain Reaction) είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται για να πολλαπλασιάσει μικρά τμήματα του DNA, αυτό είναι απαραίτητο για να γίνει ανάλυση των μεταλλάξεων ή των πολυμορφισμών σε μοριακό επίπεδο, και απαιτούνται αρκετά μεγάλες ποσότητες του DNA. Αποτελεί μια απλή, ταχεία, επιλεκτική και εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδο η οποία πραγματοποιείται με την βοήθεια του ένζυμου της πολυμεράσης και από επαναλαμβανόμενους κύκλους τριών διαδοχικών αντιδράσεων.

Κάθε κύκλος αποτελείται από τρία στάδια: στάδιο 1^ο αποδιάταξη του DNA, στην οποία η διπλή έλικα του DNA-στόχου αποδιατάσσεται, στάδιο 2^ο υβριδοποίηση των εκκινητών, που πραγματοποιείται σε χαμηλότερη θερμοκρασία, στην οποία οι εκκινητές υβριδοποιούνται με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο μόριο-στόχο τους και στάδιο 3^ο επιμήκυνση της αντίδρασης, στην οποία η DNA πολυμεράση επιμηκύνει τις αλληλουχίες των υβριδισμένων εκκινητών με κατεύθυνση 5'–3' χρησιμοποιώντας ως μήτρα τον DNA-στόχο όπου έχουν προσδεθεί οι εκκινητές. Στο τέλος του κάθε κύκλου (ο καθένας αποτελείται από τα παραπάνω τρία στάδια), η ποσότητα των προϊόντων της PCR θεωρητικά διπλασιάζεται. Η όλη διαδικασία διεξάγεται σε έναν προγραμματισμένο θερμικό κυκλοποιητή και ολοκληρώνεται μετά από 30–50 κύκλους, με αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση του συνολικού αριθμού των αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου (2).



Εικόνα 8 : Στάδια της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης. Στο 1^ο στάδιο (denaturing) γίνεται η αποδιάταξη του DNA. Στο 2^ο στάδιο (annealing) γίνεται η υβριδοποίηση των εκκινητών στο DNA εκμαγείο. Και το 3^ο στάδιο (extension) κατά το οποίο έχουμε την επιμήκυνση των εκκινητών.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μl) ανά αντίδραση
H ₂ O	35,3
MgCl ₂	1,5
Buffer	5
dNTPs (10mM)	1
Primer 1 (10mM)	1
Primer 2 (10mM)	1
Taq (5u/μl)	0,2
Δείγμα	5
Συνολικός όγκος	50

Πίνακας 4: τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στην PCR και οι ποσότητες ανά αντίδραση.

3.A.4. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR.

Μετά το πέρας της PCR, ακολουθεί ο καθαρισμός των προϊόντων της έτσι ώστε να προωθηθούν τα δείγματα για την διαδικασία της αλληλούχησης τους. Ο καθαρισμός των προϊόντων έγινε με το PureLink PCR Purification Kit, σύμφωνα με το εγχειρίδιο της κατασκευάστριας εταιρίας (Invitrogen).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον καθαρισμό των προϊόντων της PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρίας είναι το εξής :

- i. Αρχικά προστίθενται 10 ml ισοπροπανόλης 100% στα 15 ml Binding Buffer και 32 ml αιθανόλης 96-100% στα 8 ml Wash Buffer. Αναδεύουμε ελαφρώς τα δείγματα έτσι ώστε να ομογενοποιηθούν.
- ii. Προσθέτουμε τετραπλάσιο όγκο ανασυσταμένου με ισοπροπανόλη Binding Buffer από τον όγκο του προϊόντος της PCR και αναδεύουμε για να αναμιχθούν καλά.
- iii. Μεταφέρουμε το δείγμα σε μία στήλη φυγοκέντρησης (PureLink). Φυγοκεντρούμε τη στήλη για 2 λεπτό στις 11,000 xg. Έπειτα απορρίπτουμε το διήθημα.
- iv. Προσθέτουμε στη στήλη 650 μl ανασυσταμένου με αιθανόλη Wash Buffer. Φυγοκεντρούμε τη στήλη στις 11,000 xg για 2 λεπτά. Απορρίπτουμε το διήθημα και στη συνέχεια επαναφυγοκεντρούμε τη στήλη στη μέγιστη ταχύτητα για 4 λεπτά.
- v. Τοποθετούμε τη στήλη μέσα σε ένα καθαρό Elution Tube διαμέτρου 1.7ml. Προσθέτουμε 50μl Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) στο κέντρο κάθε στήλης. Αφήνουμε τη στήλη να επωαστεί σε θερμοκρασία δωματίου για 3 λεπτά. Έπειτα φυγοκεντρούμε στη μέγιστη ταχύτητα για 4 λεπτά. Και έτσι το Elution Tube περιέχει το καθαρισμένο προϊόν της PCR. Μπορούμε να αποθηκεύσουμε το καθαρισμένο προϊόν στους 4ο C για άμεση χρήση ή στους -20ο C για αποθήκευση μακράς διάρκειας.

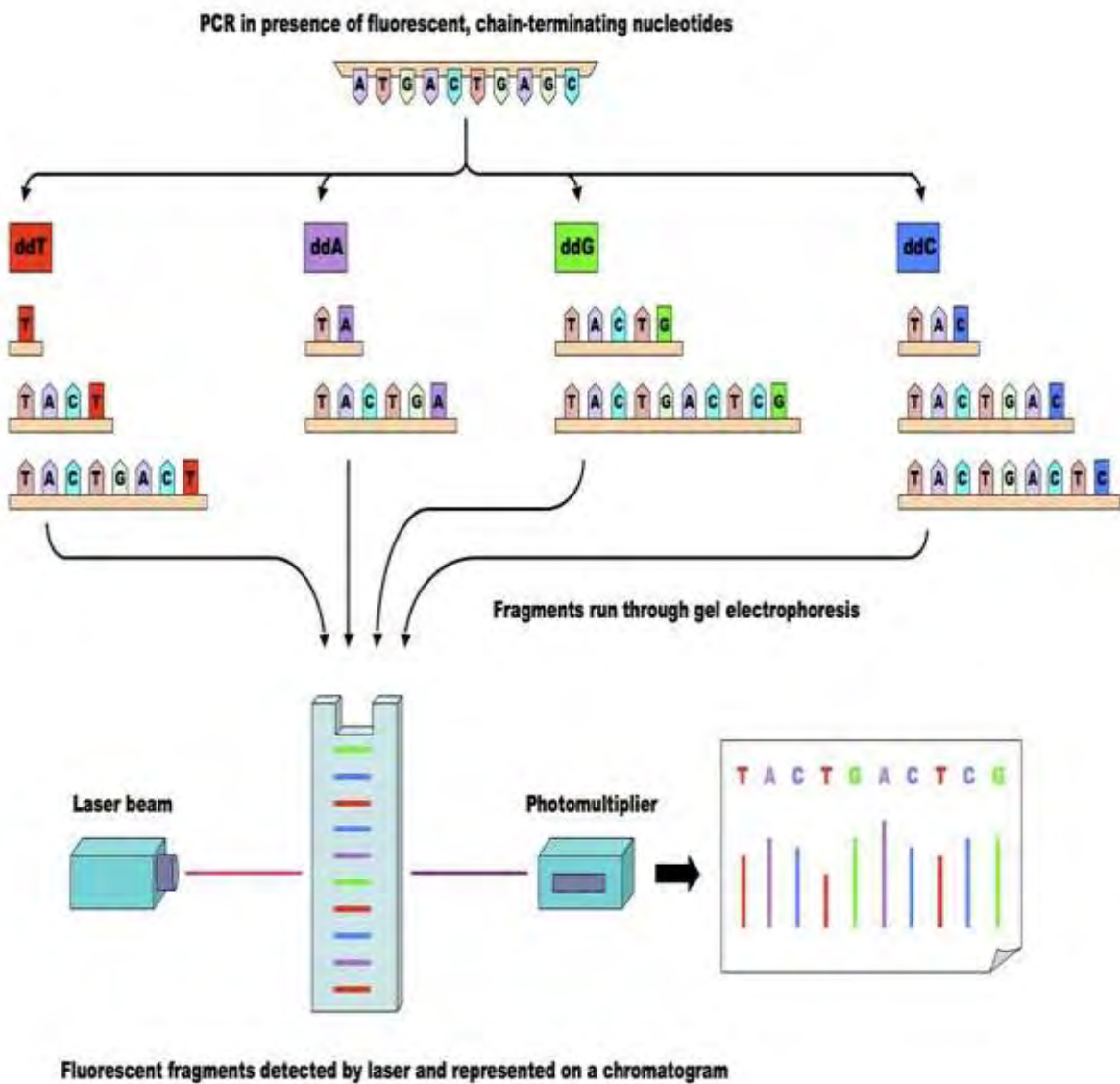
3.A.5. Ανάλυση αλληλουχίας DNA (sequencing).

Η αλληλούχηση (sequencing) προσφέρει άμεση, ακριβή ανάλυση των προϊόντων ενίσχυσης. Αφού αναλυθεί η πρωτοταγής δομή του προϊόντος PCR, ακολουθεί προαιρετικά μια αυτοματοποιημένη φυλογενετική ανάλυση βασισμένη στη σύγκριση με DNA αλληλουχίες ήδη κατατεθειμένες σε βάσεις δεδομένων (π.χ. GenBank) προς διευκρίνιση της ταυτότητας του παθογόνου. Ο αυτοματοποιημένος κατά Sanger προσδιορισμός αλληλουχίας επιτυγχάνεται μέσω της εκπομπής ειδικών φθορίζουσών χρωστικών που περιέχει το κάθε νουκλεοτίδιο (A, G, C, T), προσδίδοντας μια σειρά χρωματικών κορυφών, οι οποίες αντιστοιχούν στην πρωτοταγή δομή

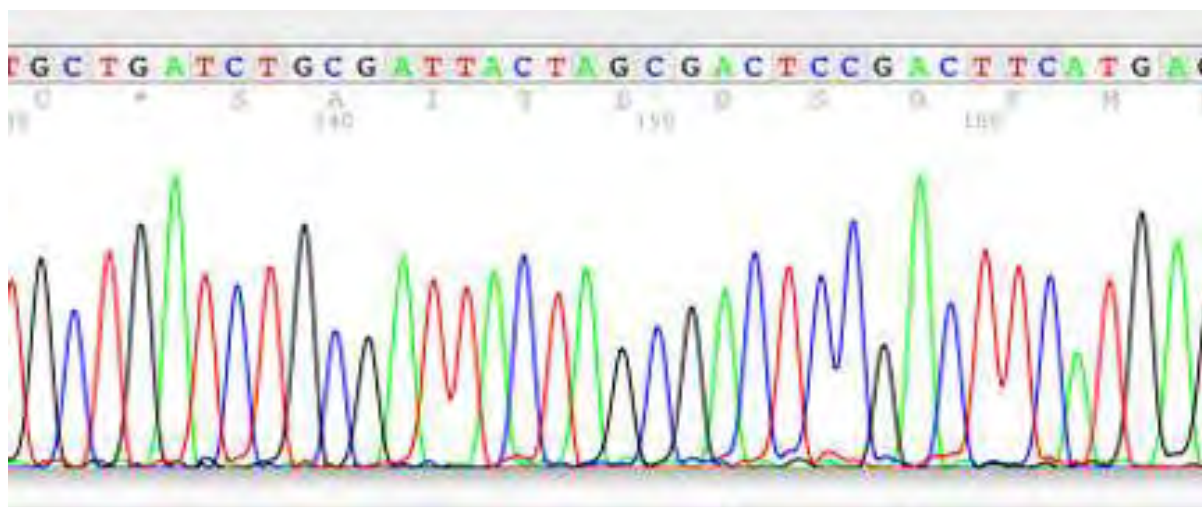
της αλληλουχίας-στόχου. Με αυτόν τον τρόπο αναλύονται περιοχές της τάξης των 700–800 ζευγών βάσεων (2).

