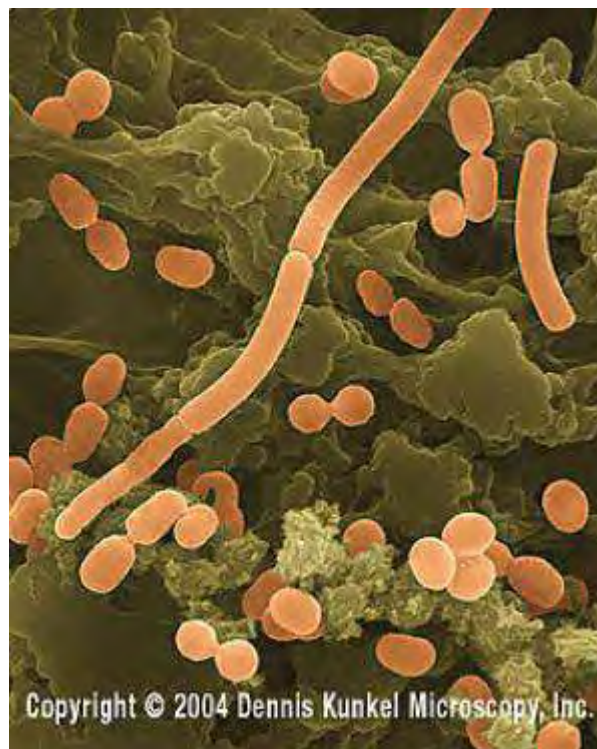


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ – ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής»

**Μοριακή τυποποίηση ενδονοσοκομειακών
στελεχών του *Acinetobacter baumannii***

Λουκία Ποταμιάνου
ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



ΛΑΡΙΣΑ
Οκτώβριος 2013

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	4
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1 Τα βακτήρια του γένους <i>Acinetobacter</i>	6
1.1.1 Μορφολογία	6
1.1.2. Ταξινόμηση	7
1.1.3. Οικολογία	8
1.1.4. Φυσιολογία	9
1.2. <i>Acinetobacter baumannii</i>	10
1.2.1. Κυτταρική δομή	10
1.2.2. Γονιδίωμα.....	10
1.2.3. Πρόσληψη ξένου DNA	11
1.2.4. Ανθεκτικότητα στην αφυδάτωση	12
1.3. Λοιμογόνοι παράγοντες	13
1.3.1. Δημιουργία Βιομεμβράνης	13
1.3.2. Επιφανειακοί πολυσακχαρίτες	13
1.3.3. Πρωτεΐνες εξωτερικής μεμβράνης	14
1.3.4. Κυστίδια εξωτερικής μεμβράνης	14
1.3.5. Υδρολυτικά ένζυμα	15
1.3.6. Παρουσία ξένων νησίδων	15
1.4. Πλαστικότητα γονιδιώματος.....	16
1.4.1. Αλληλουχίες παρεμβολής	16
1.4.2. Ιντεγκρόνια.....	18
1.4.3. Νησίδες ανθεκτικότητας	19
1.5. Ανθεκτικότητα σε διάφορα αντιμικροβιακά φάρμακα.....	22
1.5.1. β-Λακτάμες.....	28
1.5.2. Αμινογλυκοσίδες	34
1.5.3. Κινολόνες.....	35
1.5.4. Πολυμιξίνες	35
1.5.5. Πρωτεΐνες εκροής.....	37
1.6. Μέθοδοι μοριακής τυποποίησης.....	40
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	47
2.1. Καλλιέργεια βακτηρίων	47
2.2. Τεχνική ταυτοποίησης.....	47
2.3. Εξαγωγή του DNA.....	49

2.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction)	50
2.5. Ηλεκτροφόρηση	55
2.6. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR.....	58
2.7. Αλληλούχιση (sequencing)	59
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	64
4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	69
5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	75

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα βακτήρια του γένους *Acinetobacter* είναι γνωστά ήδη από το 1911 όταν ο Beijerinck απομόνωσε τα συγκεκριμένα βακτήρια από χόμα σε εμπλουτισμένο θρεπτικό υλικό με άλατα οξικού ασβεστίου, από όπου προέκυψε και η ονομασία *Micrococcus calcoaceticus*. Μερικές δεκαετίες αργότερα (1954) Οι Brisou και Prevet περιέγραψαν ένα Gram αρνητικό, ακίνητο αζυμωτικό κοκκοβακτηρίδιο, το οποίο επειδή ακριβώς στερούνταν κίνησης του αποδόθηκε η ονομασία *Acinetobacter* που προέρχεται από την ελληνική λέξη "ακίνητο".

Η καθοριστική ανακάλυψη για την μετέπειτα κατανόηση της δράσης των βακτηρίων αυτών έγινε το 1969 όταν οι Juni και Janik εντόπισαν ένα στέλεχος του *Acinetobacter calcoaceticus* ικανό να προσλάβει τμήματα DNA από αποδομημένα βακτηριακά κύτταρα και να τα ανασυνδυάσει στο δικό του χρωμόσωμα. Η παρατήρηση αυτή έδωσε στους επιστήμονες τη δυνατότητα να αρχίσουν να εξηγούν την εμφάνιση πολυανθεκτικών στελεχών σε αντιβιοτικά (Multi Drug Resistant *Acinetobacter baumannii*, MDRAB), καθώς τα τμήματα ξένου DNA περιείχαν και γονίδια ανθεκτικότητας .

Η ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά που παρουσιάζουν τα βακτήρια του γένους *Acinetobacter*, και το *Acinetobacter baumannii* ειδικότερα, δρα κατασταλτικά στη θεραπεία των λοιμώξεων που προκαλούν και τα καθιστά ως επικίνδυνα νοσοκομειακά παθογόνα.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη Διευθύντρια του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Ευθυμία Πετεινάκη, που ήταν επιβλέπουσα της Διπλωματικής μου εργασίας, για τη βοήθειά της καθώς και την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον μεταπτυχιακό φοιτητή Απόστολο Λιακόπουλο και την υποψήφια διδάκτορα Στυλιανή Σάρρου για την πολύτιμη βοήθειά τους.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Τα βακτήρια του γένους *Acinetobacter*

Τα βακτήρια του γένους *Acinetobacter* κατανέμονται ευρέως στη φύση και γενικά θεωρούνται μη παθογόνα σε υγιή άτομα. Ωστόσο, σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς που νοσηλεύονται σε νοσοκομεία μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές, ακόμα και επικίνδυνες για τη ζωή, λοιμώξεις.

1.1.1 Μορφολογία

Τα βακτήρια του γένους *Acinetobacter* είναι Gram αρνητικά, με μέγεθος που κυμαίνεται από 1,0-1,5 μέχρι 1,5-2,5 μm. Το σχήμα τους κατά την λογαριθμική φάση ανάπτυξης είναι ραβδοειδές αλλά κατά τη στατική φάση γίνεται περισσότερο κοκκιώδες (εικόνα 1) (<http://microbewiki.kenyon.edu>).



Εικόνα 1: *Acinetobacter* spp βακτήρια

Τα συγκεκριμένα βακτήρια δεν σχηματίζουν σπόρια. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι δεν διαθέτουν μαστίγια και συνεπώς στερούνται τη δυνατότητα κίνησης. Παρόλο που δεν διαθέτουν μηχανισμούς κίνησης έχει παρατηρηθεί κάποιας μορφής κινητικότητα με τη μορφή σύσπασης και ολίσθησης (<http://en.wikipedia.org/wiki>). Οι αποικίες που σχηματίζουν αυτά τα βακτήρια συνήθως δεν χρωματίζονται, ωστόσο ορισμένα στελέχη μπορούν να δώσουν από λευκές έως μπεζ αποικίες.

1.1.2. Ταξινόμηση

Τα βακτήρια του γένους *Acinetobacter* κατατάσσονται στο φύλο Proteobacteria, στην τάξη Gammaproteobacteria, στην κλάση Pseudomonadales, στην οικογένεια Moraxellaceae και στο γένος *Acinetobacter*. Ενώ το 1968 το γένος περιλάμβανε μόνο ένα είδος, το *Acinetobacter calcoaceticus*, σήμερα στο γένος υπάγονται 32 είδη, εκ των οποίων μόνο τα 21 έχουν ονομαστεί. Τα 32 είδη του γένους *Acinetobacter* που περιγράφονται σήμερα είναι τα εξής (Κατραμάδου 2010):

- *A. baumannii*
- *A. baylyi*
- *A. bereziniae*
- *A. beijerinckii*
- *A. bouvetii*
- *A. calcoaceticus*
- *A. gernerii*
- *A. guillouiae*
- *A. gyllenbergii*
- *A. haemolyticus*
- *A. johnsonii*
- *A. junii*
- *A. lwoffii*
- *A. parvus*
- *A. radioresistens*
- *A. schindleri*
- *A. tjernbergiae*
- *A. townneri*
- *A. tandoii*
- *A. ursingii*
- *A. venetianus*

Πρόσφατα απέκτησαν επιστημονική ονομασία δυο ακόμα είδη του γένους *Acinetobacter*, το "είδος 3" που ονομάστηκε *A. pittii* και το "είδος 13 TU" που ονομάστηκε *A. nosocomialis* (Nemec *et al* 2011).

Τα υπόλοιπα είδη που έχουν απομονωθεί παραμένουν χωρίς όνομα και αναφέρονται με αριθμούς ως εξής (Κατραμάδου 2010):

- | | |
|---------------------|---------------|
| – «μεταξύ 1 και 3» | – είδος 14 BJ |
| – είδος 6 | – είδος 15 TU |
| – «κοντά στο 13 TU» | – είδος 15 BJ |
| – είδος 13 BJ/14TU | – είδος 16 |
| | – είδος 17 |

Η πολυπλοκότητα των *Acinetobacter* βακτηρίων προκύπτει από το μεγάλο αριθμό των ειδών, την περίπλοκη ταξινόμηση των ειδών, τις δυσκολίες στην εργαστηριακή ταυτοποίηση, τη διαφορετική κλινική σημασία των ειδών, τις διαφορές στην επιδημιολογία και κατανομή των επιδημικών εξάρσεων, την διαφορετική αντοχή στα αντιβιοτικά και τις ποικίλες φυσικές δεξαμενές του μικροβίου που δεν έχουν ακόμα πλήρως διερευνηθεί.

1.1.3. Οικολογία

Τα βακτήρια του γένους *Acinetobacter* συναντώνται ευρέως στο φυσικό περιβάλλον και πιο συγκεκριμένα στο νερό, στο χώμα, σε φυτά, σε ζώα καθώς επίσης σε τρόφιμα φυτικά και ζωικά (π.χ. ωμό κρέας) (Κατραμάδου 2010). Στον άνθρωπο αποικίζουν υγρά και ζεστά σημεία του σώματος, όπως τους βλεννογόνους του πεπτικού, ουροποιογεννητικού και αναπνευστικού (7% φάρυγγα), παροδικά ή μόνιμα. Η κυριότερη περιοχή μόνιμης αποικίσεως είναι το δέρμα (25%) όπου παραμένει ως μέλος της μόνιμης φυσιολογικής χλωρίδας και αποτελεί την κυριότερη πηγή μόλυνσης στον άνθρωπο (Κατραμάδου 2010).

Στον χώρο του νοσοκομείου απαντάται κυρίως σε περιοχές με υγρασία, όπως νεφελοποιητές, βρύσες, νεροχύτες και αναπνευστήρες, ενώ συχνά βρίσκεται στα χέρια γιατρών και νοσηλευτών, που γίνονται φορείς, μεταφέρουν και διασπείρουν το επιδημικό στέλεχος κατά τη διάρκεια νοσοκομειακών επιδημιών (Κατραμάδου 2010). Τα πιο συχνά είδη που συναντώνται στην κλινική πράξη είναι το *Acinetobacter baumannii* (μέχρι πρόσφατα γνωστό ως *Acinetobacter calcoaceticus varanitratus*) και το *Acinetobacter lwoffii* (γνωστό ως *Acinetobacter calcoaceticuvar lwoffii*).

1.1.4. Φυσιολογία

Όλα τα μέλη του γένους *Acinetobacter* είναι αυστηρώς αερόβια και μπορούν να αναπτυχθούν σ' ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών. Τα περισσότερα στελέχη μεγαλώνουν στους 33°C, ενώ υπάρχουν και άλλα για τα οποία ιδανικές θεωρούνται οι θερμοκρασίες από 20-30°C. Τα βακτήρια του γένους *Acinetobacter* που απομονώνονται στο κλινικό περιβάλλον αναπτύσσονται στους 37°C (Juni 1978).

Πολλά από τα στελέχη *Acinetobacter* δεν είναι ικανά να ανάγουν το νιτρικό οξύ σε νιτρώδες. Αποκτούν άζωτο από αμμώνιο και νιτρικά άλατα (Juni 1978).

Το βασικό χαρακτηριστικό του γένους είναι ότι πολλά στελέχη του μπορούν να χρησιμοποιούν ένα μεγάλο εύρος οργανικών ενώσεων για το μεταβολισμό και την παραγωγή ενέργειας, όπως αλειφατικές αλκοόλες, αμινοξέα, λιπαρά οξέα, μη διακλαδισμένους υδρογονάνθρακες, σάκχαρα και πολλές αρωματικές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων των αρωματικών αμινοξέων. Η χρήση των σακχάρων σαν πηγή άνθρακα περιορίζεται στην D-γλυκόζη, την D-ριβόζη, την D-ξυλόζη και την L-αραμπινόζη (Juni 1978).

Η D-γλυκόζη στο *Acinetobacter baumannii* μεταβολίζεται μέσω του Etner-Doudoroff μονοπατιού. Οι πεντόζες που χρησιμοποιούνται στο μεταβολισμό αποικοδομούνται από μια αφυδρογονάση αλδόζης. Τα οξειδωμένα πεντοϊκά οξέα στη συνέχεια μετατρέπονται σε α-κετογλουταρικό δια μέσου πολλών σταδίων που περιλαμβάνουν αφυδάτωση και μηχανισμούς αφυδρογόνωσης (Juni 1978).

Ο κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA) στο *Acinetobacter baumannii* είναι παρόμοιος με αυτούς άλλων Πρωτεοβακτηρίων. Αρκετά από τα ένζυμα που εμπλέκονται σε στάδια του TCA κύκλου έχουν απομονωθεί στο συγκεκριμένο βακτήριο. Η κιτρική συνθάση του βακτηρίου αποτελείται από τέσσερις ίδιες υπομονάδες. Η ακονιτάση έχει αποδειχθεί ότι σχηματίζει γλυοξυλικό από ένα υπόστρωμα κιτρικού. Εκτός από τα παραπάνω ένζυμα έχουν απομονωθεί και δύο NADP συνδεδεμένα με ισοκιτρικές αφυδρογονάσες, που διεγείρονται από γλυοξυλικό ή πυροσταφυλικό. Τέλος, το α-κετογλουταρικό σύμπλοκο της αφυδρογονάσης του *Acinetobacter baumannii* λειτουργεί όπως και στον TCA κύκλο άλλων οργανισμών, με το ATP να αναστέλλει τη δράση του, ενώ το ADP ή το AMP να αυξάνουν τη δραστηριότητά του, μειώνοντας την Km (Juni 1978).

Το βακτήριο *Acinetobacter baumannii* χρησιμοποιεί το σύστημα του κυτοχρώματος στα μονοπάτια μεταφοράς ηλεκτρονίων του, γεγονός που αποδεικνύεται με την πλήρη αναστολή της δράσης της NADH οξειδάσης όταν τα κύτταρα υποβληθούν σε επεξεργασία με κυανίδιο. Τα

κυτοχρώματα a1, a2, b1 και c, καθώς και η φλαβίνη έχουν αποδειχθεί ότι συμμετέχουν στις οδούς μεταφοράς ηλεκτρονίων και στην κυτταρική αναπνοή του βακτηρίου (Juni 1978).

Για το μεταβολισμό των νουκλεϊκών οξέων, το *Acinetobacter baumannii* πιθανώς χρησιμοποιεί ουρακίλη σαν πυριμιδίνη τόσο για τη σύνθεση RNA όσο και για τη σύνθεση DNA. Αυτό συμβαίνει, επειδή το βακτήριο στερείται το ένζυμο φωσφορυλάση της θυμίνης καθώς και ένζυμο κινάσης θυμιδίνης, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να ενσωματώσει θυμίνη σε μόρια DNA (Juni 1978).