Σύμφωνα με τη μέθοδο Sanger, διενεργείται μια αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την εκτέλεση τις οποίας εκτός των τεσσάρων δεοξυριβονουκλεοτιδίων χρησιμοποιούνται και τροποποιημένα νουκλεοτίδια (διδεόξυριβονουκλεοτιδια) που δύναται να σταματούν την επέκταση της συμπληρωματικής αλυσίδας. Το διδεόξυριβονουκλεοτιδιο αυτό μπορεί να ενσωματώνεται στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα, όμως δεν μπορεί να σχηματίσει φωσφοδιεστερικό δεσμό με επόμενο νουκλεοτίδιο, γιατί λείπει το υδροξύλιο στην 3' θέση. Τα διδεοξυριβονουκλεοτίδια αυτά είναι σημασμένα το καθένα με διαφορετική φθορίζουσα χημική ομάδα. Έτσι, σχηματίζεται μείγμα προϊόντων τερματισμού που μπορεί να έχουν οποιαδήποτε από τις τέσσερις βάσεις στο 3' άκρο τους. Τα προϊόντα αυτά προκύπτουν από την ενσωμάτωση ενός διδεοξυριβονουκλεοτιδίου σε μία τυχαία θέση κατά τη σύνθεση. Επειδή οι 4 φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιούνται εκπέμπουν φωτεινή ακτινοβολία σε διαφορετικό μήκος κύματος, η ταυτότητα της βάσης στην οποία τερματίζεται η σύνθεση αντιστοιχεί στο χρώμα του διδεοξυριβονουκλεοτιδίου που έχει ενσωματωθεί στο 3' άκρο. Όταν τα προϊόντα αυτής της αντίδρασης ηλεκτροφορηθούν στη σειρά, η ακολουθία με την οποία τα νουκλεοτίδια προστίθενται στον εκκινητή δύναται να βρεθεί από τα αυξανόμενου μεγέθους διαδοχικά θραύσματα που προκύπτουν στο πήκτωμα ηλεκτροφόρησης της συσκευής αυτόματης αλληλούχησης.

Τα κομμάτια μεταναστεύουν σύμφωνα με το μέγεθος τους και οι φθορίζουσες χρωστικές διακρίνουν ποιο νουκλεοτίδιο είναι στο τέλος κάθε κομματιού. Κάθε διαδοχικό τμήμα είναι κατά ένα νουκλεοτίδιο μεγαλύτερο από το προηγούμενο. Οι φθορίζουσες χρωστικές διεγείρονται από την ακτίνα laser ενός ανιχνευτή, καθώς τα τμήματα περνούν κατά την ηλεκτροφόρηση. Ο αισθητήρας του ανιχνευτή καταγράφει την ένταση και το μήκος κύματος του φωτός, μετατρέπει το σήμα φθορισμού σε ηλεκτρικό σήμα και το στέλνει σε έναν υπολογιστή. Αυτό το σήμα αναλύεται με αλγορίθμους ειδικούς για αλληλούχηση, οι οποίοι αναγνωρίζουν τη βάση που βρίσκεται στο 3' άκρο του τμήματος, δηλαδή από το μικρότερο στο μεγαλύτερο τμήμα (εικόνα 9). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε ένα ηλεκτροφερόγραμμα (electropherogram) (εικόνα 10), μια σειρά, δηλαδή από κορυφές που αντιστοιχούν σε κάποια βάση ανάλογη με το χρώμα φθορισμού. Συγκεκριμένα αναπαριστάται η ένταση των φθορίζόντων σημάτων ως συνάρτηση του χρόνου ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 9 : Αυτοματοποιημένη μέθοδος αλληλούχησης DNA.



Εικόνα 10 : Αναπαράσταση ηλεκτροφερογράμματος.

3.A.6. Σύγκριση αλληλουχιών DNA.

Οι συγκρίσεις με τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες της GeneBank πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση των προγραμμάτων της οικογένειας BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (8), που είναι διαθέσιμα στο δικτυακό τόπο του NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) και συγκεκριμένα του προγράμματος BLAST. Το BLAST είναι ένας ευριστικός αλγόριθμος σύγκρισης ακολουθιών βελτιστοποιημένης ταχύτητας που χρησιμοποιείται για να ψάχνει σε βάσεις ακολουθιών την άριστη τοπική στοίχιση με μια αναζήτηση. Το αποτέλεσμα της σύγκρισης με το εν λόγω πρόγραμμα απεικονίζεται από το λογισμικό BLAST με τη μορφή νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (BLAST hits) στοιχισμένων με την αλληλουχία που αποτελεί το ερώτημα (Query) της σύγκρισης. Επιπλέον, αναφέρεται το ποσοστό ταυτότητας μεταξύ του κάθε BLAST hit και της αλληλουχίας Query, καθώς και η τιμή E, η οποία εκφράζει την στατιστική σπουδαιότητα κάθε στοίχισης, δηλαδή την πιθανότητα η στοίχιση να είναι τυχαία.

3.B. Μοριακή τυποποίηση στελεχών.

3.B.1. Τυποποίηση με MLST.

Η MLST (multilocus sequencing typing) είναι μια τεχνική ανάλυσης DNA αλληλουχιών με ευρεία επιδημιολογική εφαρμογή. Στην τεχνική αυτή, τα στελέχη ταυτοποιούνται σύμφωνα με τις διαφορές αλληλουχίας σε έναν αριθμό προσεκτικά επιλεγμένων γενετικών τόπων. DNA κωδικές αλληλουχίες 7–10 διαφορετικών μεταβολικών γονιδίων (house-keeping genes) μεγέθους περίπου 450 ζευγών βάσεων ενισχύονται με PCR και κατόπιν αλληλουχούνται. Για κάθε γενετικό δείκτη οι διαφορετικές αλληλουχίες των εξεταζόμενων στελεχών αντιμετωπίζονται ως διαφορετικά αλληλόμορφα γονίδια και κάθε στέλεχος καθορίζεται από την αλληλική κατατομή των χρησιμοποιούμενων δεικτών (allelic profile), η οποία στη συνέχεια συγκρίνεται με πρότυπες αλληλικές κατατομές ώστε να ταυτοποιηθεί και να τυποποιηθεί ο παθογόνος οργανισμός. Συνοπτικά, κάθε σχήμα MLST βασίζεται στην ανάλυση συνήθως επτά γονιδίων που κωδικοποιούν κρίσιμες μεταβολικές πρωτεΐνες για το βακτηριακό κύτταρο. Τα υπό μελέτη στελέχη, ορίζονται από τα αλληλόμορφα που είναι παρόντα σε αυτούς τους επτά γονιδιακούς τύπους και αποτελούν το αλληλικό προφίλ εκάστου στελέχους. Κάθε μοναδικό αλληλικό προφίλ αντιστοιχεί σε ένα συγκεκριμένο τύπο αλληλουχίας (ST), στον οποίο ανήκει κάθε βακτηριακό στέλεχος. Στελέχη με τον ίδιο ST χαρακτηρίζονται από όμοιες γονιδιακές αλληλουχίες για τα υπό εξέταση γονίδια και θεωρείται ότι αποτελούν μελή του ίδιου κλώνου.

Από τους Tourton et al. (2007), προτείνεται ένα διαφορετικό σχήμα ταυτοποίησης με χρήση αλληλούχησης, το οποίο βασίζεται στην ανίχνευση και ταυτοποίηση τριών γονιδίων, τα οποία μάλιστα δεν ανήκουν στα συντηρημένα (housekeeping) γονίδια αλλά βρίσκονται υπό εξελικτική πίεση επιλογής. Αυτή η τεχνική έχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να δώσει πληροφορίες σχετικές με την παθογονικότητα του μικροβίου. Τα γονίδια τα οποία μελετούνται σε αυτό το σχήμα είναι το *OmpA* (το οποίο κωδικοποιεί την εξωτερική μεμβρανική πρωτεΐνη A), το *csuE* (το οποίο κωδικοποιεί το ινίδιο που είναι βασικό για το σχηματισμό της βιομεμβράνης) και το *bla_{OXA-51-like}* που κωδικοποιεί τη χρωμοσωμική καρβαπενεμάση του *A.baumannii*. Το σχήμα αυτό είναι πιο απλό στην υλοποίησή του καθώς αφορά 3 μόλις γονίδια ενώ χαμηλώνει αισθητά και το κόστος υλοποίησης της τεχνικής και περιγράφεται ως ST (sequence typing) ή 3LST (3-loci sequence typing). Η βάση δεδομένων η οποία αφορά το σχήμα των Tourton et al. προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες σε σχέση με το τι έχει προκύψει μέχρι σήμερα επιδημιολογικά (131).

Τα προγράμματα που χρησιμοποιήσαμε για τα γονίδια του 3 LST είναι τα ακόλουθα : για το *ompA* το πρόγραμμα ξεκινούσε στους 94°C για 3min, ακολουθούσαν 35 κύκλοι όπου ο καθένας από τους οποίους περιελάμβανε 45 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία αποδιάταξης (94°C), 45 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητικών μορίων στο DNA στόχο (50°C) και 1 λεπτό σε θερμοκρασία επέκτασης των νεοσυντιθέμενων πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων (72°C), η αντίδραση ολοκληρώθηκε με ένα τελικό στάδιο στους 72°C για 5min. Για τα *csUE* και *OXA-51-like* ακολουθείται το ίδιο πρόγραμμα εκτός από την θερμοκρασία στο στάδιο του υβριδισμού των εκκινητικών μορίων στο DNA στόχο που είναι 65° C και 46° C αντίστοιχα για το καθένα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR των γονιδίων του 3lst φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

	Primer Name	Pimer Sequences	Annealing Temperature	Amplicons size (bp)
FOR PCR	ompAF183	5'-CAA TTG TTA TCT CTG GAG-3'	50°C	966
	ompAR1149	5'-ACC TTG AGT AGA CAA ACG A-3'		
FOR SEQUENCING	ompAF506	5'-TCA ACG GTA ACT TCT ATG-3'		
	ompAR895	5'-CTT CAG TTA ACT CTT GTG G-3'		

FOR PCR	csUEF	5'-ATG CAT GTT CTC TGG ACT GAT GTT GAC-3'	65°C	976
	csUER	5'-CGA CTT GTA CCG TGA CCG TAT CTT GAT AAG-3'		
FOR SEQUENCING	csUEconsensusF	5'-AGA CAT GAG TAG CTT TAC G-3'	52°C	515
	csUEconsensusR	5'-CTT CCC CAT CGG TCA TTC-3'		
FOR PCR	5'OXA-51-like-allF	5'-ATG AAC ATT AAA GCA CTC-3'	46°C	825
	3'OXA-51-like-allR	5'-CTA TAA AAT ACC TAA TTG TTC-3'		
FOR SEQUENCING	OXA-51-likeF	5'-TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG-3'	60°C	353
	OXA-51-likeR	5'-TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG-3'		

Πίνακας 5 : οι primers και οι αλληλουχίες τους κατά τους Tourton et al (2007).

4. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗ ΚΟΛΙΣΤΙΝΗ.

Επιλεγμένα στελέχη βάσει της 3LST με αντοχή σε κολιστίνη ελέγχθηκαν για την ύπαρξη μεταλλάξεων στα *pmrCAB* γονίδια, τα οποία έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη αντοχής στη κολιστίνη. Μετά την απομόνωση του DNA, τα γονίδια ενισχύθηκαν μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Στη συνέχεια, ακολούθησε αλληλούχιση των PCR προϊόντων. Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των *pmrCAB* γονιδίων από τα ανθεκτικά στελέχη συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες αλληλουχίες που αποκτήθηκαν από τρία κολιστίνη-εύαισθητα στελέχη, τα οποία ανήκουν στον ίδιο κλώνο με τα ανθεκτικά στελέχη, και με την αλληλουχία του ATCC17978 στελέχους αναφοράς (GenBank Accession Number CP000521).

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.

	PRIMER NAME	PRIMER SEQUENCES	Amplicons size (bp)	Annealing Temperature
	pmrA-F	5'-ATG ACA AAA ATC TTG ATG ATT GAA GAT-3'	674	60°C
	pmrA-R	5'-TTA TGA TTG CCC CAA ACG GTA G-3'		
	pmrB-F	5'-GTG CAT TAT TCA TTA AAA AAA C-3'	1334	54°C
	pmrB-R	5'-TCA CGC TCT TGT TTC ATG TA-3'		
FOR SEQUENCING	pmrB2-F	5'-GGT TCG TGA AGC TTT CG-3'		
	pmrB2-R	5'-CCT AAA TCG ATT TCT TTT TG-3'		
	pmrC-F	5'-ATG TTT AAT CTC ATT ATA GCC A-3'	1601	52°C
	pmrC-R	5'-TTA GTT TAC ATG GGC ACA A-3'		
FOR SEQUENCING	pmrC2-F	5'-GGT TGT TAT TGA AGA AAG TAT-3'		
	pmrC2-R	5'-TCA ATC CAA GTC ACT TGG TAA C-3'	3.699	

Πίνακας 6 : οι primers κατά τον Beceiro et al. (2011).

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε στην PCR είναι το ίδιο και για τα τρία *pmrA*, γονίδια *pmrB* και *pmrC*. Το πρόγραμμα ξεκινούσε στους 95°C για 5 λεπτά και ακολουθούσαν 35 κύκλοι όπου ο καθένας από τους οποίους περιελάμβανε 30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία αποδιάταξης (95°C) , 30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητικών μορίων στο DNA στόχο (60°C) και 2 λεπτά σε θερμοκρασία επέκτασης των νεοσυντιθέμενων πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων (72°C). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε με ένα τελικό στάδιο στους 72°C για 10 min.

Επιπλέον, επειδή τα στελέχη είχαν αντοχή στις καρβαπενέμες ελέγχθηκαν επίσης για την παρουσία των γονιδίων *bla_{OXA-58}* και *bla_{OXA-23}*.

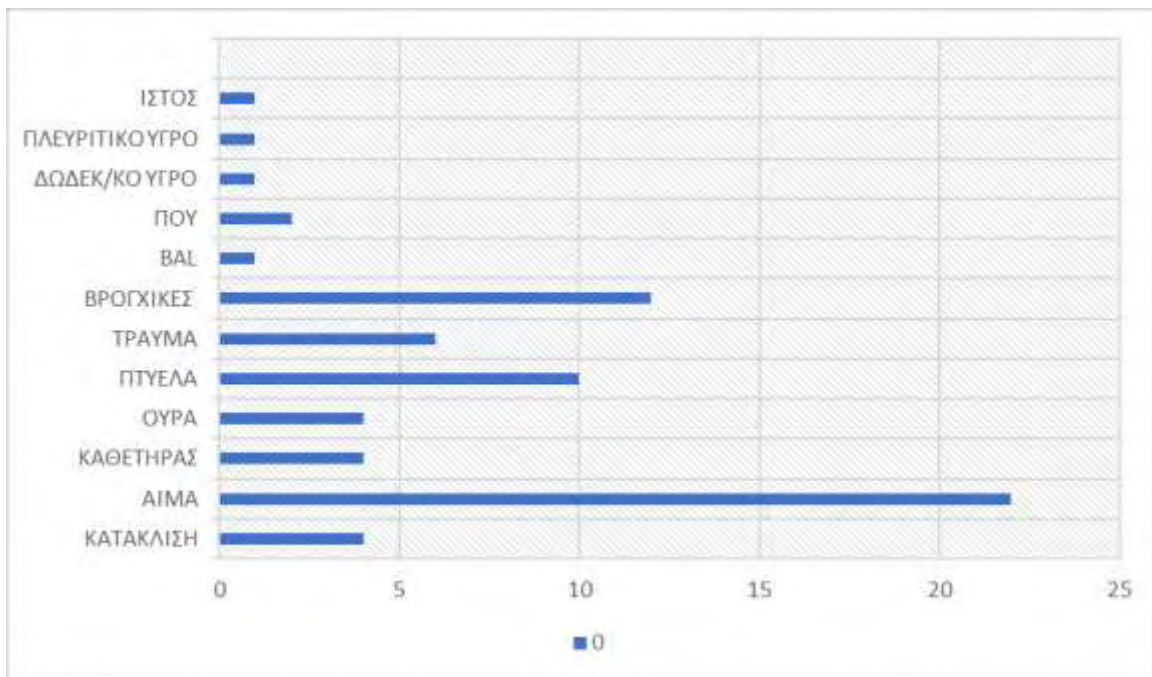
PRIMER NAME	PRIMER SEQUENCES	Amplicons size (bp)	Annealing Temperature
bla-Oxa-23-like F	5'-AAG CAT GAT GAG CGC AAA G-3'	1066	56° C
bla-Oxa-23-like R	5'-AAA AGG CCC ATT TAT CTC AAA-3'		
bla-Oxa-58-F	5'-TTA TCA AAA TCC AAT CGG C-3'	934	56° C
bla-Oxa-58-R	5'-TAA CCT AAA CTT CTA ATT C-3'		

Πίνακας 7 : οι primers και οι αλληλουχίες τους κατά τους Queenan & Bush, 2007 – Higgins et al. 2010.

Τα προγράμματα που χρησιμοποιήσαμε στην PCR τόσο για το *bla-OXA-58* όσο και για το *bla-Oxa-23-like* ήταν το ίδιο. Το πρόγραμμα ξεκινούσε στους 94°C για 5 λεπτά και ακολουθούσαν 35 κύκλοι όπου ο καθένας από τους οποίους περιελάμβανε 1 λεπτό σε θερμοκρασία αποδιάταξης (94°C), 1 λεπτό σε θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητικών μορίων στο DNA στόχο (56°C) και 1 λεπτό σε θερμοκρασία επέκτασης των νεοσυντιθέμενων πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων (72°C). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε με ένα τελικό στάδιο στους 72°C για 5 λεπτά.

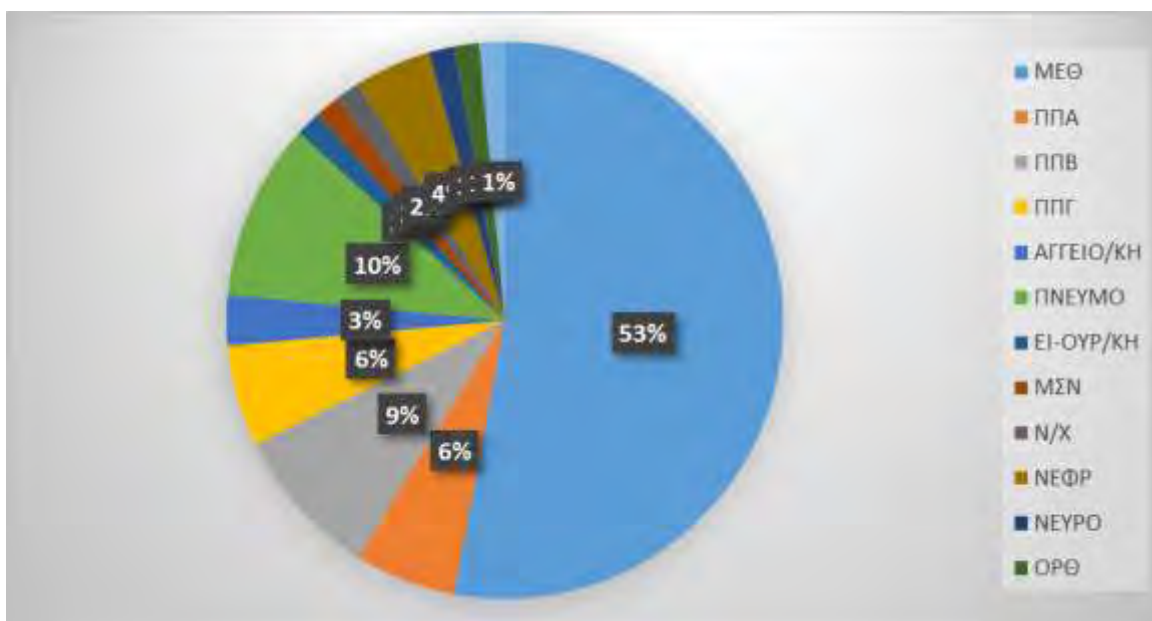
E. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν κλινικά δείγματα της περιόδου Ιανουάριος 2014 έως τον Ιανουάριο 2015 του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Τα 77 στελέχη που επιλέχθηκαν, ήταν πολυανθεκτικά (αμινογλυκοσίδες, καρβαπενέμες, κινολόνες, τετρακυκλίνες) και ταυτόχρονα ανθεκτικά στην κολιστίνη (τιμές MIC στην κολιστίνη ≥ 64 mg/L) και είχαν ταυτοποιηθεί με το σύστημα VITEK*2 (bioMerieux, Inc.) όπου και προσδιορίστηκε και η ευαισθησία τους. Τα δείγματα αυτά πάρθηκαν από : αίμα, ούρα, βρογχικές εκκρίσεις, πτύελα, πύο τραύματος, βιολογικά υγρά (πλευριτικό, δωδεκαδακτυλικό), καθετήρες (αρτηριακοί, περιτοναϊκοί, φλεβικοί) και ιστούς. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 1, οι πλειοψηφία των βακτηρίων *A.baumannii* απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν στο αίμα, έπειτα οι βρογχικές εκκρίσεις και σε μικρότερα ποσοστά να ακολουθούν στα πτύελα, πύο τραύματος, βιολογικά υγρά, καθετήρες και ιστούς.