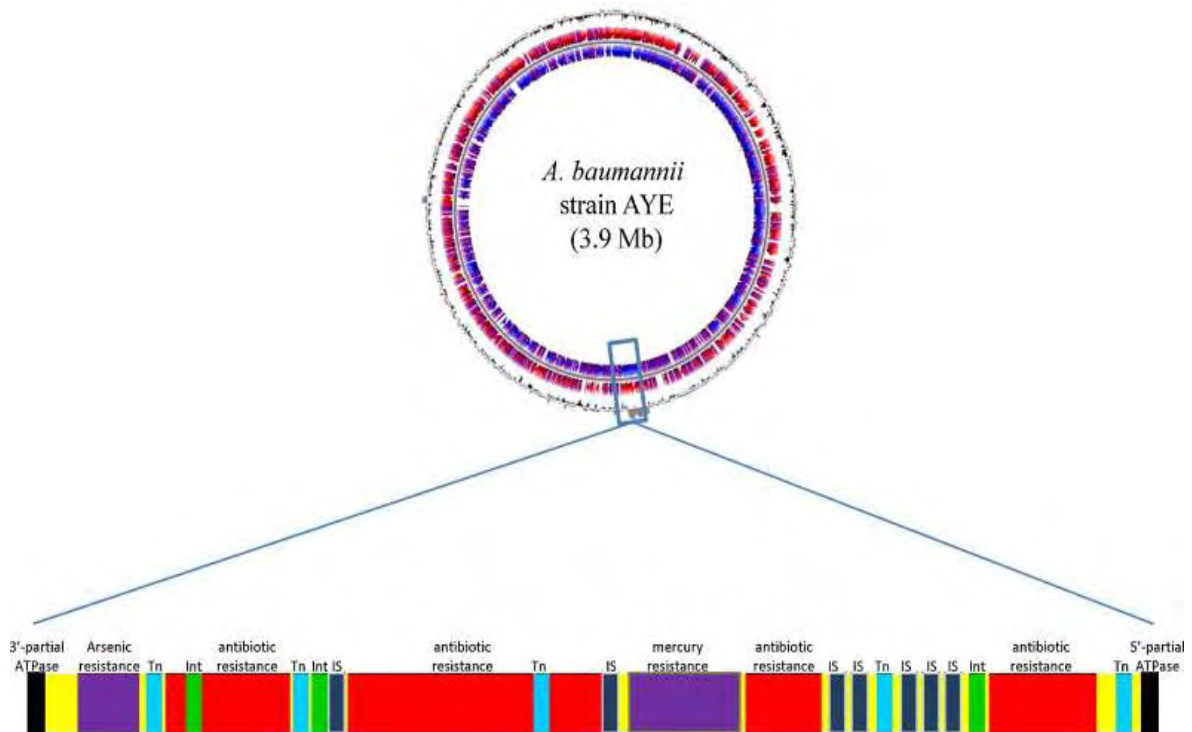
1.2. *Acinetobacter baumannii*

1.2.1. Κυτταρική δομή

Το *Acinetobacter baumannii* είναι ένα Gram αρνητικό, μη κινούμενο, ραβδόμορφο βακτήριο. Χαρακτηριστικό της μορφολογίας του είναι ο κυτταρικός φάκελος με τα πολλαπλά στρώματα που περιλαμβάνουν μια εξωτερική μεμβράνη και μια εσωτερική κυτταροπλασματική μεμβράνη, οι οποίες διαχωρίζονται από τον περιπλασματικό χώρο. Το συγκεκριμένο βακτήριο ξεχωρίζει για το μικρό αριθμό πορινών της κυτταρικής του μεμβράνης. Στην μεμβράνη του υπάρχουν και αντλίες εκροής που επιτρέπουν την απομάκρυνση τόσο οργανικών ενώσεων όσο και αντιβιοτικών που θα μπορούσαν να προκαλέσουν βλάβη στο βακτήριο. Εκτός από τα παραπάνω, στην κυτταρική μεμβράνη του *Acinetobacter baumannii* υπάρχουν επίσης πρωτεϊνικά κανάλια καθώς και μεταφορείς που σχετίζονται με την πρόσληψη ξένου DNA (<http://microbewiki.kenyon.edu>).

1.2.2. Γονιδίωμα

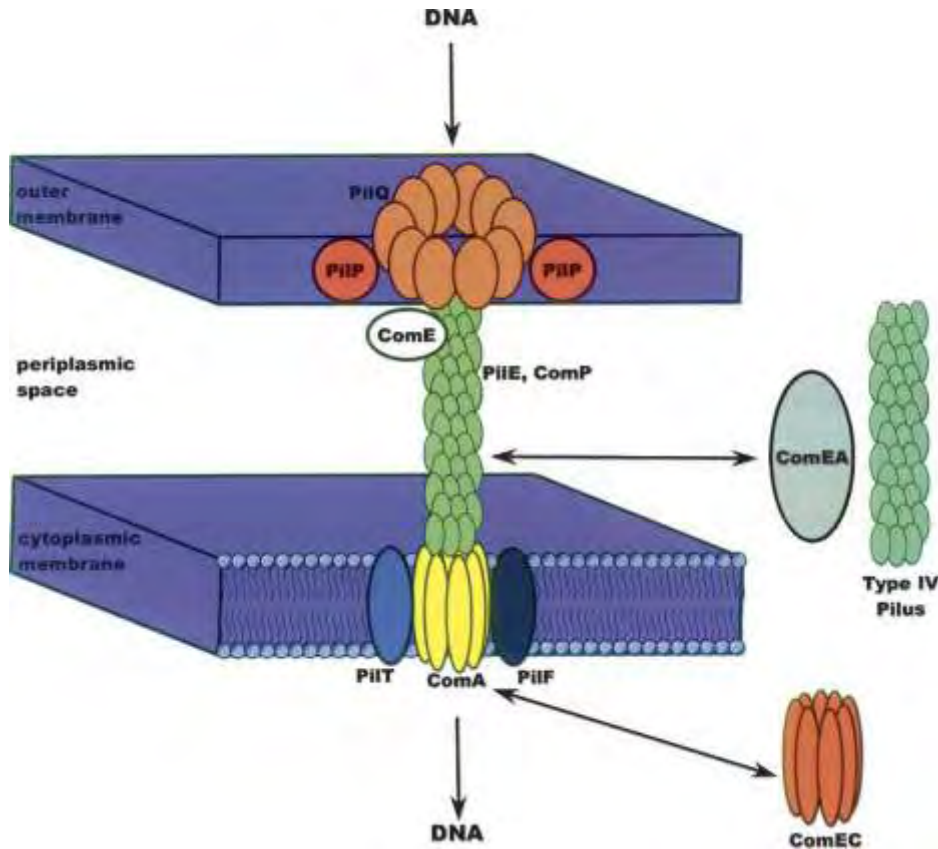
Το γονιδίωμα του *Acinetobacter baumannii* είναι ένα κυκλικό χρωμόσωμα που συνοδεύεται από δυο πλασμίδια (εικόνα 2), αν και ο αριθμός των πλασμιδίων μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το στέλεχος (Iacono *et al* 2008). Το γονιδιώμα του περιέχει 3,976,746 ζεύγη βάσεων και αποτελείται από 3830 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (<http://microbewiki.kenyon.edu>).



Εικόνα 2: Το γονιδίωμα του *Acinetobacter baumannii*.

1.2.3. Πρόσληψη ξένου DNA

Το συγκεκριμένο βακτήριο διαθέτει αρκετά γονίδια που του επιτρέπουν να δεχτεί ξένο DNA από το περιβάλλον του, όπως τα pilQ, comE και pilF, ενώ απουσιάζουν από το γονιδίωμά του δυο σημαντικά γονίδια για την πρόσληψη DNA, τα comP και comA (Smith *et al* 2007). Τα γονίδια που απουσιάζουν αντισταθμίζονται από την παρουσία δυο ομολόγων τους, των comEA και comEC αντίστοιχα. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3 αρχικά το ξένο DNA προσδένεται στον διαμεμβρανικό μεταφορέα της εξωτερικής μεμβράνης, τον PilQ. Στη συνέχεια, η διαμεμβρανική πρωτεΐνη ComEA μεταφέρει το DNA στον μεταφορέα ComEC της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα την είσοδο του DNA στο εσωτερικό του βακτηρίου και την ενσωμάτωσή του στο γονιδίωμά του (Smith *et al* 2007).



Εικόνα 3: πρόσληψη ξένου DNA από το *Acinetobacter baumannii*

1.2.4. Ανθεκτικότητα στην αφυδάτωση

Αρκετοί ερευνητές θεωρούν ότι η επιβίωση του *Acinetobacter baumannii* στο περιβάλλον θα μπορούσε να συμβάλει στην μετάδοσή του κατά την εκδήλωση λοίμωξης. Η υπόθεση αυτή έχει επιβεβαιωθεί από αρκετές μελέτες. Αναπαράγοντας τις συνθήκες νοσοκομείου, οι Jawad *et al* (1998) έδειξαν ότι τα βακτήρια αυτά ήταν σε θέση να επιβιώσουν για έναν μέσο όρο 20 ημερών σε σχετική υγρασία 31%. Από άλλες μελέτες αποδείχτηκε ότι στελέχη *Acinetobacter baumannii* μπορούσαν να απομονωθούν από κρεβάτι νοσοκομείου εννέα ημέρες μετά την αποχώρηση ενός μολυσμένου ασθενούς (Catalano *et al* 1999). Σε μια άλλη μελέτη, οι Wendt *et al* (1997) κατέλειξαν στο συμπέρασμα ότι η ικανότητα των στελεχών του βακτηρίου να επιβιώνουν υπό ξηρές συνθήκες ποικίλλουν πολύ και συσχετίζεται με την πηγή των στελεχών· τα στελέχη που απομονώθηκαν από ξηρές πηγές είχαν καλύτερα ποσοστά επιβίωσης από αυτά που απομονώθηκαν από υγρές πηγές.

1.3. Λοιμογόνοι παράγοντες

Πολλοί είναι οι λοιμογόνοι παράγοντες που είναι απαραίτητοι για την παθογένεση των λοιμώξεων που προκαλούνται από το *Acinetobacter baumannii*. Αυτοί οι παράγοντες επιτρέπουν στα βακτήρια να μολύνουν αποτελεσματικά τον ξενιστή. Ωστόσο μέχρι στιγμής είναι γνωστές πολύ λίγες πληροφορίες σχετικά τόσο με τους λοιμογόνους παράγοντες του *Acinetobacter baumannii* όσο και με τις αποκρίσεις του ξενιστή στη λοίμωξη.

1.3.1. Δημιουργία Βιομεμβράνης

Η προσκόλληση σε κύτταρα ξενιστές αντιπροσωπεύει το αρχικό στάδιο της μόλυνσης. Κατά το στάδιο αυτό, τα βακτήρια μπορούν να σχηματίσουν μικροαποικίες που τελικά να οδηγήσουν σε μια εξαιρετικά δομημένη μικροβιακή κοινότητα που ονομάζεται βιομεμβράνη. Η βιομεμβράνη είναι μια κοινότητα πολλαπλών βακτηριακών κυττάρων που σχετίζονται με μια βιοτική ή αβιοτική επιφάνεια, η οποία περικλείεται από μία πολυμερική μήτρα (Roca *et al* 2012). Η πολυμερική μήτρα, που αποτελείται από υδατάνθρακες, νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες και άλλα μακρομορία (Costerton 1995), προστατεύει τα βακτήρια, δίνοντας τους τη δυνατότητα να επιβιώσουν σε αφιλόξενο για εκείνα περιβάλλον (Roca *et al* 2012).

1.3.2. Επιφανειακοί πολυσακχαρίτες

Ένας σημαντικός λοιμογόνος παράγοντας των βακτηρίων *Acinetobacter baumannii* θεωρούνται οι επιφανειακοί πολυσακχαρίτες. Παράγονται συνήθως κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης και συντίθενται από D-γλουκουρονικό οξύ, D-μαννόζη, L-ραμνόζη και D-γλυκόζη. Οι Russo *et al* (2010) παρατηρώντας μεταλλάγματα του στελέχους AB307-0294 του *Acinetobacter baumannii* ταυτοποίησαν δύο γονίδια: Το πρώτο (ptk) είναι απαραίτητο για τον πολυμερισμό του καψιδίου και κωδικοποιεί μια πρωτεϊνική κινάσης τυροσίνης και το δεύτερο (epsA) κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης (EpsA). Αυτά τα γονίδια προσδίδουν φαινότυπο καψιδίου και εξηγούν τη συμβολή του καψιδίου στην παθογένεια του βακτηρίου. Το αποτέλεσμα αυτής της μελέτης ήταν ότι το καψίδιο K1 του στελέχους AB307-0294 του *Acinetobacter baumannii* επιτρέπει στα βακτήρια να αναπτυχθούν στον ανθρώπινο ορό, καθώς εμποδίζει την αντιβακτηριακή δράση του συμπληρώματος. Επιπλέον, η απώλεια της πρωτεϊνικής κινάσης τυροσίνης και της EpsA είχε ως αποτέλεσμα την θανάτωση των βακτηρίων (Russo *et al* 2010).

Ένας ακόμα σημαντικός εξωκυττάριος πολυσακχαρίτης είναι η πολυ-β-(1-6)-N-ακετυλογλυκοζαμίνη (PNAG), η οποία εκτός του ότι συμμετέχει στην προσκόλληση τόσο μεταξύ κυττάρων όσο και μεταξύ κυττάρων και επιφάνειας, προστατεύει τα βακτήρια από την άμυνα του ξενιστή. Μολονότι η PNAG δεν είναι αναγκαία για το σχηματισμό βιομεμβράνης σε σταθερές συνθήκες, απαιτείται όμως για τη διατήρηση της ακεραιότητας της βιομεμβράνης σε περιβάλλον stress (Roca *et al* 2012).

1.3.3. Πρωτεΐνες εξωτερικής μεμβράνης

Οι πιο σημαντικές πρωτεΐνες εξωτερικής μεμβράνης (OMP) που συναντώνται στα βακτήρια *Acinetobacter baumannii* είναι αυτές της οικογένειας OmpA (Roca *et al* 2012). Μελέτες όπως αυτή των Lee *et al* 2001 έχουν δείξει ότι μόρια που εκκρίνονται από αυτού του είδους τα βακτήρια ευθύνονται για το θάνατο των κυττάρων ξενιστών. Ανάμεσα σε αυτά τα μόρια η OmpA του *Acinetobacter baumannii* (AbOmpA) αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα με πολλαπλές επιδράσεις τόσο στην παθογένεση όσο και στην επεξεργασία σημάτων (Perez *et al* 2011). Η AbOmpA συμμετέχει στην προσκόλληση και στην είσοδο των βακτηρίων στα επιθηλιακά κύτταρα, επάγοντας απόπτωση από τα αρχικά ακόμη στάδια της λοίμωξης (Gaddy *et al* 2009). Η θανάτωση των επιθηλιακών κυττάρων προκαλείται είτε μέσω επιφανειακών υποδοχέων θανάτου είτε μέσω αποδόμησης των μιτοχονδρίων (Roca *et al* 2012). Καθαρισμένη AbOmpA ταυτοποιήθηκε στα μιτοχόνδρια όπου προκάλεσε την απελευθέρωση προαποπτωτικών μορίων, όπως του κυτοχρώματος c και του παράγοντα που επάγει απόπτωση (Apoptosis inducing factor, AIF). Τα μόρια αυτά μεσολαβούν στην εξαρτώμενη από κασπάση και εξαρτώμενη από AIF απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων και διασπών το χρωμοσωμικό DNA (Choi *et al* 2005).

1.3.4. Κυστίδια εξωτερικής μεμβράνης

Ορισμένα είδη Gram αρνητικών βακτηρίων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους, εκτός από την OmpA εκκρίνουν και κυστίδια εξωτερικής μεμβράνης (OMVs). Τα κυστίδια αυτά είναι σφαιρικά με διάμετρο μεταξύ 20-200nm και αποτελούνται από λιποπολυσακχαρίτες, OMPs, λιπίδια, και DNA ή RNA (Roca *et al* 2012). Τα εκκρινόμενα OMVs έχει αποδειχτεί ότι συμμετέχουν στη μεταφορά λοιμογόνων παραγόντων, στην αναστολή της ωρίμανσης του φαγοσώματος στα μακροφάγα, στο σχηματισμό βιοφιλμ και στη μεταφορά γονιδίων (McConnell *et al* 2011b, Rumbo *et al* 2011). Οι επιφανειακοί παράγοντες των OMVs μεσολαβούν στην προσκόλληση, όπως επίσης και στη εισαγωγή συστατικών των κυστιδίων στα κύτταρα ξενιστές,

υποδηλώνοντας έτσι ότι τα OMVs λειτουργούν ως φορείς μορίων στα κύτταρα αυτά (Kwon *et al* 2009). Η πρωτεΐνη AbOmpA που συμβάλλει στην προσκόλληση και στην εισαγωγή των *Acinetobacter baumannii* στα επιθηλιακά κύτταρα (Choi *et al* 2008) αποδείχτηκε ως η κύρια πρωτεΐνη των OMV. Οι Kwon *et al* (2009) παρατήρησαν ότι πακεταρισμένες σε OMVs οι AbOmpA επιφέρουν κυτταροτοξικότητα και θανάτωση του κυττάρου ξενιστή. Πιο συγκεκριμένα εντόπισαν πρωτεΐνες AbOmpA που προήλθαν από OMV στο κυτταρόπλασμα κυττάρων στόχων και έτσι πρότειναν ότι τα OMV μπορούν να μεταφέρουν άμεσα λοιμογόνους παράγοντες στα κύτταρα ξενιστές, απουσία βακτηρίων.