Διάγραμμα 1 : Τα δείγματα στα οποία απομονώθηκε το βακτήριο *A.baumannii*.

Τα δείγματα από τα οποία απομονώθηκαν τα βακτήρια *A.baumannii* προήλθαν κυρίως από ασθενείς που νοσηλεύονταν στην Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ) του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 2. Σημαντικά επίσης ήταν και τα ποσοστά των βακτηρίων που απομονώθηκαν από ασθενείς της Πνευμονολογικής και της Παθολογικής Κλινικής του Νοσοκομείου.



Διάγραμμα 2 : Οι κλινικές του Π.Γ.Ν.Λάρισας όπου ανιχνεύθηκε πιο συχνά το *A.baumannii*.

Αρχικά στα βακτήρια *A.baumannii* που ταυτοποιήθηκαν έγινε έλεγχος ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά : αμικασίνη, αμπικιλίνη/σουλβακτάμη, σιπροφλοξασίνη, γενταμυκίνη, ιμιπενέμη, μεροπενέμη, τιγκεκυκλίνη, σεφοταξίνη και κολιστίνη. Η πλειοψηφία των MICs των ελεγχθέντων στελεχών *A.baumannii* κυμαίνονταν μεταξύ των ορίων που θέτει η CLSI για τα ανθεκτικά στελέχη για τους περισσότερους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Οι επικρατούσες τιμές MIC για τα υπό μελέτη στελέχη ήταν: στην κολιστίνη ήταν ανθεκτικά με τιμές MIC 3-256, για την αμικασίνη τα περισσότερα δείγματα ήταν ανθεκτικά με τιμή ≥ 64 , για την τιγκεκυκλίνη τα περισσότερα δείγματα ήταν ενδιάμεσης ευαισθησίας και για την μεροπενέμη και την ιμιπενέμη τα περισσότερα ήταν ανθεκτικά με τιμή ≥ 16 .

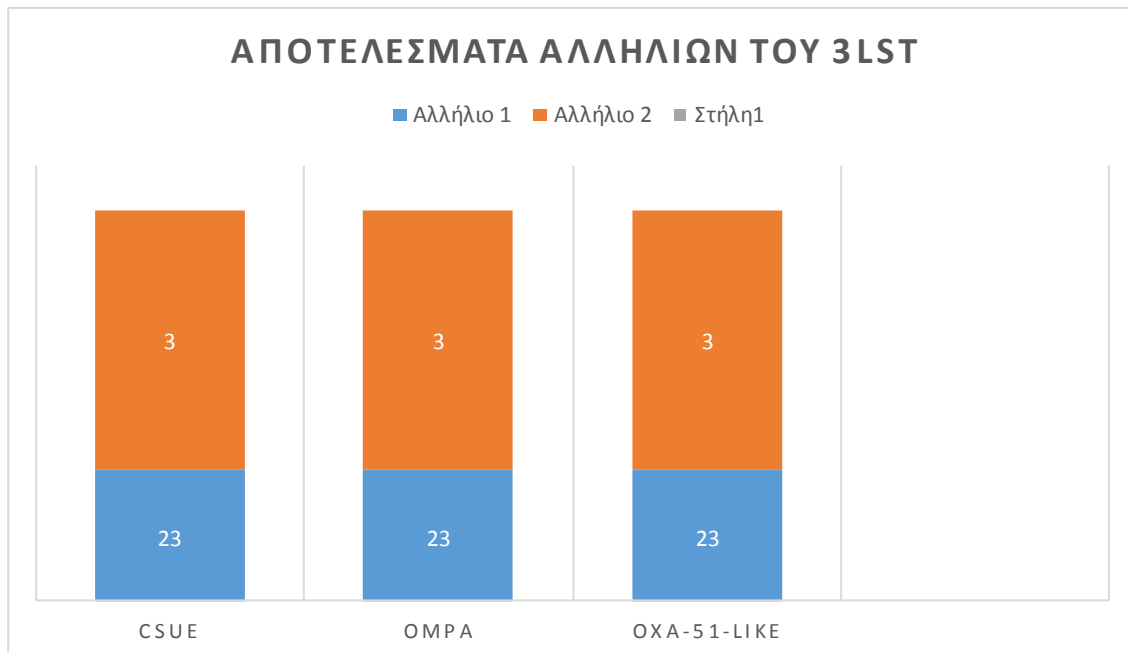
Ακολουθήσαμε την τυποποίηση των στελεχών με βάση το σχήμα Tourton και του ινστιτούτου Pasteur με τη μέθοδο 31st.

Τα αποτελέσματα που πήραμε για τους ST (Sequence Types) αφορούν την ομάδα με ST101, σχεδόν όλα τα δείγματά μας, εκτός από ένα το οποίο ανήκε στο ST201. Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με τη χρήση του προγράμματος MEGA version 6. Η σύγκριση των αλληλίων μετά την αλληλούχηση έγινε στη βάση δεδομένων BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα μας, συναντήσαμε τα ήδη γνωστά ST101 και ST201 που συναντάμε στην ευρύτερη περιοχή της Ελλάδας. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας φαίνονται στα διαγράμματα 4 και 5. Στα διάγραμμα 4 γίνεται κατανοητό πως το 51% των δειγμάτων μας ανήκουν στον τύπο αλληλουχίας με ST101 και το 49% ανήκουν στον τύπο αλληλουχίας με ST201.



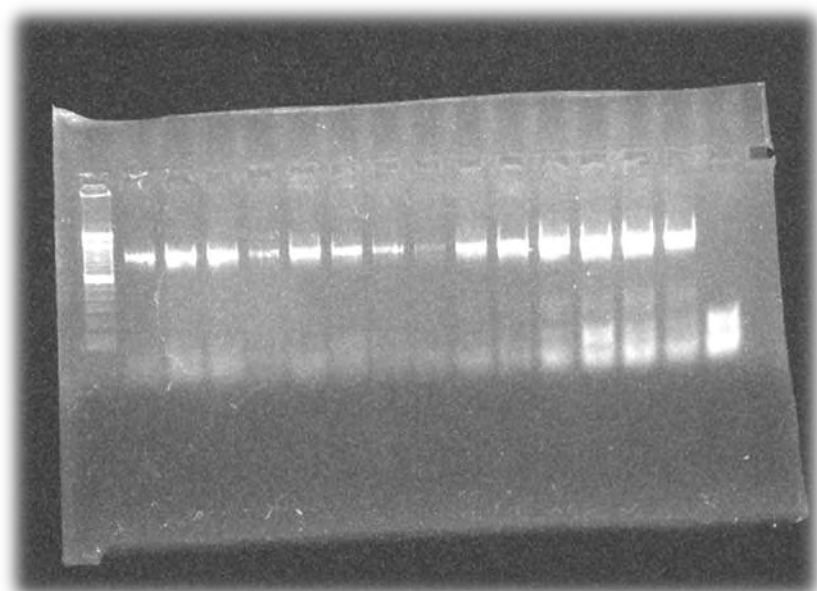
Διάγραμμα 3 : Τα αποτελέσματα που λάβαμε από την εφαρμογή της μεθόδου 31st για τα δείγματά μας.

Στο διάγραμμα 4 φαίνονται τα αποτελέσματα που λάβαμε έπειτα από εφαρμογή της μεθόδου 3lst για τα ompA, csuE και OXA-51-like, μέσω της οποίας κάναμε τυποποίηση μερικών ενδεικτικών στελεχών, όπου προσδιορίσαμε πως τα περισσότερα δείγματά μας φέρουν το αλληλίο 1 στο οποίο και αντιστοιχεί το ST101 και λιγότερα στο αλληλίο 2 όπου και αντιστοιχεί στο ST201.

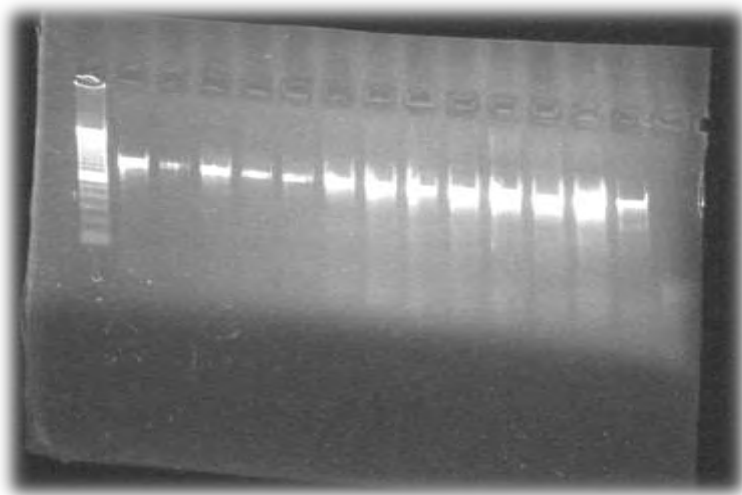


Διάγραμμα 4 : Τα αποτελέσματα που πήραμε από την εφαρμογή της μεθόδου 3lst για τα ompA, csuE και OXA-51-like.

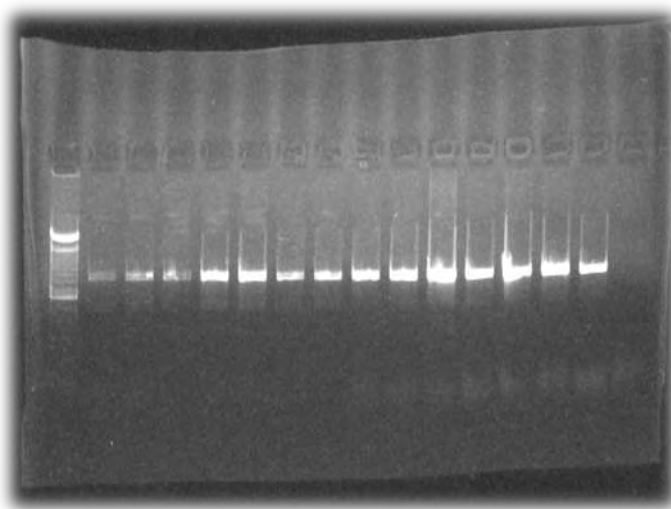
Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης για τα γονίδια του 3lst.