1.3.5. Υδρολυτικά ένζυμα

Μερικές ακόμη πρωτεΐνες που δρουν ως λοιμογόνοι παράγοντες είναι η φωσφολιπάση D και η φωσφολιπάση C. Οι Jacobs *et al* (2010) μελέτησαν ένα μεταλλαγμένο στέλεχος *Acinetobacter baumannii* στο οποίο είχε εισαχθεί ένα τραπεζοζόνιο στο γονίδιο που κωδικοποιεί τη φωσφολιπάση D. Παρατήρησαν λοιπόν ότι επηρεάστηκε όχι μόνο η ενεργότητα της φωσφολιπάσης αλλά και η προσβολή των επιθηλιακών κυττάρων από τα βακτήρια, η οποία ελαττώθηκε σημαντικά. Για το λόγο αυτό η φωσφολιπάση D θεωρείται ένας ακόμη λοιμογόνος παράγοντας.

Και η φωσφολιπάση C όμως έχει αποδειχτεί ότι ενισχύει την τοξικότητα των επιθηλιακών κυττάρων. Οι Camarena *et al* (2010) διαπίστωσαν ότι μια μετάλλαξη που προέκυψε από την εισαγωγή μιας κασέτας καναμυκίνης στην κωδική περιοχή του γονιδίου της φωσφολιπάσης C1 οδήγησε σε μείωση της κυτταροτοξικότητας που προκαλείται από το *Acinetobacter baumannii* στα επιθηλιακά κύτταρα.

1.3.6. Παρουσία ξένων νησίδων

Νέα στοιχεία σχετικά με την παθογένεση του *Acinetobacter baumannii* κατέδειξαν ότι η μεταλλαξιγένεση και η αλληλούχιση του γονιδιώματος μπορούν να αποκαλύψουν πολλούς λοιμογόνους παράγοντες, ώστε να γίνει πιο κατανοητή η παθογένεια του συγκεκριμένου βακτηρίου. Οι Smith *et al* (2007) πραγματοποιώντας μια ανάλυση γονιδιώματος μεταξύ *Acinetobacter baumannii* και *Acinetobacter baylyi* βρήκαν 55,74% ομολογία σε επίπεδο πρωτεΐνης. Ωστόσο μια από τις πιο ενδιαφέρουσες διαφορές ανάμεσα στα δυο είδη ήταν η παρουσία 28 ξένων νησίδων (putative alien islands, pAs) στο *Acinetobacter baumannii*. Αυτές οι νησίδες περιείχαν παράγοντες ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά καθώς και λοιμογόνους

παράγοντες, γεγονός που υποδεικνύει το ρόλο τους στην παθογένεια του βακτηρίου (Roca *et al* 2012).

1.4. Πλαστικότητα γονιδιώματος

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ίσως ένα από τα πιο ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά του *Acinetobacter baumannii* είναι η ικανότητά του να αποκτά, να διατηρεί και να μεταδίδει πολλαπλούς μηχανισμούς ανθεκτικότητας, που σε συνδυασμό με την ικανότητά του να επιβιώνει σε καταστάσεις ξηρασίας και παρουσίας απολυμαντικών το καθιστούν πολύ ανθεκτικό στο κλινικό περιβάλλον και θεωρείται σχεδόν αδύνατο να καταπολεμηθεί.

Η απόκτηση και η διάδοση των παραγόντων ανθεκτικότητας επιτυγχάνεται με το συνδυασμό γονιδίων ανθεκτικότητας και μιας σειράς κινητών στοιχείων που μεσολαβούν στην ανταλλαγή γενετικού υλικού και αναδιατάσσουν τα βακτηριακά γονιδιώματα. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία πολλών γενετικών συνδυασμών που παρέχουν μια ατελείωτη πηγή γενετικής προσαρμοστικότητας. Αυτά τα κινητά στοιχεία περιλαμβάνουν αλληλουχίες παρεμβολής, τρανσποζόνια, ιντεγκρόνια, πλασμίδια και νησίδες ανθεκτικότητας (Roca *et al* 2012).

1.4.1. Αλληλουχίες παρεμβολής

Οι αλληλουχίες παρεμβολής (insertion sequences, IS) κατέχουν σημαντικό ρόλο στην αποκτήση γονιδίων ανθεκτικότητας από τα βακτήρια *Acinetobacter baumannii*. Γενικά θεωρούνται ως τα μικρότερα κινητά στοιχεία DNA (<2,5 kb) που μεταφέρουν μόνο τη γενετική πληροφορία που απαιτείται για την κινητοποίησή τους. Αποτελούνται από ένα ζεύγος μικρών ανεστραμμένων επαναληπτικών αλληλουχιών και είναι τοποθετημένα κοντά σε ένα ή ίσως δύο ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (open reading frames, ORFs) που κωδικοποιούν μια τρανσποζάση, ένζυμο που συμμετέχει στη μεταφορά του IS στοιχείου (Roca *et al* 2012).

Περισσότεροι από 30 διαφορετικοί τύποι IS έχουν αναφερθεί σε είδη *Acinetobacter* (Siguier *et al* 2006), με τις ISAbal και ISAbal25 να είναι οι πιο διαδεδομένες (Adams *et al* 2010). Το γονιδίωμα του στελέχους AYE του *Acinetobacter baumannii* έχει αποδειχτεί ότι περιέχει έως και 21 αντίγραφα της ISAbal (Vallenet *et al* 2008). Ωστόσο, η ίδια IS έχει εντοπιστεί σε πολλά βακτήρια του είδους σε ολόκληρο τον κόσμο (Higgins *et al* 2010, Adams-Haduch *et al* 2011, Nigro *et al* 2011b). Αυτά τα γενετικά στοιχεία μπορούν να συμβάλλουν στην ανθεκτικότητα με τρεις διαφορετικούς τρόπους:

1. Παρεμβολή μιας IS ακριβώς πριν από ένα ORF μπορεί να παρέχει πρόσθετους υποκινητές που θα ενισχύσουν τα επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων, τα οποία διαφορετικά θα εκφράζονταν ανεπαρκώς. Στο πλαίσιο αυτό, η ISAba1 βρίσκεται συνήθως άνωθεν των γονιδίων bla_{ampC} και bla_{OXA-51}, και είναι υπεύθυνη για ανθεκτικότητα στην κεφταζιδίμη και στις καρβαπενέμες αντίστοιχα, σε περιπτώσεις στελεχών που στερούνται πρόσθετους μηχανισμούς ανθεκτικότητας (Héritier *et al* 2006, Turton *et al* 2006). Επιπλέον, οι ISAba1, ISAba2, ISAba3, ISAba4, ISAba10, ISAba16, ISAba125, ISAba825 και IS18 έχουν επίσης βρεθεί πριν από τα γονίδια bla_{OXA} 23 and bla_{OXA}58 (Poirel and Nordmann 2006b, Giannouli *et al* 2009, Lee *et al* 2011b).

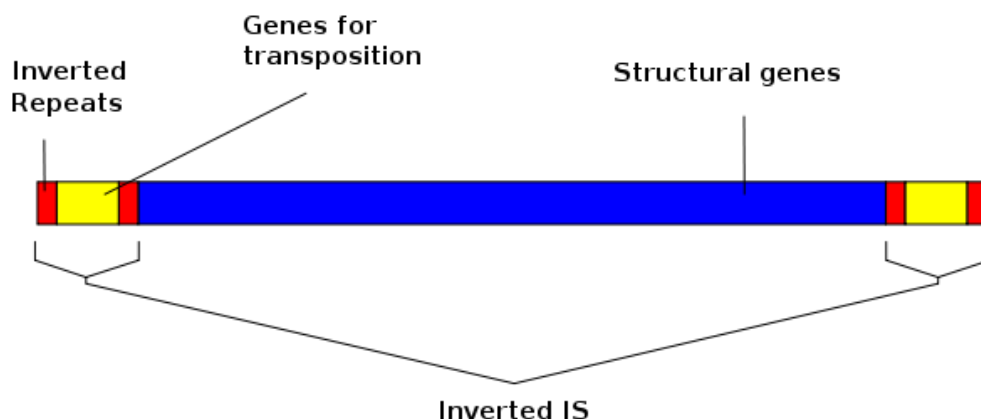
Ωστόσο, δεν είναι μόνο οι β-λακταμάσες τάξης D που υδρολύουν καρβαπενέμες οι μόνες β-λακταμάσες των οποίων η έκφραση ενισχύεται από τις IS, αλλά και τα γονίδια bla_{PER-1} και bla_{PER-2} περιέχουν ένα IS στοιχείο, το ISPa12, το οποίο αυξάνει την έκφρασή τους (Poirel *et al* 2005a, Pasterán *et al* 2006). Ομοίως, η έκφραση του γονιδίου bla_{PER-7} καθοδηγείται επίσης από μία αλληλουχία υποκινητή που βρίσκεται μέσα σε ένα ISCR1 στοιχείο (Bonnin *et al* 2011b).

2. Τα IS στοιχεία μπορούν επίσης να συμβάλλουν στην ανθεκτικότητα όταν εισαχθούν εντός ορισμένων ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης και να μεταβάλλουν τις κωδικοποιούσες αλληλουχίες. Απενεργοποίηση γονιδίων από εισαγωγή IS που να οδηγεί σε ανθεκτικότητα έχει συσχετιστεί με αλλαγές στους μεταγραφικούς ρυθμιστές· για παράδειγμα εισαγωγή του ISAba1 εντός του γονιδίου adeS οδηγεί σε υπερέκφραση της αντλίας εκροής AdeABC. Επίσης, εισαγωγή των ISAba10, ISAba825 ή ISAba125 εντός του γονιδίου carO, που σχετίζεται με τη διαπερατότητα της μεμβράνης, οδηγεί σε ανθεκτικότητα στις καρβαπενέμες (Lu *et al* 2009, Lee *et al* 2011b, Ravasi *et al* 2011).

3. Η πιο σημαντική συμβολή των IS στην ανάπτυξη των πολυανθεκτικών στελεχών *Acinetobacter baumannii* έγκειται στην ικανότητά τους να κινητοποιούν γονιδιακές κασέτες, είτε μέσα στο βακτηριακό χρωμόσωμα είτε μεταξύ του χρωμοσώματος και των πλασμιδίων, επιτρέποντας την ταχεία διάδοση τέτοιων κασετών, όχι μόνο μεταξύ των διαφόρων στελεχών *Acinetobacter baumannii*, αλλά και μεταξύ στελεχών που ανήκουν σε διαφορετικά γένη (Roberts *et al* 2008).

Η ενεργοποίηση που γίνεται με τη βοήθεια των IS μπορεί να πραγματοποιηθεί όταν δυο IS περιβάλλουν μια γονιδιακή κασέτα (η οποία συνήθως περιέχει γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά), έτσι ώστε οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες από κάθε IS να συνεργαστούν για

να εκτοπίσουν την παρεμβαλλόμενη αλληλουχία DNA, σχηματίζοντας έτσι ένα τρανσποζόνιο (Roberts *et al* 2008), όπως φαίνεται στην εικόνα 7:



Εικόνα 4: Δημιουργία βακτηριακού τρανσποζονίου από IS στοιχεία

Στο *Acinetobacter baumannii* για παράδειγμα, η ενεργοποίηση του γονιδίου bla_{OXA 23} (κλάσης D β-λακταμάση με ενεργότητα καρβαπενεμάσης) γίνεται είτε από δύο αντίτυπα των ISAba1, ανεστραμμένα ή όχι, που δημιουργούν ένα τρανσποζόνιο που ονομάζεται Tn2006 ή Tn2009 αντίστοιχα (Corvec *et al* 2007, Adams *et al* 2008, Zhou *et al* 2011), είτε από ένα μόνο αντίγραφο της ISAba1, σχηματίζοντας μια δομή όμοια με τρανσποζόνιο που ονομάστηκε Tn2008 (Adams-Haduch *et al* 2008), είτε με μια παρόμοια δομή που περιλαμβάνει ένα μόνο αντίτυπο του ISAba4, σχηματίζοντας άλλη δομή όμοια με τρανσποζόνιο που πήρε το όνομα Tn2007 (Corvec *et al* 2007).

1.4.2. *Ιντεγκρόνια*

Τα ιντεγκρόνια αποτελούν άλλο ένα σημαντικό παράγοντα για τη διάδοση και τη συσσώρευση των γονιδίων ανθεκτικότητας στα βακτήρια *Acinetobacter baumannii* και αρκετές μελέτες έχουν δείξει μια θετική συσχέτιση μεταξύ της μεταφοράς των ιντεγκρονίων και του βαθμού της πολυανθεκτικότητας (Huang *et al* 2008, Lee *et al* 2009b). Τα ιντεγκρόνια είναι γενετικά στοιχεία που μεσολαβούν στην ενσωμάτωση γονιδιακών κασετών μέσω ενός τοποειδικού μηχανισμού ανασυνδυασμού που κατευθύνει συντονισμένα την έκφρασή τους. Όλα τα ιντεγκρόνια φέρουν τρία βασικά στοιχεία: ένα συγκεκριμένο σημείο ανασυνδυασμού (attI), ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μια ιντεγκράση (intI) και μια κοινή περιοχή υποκινητή (P1-P2) προσανατολισμένη προς την τοποθεσία της ενσωμάτωσης. Η ιντεγκράση ανασυνδυάζει διακριτές μονάδες κυκλικού DNA, γνωστές ως γονιδιακές κασέτες (συχνά φέρουν γονίδια

ανθεκτικότητας) εντός της θέσεως attI, επιτρέποντας τη συντονισμένη έκφραση των γονιδίων της κασέτας από τον κοινό υποκινητή (Mazel 2006).

Μολονότι τα ιντεγκρόνια δεν μετακινούνται από μόνα τους (αλλά οι γονιδιακές κασέτες μπορούν εύκολα να ανταλλάγουν με άλλα ιντεγκρόνια), μπορούν να εξαπλωθούν σε διάφορες χρωμοσωμικές περιοχές, πλασμίδια ή ακόμη και σε άλλους μικροοργανισμούς μέσω της IS-μεσολαβούμενης μεταφοράς ή μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (Mazel 2006). Υπάρχουν αρκετές κατηγορίες ιντεγκρονίων που ταξινομούνται κυρίως σύμφωνα με την αλληλουχία των κωδικοποιημένων ιντεγκρασών, με τις οποίες εμφανίζουν 40-58% ομοιότητα. Τα ιντεγκρόνια τάξης 1 που εμφανίζουν μια ευρεία ποικιλία γονιδιακών κασετών απαντώνται συχνά στα *Acinetobacter baumannii* και κωδικοποιούν γονίδια ανθεκτικότητας στις αμινογλυκοσίδες, καθώς επίσης και γονίδια που παρέχουν ανθεκτικότητα σε αντισηπτικά και σουλφοναμίδια (Nemec *et al* 2004, Zhao and Hu, 2011). Άλλοι παράγοντες ανθεκτικότητας που σχετίζονται με τα τάξης 1 ιντεγκρόνια περιλαμβάνουν τάξης Β β-λακταμάσες (blaIMP, blaVIM και blaSIM), τάξης Α β-λακταμάσες (CARB, GES, PER και VEB) και περιορισμένου φάσματος λακταμάσες τύπου OXA (Vila *et al* 1997, Poirel *et al* 2003, Naas *et al* 2006a, Potron *et al* 2009).

Τα τάξης 2 ιντεγκρόνια που βρίσκονται στο Tn7 τρανσποζόνιο εμφανίζουν μια πιο περιορισμένη ποικιλομορφία σε γονιδιακές κασέτες και εκείνα που περιγράφονται στο *Acinetobacter baumannii* έχουν αποδειχθεί ότι περιέχουν διάφορους παράγοντες ανθεκτικότητας όπως οι aadB, catB2, dfrA1, sat2 και aadA1 που παρέχουν ανθεκτικότητα έναντι στις αμινογλυκοσίδες, στη χλωραμφενικόλη, στη τριμεθοπρίμη, στρεπτοθρικήνη και στρεπτομυκίνη, αντίστοιχα (Ramírez *et al* 2010a). Οι Ramírez *et al* (2010) αναφέρθηκαν σε ένα στέλεχος *Acinetobacter baumannii*, το οποίο φέρει το γονίδιο blaCARB-4 σε τάξης 2 ιντεγκρόνιο μαζί με 6 επιπλέον στοιχεία ανθεκτικότητας που περιλαμβάνουν τέσσερις οικογένειες αντιβιοτικών. Αυτό το νέο ιντεγκρόνιο αποτελεί το μεγαλύτερο της τάξης 2 που έχει περιγραφεί μέχρι σήμερα και αντιπροσωπεύει επίσης το μόνο παράδειγμα γονιδίου β-λακταμάσης που κωδικοποιείται μέσα στην τάξη αυτή (Ramírez *et al* 2010b).

1.4.3. Νησίδες ανθεκτικότητας

Εκτός από την τεράστια ποικιλία των μηχανισμών ανθεκτικότητας που εμφανίζονται στα διάφορα στελέχη *Acinetobacter baumannii*, τα βακτήρια αυτά είναι επίσης σε θέση να συγκεντρώνουν πολλούς παράγοντες ανθεκτικότητας σε γενετικά στοιχεία που έχουν ονομαστεί ως "νησίδες ανθεκτικότητας". Οι νησίδες ανθεκτικότητας είναι συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος που φιλοξενούν μεγάλες ομάδες οριζόντια μεταφερόμενων τμημάτων DNA, οι

οποίες περιλαμβάνουν πολλά γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά (Roca *et al* 2012). Τέτοιες περιοχές παρέχουν ασφάλεια στα κινητά στοιχεία, εφόσον εισαγωγή σε αυτή τη θέση είναι απίθανο να προκαλέσει βλάβη στο κύτταρο ξενιστή. Συχνά εισάγονται στην ίδια θέση στο χρωμόσωμα του βακτηρίου και συντίθενται από διακριτά γονίδια ή ομάδες γονιδίων που συνήθως συνδέονται με κινητά στοιχεία (αλληλουχίες παρεμβολής και τραμποζόνια), ιντεγκρόνια, ή και τα δύο (Roca *et al* 2012).

Η πρώτη νησίδα ανθεκτικότητας που περιγράφηκε στο *Acinetobacter baumannii* βρέθηκε στο πολυανθεκτικό στέλεχος AYE και ονομάστηκε AbaR1. Η AbaR1 περιλάμβανε μια περιοχή 86 ζευγών βάσεων ενσωματωμένη εντός του γονιδίου *comM* και περιείχε έως και 45 γονίδια ανοχής ενάντια στα αντιβιοτικά (Roca *et al* 2012). Οι νησίδες ανθεκτικότητας που έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα σε στελέχη του είδους *Acinetobacter baumannii* φαίνονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1: Νησίδες ανθεκτικότητας που έχουν εντοπιστεί στο *Acinetobacter baumannii*.

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

AbaR18	52	NIPH2713	I	+	Krizova <i>et al</i> (2011)
AbaR19	30	NIPH2554	I	+	Krizova <i>et al</i> (2011)
AbaR21	64	RUH875	I	+	Nigro <i>et al</i> (2011b)
AbaR22	39	MDR-ZJ06	II	+	Zhou <i>et al</i> (2011)
Δεν έχει προσδιοριστεί	Δεν έχει βρεθεί	A473	I	-	Rose (2010)
Δεν έχει προσδιοριστεί	Δεν έχει βρεθεί	A473	I	-	Rose (2010)

Οι Shaikh *et al* (2009) μελέτησαν 50 πολυανθεκτικά στελέχη *Acinetobacter baumannii* και διαπίστωσαν ότι το 82% περιείχε ένα διακοπτόμενο γονίδιο *comM*. Από βαθύτερη ανάλυση αλληλουχίας σε 10 τέτοια στελέχη διαπιστώθηκε ότι σε 8 ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες *AbaR*, επιβεβαιώνοντας έτσι ότι η *comM* είναι πιθανόν μία προτιμώμενη θέση ενσωμάτωσης για αυτού του είδους τις γενετικές δομές.

Επιπλέον, όλες οι αλληλουχίες *AbaR* που προσδιορίζονται στα *Acinetobacter baumannii* που ανήκουν στον Ευρωπαϊκό Κλώνο I (EC I) φαίνεται να έχουν μια κοινή γενετική δομή: μοιράζονται ένα τρανσποζόνιο μεγέθους 16.3-kb, το Tn6019, ένα οπερονίο που προσδίδει ανθεκτικότητα σε αρσενικό (*arsHBRC*), ένα γονίδιο θειϊκής περμεάσης (*sup*) και ένα γονίδιο πρωτεΐνης στρες (*uspA*) (Roca *et al* 2012).

Παρά το γεγονός ότι η *AbaR1* είναι μέχρι στιγμής η μεγαλύτερη νησίδα ανθεκτικότητας που έχει περιγραφεί στο *Acinetobacter baumannii* (Fournier *et al* 2006), παρατηρήθηκε ότι από την *AbaR5* έως και την *AbaR21* είναι όλες παράγωγα της *AbaR3*. Αυτό συνέβη είτε από διαγραφές ενός εκ των τριών IS26 που υπάρχουν στην *AbaR3*, είτε από διαγραφές λόγω ομόλογου ανασυνδυασμού ή λόγω μετάθεσης τρανσποζονίου (Krizova *et al* 2011, Nigro *et al* 2011b). Η *AbaR1* εμφανίζει την ίδια δομή με την *AbaR3* αλλά περιέχει μια πρόσθετη περιοχή 29kb, η οποία αποτελείται από ένα πολύ σύνθετο ιντεγκρόνιο τάξης 1 που θα μπορούσε να έχει ενσωματωθεί στην *AbaR3*.

Ο συνδυασμός των αλληλουχιών παρεμβολής, τρανσποζονίων, ιντεγκρονίων, πλασμιδίων σύζευξης και νησίδων ανθεκτικότητας εξηγεί την μεγάλη γονιδιωματική πλαστικότητα του *Acinetobacter baumannii*, έχοντας αναγάγει τον μικροοργανισμό αυτό σε ένα επικίνδυνο νοσοκομειακό ανθρώπινο παθογόνο. Πρόσφατες μελέτες στις οποίες γίνεται σύγκριση ολόκληρης της αλληλουχίας του γονιδιώματος στελεχών που συνδέονται στενά με το *Acinetobacter baumannii* έχουν δείξει ένα μοναδικό γενετικό ρεπερτόριο IS, πλασμιδίων και

AbaRs, ακόμη και σε στελέχη του βακτηρίου που ανήκουν στον ίδιο τύπο αλληλουχίας (ST) (Adams *et al* 2010, Di Nocera *et al* 2011, Snitkin *et al* 2011).

1.5. Ανθεκτικότητα σε διάφορα αντιμικροβιακά φάρμακα

Ενώ άλλα ανθρώπινα παθογόνα ξεχωρίζουν για την τοξικότητα και την παθογένειά τους, το *Acinetobacter baumannii* δεν είναι ιδιαίτερος γνωστό για την τοξική του δράση. Ωστόσο, το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό αυτού του μικροοργανισμού είναι η ανθεκτικότητα που παρουσιάζει έναντι σε πολλά αντιβιοτικά όπως φαίνεται και στην εικόνα 5 (Roca *et al* 2012). Πράγματι, το *Acinetobacter baumannii* έχει μια εξαιρετική ικανότητα να συσσωρεύει διαφορετικούς μηχανισμούς ανθεκτικότητας, οι οποίοι σε συνδυασμό με την έμφυτη ικανότητα του βακτηρίου να επιβιώνει σε συνθήκες ξηρασίας συμβάλλουν στην ανθεκτικότητά του σε συνθήκες περιβαλλοντικής πίεσης. Τα παραπάνω στοιχεία καθιστούν το *Acinetobacter baumannii* ένα άκρως ιδιαίτερο νοσοκομειακό παθογόνο (Roca *et al* 2012).



Εικόνα 5: Αντιβιογράμμα ενός στελέχους *Acinetobacter baumannii* του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας

Αντοχή στα αντιβιοτικά μπορεί να επιτευχθεί με δύο βασικούς μηχανισμούς: την απόκτηση καινούριας γενετικής πληροφορίας μέσω μεταφοράς γονιδίων και τη γενετική

τροποποίηση των ενδογενών γονιδίων. Ο πρώτος μηχανισμός στο *Acinetobacter baumannii* επιτυγχάνεται από τη συνδυασμένη δράση των κινητών γενετικών στοιχείων (αλληλουχίες παρεμβολής και τρανσποζόνια), ιντεγκρονίων και πλασμιδίων. Ο δεύτερος μηχανισμός προϋποθέτει είτε αυθόρμητες μεταλλάξεις που τροποποιούν τους στόχους των φαρμάκων είτε εισαγωγή/διαγραφή των κινητών στοιχείων που μεταβάλλουν την έκφραση των ενδογενών μηχανισμών αντίστασης ή τροποποιούν τη διαπερατότητα της μεμβράνης (Roca *et al* 2012). Ο πίνακας 2 αναφέρει συνοπτικά τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας που συναντώνται στο *Acinetobacter baumannii*.

Πίνακας 2: Μηχανισμοί αντίστασης στα αντιβιοτικά που παρατηρούνται στο *Acinetobacter baumannii*.

Αντιβιοτικά	Μηχανισμός αντίστασης	Τάξη/ οικογένεια	Πρωτεΐνη	Περιγράφτηκε σε συνδυασμό με	Αναφορά
β-Λακτάμες	Χρωμοσωμική κεφαλοσπορινάση	Τάξη C	AmpC	IS	Hujer <i>et al</i> (2005)
	Τάξης D β-λακταμάση που υδρολύει καρβαπενέμες	Τάξη D	OXA-51-like OXA-23-like OXA-24/40-like OXA-58-like OXA-143-like	IS IS, Tn, AbaR XerC/XerD IS, Tn	Turton <i>et al</i> (2006) Corvec <i>et al</i> (2007), Adams <i>et al</i> (2008) Merino <i>et al</i> (2010) Poirel and Nordmann, (2006b) Higgins <i>et al</i> (2009)
	Άλλες β-λακταμάσες	Τάξη A	TEM SHV SCO-1 CARB PER VEB CTX-M GES KPC	AbaR IS, Tn, ιντεγρόνιο IS, Tn, ιντεγρόνιο IS, ιντεγρόνιο, AbaR Tn ιντεγρόνιο	Adams <i>et al</i> (2008), Shakil and Khan, (2010) Naas <i>et al</i> (2007) Poirel <i>et al</i> (2007) Potron <i>et al</i> (2009), Ramírez <i>et al</i> (2010b) Poirel <i>et al</i> (2005a), Bonnin <i>et al</i> (2011b) Fournier <i>et al</i> (2006), Poirel <i>et al</i> (2009) Potron <i>et al</i> (2011) Moubareck <i>et al</i> (2009) Robledo <i>et al</i> (2010)

Μοριακή τυποποίηση ενδοσοκομειακών στελεχών του *Acinetobacter baumannii*

Αντιβιοτικά	Μηχανισμός αντίστασης	Τάξη/ οικογένεια	Πρωτεΐνη	Περιγράφηκε σε συνδυασμό με	Αναφορά
	Μειωμένη διαπερατότητα		CarO 47kDa OMP 44kDa OMP 37kDa OMP 33–36kDa OMP 22–33kDa OMP HMP-AB 43kDa OMP	IS	Ravasi <i>et al</i> (2011) Quale <i>et al</i> (2003) Quale <i>et al</i> (2003) Quale <i>et al</i> (2003) del Mar Tomas <i>et al</i> (2005) Bou <i>et al</i> (2000a) Gribun <i>et al</i> (2003) Fernández-Cuenca <i>et al</i> (2011)
	Αντλίες εκροής	RND	AdeABC AdeIJK	IS	Magnet <i>et al</i> (2001) Damier-Piolle <i>et al</i> (2008)
	Πρωτεΐνες που συνδέουν τροποποιημένη πενικιλίνη		PBP		Cayo <i>et al</i> (2011)
Αμινογλυκοσίδες	Αμινογλυκοσιδικά τροποποιητικά ένζυμα		Ακετυλτρανσφεράσες Νουκλεοτιδιλ-τρανσφεράσες Φωσφοτρανσφεράσες	IS, Tn, ιντεγκρόνιο, AbaR	Cho <i>et al</i> (2009) Cho <i>et al</i> (2009) Cho <i>et al</i> (2009)

Μοριακή τυποποίηση ενδοσοκομειακών στελεχών του *Acinetobacter baumannii*

Αντιβιοτικά	Μηχανισμός αντίστασης	Τάξη/ οικογένεια	Πρωτεΐνη	Περιγράφηκε σε συνδυασμό με	Αναφορά
	Τροποποίηση στόχου πρόσδεσης		16S rRNA μεθυλάσες	IS, Tn	Doi <i>et al</i> (2007)
	Αντλίες	RND MATE	AdeABC AbeM	IS	Magnet <i>et al</i> (2001) Su <i>et al</i> (2005)
Κινολόνες	Μεταλλάξεις της θέσης στόχου		GyrA/ParC		Hamouda and Amyes (2004)
	Αντλίες εκροής	RND MATE SMR	AdeABC AdeIJK AdeFGH AbeM AbeS	IS	Magnet <i>et al</i> (2001) Damier-Piolle <i>et al</i> (2008) Coyne <i>et al</i> (2010b) Su <i>et al</i> (2005) Srinivasan <i>et al</i> (2009a)
Χλωραμφενικόλη	Αντλίες εκροής	RND MFS MATE SMR	AdeABC AdeIJK AdeFGH CmlA CraA AbeM AbeS	IS AbaR	Magnet <i>et al</i> (2001) Damier-Piolle <i>et al</i> (2008) Coyne <i>et al</i> (2010b) Fournier <i>et al</i> (2006), Vila <i>et al</i> (2007) Roca <i>et al</i> (2009) Su <i>et al</i> 2005 Srinivasan <i>et al</i> (2009a)

Μοριακή τυποποίηση ενδοσοκομειακών στελεχών του *Acinetobacter baumannii*

Αντιβιοτικά	Μηχανισμός αντίστασης	Τάξη/ οικογένεια	Πρωτεΐνη	Περιγράφηκε σε συνδυασμό με	Αναφορά
Τετρακυκλίνες	Αντλία εκροής	MFS	TetA TetB	IS, Tn, AbaR	Ribera <i>et al</i> (2003a), Fournier <i>et al</i> (2006) Vila <i>et al</i> (2007)
	Προστασία ριβοσωμάτων		TetM		Ribera <i>et al</i> (2003b)
Τιγκεκυκλίνη	Αντλίες εκροής	RND	AdeABC AdeIJK	IS	Magnet <i>et al</i> (2001) Damier-Piolle <i>et al</i> (2008)
Πολυμιξίνες	Τροποποίηση λιπιδίου A		PmrCAB		Arroyo <i>et al</i> (2011), Beceiro <i>et al</i> (2011)
	Απώλεια λιποπολυσακχαρίτη		LpxABC	IS	Moffatt <i>et al</i> (2011)
	Απώλεια πορίνης				Fernández-Reyes <i>et al</i> (2009)

(IS αλληλουχίες παρεμβολής, Tn τρανποζόνια, AbaR νησίδα ανθεκτικότητας και RND, MFS, MATE, SMR οικογένειες αντλιών εκροής)

1.5.1. β-Λακτάμες

Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην αντοχή στις β-λακτάμες περιλαμβάνουν: α) ενζυμικούς μηχανισμούς, δηλαδή παραγωγή των υδρολυτικών ενζύμων β-λακτάμης (β-λακταμάσες) και β) μη ενζυμικούς μηχανισμούς, που συνεπάγονται τροποποίηση της διαπερατότητας της μεμβράνης είτε μέσω απώλειας/μείωσης της έκφρασης των OMPs είτε μέσω αύξησης της έκφρασης αντλίων ροής (Roca *et al* 2012). Στους μη ενζυμικούς μηχανισμούς συμπεριλαμβάνεται και η τροποποίηση των πενικιλλοδεσμευτικών πρωτεϊνών (PBPs) (Roca *et al* 2012).