Εικόνα 11 : το csuE, όπου φαίνεται πως το προϊόν που έχουμε πάρει μετά από την PCR είναι γύρω στις 800 βάσεις όπως ήταν αναμενόμενο.



Εικόνα 12 : το *ompA*, όπου φαίνεται πως το προϊόν που λάβαμε μετά την PCR είναι γύρω στις 800 βάσεις όπως ήταν αναμενόμενο.



Εικόνα 13 : το OXA-51-like, όπου φαίνεται πως το προϊόν που λάβαμε μετά την PCR είναι γύρω στις 800 βάσεις όπως ήταν αναμενόμενο.

Η αλληλούχιση των *pmrCAB* γονιδίων ανίχνευσε δύο διαφορετικά πρότυπα αμινοξικών μεταλλαγών, τα οποία δεν υπήρχαν στο ATCC 17978 στελέχος, (i) PmrB:A138T + A226V + A444V; PmrC:F150L + I212V + R332K + A354S + K515T (πρότυπο A; GenBank accession number KR024312) μεταξύ των κολιστίνη-ευαίσθητων ST101 *A. baumannii* και (ii) PmrA:G54E; PmrB:A138T + A226V + A444V; PmrC:R109H + F150L + I212V + R332K + A354S + K515T (πρότυπο B; GenBank accession number KR024313) μεταξύ των κολιστίνη-ανθεκτικών ST101 *A. baumannii*. Το παραπάνω εύρημα προφανώς υποδηλώνει την ανάμιξη των PmrA: G54E και PmrC: R109H μεταλλαγών στην ανάπτυξη αντοχής στη κολιστίνη των στελεχών *A. baumannii* που ανήκουν στον κλώνο ST101. Καμία από τις μεταλλαγές που ανιχνεύθηκαν στα *pmrCAB* γονίδια δεν έχουν αναφερθεί προηγουμένως. Όλα τα στελέχη ήταν θετικά για *bla*_{OXA-23}.

a/a	ΔΕΙΓΜΑ	ΚΛΙΝΙΚΗ	ΗΜΕΡ/ΝΙΑ	3LST	bla_{ompA}	bla_{csnE}	bla_{OXA-51-}	bla_{OXA-23}	bla_{OXA-58}	PmrA	PmrC	MIC Col
4936	Αίμα	ΜΕΘ	22/1/14	201	2	2	2	POS	NEG	G54E	R109H	16 mg/L
5117	Κατάκλιση	ΠΠΑ	26/4/14	101	1	1	1	POS	NEG	G54E	R109H	4 mg/L
5289	Αίμα	ΜΕΘ	28/5/14	201	2	2	2	NEG	NEG	G54E	R109H	16 mg/L
5740	Βρογχικές	ΜΕΘ	17/9/14	101	1	1	1	POS	NEG	G54E	R109H	16 mg/L
5836	Αίμα	ΜΕΘ	6/10/14	101	1	1	1	POS	NEG	G54E	R109H	4 mg/L
5853	Καθετήρας	ΜΕΘ	7/10/14	101	1	1	1	POS	NEG	G54E	R109H	16 mg/L
5857	Τραύμα	ΜΕΘ	8/10/14	101	1	1	1	POS	NEG	G54E	R109H	12 mg/L
5887	Αίμα	N/X	9/10/14	201	2	2	2	NEG	NEG	G54E	R109H	3 mg/L
5891	Αίμα	ΜΕΘ	13/10/14	101	1	1	1	POS	NEG	G54E	R109H	256 mg/L
5889	Βρογχικές	ΜΕΘ	13/10/14	101	1	1	1	POS	NEG	G54E	R109H	24 mg/L
5898	Βρογχικές	ΜΕΘ	14/10/14	101	1	1	1	POS	NEG	G54E	R109H	8 mg/L

5918	Ούρα	ΠΠΒ	18/10/14	101	1	1	1	POS	NEG	G54E	R109H	32 mg/L
5941	Δωδεκ/κο υγρό	ΠΠΒ	21/10/14	101	1	1	1	POS	NEG	G54E	R109H	32 mg/L
6053	Αίμα	ΜΕΘ	11/11/14	101	1	1	1	POS	NEG	G54E	R109H	32 mg/L
6063	Τραύμα	ΝΕΦΡ	12/11/14	101	1	1	1	POS	NEG	G54E	R109H	32 mg/L
6158	Ιστός	ΟΡΘ	28/11/14	101	1	1	1	POS	NEG	G54E	R109H	16 mg/L
6264	Τραύμα	ΑΓΓΕΙ ΟΧ	16/12/14	101	1	1	1	POS	NEG	G54E	R109H	8 mg/L
6365	Αίμα	ΜΕΘ	9/1/15	101	1	1	1	POS	NEG	G54E	R109H	32 mg/L
6396	Βρογχικές	ΜΕΘ	15/1/15	101	1	1	1	POS	NEG	G54E	R109H	32 mg/L
6426	Πτύελα	ΟΓΚΟ/ ΚΗ	21/1/15	101	1	1	1	POS	NEG	G54E	R109H	24 mg/L
6445	Πτύελα	ΠΝΕΥ Μ	26/1/15	101	1	1	1	POS	NEG	G54E	R109H	48 mg/L
6457	Βρογχικές	ΜΕΘ	27/1/15	101	1	1	1	POS	NEG	G54E	R109H	16 mg/L
6473	Πτύελα	ΠΝΕΥ Μ	30/1/15	101	1	1	1	POS	NEG			16 mg/L

5775	Αίμα	ΠΠΒ	19/9/14	101	1	1	1			-	-	<=0.5 mg/L
5791	Αίμα	ΜΕΘ	23/9/14	101	1	1	1			-	-	<=0.5 mg/L
5794	Βρογχικές	ΜΕΘ	29/9/14	101	1	1	1			-	-	<=0.5 mg/L
5796	Βρογχικές	ΜΕΘ	29/9/14	101	1	1	1			-	-	<=0.5 mg/L
5854	Αίμα	ΜΕΘ	6/10/14	201	2	2	2			-	I42V, I115V, L150F	<=0.5 mg/L
5885	Βρογχικές	ΜΕΘ	11/10/14	101	1	1	1			-	-	<=0.5 mg/L

Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα των πειραμάτων μας σε ενδεικτικά δείγματα φαίνονται στον παραπάνω πίνακα .

ΣΤ. Συζήτηση.

Σήμερα δεδομένης της ολοένα αυξανόμενης αντοχής στα αντιβιοτικά επανεισήχθη η χρήση της κολιστίνης. Η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα αυτού του αντιβιοτικού αμφισβητήθηκε κατά το παρελθόν, με αποτέλεσμα τον περιορισμό της χρήσης του.

Το βακτήριο *A.baumannii* είναι ένα ιδιαίτερος παθογόνο βακτήριο το οποίο σχετίζεται με την υψηλού βαθμού αντοχή στα περισσότερα αντιμικροβιακά φάρμακα και με δυνατότητα επιβίωσης και διασποράς στο νοσοκομειακό περιβάλλον. Οι καρβαπενέμες θεωρούνται τα ιδανικότερα φάρμακα για την θεραπεία των λοιμώξεων που προκαλούνται από το βακτήριο *A.baumannii* και για το λόγο αυτό υπάρχει μεγάλη ανησυχία για την εμφάνιση πολυανθεκτικών στελεχών στη χρήση των καρβαπενεμών.

Η κολιστίνη ως η τελευταία επιλογή θεραπείας των MDR *A.baumannii*, έλαβε μεγάλη προσοχή τα τελευταία χρόνια. Δυστυχώς, ωστόσο, άρχισε η περιγραφή σε όλο τον κόσμο ανθεκτικών στελεχών ακόμα και στην κολιστίνη. Τα υψηλότερα επίπεδα αντοχής περιγράφηκαν στην Ασία και έπειτα ακολουθεί η Ευρώπη. Ο μηχανισμός αντοχής ακόμα δεν είναι ξεκάθαρος αλλά κάποιες ερευνητικές μελέτες επιβεβαιώνουν ότι πιθανόν οφείλεται στην απώλεια του LPS ή/και του *PmrAB* συστήματος δύο-συστατικών (91). Επίσης, η μελέτη των *Moffat et al.* παρουσιάζει ότι η αντοχή στη κολιστίνη μεσολαβείται από την απώλεια του LPS και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη ευαισθησία σε άλλα κλινικά αντιβιοτικά. Αυτή η ευαισθησία που αναδύεται σε άλλα αντιβιοτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πρόγραμμα συνδυαστικής αντιβιοτικής θεραπείας περιλαμβάνοντας και την κολιστίνη ως δεύτερο αντιβιοτικό, όπου θα δρα κατά της αντοχής στη κολιστίνη στα κύτταρα που εμφανίζουν ανεπάρκεια στο LPS. Τέτοιου είδους στρατηγική μπορεί τελικά να επιμηκύνει την χρήση της κολιστίνης ως αποτελεσματικού αντιμικροβιακού αντιβιοτικού κατά των MDR *A.baumannii* (91).

Σε προηγούμενες μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η αντοχή στην κολιστίνη σχετίζεται με μεταλλάξεις στο γονίδιο *PmrB*. Στα στελέχη της εργασίας μας, η αντοχή στην κολιστίνη συσχετίστηκε με τις μεταλλάξεις στα γονίδια των *PmrA* και *PmrC*. Ωστόσο, είναι απαραίτητη επιπλέον διερεύνηση για να αποδειχθεί η συμμετοχή του G54E (*PmrA*) και του R109H (*PmrC*) στην αντικατάσταση των αμινικών οξέων που σχίζονται με την ανάπτυξη της ανθεκτικότητας στην κολιστίνη του *A.baumannii*, και στις τελευταίες αντικαταστάσεις στη μετατροπή των συστατικών του λιπιδίου A.