1.5.1.1. Ενζυμικοί μηχανισμοί

Ο βασικός μηχανισμός ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά β-λακτάμης στο *Acinetobacter baumannii* έγκειται στην παραγωγή β-λακταμασών που κωδικοποιούνται είτε χρωμοσωμικά είτε σε πλασμίδια. Το γονιδίωμα του *Acinetobacter baumannii* διαθέτει δύο υδρολυτικά ένζυμα β-λακτάμης: μια μη επαγώγιμη κεφαλοσπορινάση (AmpC) (Bou and Martinez-Beltran 2000b) και μια τάξης D οξασυλινάση (OXA-51/69) (Brown *et al* 2005). Οι χρωμοσωμικές κεφαλοσπορινάσες (AmpC) είναι ένζυμα που ανήκουν στην τάξη C των β-λακταμασών και είναι υπεύθυνες για την ανθεκτικότητα σε όλες τις πενικιλίνες και ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες, εκτός της καφεπίμης, καθώς και στους συνδυασμούς αναστολέα β-λακτάμης-β-λακταμικών αντιβιοτικών (Drawz *et al* 2010). Λόγω του ότι έχουν αναφερθεί αρκετές παραλλαγές του ενζύμου AmpC έχει δοθεί και μια νέα ονομασία για αυτή την οικογένεια κεφαλοσπορινασών (Acinetobacter-derived cephalosporinases, ή ADC). Σύμφωνα με τις ομοιότητες στην αλληλουχία καθώς και τα υποστρώματα που προτιμούν, οι AmpCs των *Acinetobacter* spp έχουν ταξινομηθεί σε 56 διαφορετικούς τύπους, με περισσότερες από 25 παραλλαγές να έχουν βρεθεί στο *Acinetobacter baumannii* (Hujer *et al* 2005, Zhao and Hu 2012). Όντας μη επαγώγιμα, τα βασικά επίπεδα έκφρασης των ενζύμων AmpC από το συγκεκριμένο βακτήριο δεν μεταβάλλουν σημαντικά την ευαισθησία σε β-λακτάμες, αν και η παρουσία μιας αλληλουχίας παρεμβολής IS (ISAba1) προκαλεί αυξημένη έκφραση bla_{AmpC} και ανθεκτικότητα στις ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες, εκτός της καφεπίμης και των καρβαπενεμών (Roca *et al* 2012).

Οι οξασιλλινάσες χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να υδρολύουν κλοξακιλλίνη και οξακιλλίνη καθώς επίσης και μερικές οξυϊμινο-β-λακτάμες, αλλά όχι καρβαπενέμες (Roca *et al* 2012). Τα ένζυμα που υπάρχουν στα βακτήρια του γένους *Acinetobacter* αποτελούν την άτυπη υποομάδα των OXA ενζύμων, δεδομένου ότι παρουσιάζουν δραστικότητα υδρόλυσης καρβαπενεμίου (υδρολύουν δηλαδή την μιπενέμη και τη μεροπενέμη αλλά όχι τις ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες και την αζτρεονάμη) και κατά συνέπεια αποκαλούνται επίσης ως τάξης D β-λακταμάσες που υδρολύουν καρβαπενέμες (CHDLs) (Poirel and Nordmann 2006a). Επιπλέον, έχουν τη δική τους ομάδα (2df) στην επικαιροποιημένη λειτουργική ταξινόμηση των β-λακταμασών που δημοσιεύθηκε πρόσφατα από τους Bush και Jacoby (2010). Στο *Acinetobacter baumannii* έχουν ταυτοποιηθεί πέντε φυλογενετικές υποομάδες της τάξης D των β-λακταμασών: οι OXA-51/69 και τέσσερις ομάδες CHDLs (OXA-23, OXA-24/40, OXA-58, και OXA 143) (Roca *et al* 2012).

Όμοια με το bla_{ampC}, η βασική έκφραση της φυσικά απαντώμενης OXA-51 οξασιλλινάσης στο *Acinetobacter baumannii* επιτρέπει μόνο ασθενή υδρόλυση των υποστρωμάτων β-λακταμάσης, κυρίως πενικιλινών και καρβαπενεμών, ενώ δεν είναι δραστική εναντίον των διευρυμένου-φάσματος κεφαλοσπορινών (Héritier *et al* 2005a), εκτός και αν βρίσκονται οι αλληλουχίες παρεμβολής ISAba1 ή ISAba9 ανοδικά των bla_{OXA-51} γονιδίων, ώστε να αυξήσουν την έκφρασή τους (Turton *et al* 2006, Figueiredo *et al* 2009). Πάνω από 68 διαφορετικές παραλλαγές της αλληλουχίας των OXA-51 περιλαμβάνονται στην ομάδα ενζύμων D (Zhao and Hu 2012).

Το ένζυμο OXA-23 μοιράζεται 56% ομοιότητα σε επίπεδο πρωτεΐνης με το OXA-51/69. Ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά σε ένα πλασμίδιο στελέχους *Acinetobacter baumannii* από τη Σκωτία, αποτελώντας την πρώτη οξασιλλινάση με ενεργότητα καρβαπενεμάσης που έχει αναφερθεί (Paton *et al* 1993). Από τότε το γονίδιο bla_{OXA-23} έχει εντοπιστεί σε ολόκληρο τον κόσμο, τόσο στο χρωμόσωμα του βακτηρίου όσο και σε πλασμίδια και αποτελεί χαρακτηριστικό του γένους *Acinetobacter* (Roca *et al* 2012).

Η δεύτερη ομάδα των ενζύμων τάξης D πήρε το όνομά της από το ένζυμο OXA-24/40, το οποίο απομονώθηκε πρώτη φορά από το χρωμόσωμα ενός ανθεκτικού στις καρβαπενέμες στελέχους *Acinetobacter baumannii* από την Ισπανία

(Bou *et al* 2000c). Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει επίσης τα ένζυμα OXA-25, OXA-26, και OXA-72 και διαπιστώθηκε αμινοξική ομοιότητα κατά 60% με τα OXA-51/69 και OXA-23. Μολονότι το ένζυμο OXA-26 έχει ταυτοποιηθεί στο Βέλγιο (Afzal-Shah *et al* 2001), το OXA-72 στην Ασία (Wang *et al* 2007, Lee *et al* 2009a, Lu *et al* 2009) και πιο πρόσφατα στην Κροατία (Goic-Barisic *et al* 2011) και το blaOXA-40 γονίδιο έχει βρεθεί, επίσης, στις ΗΠΑ (Lolans *et al* 2006, Qi *et al* 2008), τα γονίδια blaOXA-24/40 φαίνεται να είναι περισσότερο διαδεδομένα στην Ισπανία και την Πορτογαλία (Quinteira *et al* 2007, Ruiz *et al* 2007) και εντοπίζονται είτε στο χρωμόσωμα είτε σε πλασμίδια.

Η τρίτη ομάδα ταυτοποιήθηκε σε *Acinetobacter baumannii* από τους Poirel *et al* (2005b) και περιλαμβάνει τα γονίδια OXA-58. Τα γονίδια αυτά μοιράζονται 59% αμινοξική ομοιότητα με τα OXA-51/69 και λιγότερο από 50% με τα OXA-23 και OXA-24/40 (Roca *et al* 2012). Το γονίδιο bla_{OXA-58} μέχρι τώρα έχει βρεθεί μόνο σε είδη του γένους *Acinetobacter* και παρόλο που εμφανίζει μια ευρεία κατανομή σε ολόκληρο τον κόσμο είναι ιδιαίτερα διαδεδομένο στην Ιταλία και στην Ελλάδα (D'Arezzo *et al* 2009, Gogou *et al* 2011), όπου στελέχη *Acinetobacter baumannii* ανθεκτικά σε καρβαπενέμες που παράγουν OXA-58 αποτελούν αιτία για πολλά κρούσματα λοιμώξεων σε μονάδες εντατικής θεραπείας και σε παιδιατρικές μονάδες (Pournaras *et al* 2006, Tsakris *et al* 2008). Τα OXA-96 και OXA-97 συνιστούν παράγωγα σημειακής μετάλλαξης του OXA-58, συμπεριλαμβάνονται στο ίδιο σύμπλεγμα και έχουν τις ίδιες υδρολυτικές ιδιότητες (Roca *et al* 2012).

Η τέταρτη ομάδα των CHDLs ταυτοποιήθηκε πρόσφατα από την απομόνωση του νέου ενζύμου OXA-143 από βακτήριο *Acinetobacter baumannii* στη Βραζιλία (Higgins *et al* 2009). Σε πρωτεϊνικό επίπεδο το ένζυμο αυτό είναι 88%, 63%, και 52% ταυτόσημο με τα OXA-24/40, OXA-23, και OXA-58 αντίστοιχα, αλλά εμφανίζει ένα παρόμοιο προφίλ υποστρώματος με εκείνο των άλλων CHDLs από το *A. baumannii*.

Από την ανακάλυψή τους το 1985 οι καρβαπενέμες ήταν κατά πάσα πιθανότητα, και εξακολουθούν να είναι, οι πιο σημαντικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες για τη θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από το πολυανθεκτικό *Acinetobacter baumannii*. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών η ανθεκτικότητα στις καρβαπενέμες αυξάνεται σε όλο τον κόσμο (Gogou *et al* 2011). Συνήθως στελέχη *Acinetobacter baumannii* που είναι ανθεκτικά στις καρβαπενέμες

είναι ανθεκτικά και σε πολλές άλλες κατηγορίες αντιβιοτικών, παρουσιάζοντας ταυτόχρονα ενδιάμεση ευαισθησία στην ριφαμπικίνη, ενώ είναι ευαίσθητα σε τιγκεκυκλίνη και κολιστίνη, αν και πρόσφατα έχει αναφερθεί ανθεκτικότητα και στα δυο αυτά αντιβιοτικά (Al-Sweih *et al* 2011, Taneja *et al* 2011).

Υπάρχει και μια άλλη κατηγορία β-λακταμασών που μαζί με τα ένζυμα τάξης D συμβάλλει στον ανθεκτικό στην καρβαπενέμη φαινότυπο και είναι οι μεταλλο β-λακταμάσες τάξης B (MBLs). Αυτή η ομάδα ενζύμων διαφέρει από τις υπόλοιπες β-λακταμάσες στο ότι υδρολύουν τις περισσότερες β-λακτάμες εκτός από μονοβακτάμη και αζτρεονάμη, καθώς επίσης στο ότι είναι μεταλλοπρωτεΐνες εξαρτώμενες από ψευδάργυρο που αναστέλλονται από EDTA, αλλά όχι από καρβαπενέμη ή αναστολείς β-λακταμάσης, όπως κλαβουλανικό οξύ, ταζομπακτάμη και σουλμπακτάμη (Bush and Jacoby 2010).

Παρά το γεγονός ότι οι MBLs δεν είναι τόσο διαδεδομένες στο *Acinetobacter baumannii* όσο τα ένζυμα τάξης D, εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη υδρολυτική ενεργότητα έναντι των καρβαπενεμών (Poirel and Nordmann 2006a). Από τις διάφορες ομάδες των MBLs που έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα, μόνον οι IMP, VIM, SIM και η νέα NDM έχουν βρεθεί στο *Acinetobacter baumannii* και με εξαίρεση την NDM έχουν ταυτοποιηθεί σε τάξης 1 ιντεγκρόνια που περιέχουν μια σειρά από κασέτες γονιδίων ανθεκτικότητας (Tsakris *et al* 2006).

Οι IMP μεταλλο-β-λακταμάσες (το όνομά τους οφείλεται στο ότι είναι ενεργές στην μιπενέμη) περιγράφηκαν για πρώτη φορά σε στέλεχος *Pseudomonas aeruginosa* που απομονώθηκε το 1990 στην Ιαπωνία (Watanabe *et al* 1991). Μετά από αυτή την αρχική απομόνωση, IMP ένζυμα έχουν αναφερθεί σε όλο τον κόσμο σε διάφορα Gram-αρνητικά βακτήρια, συμπεριλαμβανομένου και του *Acinetobacter baumannii* (Queenan and Bush 2007). Μέχρι στιγμής υπάρχουν έως 33 διαφορετικές IMP αλλά μόνο 8 έχουν εντοπιστεί σε *Acinetobacter baumannii* κυρίως στην Ασία αλλά και στην Ευρώπη και σε περιοχές της Νότιας Αμερικής (Riccio *et al* 2000, Chu *et al* 2001, Da Silva *et al* 2002, Towner *et al* 2002, Gales *et al* 2003, Lee *et al* 2003, 2008, Yamamoto *et al* 2011). Τα ένζυμα που ανήκουν στον τύπο IMP έχουν ευρεία εξειδίκευση υποστρώματος και είναι ιδιαίτερα δραστικά έναντι των κεφαλοσπορινών και των καρβαπενεμών.

Το πρώτο ένζυμο-VIM (VIM-1) περιγράφηκε αρχικά το 1999 σε ένα στέλεχος *Pseudomonas aeruginosa* στην Βερόνα της Ιταλίας (Lauretti *et al* 1999), αλλά το πρώτο ένζυμο VIM (VIM-2) που εντοπίστηκε στο *Acinetobacter baumannii* παρουσιάστηκε λίγο αργότερα (Yum *et al* 2002). Οι VIM MBLs εμφανίζουν μικρότερη του 40% ομοιότητα αμινοξέων με τα IMP ένζυμα, ενώ μοιράζονται ένα παρόμοιο προφίλ υποστρωμάτων, αν και έχουν μεγαλύτερη συγγένεια έναντι των καρβαπενεμών (Docquier *et al* 2003). Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας έχουν εντοπιστεί πολλές παραλλαγές VIM (VIM-1, VIM-2, VIM-3, VIM-4 και VIM-11) σε στελέχη *Acinetobacter baumannii*, κυρίως σε ευρωπαϊκές και ασιατικές χώρες (Yum *et al* 2002, Lee *et al* 2003, 2008, Tsakris *et al* 2006, Wroblewska *et al* 2007, Figueiredo *et al* 2008).

Η SIM-1 βρέθηκε αρχικά σε στέλεχος *Acinetobacter baumannii* σε ένα τριτοβάθμιο νοσοκομείο στη Σεούλ, και μέχρι στιγμής αποτελεί το μόνο bla_{SIM-1} γονίδιο που αναφέρθηκε σ' αυτόν τον μικροοργανισμό (Lee *et al* 2005). Η SIM-1 εμφανίζει 64-69% ομοιότητα αμινοξέων με τα ένζυμα IMP, και όπως οι IMP και οι VIM, είναι σε θέση να υδρολύει πενικιλίνες, περιορισμένου και ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες καθώς και καρβαπενέμες.

Το πιο πρόσφατο ένζυμο μεταλλο-β-λακταμάσης τάξης B, που ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά σε στελέχη *Klebsiella pneumoniae* και *Escherichia coli* στη Σουηδία, απομονώθηκε από ένα άτομο που επέστρεψε από την Ινδία και, ως εκ τούτου, έχει ονομαστεί NDM-1 (New Delhi metallo-β-lactamase) (Yong *et al* 2009). Ομοίως με άλλα ένζυμα MBL, η NDM-1 παρέχει ανθεκτικότητα έναντι σε όλες τις β-λακτάμες, εκτός της αζτρεονάμης. Μετά την αρχική απομόνωση του, αρκετές αναφορές έχουν γίνει για γονίδια bla_{NDM} σε στελέχη της οικογένειας των *Enterobacteriaceae* σε όλο τον κόσμο, λόγω του ότι η πλασμιδιακή τους εντόπιση επιτρέπει την ταχεία μεταφορά και διάδοσή τους (Nordmann *et al* 2011, 2012, Poirel *et al* 2011a). Το 2010 εντοπίστηκε για πρώτη φορά σε μια μονάδα εντατικής θεραπείας στην Ινδία το γονίδιο bla_{NDM-1} σε στέλεχος *Acinetobacter baumannii* που περιείχε, επίσης, το γονίδιο bla_{OXA-23} καθώς και το armA (Karthikeyan *et al* 2010), ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μια 16S rRNA μεθυλάση και προσδίδει αντοχή σε αμινογλυκοσίδες (Yamane *et al* 2005). Αρκετές αναφορές έχουν γίνει για τα NDM ένζυμα σε στελέχη *Acinetobacter baumannii* από την Κίνα, τη Γερμανία και το Ισραήλ (Chen *et al* 2011,

Espinal *et al* 2011a, Pfeifer *et al* 2011). Ενδιαφέρον είναι ότι ενώ τα γονίδια bla_{NDM-1} και bla_{NDM-2}, από τη Γερμανία και το Ισραήλ αντίστοιχα βρέθηκαν στο χρωμόσωμα του *Acinetobacter baumannii*, το bla_{NDM-1} από κινεζικά στελέχη βρέθηκε σε πλασμίδια που κυμαίνονταν από 30 έως 50 kb σε μέγεθος (Chen *et al* 2011).

1.5.1.2. Μη ενζυμικοί μηχανισμοί

1.5.1.2.1. Διαπερατότητα της μεμβράνης

Η ανθεκτικότητα σε β-λακτάμες με τη βοήθεια των μη-ενζυμικών μηχανισμών προκαλείται από οποιαδήποτε μεταβολή στην διαπερατότητα των βακτηριακών μεμβρανών που είτε εμποδίζει την είσοδο των αντιμικροβιακών παραγόντων είτε προωθεί την αποβολή τους (Roca *et al* 2012). Πολύ λίγα στοιχεία είναι γνωστά για τις OMPs του *Acinetobacter baumannii*, αλλά αρκετές μελέτες έχουν αναδείξει τη σημασία τέτοιων πρωτεϊνών στην ανθεκτικότητα σε β-λακτάμες. Το 2002 αποδείχτηκε ότι η απώλεια μιας πρωτεΐνης 29-kDa, της CarO, συνδέεται με την ανθεκτικότητα στις καρβαπεμέμες στο *Acinetobacter baumannii*, απουσία καρβαπενεμάσης (Limansky *et al* 2002). Η απώλεια της CarO σε αρκετά στελέχη *Acinetobacter baumannii* ανθεκτικά στις καρβαπεμέμες οφείλεται στην παρουσία στοιχείων εισαγωγής, τα οποία διαταράσσουν το γονίδιο carO (Mussi *et al* 2005). Μελέτες σχετικά με την δομή της πρωτεΐνης αυτής, ωστόσο, έδειξαν ότι αν και η CarO παρουσιάζει ορισμένες ιδιότητες σχηματισμού πορινών, δεν περιέχει καμία ειδική θέση δέσμευσης για καρβαπενέμες και είναι μάλλον ένας μη-συγκεκριμένος διάυλος (Siroy *et al* 2005). Και από άλλες έρευνες έχουν προσδιοριστεί πρωτεΐνες OMP που εμπλέκονται κυρίως στην ανθεκτικότητα σε καρβαπενέμες κατόπιν απώλειας ή μειωμένης έκφρασής τους. Οι πρωτεΐνες αυτές εντοπίστηκαν σε ένα σύνολο στελεχών *Acinetobacter baumannii* από τη Νέα Υόρκη ανθεκτικών στις καρβαπενέμες και παρουσίασαν μειωμένη έκφραση των 47 -, 44 -, και 37-kDa OMPs μαζί με αυξημένη έκφραση της κεφαλοσπορινάσης τάξης C (Quale *et al* 2003).

Πρωτεωμικές μελέτες κατέδειξαν, επίσης, κάποιες OMPs που ενδέχεται να σχετίζονται με τον ανθεκτικό φαινότυπο σε β-λακτάμες, όπως είναι η θερμοτροποποιήσιμη HMP-AB που αποτελεί τη μείζουσα OMP του *Acinetobacter baumannii* και μοιάζει με την πρωτεΐνη OmpA των εντεροβακτηριδίων (Gribun *et al* 2003). Η OmpW (Siroy *et al* 2006) και μια 43-kDa πρωτεΐνη παρόμοια της OmpD από

την *Pseudomonas aeruginosa* (Dupont *et al* 2005) σχετίζονται, επίσης, με τον ανθεκτικό φαινότυπο σε β-λακτάμες.

1.5.1.2.2. Πρωτεΐνες δέσμησης πενικιλίνης

Ένας άλλος μη ενζυμικός μηχανισμός ανθεκτικότητας σε β-λακτάμες περιλαμβάνει αλλαγές στα επίπεδα συγγένειας ή έκφρασης των πρωτεϊνών δέσμησης πενικιλίνης (PBPs). Από μελέτες που έχουν γίνει έχουν εντοπιστεί διαφορές στα πρότυπα έκφρασης των PBPs μεταξύ ευαίσθητων και ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *Acinetobacter baumannii* (Roca *et al* 2012). Σε μερικά από αυτά τα στελέχη η ανθεκτικότητα στις καρβαπενέμες έχει συσχετισθεί με την υπερέκφραση τύπων της PBP με χαμηλή συγγένεια για τα συγκεκριμένα αντιβιοτικά, απουσία οποιουδήποτε άλλου γνωστού μηχανισμού αντίστασης (Gehrlein *et al* 1991, Urban *et al* 1995). Η ανθεκτικότητα στις καρβαπενέμες έχει, επίσης, συσχετισθεί με μειωμένη έκφραση τύπων PBP με την ταυτόχρονη παραγωγή αρκετών β-λακταμασών, όπως και με την απώλεια μιας OMP 22,5 kDa (Fernández-Cuenca *et al* 2003, Cayo *et al* 2011). Συνολικά, η συνεισφορά των PBP στην ανθεκτικότητα σε καρβαπενέμες ενισχύεται είτε εάν αυτά συνδέονται με β-λακταμάσες, είτε αν υπερεκφράζονται αντλίες εκροής είτε αν υπάρχει μειωμένη έκφραση των OMPs (Roca *et al* 2012).

1.5.2. Αμινογλυκοσίδες

Στο *Acinetobacter baumannii* ανθεκτικότητα ενάντια στις αμινογλυκοσίδες μπορεί να επιτευχθεί μέσω πρωτεϊνών που τις εξωθούν από το βακτήριο (αντλιών εκροής) ή από την έκφραση τροποποιητικών ενζύμων αμινογλυκοσίδης (AMEs), συγκεκριμένα ακετυλοτρανσφερασών, νουκλεοτιδylτρανσφερασών και φωσφοτρανσφερασών (Cho *et al* 2009). Η ενεργοποίηση των AMEs έχει ως αποτέλεσμα την τροποποίηση των υδροξυλομάδων ή των αμινομάδων των αμινογλυκοσιδών, ελαττώνοντας έτσι τη συγγενειά τους με το μόριο στόχο (Smith and Baker 2002). Τα AMEs μπορεί να βρίσκονται είτε στο βακτηριακό χρωμόσωμα είτε σε πλασμίδια και συνήθως συνδέονται με ιντεγκρόνια τάξης 1 και νησίδες ανθεκτικότητας, όπου δύο ή περισσότερα γονίδια ανθεκτικότητας στις αμινογλυκοσίδες υπάρχουν συχνά σε συνδυασμό (Cho *et al* 2009). Οι Nemeč *et al* (2004) διαπίστωσαν ότι σε 106 πολυανθεκτικά στελέχη *Acinetobacter baumannii* περισσότερο από το 95% περιείχαν τουλάχιστον ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε

αμινογλυκοσίδες και 84% περιείχαν έναν συνδυασμό από δύο έως πέντε διαφορετικά γονίδια. Το 78% των στελεχών αυτών περιείχαν τάξης 1 ιντεγκρόνια, υπογραμμίζοντας τον σημαντικό ρόλο της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων στη διάδοση των AMEs στο *Acinetobacter baumannii* (Nemec *et al* 2004).

Πιο πρόσφατα, περιγράφηκε στο *Acinetobacter baumannii* η μεθυλίωση του 16S rRNA που μεσολαβείται από τη μεθυλάση armA, η οποία παρέχει υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητα σε όλες τις κλινικά σημαντικές αμινογλυκοσίδες, όπως η γενταμυκίνη, η τομπραμυκίνη και η αμικακίνη (Doi and Arakawa 2007). Το γονίδιο armA έχει βρεθεί στην Κίνα, την Κορέα και τις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (ΗΠΑ) (Lee *et al* 2006a, Doi *et al* 2007, Yu *et al* 2007), και συχνά συναντάται σε συνδυασμό με το γονίδιο bla_{OXA-23} (Kim *et al* 2008, Karthikeyan *et al* 2010).

1.5.3. Κινολόνες

Οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας του *Acinetobacter baumannii* σε φθοροκινολόνες είναι ανάλογες με αυτές των άλλων Gram-αρνητικών βακτηρίων. Προκαλούνται κυρίως από σημειακές μεταλλάξεις, πιο συγκεκριμένα υποκαταστάσεις αμινοξέων, που συμβαίνουν στα γονίδια της DNA γυράσης και της DNA τοποϊσομεράσης IV (QRDR) (Fàbrega *et al* 2009). Στο *Acinetobacter baumannii* έχουν βρεθεί μεταλλάξεις τόσο στο gyrA όσο και στο parC γονίδιο με τις πιο συχνές υποκαταστάσεις να είναι της Ser83 σε Leu83 στο gyrA και της Ser80 σε Leu80 στο parC (Vila *et al* 1995, 1997b, Seward and Towner 1998, Spence and Towner 2003, Wisplinghoff *et al* 2003, Hamouda and Amyes 2004, Higgins *et al* 2004, Valentine *et al* 2008). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι μεταλλάξεις που συμβαίνουν στο parC, συνοδεύονται πάντα από μια παράλληλη μετάλλαξη στη gyrA, γεγονός που υποδηλώνει ότι πιθανότατα η DNA γυράση είναι ο προτιμώμενος στόχος για τις φθοροκινολόνες στο *Acinetobacter baumannii* (Vila *et al* 1995, 1997b, Hamouda and Amyes 2004).

1.5.4. Πολυμιξίνες

Μέχρι και σήμερα τα περισσότερα πολυανθεκτικά στελέχη *Acinetobacter baumannii* παραμένουν ευαίσθητα σε πολυμιξίνες, με αποτέλεσμα να αυξάνεται συνεχώς η χρήση αυτών των αντιβιοτικών, παρά τις προηγούμενες ανησυχίες σχετικά με θέματα τοξικότητας (Falagas and Kasiakou 2005). Η πολυμιξίνη E (κολιστίνη),

δρα τροποποιώντας τα αρνητικά φορτία των εξωτερικών μεμβρανών των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, με αποτέλεσμα να διαταράσσεται η βακτηριακή μεμβράνη (Roca *et al* 2012). Υπάρχουν πολύ λίγες πληροφορίες σχετικά με τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας του *Acinetobacter baumannii* στην κολιστίνη, αλλά φαίνεται ότι η ανθεκτικότητα σε αυτό το αντιβιοτικό μπορεί να είναι πολυπαραγοντική (Roca *et al* 2012).

Συγκρίνοντας το πρωτέωμα των στελεχών *Acinetobacter baumannii* που είναι ευαίσθητα στην πολυμυξίνη με αυτό των στελεχών που είναι ανθεκτικά, οι Fernández-Reyes *et al* (2009) ήταν σε θέση να προσδιορίσουν τις διαφορές στην έκφραση 35 πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των OMPs, μοριακών συνοδών, παραγόντων βιοσύνθεσης πρωτεΐνης και μεταβολικών ενζύμων. Άλλες μελέτες, ωστόσο, έχουν επικεντρωθεί σε τροποποιήσεις στους λιποπολυσακχαρίτες των βακτηρίων. Έχει αποδειχθεί ότι οι μεταλλάξεις που προκαλούν αύξηση στην έκφραση των γονιδίων *pmrA* και *pmrB* οδηγούν σε ανθεκτικότητα στην κολιστίνη (Adams *et al* 2009). Τα *pmrA* και *pmrB* συνιστούν ένα σύστημα που ρυθμίζει την έκφραση του *pmrC*, κωδικοποιώντας ένα ένζυμο μεταφοράς φωσφοαιθανολαμίνης που εμπλέκεται στην τροποποίηση του λιπιδίου A (Roca *et al* 2012). Η αύξηση της έκφρασης των *pmrA* και *pmrB* προκαλεί επίσης την υπερέκφραση του *pmrC* και την προσθήκη της φωσφοαιθανολαμίνης στο λιπίδιο A, γεγονός που δυσχεραίνει την πρόσληψη της κολιστίνης από όλη την εξωτερική μεμβράνη (Agroyo *et al* 2011, Beceiro *et al* 2011).

Από την άλλη πλευρά, οι Moffatt *et al* (2010) απέδειξαν ότι η ανθεκτικότητα στην κολιστίνη θα μπορούσε, επίσης, να επιτευχθεί με την πλήρη απώλεια της παραγωγής λιποπολυσακχαριτών λόγω μεταλλάξεων που επηρεάζουν διάφορα γονίδια που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση του λιπιδίου A (*lpxA*, *lpxC*, ή *lpxD*). Μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια, που ποικίλλουν από σημειακές μεταλλάξεις μέχρι μεγάλα ελλείμματα ή ακόμη και η παρουσία ενός στοιχείου εισαγωγής, ISAba11, έχουν σαν αποτέλεσμα την περικοπή είτε του *lpxA* είτε του *lpxC* (Moffatt *et al* 2011). Οι Moffatt *et al* (2011) παρατήρησαν ότι τα μεταλλάγματα που ήταν ανθεκτικά στην κολιστίνη και στερούνταν λιποπολυσακχαρίτες είχαν αυξήσει από 32-256 φορές την ευαισθησία τους σε άλλες κατηγορίες αντιβιοτικών. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στην αυξημένη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης λόγω απώλειας λιποπολυσακχαριτών.

1.5.5. Πρωτεΐνες εκροής

Η εκροή αντιμικροβιακών παραγόντων είναι ένας ακόμη σημαντικός μηχανισμός που προσδίδει ανθεκτικότητα στα βακτήρια *Acinetobacter baumannii*. Η εκροή αποτελεί ένα μηχανισμό ανθεκτικότητας που περιλαμβάνει την αποβολή των αντιμικροβιακών παραγόντων (καθώς και άλλων ενώσεων) από την εσωτερική πλευρά των βακτηριακών μεμβρανών στο εξωτερικό περιβάλλον, μέσω ειδικών πρωτεϊνών που ονομάζονται αντλίες εκροής. Αν και έχουν περιγραφεί λίγα συστήματα εκροής σε αυτόν τον μικροοργανισμό η σημασία τους είναι μεγάλη, δεδομένου ότι τα περισσότερα είναι ικανά να εξωθούν αρκετούς αντιμικροβιακούς παράγοντες και επομένως να συμβάλλουν στον πολύ επικίνδυνο φαινότυπο αυτού του βακτηρίου.

Οι αντλίες εκροής στα βακτήρια κατατάσσονται σε πέντε διαφορετικές οικογένειες σύμφωνα με τις ομοιότητες της αμινοξικής αλληλουχίας, την πηγή ενέργειας, τον αριθμό των συστατικών, τον αριθμό των διαμεμβρανικών περιοχών και τους τύπους των υποστρωμάτων: την ATP οικογένεια, την MATE οικογένεια, την SMR οικογένεια, την MFS οικογένεια και την RND οικογένεια (Pidcock 2006).

Η οικογένεια RND παίζει συνήθως κυρίαρχο ρόλο στην πολυανθεκτικότητα στα Gram-αρνητικά βακτήρια και το γένος *Acinetobacter* δεν αποτελεί εξαίρεση (Li and Nikaido 2009). Μέλη της οικογένειας αυτής αποτελούνται από ένα τριμερές σύστημα που περιλαμβάνει μια πρωτεΐνη μεταφορέα ενσωματωμένη εντός της εσωτερικής μεμβράνης, ένα κανάλι OMP και μία πρωτεΐνη με δυνατότητα σύντηξης στη μεμβράνη που συνδέει τα άλλα δύο (Magnet *et al* 2001). Η πρώτη RND αντλία που ταυτοποιήθηκε στο *Acinetobacter baumannii* ονομάστηκε AdeABC, με την AdeB να αποτελεί την πολυανθεκτική πρωτεΐνη μεταφορέα, AdeC να είναι η OMP και AdeA να είναι η πρωτεΐνη σύνδεσης του περιπλάσματος (Magnet *et al* 2001). Των γονιδίων *adeABC* προηγούνται δύο επιπλέον γονίδια σε ανεστραμμένο προσανατολισμό, τα *adeSR*, τα οποία κωδικοποιούν ένα ρυθμιστικό σύστημα που εμπλέκεται στον έλεγχο της έκφρασης των *adeABC* (Marchand *et al* 2004). Η έκφραση των *AdeABC* προσδίδει μειωμένη ευαισθησία σε μια ευρεία ποικιλία αντιβιοτικών όπως η καναμυκίνη, η γενταμυκίνη, η τομπραμυκίνη, η νετιλμικίνη, η αμικασίνη, η ερυθρομυκίνη, η τετρακυκλίνη, η χλωραμφενικόλη, η τριμεθοπρίμη, η σπαρφλοξακίνη, η οφλοξακίνη, η νορφλοξακίνη, το βρωμιούχο αιθίδιο, η τιγκεκυκλίνη

(Ruzin *et al* 2007) και η μεροπενέμη (Koh *et al* 2007a). Δεν φαίνεται να φέρουν όλα τα στελέχη *Acinetobacter baumannii* αυτό το σύστημα, αν και οι Huys *et al* (2005a), ανίχνευσαν το γονίδιο *adeB* σε 49 από τα 51 (96%) συγγενικά στελέχη *Acinetobacter baumannii*, και οι Chu *et al* (2006) βρήκαν το γονίδιο *adeB* σε 39 από τα 56 (70%) στελέχη από το Χονγκ Κονγκ.

Και άλλες μελέτες δείχνουν ότι υπάρχει συσχετισμός μεταξύ της παρουσίας αυτού του συστήματος εκροής και του ανθεκτικού φαινοτύπου του *Acinetobacter baumannii*, επειδή η AdeABC σε ανθεκτικά στελέχη συνήθως συνδέεται με γονίδια ιντεγκρονίων τάξης 1, αλλά απουσιάζει από τα ευαίσθητα (Fournier *et al* 2006, Lin *et al* 2009).

Το δεύτερο σύστημα εκροής RND που περιγράφηκε στο *A. baumannii* (AdeIJK) αναφερόταν στο ίδιο κλινικό στέλεχος που οδήγησε στην ταυτοποίηση του AdeABC (Damier-Piolle *et al* 2008). Η υπερέκφραση αυτής της αντλίας, είτε σε *Escherichia coli* είτε σε *Acinetobacter baumannii* βακτήρια προκαλεί τοξικότητα, γεγονός που υποδηλώνει την παρουσία ενός αυστηρού μηχανισμού ρύθμισης που θα διατηρεί τα επίπεδα έκφρασης της χαμηλά. Ωστόσο, δεν έχουν βρεθεί ρυθμιστικά γονίδια κοντά στο *adeIJK* (Roca *et al* 2012).