Η γενετική τυποποίηση των στελεχών *Acinetobacter baumannii* έχει αναδείξει ότι παρ'όλη τη γενετική ποικιλομορφία που υπάρχει σε αυτά, οι νοσοκομειακές επιδημίες που προκύπτουν από το συγκεκριμένο μικρόβιο οφείλονται σε παγκόσμιο επίπεδο στην επικράτηση ενός περιορισμένου αριθμού ευρέως διαδεδομένων κλώνων. Στην παρούσα εργασία τα στελέχη

που επικράτησαν ήταν αυτά με ST101 που ανήκουν στον κλώνο CC2 και ένα μόνο στέλεχος με ST201 που ανήκει στον κλώνο CC1. Οι CC1 και CC2 κλώνοι ανήκουν στους δύο από τους τρεις Ευρωπαϊκούς κλώνους, οι οποίοι έχουν μετονομαστεί και σε International-clones. Μέσα από μελέτες των τελευταίων δεκαετιών προκύπτει ότι η πλειοψηφία των στελεχών *A.baumannii* που είναι υπεύθυνες για τα κρούσματα λοιμώξεων, ανήκουν κατά αποκλειστικότητα στους διεθνής κλώνους CC1 και CC2. Οι MLST γονότυποι θεωρούνται ότι φέρουν ένα συγκεκριμένο γονιδίωμα το οποίο παραμένει σταθερό καθ'όλη την εξελικτική διαδικασία καθώς επίσης φέρουν και ένα συμπληρωματικό γονιδίωμα στο οποίο συνήθως εμπεριέχονται οι περισσότεροι μηχανισμοί αντοχής όπου υφίστανται μεγάλη εξελικτική πίεση. Συνεπώς, είναι μεγάλη η ανάγκη της συνεχούς τυποποίησης των κυρίαρχων κλώνων για την ανεύρεση νέων ισοτύπων με ιδιαίτερη γονιδιακή, φαινοτυπική ταυτότητα επαναπροσδιορίζοντας τη γεωγραφική τους κατανομή. Ο κλώνος που συναντάται πιο συχνά στην Ελλάδα είναι ο CC2. Ωστόσο στη μελέτη μας δεν τυποποιήθηκαν στελέχη να ανήκουν στον κλώνο CC3. Επίσης μπορούμε να υποθέσουμε ότι κάτω από εκλεκτική πρόωθηση της κολιστίνης ο κλώνος με ST101 μπορεί να παρουσιάσει ανθεκτικότητα και έπειτα να μεταδοθεί από ασθενή σε ασθενή.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ :

1. Στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας αναδύθηκαν κολιστίνη πολυανθεκτικά στελέχη *A.baumannii*.
2. Τα στελέχη είχαν αντοχή σε καρβαπενέμες που οφειλόταν στην παραγωγή της OXA-23 καρβαπενεμάσης και ανήκαν κυρίως στον παγκόσμιο κλώνο ST101.
3. Η αντοχή στην κολιστίνη των στελεχών που μελετήθηκαν οφειλόταν σε μεταλλάξεις στα γονίδια *pmrA* και *pmrC*, ενώ δεν ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο *pmrB*.

ΠΗΓΕΣ –ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Αρσένη-Εμμανουηλίδου Α. Neisseriaceae II. Στο βιβλίο : Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διάγνωση Λοιμώξεων. Ζήτα Ιατρικές Εκδόσεις, (1994), σελ.216-232.
2. Κυριαζής Ι.Δ, Καμπούρης Μ.Ε, Πουλάς Κ, Πατρινός Γ.Π (2014). Μοριακές τεχνικές για την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό μικροοργανισμών. Archives of Hellenic Medicine 32(1):23-40.
3. Μανιάτης Α. Ψευδομονάδες –Αερομονάδες – Πλεσιομονάδες _Acinetobacter. Στο βιβλίο Ιατρική Μικροβιολογία των Αντωνιάδης Α, Αντωνιάδης Γρ, Λεγάκης Ν.Ι, Τσελέντης Ι. Εκδόσεις Πασχαλίδη Π.Χ (Αθήνα 1999), σελ.121-129.
4. Actis L.A, Tolmasky M.E, Crosa L.M and Crosa J.H (1993). Effect of iron-limiting conditions on growth of clinical isolates of Acinetobacter baumannii. J.Clin.Microbiol. 130A:404-405.
5. Adams M.D, Goglin K, Molyneaux N et al. (2008). Comparative genome sequence analysis of multi-drug resistant Acinetobacter baumannii. J.Bacteriol. 190:8053-8064.
6. Adams M.D, Nickel G.C, Bajaksouzian S et al. (2009). Resistance to colistin in Acinetobacter baumannii associated with mutations in the PmrAB two-component system. Antimicrob. Agents Chemothe. 53:3628-3634.
7. Al-Sweigh N.A, Al-Hubail M.A and Rotimi V.O (2011). Emergence of tigecycline and colistin resistance in Acinetobacter species isolated from patients in Kuwait hospitals. J.Chemother. 23:13-16.
8. Altschul S.F, Gish W, Miller W, Myers E.W, Lipman D.J (1990). Basic local alignment search tool. J.Mol.Biol. 215:403-410.
9. Anstey N.M, Currie B.J, Withnall K.M (1993). Community-acquired Acinetobacter pneumonia in the Northern Territory of Australia. Clin.Infect.Dis. 17:820-821.
10. Avril J.L, Mesnard R (1991). Factors influencing the virulence of Acinetobacter in : Towner K.J, Bergogne-Berezin E and Fewson C.A (ed), The biology of Acinetobacter. Plenum Publishing Corp, New York, pp77-82.
11. Barnett M, Bushby S.R, Wilkinson S (1964). Sodium sulphomethyl derivatives of polymyxins. Br.J.Pharmacol. 23:552-574.
12. Baumann P, Doudoroff M and Stanier R.Y (1968). A study of the Moraxella group.II. Oxidative-negative species (genus Acinetobacter). J.Bacteriol. 95:1520-1541.
13. Beceiro A1, Llobet E, Aranda J, Bengoechea JA, Doumith M, Hornsey M, Dhanji H, Chart H, Bou G, Livermore DM, Woodford N (2011). Phosphoethanolamine modification of lipid A in colistin-resistant variants of Acinetobacter baumannii mediated

- by the *pmrAB* two-component regulatory system. *Antimicrob.Agents Chemother.* 55(7):3370-3379.
14. Beijerinck M (1911) Pigmenten als oxydatieproducten gevormd door bacterien. *Vesrl. Koninklijke Akad.Wetensch. Amsterdam* 19:1092-1103.
 15. Bergogne-Berezin E, Joly-Guillou M.L (1991). Hospital infection with *Acinetobacter* sp: an increasing problem. *J.Hosp.Infect.* 18(Suppl.A):250-255.
 16. Bergogne-Berezin E and Towner K.J (1996) *Acinetobacter* spp. as Nosocomial Pathogens : Microbiological, Clinical and Epidemiological Features. *Clin.Microbiol.Reviews* 9(2):148-165.
 17. Betrosian A.P, Frantzeskaki F, Xanthaki A, Douzinas E.E (2008). Efficacy and safety of high-dose ampicillin/sulbactam vs. colistin as monotherapy for the treatment of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia. *J.Infect.* 56:432-436.
 18. Beveridge E.G, Martin A.J (1967). Sodium sulphomethyl derivatives of polymyxins. *Br.J.Pharmacol.Chemother.* 29(2):125-135.
 19. Bonome R.A and Szabo D (2006). Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin.Infect.Dis.* 43:549-556.
 20. Bouvet P.J and Grimont P.A (1986) Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov., and emended description of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 36:228-240.
 21. Breslow J.M, Monroy M.A, Daly J.M, Meissler J.J, Gaughen J, Adler M.W and Eisenstein T.K (2011). Morphine, but no trauma, sensitizes to systemic *Acinetobacter baumannii* infection. *J.Neuroimmune Pharmacol.* 6:551-565.
 22. Brisou J and Prevot A.R (1954) Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Achromabacter* group. *Ann.Inst.Pasteur (Paris)* 86:722-728.
 23. Brown J.M, Dorman D.C, Roy L.P (1970). Acute renal-failure due to overdosage of colistin. *Med.J.Aust.* 2(20):923-924.
 24. Buxton A.E, Anderson R.L, Werdegard D, Atlas E (1978). Nosocomial respiratory tract infection and colonization with *Acinetobacter calcoaceticus* : epidemiologic characteristics. *Am.J.Med.* 65:507-513.
 25. Cai Y, Chai D, Wang R, Liang B and Bain N (2012). Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii* : clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *J.Antimicrob.Chemother.* 67:1607-1615.

26. Camarena L, Bruno V, Euskirchen G, Poggio S and Snyder M (2010). Molecular mechanisms of ethanol-induced pathogenesis revealed by RNA-sequencing. *PLOS Pathog.* 6:e1000834.
27. Castle M, Tenney J.H, Weinstein M.P and Eickhoff T.C (1978). Outbreak of a multiply resistant *Acinetobacter* in a surgical intensive care unit : epidemiology and control. *Heart Lung.* 7:177-182.
28. Catchpole C.R, Andrews J.M, Brenwald N, Wise R (1997). A reassessment of the in-vitro activity of colistin sulphomethate sodium. *J.Antimicrob.Chemother.* 39(2):255-260.
29. Centers for Disease Control and Prevention (2004). *Acinetobacter baumannii* infections among patients at military medical facilities treating injured US service members 2002-2004. 53:1063-1066.
30. Chang W.N, Lu C.H, Huang C.R and Chuang Y.C (2000). Community-acquired *Acinetobacter meningitis* in adults. *Infection.* 28:395-397.
31. Chen C.C Feingold D.S (1972). Locus of divalent cation inhibition of the bactericidal action of polymyxin B. *Antimicrob.Agents Chemother.* 2:331-335.
32. Choi C.H, Lee E.Y, Lee Y.C, Park T.I, Kim H.J, Hyun S.H, Kim S.A, Lee S.K and Lee J.C (2005). Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cell Microbiol.* 7:1127-1138.
33. Choi J.Y, Kim C.O, Park Y.S, Yoon H.J, Shin S.Y, Kim Y.K et al. (2006). Comparison of efficacy of cefoperazone/sulbactam and imipenem/cilastatin for treatment of *Acinetobacter bacteremia*. *Yonsei Med.J.* 47:63-69.
34. Cisneros J.M, Rodrigues-Bano J, Fernandez-Cuenca F, Ribera A, Vila J, Pasqual A, Martinez-Martinez L, Bou G, Pachon J (2005). Risk-factors for the acquisition of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Spain : a nationwide study. *Clin.Microbiol.Infect.* 11:874-879.
35. *Coly-Mycin M.Parental* [package insert] West Ryde NSW Australia. Pfizer Australia Pty Ltd. (2003).
36. *Coly-Mycin M.Parental* [package insert] Bristol, T.N. Monarch Pharmaceuticals (2005).
37. Conway S.P, Pond M.N, Watson A, Etherington C, Robey H.L, Goldman M.H (1997). Intravenous colistin sulphomethate in acute respiratory exacerbations in adult patients with cystic fibrosis. *Thorax.* 52(11):987-993.
38. Cunningham S, Prasad A, Collyer L, Carr S, Lynn I.B, Wallis C (2001). Bronchoconstriction following nebulised colistin in cystic fibrosis. *Arch.Dis.Child* 84(5):432-433.

39. Decolin D, Leroy P, Nicolas A, Archimbault P (1997). Hyphenated liquid chromatographic method for the determination of colistin residues in bovine tissues. *J.Chromatogr.Sci.* 35(12):557-564.
40. Diancourt L, Passet V, Nemec A, Dijkshoorn L and Brisse S (2010). The population structure of *Acinetobacter baumannii* : expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS ONE.* 5:e10034.
41. Dijkshoorn L, Nemec A and Seifert H (2007). An increasing threat in hospitals : multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat.Rev.Microbiol.* 5:939-951.
42. Dixon R.A, Chopra I (1986). Leakage of periplasmic proteins from *Escherichia coli* mediated by polymyxin B nonapeptide. *Antimicrob.Agents Chemother.* 29:781-788.
43. Echenique J.R, Arienti H, Tolmasky M.E, Read R.R, Staneloni R.J, Crosa J.H, Actis L.A (1992). Characterization of a high-affinity iron transport system in *Acinetobacter baumannii*. *I.Bacteriol.* 174:7670-7679.
44. Escartin P, Rodriguez-Montes J.A, Cuervas-Mons V et al. (1982). Effect of colistin on reduction of biliary flow induced by endotoxin in *E.coli*. *Dig.Dis.Sci.* 27:875-879.
45. Falagas M.E and Kasiakou S.K (2005). Colistin : The revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Clin.Infect.Dis.* 40:1333-1341.
46. Falagas M.E, Karveli E.A, Kelesidis I and Kelesidis T (2007). Community-acquired *Acinetobacter* infections. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* 26:857-866.
47. Falagas M.E, Karveli E.A, Siempos I.I, Vardakas K.Z (2008). *Acinetobacter* infections : a growing threat for critically ill patients. *Epidemiol.Infect.* 136:1009-1019.
48. Falagas M.E and Rafailidis P.I (2007). Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii* : no longer a controversial issue. *Crit.Care.* 11:134.
49. Falagas M.E and Rafailidis P.I (2009). Nephrotoxicity of colistin : new insight into an old antibiotic. *Clin.Infect.Dis.* 48:1729-1731.
50. Gales A.C, Reis A.O, Jones R.N (2001). Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin : review of available interpretative criteria and quality control guidelines. *J.Clin.Microbiol.* 39(1):183-190.
51. Gardiner K.R, Erwin P.J, Anderson N.H et al. (1995). Lactulose as an antiendotoxin in experimental colitis. *Br.J.Surg.* 82:469-472.
52. Hancock R.E, Chapple D.S (1999). Peptide antibiotics. *Antimicrob.Agents Chemother.* 43:1317-1323.
53. Harrington B G, (1997). Letter. *Clin.Microbial.News* 19:191.

54. Henry R, Vithanage N, Harrison et al. (2012). Colistin-resistant, lipopolysaccharide-deficient *Acinetobacter baumannii* responds to lipopolysaccharide loss through increased expression of genes involved in the synthesis and transport of lipoproteins, phospholipids, and poly- β -1,6-N-acetylglycosamine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:59-69.
55. Higgins P.G, Wisplinghoff H, Krut O and Seifert (2007). A PCR-based method to differentiate between *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU. *Clin. Microbiol. Infect.* 13:1199-1201.
56. Hilf M, Yu V.L, Sharp J, Zuravleff J.J, Korvick J.A, Muder R.R (1989). Antibiotic therapy for *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia : outcome correlation in a prospective study of 200 patients. *Am.J.Med.* 87:540-546.
57. Hogardt M, Schmoldt S, Gotzfried M, Adler K, Heesemann J (2004). Pitfalls of polymyxin antimicrobial susceptibility testing of *pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients. *J.Antimicrob.Chemother.* 54(6):1057-1061.
58. Howard A, O'Donoghue M, Feeney A and Sleator R.D (2012). *Acinetobacter baumannii*. An emerging opportunistic pathogen. *Virulence* 3:3, 24-250.
59. Hsueh P.R, Teng L.J, Chen C.Y et al. (2002). Pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii* causing nosocomial infections in a university hospital, Taiwan. *Emerg.Infect.Dis.* 8(8):827-832.
60. Imperi F, Antunes L.C, Blom J, Villa L, Iacono M, Visca P and Carattoli A (2011). The genomics of *Acinetobacter baumannii* : insights into genome plasticity, antimicrobial resistance and pathogenicity. *IUBMB.* 63:1068-1074.
61. Iwashkiw J.A, Seper A, Weber B.S et al. (2012). Identification of a general O-linked protein glycosylation system in *Acinetobacter baumannii* and its role in virulence and biofilm formation. *PLoS Pathog.* 8:e1002758.
62. Jacobs A.C, Hood I, Boyd K.L, Olson P.D, Morrison J.M, Carson S, Sayood K, Iwen P.C, Skaar E.P and Dunman P.M (2010). Inactivation of phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. *Infect.Immun.* 78:1952-1962.
63. Jacobs A.C, Sayood K, Olmsted S.B, Blanchard C.E, Hinrichs S, Russell D and Dunman P.M (2012). Characterization of the *Acinetobacter baumannii* growth phase-dependent and serum responsive transcriptomes. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* 64:403-412.
64. Jimenez-Mejias M.E, Pichardo-Guerrero C, Marquez-Rivas F.J, Martin-Lozano D, Prados T, Pachon J (2002). Cerebrospinal fluid penetration and pharmacokinetic/pharmacodynamics parameters of intravenously administered colistin in

- a case of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* meningitis. *Eur.J.Clin.Microbiol.* 21(3):212-214.
65. Joly-Gouillou M.L (2005). Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clin.Microbiol.Infect.* 11:868-873.
66. Jones R.N, Anderegg T.R, Swenson J.M and The Quality Control Working Group (2005). Quality control guidelines for Testing Gram-negative control strains with Polymyxin B and Colistin (Polymyxin E) by standardized methods. *J.of Clin.Microbiol.* 43(2):925-927.
67. Joshi S.G, Litake G.M (2013). *Acinetobacter baumannii* : An emerging pathogenic threat to public health. *World J.of Clin.Infect.Dis.* 3(3):25-36.
68. Juni E, (1978). Genetics and physiology of *Acinetobacter*. *Annu.Rev.Microbiol.* 32:349-371.
69. Kaplan N, Rosenberg E, Jann B, Jann K (1985). Structural studies of the capsular polysaccharide of *Acinetobacter calcoaceticus* BD4. *Eur.Biochem.* 52:453-458.
70. Katz E, Demain A.L (1977). The peptide antibiotics of bacillus : chemistry, biogenesis and possible functions. *Bacterial.Rev.* 41(2):449-474.
71. Keen E.F III, Murray C.K, Robinson B.J, Hospenthal D.R, Co E.M and Aldous W.K (2010). Changes in the incidences of multidrug-resistant and extensively drug-resistant organisms isolated in a military medical center. *Infect.Control Hosp.Epidemiol.* 31:728-732.
72. Kempf and Rolain (2012). Emergence of resistance to carbapenems of *Acinetobacter baumannii* in Europe : clinical impact and therapeutic options. *Int.J.Antimicrob.Agents* 39:105-114.
73. Kim U.J, Kim H.K, An J.H, Cho S.K, Park K-H and Jang H-C (2014). Update on the epidemiology, treatment and outcomes of Carbapenem-resistant *Acinetobacter* infections. *Chonnam Med.J.* 50:37-44.
74. Koch-Weser J, Sidel V.W, Federman E.B, Kanarek P, Finer D.C, Eato A.E (1970). Adverse effects of sodium colistimethate. Manifestations and specific reaction rates during 317 courses of therapy. *Ann.Intern.Med.* 72(6):857-868.
75. Koike M, Iida K, Matsuo T (1969). Electron microscopic studies on mode of action of polymyxin. *J.Bacteriol.* 97:448-452.
76. Komura S, Kurahashi K (1979). Partial purification and properties of L-2,4-diaminobutyric acid activation enzyme from polymyxin E producing organism. *J.Biochem.* 84(4):1013-1021.

77. Koyama Y, Kurosasa A, Tsuchiya A, Takakuta K (1950). A new antibiotic “colistin” produced by spore-forming soil bacteria. *J.Antibiot. (Tokyo)* 3:457-458.
78. Lautrop H (1974) *Bergey’s manual of determinative bacteriology*. Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD.
79. Ledson M.J, Gallagher M.J, Cowperhwaite C, Convery R.P, Walshaw M.J (1998). Four years’ experience of intravenous colomycin in an adult cystic fibrosis unit. *Eur.Respir.J.* 12(3):592-594.
80. Lessel E.F (1971) Subcommittee on nomenclature of Moraxella and allied bacteria. *Int.Syst.Bacteriol.* 21:213-214.
81. Levidiotou S, Galanakis E, Vrioni G, Papamichael D, Nakos G, Stefanou D (2002). A multi-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak in a general intensive care unit. *In Vivo.* 16:117-122.
82. Li J, Milne R.W, Nation R.L, Turnidge J.D, Coulthard K (2003). Stability of colistin and colistin methanesulfonate in aqueous media and plasma as determined by high-performance liquid chromatography. *Antimicrob.Agents Chemother.* 47(4):1364-1370.
83. Li J, Coulthard K, Milne R.W et al. (2003). Steady-state pharmacokinetics of intravenous colistin methanesulphonate in patients with cystic fibrosis. *J.Antimicrob.Chemother.* 52(6):987-992.
84. Li J, Milne R.W, Nation R.L, Turnidge J.D, Smeaton T.C, Coulthard K (2004). Pharmacokinetics of colistin methanesulphonate and colistin in rats following an intravenous dose of colistin methanesulphonate. *J.Antimicrob.Chemother.* 53(5):837-840.
85. Li J, Nation R.L, Milne R.W, Turnidge J.D, Coulthard K (2005). Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *Inter.J. of Antimicrob.Ag.* 25:11-25.
86. Lin M-F, Lan C-Y (2014). Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii* : From bench to bedside. *World J.of Clin. Cases* 2(12):787-814.
87. Lopes J, Iniss W.E (1969). Electron microscopy of the effect of polymyxin on *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *J.Bacteriol.* 100:1128-1129.
88. Lortholary O, Fagon J.Y, Buu Hoi A, Slama M.A, Pierre J, Giral P, Rosenzweig R, Gutman L, Safar M, Acar J (1995). Nosocomial acquisition of multiresistant *Acinetobacter baumannii*: risk factors and prognosis. *Clin.Infect.Dis.* 20:790-796.
89. Lounatmaa K, Nanning N (1976). Effect of polymyxin on the outer membrane of *Salmonella typhimurium* :freeze-fracture studies. *J.Bacteriol.* 128:665-667.
90. Maragakis L.L and Perl T.M (2008). *Acinetobacter baumannii* : Epidemiology, antimicrobial resistance and treatment options. *Clin.Infect.Dis.* 46:1254-1263.