Αδρανοποίηση της AdeIJK από αντικατάσταση αλληλομόρφου έδειξε μειωμένη αντίσταση σε υποστρώματα παρόμοια με εκείνα της αντλίας AdeABC και ένα διπλό μετάλλαγμα (ΔadeABC / ΔadeIJK) οδήγησε σε ακόμη χαμηλότερες MICs (ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση) χλωραμφενικόλης, τετρακυκλίνης, ερυθρομυκίνης, κλινδαμυκίνης, φθοριοκινολόνης, καθώς και τιγκεκυκλίνης σε σχέση με τα μεμονωμένα μεταλλάγματα, υποδεικνύοντας έτσι τη συσσωρευμένη επίδραση των αντλιών καθώς και τα επικαλυπτόμενα προφίλ υποστρώματος, τα οποία είναι ενδιαφέροντα από κλινικής άποψης (Roca *et al* 2012). Ωστόσο, σε αντίθεση με τις AdeABC, οι AdeIJK δεν φαίνονται ικανές να αποβάλλουν βρωμιούχο αιθίδιο ή αζιθρομυκίνη, παρά το γεγονός ότι το τελευταίο είναι προτιμώμενο υπόστρωμα για τις AdeABC (Damier-Piolle *et al* 2008).

Οι Coyne *et al* (2010a) ανέφεραν μια τρίτου τύπου αντλία εκροής RND, την AdeFGH, εντός ενός παράγωγου μεταλλάγματος (ΔadeABC / ΔadeIJK) από το ίδιο στέλεχος *Acinetobacter baumannii* στο οποίο είχαν χαρακτηριστεί οι AdeABC και AdeIJK. Έκφραση της AdeFGH ήταν υπεύθυνη για την υψηλού επιπέδου

ανθεκτικότητα σε χλωραμφαινικόλη, κλινδαμυκίνη, φθοριοκινολόνες και τριμεθοπρίμη, καθώς και για μειωμένη ευαισθησία στην τετρακυκλίνη, την τιγκεκυκλίνη και τα σουλφοναμίδια, αλλά η ανθεκτικότητα σε β-λακτάμες, ερυθρομυκίνη και ριφαμπίνη παρέμεινε αμετάβλητη (Coynne *et al* 2010b).

Οι Roca *et al* (2009) εντόπισαν μια αντλία εκροής της οικογένειας MFS, την CraA, σε ένα κλινικό στέλεχος *Acinetobacter baumannii* από την Ισπανία. Η CraA ενισχύει την ανθεκτικότητα του βακτηρίου έναντι της χλωραμφενικόλης. Αυτή η πρωτεΐνη ήταν παρόμοια σε αλληλουχία και δευτεροταγή δομή με την αντλία εκροής MdfA της *Escherichia coli*, αλλά διέφεραν στο προφίλ υποστρώματος. Η CraA αποδείχθηκε ότι είναι εξαιρετικά ειδική για χλωραμφενικόλη και έχει βρεθεί σε όλα τα στελέχη που εξετάστηκαν μέχρι σήμερα.

Πιο πρόσφατα, οι Rajamohan *et al* (2010) περιέγραψαν μια δεύτερη αντλία εκροής της οικογένειας MFS, την AmnA, που εμπλέκεται κυρίως στην αποβολή χρωστικών, απολυμαντικών, απορρυπαντικών καθώς επίσης και της ερυθρομυκίνης, αν και προκαλεί μόνο τετραπλάσια μείωση της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης του αντιβιοτικού αυτού. Και η AmnA είναι παρούσα σε όλα τα στελέχη *Acinetobacter baumannii* που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα (Rajamohan *et al* 2010).

Ο τρίτος τύπος αντλιών εκροής της MFS που υπάρχουν στο *Acinetobacter baumannii* αποτελείται από συστήματα εκροής τετρακυκλίνης (Tet), τα οποία συναντώνται σε πλασμίδια, μεταθετόνια, ή νησίδες ανθεκτικότητας. Οι TetA και TetB αποτελούν τις πιο διαδεδομένες αντλίες εκροής τετρακυκλίνης, με την TetA να προσδίδει ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη και την TetB στην τετρακυκλίνη και στην μινोकυκλίνη (Vila *et al* 2007). Ωστόσο, και το γονίδιο tet(M) έχει ταυτοποιηθεί σε κλινικό στέλεχος *Acinetobacter baumannii* (Ribera *et al* 2003b). Το γονίδιο tet(A), μαζί με αυτό που κωδικοποιεί το μεταγραφικό ρυθμιστή του, tetR, βρίσκεται σε ένα τρανσποζόνιο, το Tn1721, το οποίο με τη σειρά του θα μπορούσε να είναι μέρος μιας μεγαλύτερης νησίδας ανθεκτικότητας (Ribera *et al* 2003a, Fournier *et al* 2006). Από την άλλη πλευρά, το tet (B) βρίσκεται σε μικρά πλασμίδια που κυμαίνονται από 5 έως 9 kDa (Srinivasan *et al* 2009b). Από γενικευμένες μελέτες φαίνεται να προκύπτει ότι το γονίδιο tet (B) παρατηρείται πιο συχνά σε κλινικά στελέχη *Acinetobacter*

baumannii (Guardabassi *et al* 2000, Huys *et al* 2005b, Martí *et al* 2006, Mak *et al* 2009, Srinivasan *et al* 2009b).

Η μόνη αντλία εκροής της οικογένειας MATE που έχει βρεθεί μέχρι σήμερα σε στελέχη *Acinetobacter baumannii*, η AbeM, ταυτοποιήθηκε από τους Su *et al* (2005) και χρησίμευε στο να εξωθεί από τα βακτήρια αμινογλυκοσίδες, φθοροκινολόνες, χλωραμφενικόλες, τριμεθοπρίμες, βρωμιούχο αιθίδιο και διάφορες χρωστικές. Μολονότι η AbeM έχει επίσης εντοπιστεί σε όλα τα στελέχη *Acinetobacter baumannii* που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα, ο ακριβής ρόλος αυτής της αντλίας στην ανθεκτικότητα ενάντια στα αντιβιοτικά παραμένει ασαφής (Roca *et al* 2012).

Η AbeS είναι μια επιπρόσθετη αντλία εκροής που προσδιορίστηκε στο *Acinetobacter baumannii* και προσδίδει χαμηλού επιπέδου ανθεκτικότητα σε αρκετούς αντιμικροβιακούς παράγοντες, περιλαμβανομένης της χλωραμφενικόλης, των φθοροκινολονών, της ερυθρομυκίνης και της νοβοβοκίνης, καθώς και έναντι χρωστικών και απορρυπαντικών (Roca *et al* 2012). Παρ' όλα αυτά η συγκεκριμένη αντλία δεν εμφανίζεται σε πλήρως αλληλουχημένο γονιδίωμα του βακτηρίου (Roca *et al* 2012). Η AbeS ανήκει στην οικογένεια SMR και διατηρεί κάποιο βαθμό ομοιότητας με το σύστημα EmrE της *Escherichia coli* (Srinivasan *et al* 2009a).

1.6. Μέθοδοι μοριακής τυποποίησης

Οι μέθοδοι μοριακής τυποποίησης διακρίνονται στις φαινοτυπικές μεθόδους και στις γονοτυπικές μεθόδους. Οι φαινοτυπικές μέθοδοι χρησιμοποιούν τα προϊόντα γονιδιακής έκφρασης για να διαφοροποιήσουν τα στελέχη, όπως για παράδειγμα βιοχημικά προφίλ, τύπους βακτηριοφάγων, αντιγόνα που παρουσιάζονται στην επιφάνεια των κυττάρων και την ευαισθησία που παρουσιάζουν οι μικροοργανισμοί σε αντιμικροβιακούς παράγοντες. Φαινοτυπικές μέθοδοι τυποποίησης είναι η βιοτυποποίηση, τα πρότυπα αντιμικροβιακής ευαισθησίας και η οροτυποποίηση.

Η βιοτυποποίηση, δηλαδή ο προσδιορισμός του βιότυπου, γίνεται με τη χρήση συνδυασμένων βιοχημικών και ανοσολογικών τεστ. Ωστόσο, η βιοτυποποίηση βασίζεται σε μια ποικιλία καινούριων υποστρωμάτων, με αποτέλεσμα αρκετά από αυτά τα τεστ να διαφέρουν ακόμη και μεταξύ μελών του ίδιου στελέχους. Αυτό σημαίνει ότι αυτή η φαινοτυπική μέθοδος έχει μικρή επαναληψιμότητα, λόγω της ιδιότητας των μικροοργανισμών να μεταβάλλουν την έκφραση πολλών κυτταρικών

προϊόντων τους. Επιπλέον, η συγκεκριμένη μέθοδος έχει μικρή διακριτική ικανότητα μεταξύ παθογόνων με παρόμοιο βιοχημικό προφίλ.

Η ευαισθησία σε αντιμικροβιακούς παράγοντες αποτελεί μια ακόμη φαινοτυπική μέθοδο μοριακής τυποποίησης βακτηρίων. Παρατηρήθηκε όμως ότι λόγω της ύπαρξης μεταθετών στοιχείων βακτήρια που συνδέονται επιδημιολογικά παρουσιάζουν διαφορές στα αντιβιογράμματα και μη συγγενή βακτήρια να εμφανίζουν παρόμοια αντιμικροβιακή ευαισθησία.

Η οροτυποποίηση, η τρίτη φαινοτυπική μέθοδος, χρησιμοποιεί σειρές αντισωμάτων για ανιχνεύσει διαφορετικά αντιγονικά κατάλοιπα στην επιφάνεια του βακτηριακού κυττάρου. Η οροτυποποίηση αποτελεί μια από τις κλασσικές μεθόδους τυποποίησης για επιδημιολογικές μελέτες πολλών ειδών βακτηρίων εδώ και πολλά χρόνια.

Οι γονοτυπικές μέθοδοι τυποποίησης βασίζονται στην ανάλυση του γονιδιώματος ενός οργανισμού και είναι οι εξής: η μέθοδος που εξετάζει την ύπαρξη πλασμιδίων, η ανάλυση πλασμιδιακού DNA με περιοριστική ενδονουκλεάση, η ανάλυση χρωμοσωμικού DNA με περιοριστική ενδονουκλεάση, ο πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών τμημάτων (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP), η ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Pulsed field gel electrophoresis, PFGE) και η Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αυθαίρετους εκκινητές (PCR with arbitrary primers, AP-PCR).

Η μέθοδος που βασίζεται στην παρουσία πλασμιδίων ήταν η πρώτη μοριακή μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την τυποποίηση βακτηρίων (Schaberg *et al* 1981, Taylor *et al* 1982). Τα πλασμίδια είναι εξωχρωμοσωμικά τμήματα DNA που εντοπίζονται σε πολλά κλινικά βακτήρια. Η τυποποίηση με τη μέθοδο αυτή βασίζεται στον αριθμό και το μέγεθος των πλασμιδίων που εντοπίζονται σε κάποιο βακτήριο.

Ωστόσο, ορισμένα βακτηριακά στελέχη περιέχουν μόνο ένα μεγάλο πλασμίδιο, το οποίο είναι δύσκολο να χρησιμοποιηθεί στην τυποποίηση ακριβώς λόγω του μεγάλου μεγέθους του. Για το λόγο αυτό γίνεται πέψη του πλασμιδίου με περιοριστική ενδονουκλεάση, ώστε να επιτευχθεί μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα κατά την ηλεκτροφόρηση των τμημάτων της πέψης στο πήκτωμα αγαρόζης. Η μέθοδος αυτή, όμως, έχει και κάποια μειονεκτήματα: πρώτον, τα πλασμίδια είναι δυνατόν να μετακινηθούν σε διαφορετικά είδη βακτηρίων και δεύτερον τόσο η

εξωτερική δομή όσο και το περιεχόμενο των πλασμιδίων ενός συγκεκριμένου στελέχους μεταβάλλονται λόγω της ύπαρξης μεταθετών στοιχείων.

Εκτός του πλασμιδιακού DNA υπάρχουν και μέθοδοι μοριακής τυποποίησης βακτηρίων που στηρίζονται στην πέψη χρωμοσωμικού DNA. Μια από αυτές είναι ο πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών τμημάτων, όπου ακολουθείται η εξής διαδικασία: το χρωμοσωμικό DNA κόβεται σε συγκεκριμένα σημεία από περιοριστικές ενδονουκλεάσες και τα τμήματα που προκύπτουν διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Στη συνέχεια τα τμήματα αυτά μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, η οποία υβριδοποιείται με σημασμένα τμήματα DNA έτσι ώστε τα σημασμένα τμήματα να συνδεθούν με τα συμπληρωματικά τους που βρίσκονται στη μεμβράνη. Οι διαφορές στον αριθμό και το μέγεθος των τμημάτων DNA που εντοπίζονται με τον υβριδισμό αναφέρονται ως πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών τμημάτων. Η ριβοτυποποίηση, που είναι κι αυτή διαδεδομένη τεχνική τυποποίησης βακτηρίων, έχει την διαφορά ότι σε αυτή την περίπτωση γίνεται χρήση σημασμένων τμημάτων rRNA και όχι DNA.

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Pulsed field gel electrophoresis, PFGE) ξεκινά με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων *ApaI* και *SmaI* που έχει σαν αποτέλεσμα τη διάσπαση του χρωμοσωμικού DNA (Bou *et al* 2000, Gouby *et al* 1992). Τα χρωμοσωμικά θραύσματα που προκύπτουν διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση εντός μεταβαλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Το πρότυπο ζωνών που προκύπτει συγκρίνεται με τα υπόλοιπα στελέχη της μελέτης, ώστε να βρεθεί πιθανή γενετική σχέση (Allardet-Servent *et al* 1989). Το πρωτόκολλο RRLP-PFGE που προτείνεται από τους Seifert *et al* (2005) είναι κοινά αποδεκτό για το *Acinetobacter baumannii*, καθώς τα αποτελέσματα είναι συγκρίσιμα μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων επιβάλλει και την καθιέρωση κοινών κριτηρίων έτσι ώστε τα αποτελέσματα να μπορούν να αξιολογηθούν και από άλλα εργαστήρια. Τα κριτήρια ανάλυσης των δεδομένων από RFLP-PRGE είναι τα κριτήρια των Tenover *et al* (1995), τα οποία αναφέρουν:

α) Το κοινό πρότυπο ζωνών που επιδεικνύουν τα περισσότερα από τα στελέχη της συλλογής θεωρείται το επιδημικό προφίλ.

β) Στελέχη που διαφέρουν σε 2 ή 3 ζώνες θεωρούνται στενά σχετιζόμενα με το επιδημικό προφίλ. Οι διαφορές αυτές μπορεί να οφείλονται σε σημειακή μετάλλαξη, προσθήκη ή έλλειψη νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, που δημιούργησαν μια νέα ή κατέστρεψαν μια ήδη υπάρχουσα θέση αναγνώρισης από το αντίστοιχο περιοριστικό ένζυμο.

γ) Στελέχη που διαφέρουν σε 4-6 ζώνες θεωρούνται πιθανώς σχετιζόμενα με το επιδημικό προφίλ και προκύπτουν από δυο ανεξάρτητα γενετικά συμβάντα. Τα στελέχη αυτά είναι λιγότερο πιθανό να σχετίζονται επιδημιολογικά και συνήθως τέτοιες διαφορές παρατηρούνται σε μεγάλες συλλογές δειγμάτων. Επίσης μπορούν να παρουσιάσουν διαφορετικό πρότυπο με άλλη τεχνική τυποποίησης.

δ) Στελέχη που διαφέρουν σε ποσοστό 50% των παρατηρούμενων ζωνών θεωρούνται μη σχετιζόμενα με το επιδημικό προφίλ.