91. Markou N, Markantonis S.L, Dimitrakis E et al. (2008). Colistin serum concentrations after intravenous administration in critically ill patients with serious multidrug-resistant, Gram-negative bacilli infections : a prospective, open-label, uncontrolled study. *Clin.Ther.* 30(1):143-151.
92. McConnell M.J, Actis L and Pachon J (2013). *Acinetobacter baumannii* : human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol.Rev.* 37:130-155.
93. McMillan F.H, Pattison I.C (1969). Sodium colistimethate.I.Dissociations of aminomethanesulfonates in aqueous solution. *J.Pharm.Sci.* 58(6):730-737.
94. Mera R.M, Miller L.A, Amrine-Madsen H and Sahm D.F (2010). *Acinetobacter baumannii* 2002-2008 : increase of carbapenem-associated multiclass resistance in United States. *Microb.Drug Resist.* 16:209-215.
95. Moffatt J.H, Harper M, Harrison P, Hale J.D, Vinogradov E, Seemann T et al. (2010). Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob.Agents Chemother.* 54:4971-4977.
96. Moffatt J.H, Harper M, Harrison P, et al. (2011). Insertion sequence ISAbal1 is involved in colistin resistance and loss of polysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob.Agents Chemother.* 55:3022-3024.
97. Nation R.L, Li J (2009). Colistin in the 21st century. *Curr.Opin.Infect.Dis.* 22(6):535-543.
98. Niks M, Hanzen J, Ohlasova D et al. (2004). Multiresistant nosocomial bacterial strains and their “in vitro” susceptibility to chloramphenicol and colistin. *Kiln.Microbiol.InfeKc.Lek.* 10(3):124-129.
99. Oikonomou O, Sarrou S, Papagiannitsis C, Georgiadou S, Mantzarlis K, Zakyntinos E, Dalekos G.N and Petinaki E (2015). Rapid dissemination of colistin and carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* in Central Greece : mechanisms of resistance, molecular identification and epidemiological data. *BMC Infectious Diseases.* 15:559
100. Olaitan A.O, Morand S and Rolain J.M (2014). Mechanisms of polymyxin resistance :acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontier in Microbiology* 643(5):1-18.
101. Oliveira M.S, Prado G.V, Costa S.F, Grinbaum R.S, Levin A.S (2008). Ampicillin/sulbactam compared with polymyxins for the treatment of infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. *J.Antimicrob.Chemother.* 61:1369-1375.
102. Orwa J.A, Govaerts C, Busson R, Roets E, Van S.A, Hoogmartens J (2001). Isolation and structural characterization of colistin components. *J.Antibiot. (Tokyo).* 54(7):595-599.
103. Pantophlet R.A (2008). Lipopolysaccharides of *Acinetobacter*. *Acinetobacter molecular biology* (Gerishker U,ed). Caiser Academic Press, Norfolk, Uk. pp 61-98.

104. Park Y.K, Choi J.Y, Shin D et al. (2011). Correlation between overexpression and amino acid substitution of the PmrAB locus and colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int.J.Antimicrob.Agents*. 37:525-530.
105. Peacock J.E, Sorrell L, Sottile F.D, Price L.E, Rutala W.A (1988). Nosocomial respiratory tract colonization and infection with aminoglycoside-resistant *Acinetobacter calcoaceticus var. anitratus* : epidemiologic characteristics and clinical significance. *Infect.Control Hosp.Epidemiol*. 9:302-308.
106. Pedersen M.M, Marso E, Pickett M.J (1970). Non-fermentative bacilli associated with man.III. Pathogenicity and antibiotic susceptibility. *Am.J.Clin.Pathol*. 54:178-192.
107. Peleg A.Y, Schifert H and Paterson D.L (2008). *Acinetobacter baumannii* : Emergence of a Successful Pathogen. *Clin.Microbiol.Reviews*. 21(3):538-582.
108. Perez F, Hujer A.M, Hujer K.M, Decker B.K, Rather P.N and Bonomo R.A (2007). Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob.Agents and Chemother*. 51(10):3471-3484.
109. Peterson A.A, Hancock R.E, McGroarty E.J (1985). Binding of polycationic antibiotics and polymyxins to lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Bacteriol*. 164:1256-1261.
110. Pines O, Gutnick D (1984). Alternate hydrophobic sites on the cell surface of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1. *FEMS Microbiol.Lett*. 22:307-311.
111. Plachouras D, Karvanen M, Friberg L.E et al. (2009). Population pharmacokinetic analysis of colistin methanesulphonate and colistin after intravenous administration in critically ill patients with infections caused by Gram-negative bacteria. *Antimicrob.Agents Chemother*. 53(8):3430-3436.
112. Pogue J.M, Cohen D.A and Marchain D (2015). Polymyxin-resistant *Acinetobacter baumannii* : Urgent action needed. *Clin.Infect.Dis*. 60(9):1304-1307.
113. Poh C.L, Loh G.K (1985). Enzymatic profile of clinical isolates of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Med.Microbiol.Immunol*. 74:29-33.
114. Pournaras S, Markogiannakis A, Ikonomidis A, Kondyli L, Bethimouti K, Maniatis A.N, Legakis N.J, Tsakris A (2006). Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. *J.Antimicrob.Chemother*. 57:557-561.
115. Rastogi N, Potar M.C, David H.L (1986). Antimycobacterial spectrum of colistin (polymyxin E). *Ann.Inst.Pasteur.Microbiol*. 137A(1):45-53.
116. Rastogi N, Henrotte J.G, David H.L (1987). Colistin (polymyxin E)-induced cell leakage in *Mycobacterium aurum*. *Zentralb.Bakteriol.Microbiol.Hyg.A*. 263(4):548-551.

117. Rastogi N, Potar M.C, Henrotte J.G, Granck G, David H.L (1988). Further studies on colistin (polymyxin E)-induced cell leakage in mycobacteri : Mg⁺⁺ efflux in *Mycobacterium avium* and its effects on drug-susceptibility. *Zentralb.Mikrobiol.Hyg.A.* 268(2):251-258.
118. Reed M.D, Stern R.C, O'Riordan M.A, Blumer J.L (2001). The pharmacokinetics of colistin in patients with cystic fibrosis. *J.Clin.Pharmacol.* 41(6):645-654.
119. Roca I, Espinal P, Vila-Farres X and Vila J (2012). The *Acinetobacter baumannii* oxymoron : commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. *Front.Microbiol.* 3:148.
120. Rodriguez-Bano J, Marti S, Soto S, Fernandez-Cuenca F, Cisneros J.M, Pachon J, Pascual A, Martinez-Martinez L, McQueary C, Actis L.A, Vila J :Spanish Group for the study of Nosocomial infections (GEIH), (2008). *Clin.Microbiol.Infect.* 14:276-278.
121. Rosenberg E, Kaplan N, Pines O, Rosenberg M, Gutnic D (1983). Capsular polysaccharides interfere with adherence of *Acinetobacter calcoaceticus* to hydrocarbon. *FEMS Microbiol.Lett.* 17:157-160.
122. Rosenberg M, Bayer E.A, Delarea J, Rosenberg E (1982). Role of thin fimbriae in adherence and growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane. *Appl.Environ.Microbiol.* 44:929-937.
123. Ryan K.J, Schainuck L.I, Hickman R.O, Striker G.E (1969). Colistimethate toxicity. Report of a fatal case in a previously healthy child. *JAMA.* 207(11):2099-2101.
124. Schindler M, Osborn M.J (1979). Interaction of divalent cations and polymyxin B with lipopolysaccharide. *Biochemistry.* 18:4425-4430.
125. Schreckenberger P.C, Deneshvar M.I, Hollis D.G. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and other nonfermentative Gram-negative rods. In : *Manual of Clinical Microbiology.* Murray P.R, Baron E.J, Jorgesen J.H, Landry M.L, Pfaller M.A. Eds 9th edition (2007), pp 770-802.
126. Skerman V.B.D, McGowan V and Sneath P.H.A (1980). Approved list of bacterial names. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 30:225-420.
127. Smego R.A (1985). Endemic nosocomial *Acinetobacter calcoaceticus* bacteriemia. *Arch.Inter.Med.* 145:2174-2179.
128. Smith A.W, Freeman S, Minett W.G, Lambert P.A (1990). Characterization of a siderophore from *Acinetobacter calcoaceticus*. *FEMS Microbiol.Lett.* 70:29-32.
129. Smolyakov R, Borer A, Riesenber K, Schaeffer F, Alkan M, Purath A et al. (2003). Nosocomial multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection : risk factors and outcome with ampicillin-sulbactam treatment. *J.Hosp.Infect.* 54:32-38.

130. Storm D.R, Rosenthal K.S, Swanson P.E (1977). Polymyxin and related peptide antibiotics. *Annu.Rev.Biochem.* 46:723-763.
131. Struelens M.J, Carlier E, Maes N, Seuys E, Quint W.G.V, and van Belkum (1993). Nosocomial colonization and infection with multiresistant *Acinetobacter baumannii* : outbreak delineation using DAN macrorestriction analysis and PCR-fingerprinting. *J.Hosp.Infect.* 25:15-32.
132. Takigami T, Tani S, Kitamoto O (1962). Clinical trials of colistin. Effect of the oral administration of the colistin on the intestinal bacterial flora. *Jpn.J.Exp.Med.* 32:107-116.
133. Turton et al. (2007). Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter Baumannii*. *Clin.Microb. and Infect.* 13:807-815.
134. Uh J.K, Hee K.K, Joon H.A, Soo K.C, Kyung-Hwa P and Hee-Chang J (2014). Update on the epidemiology, treatment and outcomes of carbapenem-resistant *Acinetobacter* infections. *Chonnam.Med.J.* 50:37-44.
135. Urban C, Segal-Maurer S and Rahal J.J (2003). Consideration in control and treatment of Nosocomial Infections due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin.Infect.Dis.* 36:1268-1274.
136. Valencia R, Arroyo L.A, Conde M, Aldana J.M, Torres M.J, Fernandez-Cuenca F et al. (2009). Nosocomial outbreak of infection with pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care university hospital. *Infect.Control.Hosp.Epidemiol.* 30:257-263.
137. Villegas M.V, Hartstein A.I (2003). *Acinetobacter* outbreaks, 1977-2000. *Infect.Control Hosp. Epidemiol.* 24:284-295.
138. Visca P, Seifert H and Towner K.J (2011). *IUBMB Life.* 63(12):1048-1054.
139. Warren H.S, Kania S.A, Siber G.R (1985). Binding and neutralization of bacterial lipopolysaccharide by colistin nonapeptide. *Antimicrob.Agents Chemother.* 28:107-112.
140. Wisplinghoff H, Perbix W and Seifert H (1999). Risk factors for nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii* : a case-control study of adult burn patients. *Clin.Infect>Dis.* 28:59-66.
141. Yang S.C, Chang W.J, Chang Y.H, Tsai Y.S, Yang T.P, Juan C.W et al. (2010). Prevalence of antibiotics resistance and OXA carbapenemases genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in central Taiwan. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* 29:601-604.
142. Yow E.M, Tan E, Shane L, Schonfeld S, Abu-Nassar H (1961). Colistin (coly-mycin) in resistant bacterial infections. A clinical appraisal. *Arch.Intern.Med.* 108:664-670.