Η PFGE είναι μια μάλλον κοπιαστική μέθοδος που απαιτεί αρκετές ημέρες πριν από τη δημιουργία ενός αποτελέσματος ταυτοποίησης, αλλά ο απαραίτητος εξοπλισμός για τη διεπεραίωσή της υπάρχει ήδη στα περισσότερα εργαστήρια. Το βασικό μειονέκτημα της PFGE είναι η δυσκολία στην επίτευξη επαναληψιμότητας μεταξύ των εργαστηρίων κυρίως λόγω έλλειψης προτυποποιημένων πρωτοκόλλων.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αποτελεί και αυτή μια τεχνική μοριακής τυποποίησης. Η AP-PCR αποτελεί μια παραλλαγή της κλασσικής PCR που χρησιμοποιεί έναν μικρό σε μέγεθος εκκινητή (συνήθως 10 ζεύγη βάσεων), ο οποίος δεν ενισχύει μια εξειδικευμένη βακτηριδιακή αλληλουχία αλλά αντίθετα συνδέεται σε πολλές τυχαίες θέσεις του χρωμοσωμικού γονιδιώματος και επάγει τη σύνθεση DNA. Όταν ένα αντίγραφο του εκκινητή συνδεθεί στη μια αλυσίδα του DNA και ένα άλλο αντίγραφο συνδεθεί στην αντίστροφη αλυσίδα κοντά στον πρώτο εκκινητή θα δημιουργηθούν πολλά αντίγραφα του τμήματος αυτού. Τα τμήματα DNA που θα προκύψουν διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η AP-PCR είναι πιο γρήγορη από άλλες μεθόδους τυποποίησης. Παρόλα αυτά είναι και εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδος που σημαίνει ότι ακόμη και μικρές διαφοροποιήσεις στο pH ή την ιοντική δύναμη του ρυθμιστικού διαλύματος, μεταβολές στη θερμοκρασία της αντίδρασης και η προέλευση της DNA πολυμεράσης μπορούν να επηρεάσουν την σύνθεση DNA. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα αντίγραφα ενός γενετικού τύπου από ένα συγκεκριμένο στέλεχος να διαφέρουν.

Μια μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως για την μοριακή τυποποίηση βακτηρίων και χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα εργασία είναι η τυποποίηση αλληλουχίας πολλαπλών τόπων (multilocus sequence typing, MLST). Η MLST βασίζεται στην άμεση σύγκριση DNA αλληλουχιών γονιδίων οικιακής οικονομίας και υπάρχει σε δυο σχήματα: του Bartual (Πίνακας 3) και του Pasteur.

Πίνακας 3: τα γονίδια οικιακής οικονομίας που χρησιμοποιούνται από το σχήμα Bartual

Locus	Gene product	Primer	Sequences (5' _3' _)	Amplicon size (bp)	Usage
<i>gltA</i>	Citrate synthase <i>a</i>	Citrato F1	AATTTACAGTGGCACATTAGGTCCC	722	Amplification/s equencing
		Citrato R12	GCAGAGATACCAGCAGAGATACACG		Amplification/s equencing
<i>gyrB</i>	DNA gyrase subunit <i>Bb</i>	APRU F	TGTA AACGACGGCCAGTGCNNGR TCYTTYTCYGRCA	909	Amplification
		M13 [_21]	TGTA AACGACGGCCAGT		Sequencing
		UP1ER	CAGGAAACAGCTATGACCA YGSNNGGNGGNAARTTYRA		Amplification
		M13 F	CAGGAAACAGCTATGACC		Sequencing
<i>gdhB</i>	Glucose dehydrogenase <i>Ba</i>	GDHB 1F	GCTACTTTTATGCAACAGAGCC	775	Amplification
		GDH SEC F	ACCACATGCTTTGTTATG		Sequencing
		GDHB 775R	GTTGAGTTGGCGTATGTTGTGC		Amplification
		GDH SEC R	GTTGGCGTATGTTGTGC		Sequencing
<i>recA</i>	Homologous recombination factor <i>c</i>	RA1	CCTGAATCTTCYGGTAAAC	425	Amplification/s equencing
		RA2	GTTTCTGGGCTGCCAAACATTAC		Amplification/s equencing
<i>cpn60</i>	60 kDa chaperonin	CPN 3F2	ACTG TACTTGCTCAAGC	479	Amplification/s equencing

	<i>a</i>	CPN R2	TTCAGCGATGATAAGAAGTGG		Amplification/s equencing
<i>Gpi</i>	Glucose-6-phosphate isomerase	GPI F1	AATACCGTGGTGCTACGGG	508	Amplification/s equencing
		GPI R1	AACTTGATTTTCAGGAGC		Amplification/s equencing
<i>rpoD</i>	RNA polymerase sigma factor <i>rpoD</i> (Sigma-70)b	70F RPOD	ACGACTGACCCGGTACGCATGTAYATGMGNGARATCGC NACNCT	492	Amplification
		70FS	ACGACTGACCCGGTACGCATGTA		Sequencing
		70R RPOD	ATAGAAATAACCAGACGTAAGTTNGCYTCNACCATYTG TTYTT		Amplification
		70RS	ATAGAAATAACCAGACGTAAGTT		Sequencing

Το σχήμα του Pasteur μελετά τα γονίδια:

- *crn60* (σαπερόνη 60-KDa)
- *fusA* (παράγοντας επιμήκυνσης EF-G)
- *gltA* (κιτρικής συνθάση)
- *pyrG* (συνθετάση CTP)
- *recA* (παράγοντας ομόλογου ανασυνδυασμού)
- *rplB* (50S ριβοσωμικής πρωτεΐνης L2)
- *rpoB* (B υπομονάδα RNA πολυμεράσης)

Τα γονίδια αυτά έχουν επιλεγεί διότι τα προϊόντα τους έχουν ζωτικής σημασίας ρόλο στην επιβίωση του βακτηρίου. Επιπλέον, τα γονίδια αυτά υπάρχουν σε όλα τα μέλη ενός στελέχους και οι μεταλλάξεις που συμβαίνουν σε αυτά τα γονίδια είναι ουδέτερες. Για κάθε γονιδιακό τμήμα οι διαφορετικές αλληλουχίες θεωρούνται ως διαφορετικά αλλήλια και κάθε βακτήριο ενός στελέχους καθορίζεται από τα αλλήλια για καθέναν από τους τύπους των γονιδίων οικιακής οικονομίας.

Η MLST προσφέρει τη δυνατότητα σύγκρισης δεδομένων τυποποίησης από εργαστήριο σε εργαστήριο μέσω του διαδικτύου, παρέχοντας ένα σημαντικό εργαλείο για επιδημιολογικές μελέτες. Επίσης, η διακριτική ικανότητα που προτείνεται σήμερα

από το MLST σύστημα είναι συγκρίσιμη με εκείνη των PFGE και AFLP μαζί. Ωστόσο, η MLST είναι δαπανηρή και κοπιαστική μέθοδος και ως εκ τούτου δεν είναι κατάλληλη για αναλύσεις περιστατικών ρουτίνας ή άλλων περιορισμένης κλίμακας αναλύσεων της επιδημιολογίας του *Acinetobacter baumannii*.

Οι Turton et al (2007) πρότειναν ένα ακόμα σχήμα τυποποίησης, το οποίο επίσης χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, που βασίζεται στην ανίχνευση και ταυτοποίηση 3 γονιδίων, τα οποία δεν είναι γονίδια οικιακής οικονομίας αλλά γονίδια που βρίσκονται υπό εξελικτική πίεση επιλογής. Αυτή η τεχνική παρουσιάζει πιο διευρυμένη διακριτική ικανότητα σε σχέση με το σχήμα που μελετά τα γονίδια οικιακής οικονομίας, εφόσον δίνει τη δυνατότητα να μελετηθούν περισσότεροι πολυμορφισμοί. Ταυτόχρονα, έχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να δώσει πληροφορίες σχετικές με την παθογονικότητα του βακτηρίου. Τα γονίδια που μελετώνται σε αυτό το σχήμα είναι τα εξής: ompA (κωδικοποιεί την εξωτερική μεμβρανική πρωτεΐνη A), csuE (κωδικοποιεί βασικό ινίδιο για τη δημιουργία του βιοφιλμ) και το bla_{OXA-51-like} (κωδικοποιεί τη χρωμοσωμική καρβαπενεμάση του *Acinetobacter baumannii*). Το σχήμα αυτό είναι πιο εύκολο να πραγματοποιηθεί, καθώς αφορά μόλις 3 γονίδια, ενώ είναι και αισθητά μειωμένο το κόστος που απαιτείται για την υλοποίησή του.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μοριακή τυποποίηση ενδοноσοκομειακών στελεχών *Acinetobacter baumannii* που απομονώθηκαν από ασθενείς του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Λάρισας την περίοδο Νοεμβρίου-Δεκεμβρίου 2012, ώστε να προσδιοριστούν οι επικρατέστεροι κλώνοι (STs) του βακτηρίου.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Καλλιέργεια βακτηρίων

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των βακτηρίων να αναπτύσσονται και να πολλαπλασιάζονται παρουσία του κατάλληλου θρεπτικού υλικού και υπό συγκεκριμένες εργαστηριακές συνθήκες.

Υλικά

- Τρυβλίο καλλιέργειας
- Κρικοφόρος στυλεός
- Πιπέτα Pasteur
- Κλίβανος

Διαδικασία

Παίρνουμε με την πιπέτα Pasteur μια μικρή ποσότητα από το κλινικό δείγμα και την τοποθετούμε σε μια άκρη του τρυβλίου. Το θρεπτικό υλικό που περιέχει το εκάστοτε τριβλίο εξαρτάται από την προέλευση του κλινικού δείγματος και από τον τύπο των βακτηρίων που ενδέχεται να περιέχει το δείγμα (Gram θετικά ή Gram αρνητικά). Με τη βοήθεια του κρικοφόρου στυλεού απλώνουμε το δείγμα των βακτηρίων αρχικά σχηματίζοντας πυκνές γραμμές περίπου μέχρι το μισό του τρυβλίου και στη συνέχεια τραβώντας από αυτή την πυκνή περιοχή πιο αραιές γραμμές κυκλικά κατά μήκος του τρυβλίου. Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία τοποθετούμε το τρυβλίο στον κλίβανο στους 37 °C για 24 έως 48 ώρες ώστε αν υπάρχουν βακτήρια να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν.

2.2. Τεχνική ταυτοποίησης

Αρχή της μεθόδου

Η ταυτοποίηση των βακτηρίων έγινε με το σύστημα VITEK 2. Το σύστημα αυτό χρησιμοποιεί την κάρτα GN για την αυτοματοποιημένη ταυτοποίηση των περισσότερων κλινικώς σημαντικών ζυμωτικών και αζυμωτικών Gram-αρνητικών βακίλων. Η κάρτα GN βασίζεται σε καθιερωμένες βιοχημικές μεθόδους και προσφάτως αναπτυχθέντα υποστρώματα που μετρούν τη χρήση του άνθρακα, τις ενζυμικές δραστηριότητες και την ανθεκτικότητα. Στην κάρτα υπάρχουν 47 βιοχημικές εξετάσεις και μια υποδοχή αρνητικού ελέγχου. Τελικά αποτελέσματα είναι διαθέσιμα σε 10 ώρες περίπου.

Υλικά

- Αποικίες βακτηρίου
- Κάρτα VITEK 2 GN
- Κιτ VITEK 2 DENSICHEK
- Κασέτα VITEK 2
- Αποστειρωμένος στυλεός
- Διαφανής πλαστικός δοκιμαστικός σωλήνας 12 x 75 mm
- Στείρο αλατούχο διαλύμα (υδατικό διάλυμα 0.45% έως 0.50% NaCl, pH 4,5 έως 7,0)
- Κατάλληλο υλικό άγαρ
- Βαθμονομητής DENSICHEK

Διαδικασία

Για τον προσδιορισμό της αντίδρασης και της μορφολογίας κατά Gram ενός μικροοργανισμού πρέπει να κάνουμε χρώση κατά Gram πριν την επιλογή της κάρτας ταυτοποίησης.

Για να φτιάξουμε το εναιώρημα βακτηρίου ακολουθούμε την εξής διαδικασία: αρχικά, ελέγχουμε αν η καλλιέργειά μας είναι καθαρή (σε περίπτωση που δεν είναι παίρνουμε λίγες καθαρές αποικίες με έναν αποστειρωμένο στυλεό ή μια μπατονέτα

και τις τοποθετούμε σε καθαρό τριβλίο, ώστε να αναπτυχθούν ξανά). Στη συνέχεια, μεταφέρουμε σε ασηπτικές συνθήκες 3 ml στείρου αλατούχου διαλύματος (υδατικό διάλυμα 0.45% έως 0.50% NaCl, pH 4,5 έως 7,0) σε διαφανές πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα 12 x 75 mm. Με έναν αποστειρωμένο στυλεό ή μια μπατονέτα μεταφέρουμε έναν επαρκή αριθμό μορφολογικά παρόμοιων αποικιών της καθαρής καλλιέργειας στο δοκιμαστικό σωλήνα με το αλατούχο διάλυμα. Μετράμε την οπτική πυκνότητα του εναιωρήματος στον βαθμονομητή DENSICHECK, που πρέπει να είναι ισοδύναμη με ένα πρότυπο McFarland 0,50 έως 0,63.

Αφού ετοιμαστεί το εναιώρημα τοποθετείται με το σωληνάριο στο οποίο βρίσκεται στην κασέτα μαζί με την κάρτα GN. Η ηλικία του εναιωρήματος δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 30 λεπτά από τον ενοφθαλμισμό της κάρτας.

2.3. Εξαγωγή του DNA

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στις εξής αρχές: λύση των κυττάρων ώστε να εκτεθεί το DNA, αφαίρεση μεμβρανικών λιπιδίων, αφαίρεση πρωτεϊνών, αφαίρεση RNA και καθαρισμός του DNA από πρωτεΐνες, απορρυπαντικά, άλατα και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά το στάδιο κυτταρικής λύσης.

Για τη εξαγωγή του DNA από τα βακτήρια χρησιμοποιήθηκε το Quick-gDNATM MiniPrep kit (Zymo research).

Υλικά

- Φυγόκεντρος
- Vortex
- Πιπέτες
- Tips
- Στήλες (περιέχονται στο kit)
- Σωληνάρια συλλογής/αποθήκευσης (περιέχονται στο kit)

- Αντιδραστήρια (περιέχονται στο kit)
 - Genomic Lysis Buffer
 - Pre-Wash Buffer
 - Wash Buffer
 - Elution Buffer

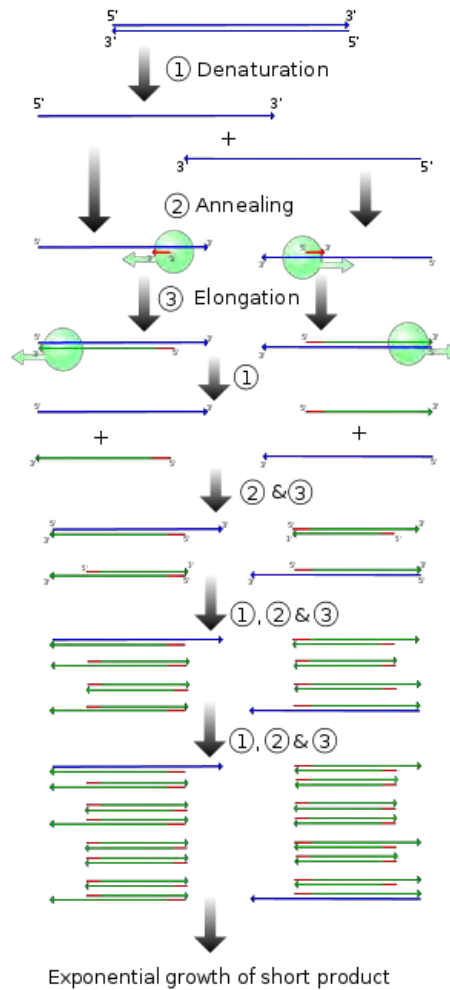
Διαδικασία

1. Προσθέτουμε 400 µl Genomic Lysis Buffer σε 100 µl δείγματος (σε δείγματα μικρότερα των 50 µl προσθέτουμε 200 µl Genomic Lysis Buffer, ενώ σε δείγματα μεγαλύτερα των 50 µl προσθέτουμε τον τετραπλάσιο όγκο). Κάνουμε vortex για 4-6 δευτερόλεπτα και αφήνουμε 5-10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Μεταφέρουμε το μείγμα του δείγματος με το Genomic Lysis Buffer σε μια στήλη Zymo-SpinTM που είναι τοποθετημένη σε ένα σωληνάριο συλλογής. Φυγοκεντρούμε στις 10,000 x g για ένα λεπτό. Πετάμε το σωληνάριο συλλογής με το περιεχόμενό του.
3. Μεταφέρουμε τη στήλη σε ένα καινούριο σωληνάριο συλλογής. Προσθέτουμε στη στήλη 200 µl DNA Pre-Wash Buffer. Φυγοκεντρούμε στις 10,000 x g για ένα λεπτό. Πετάμε το υποκείμενο.
4. Προσθέτουμε στη στήλη 500 µl g-DNA Wash Buffer. Φυγοκεντρούμε στις 10,000 x g για ένα λεπτό.
5. Μεταφέρουμε τη στήλη σε ένα καθαρό σωληνάριο αποθήκευσης. Προσθέτουμε περίπου 50 µl DNA Elution Buffer ή απιονισμένο νερό. Επιάζουμε 2-5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα φυγοκεντρούμε στη μέγιστη ταχύτητα για 30 δευτερόλεπτα, ώστε να εκλουστεί το DNA. Το DNA που θα εκλουστεί μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα σε μοριακές εφαρμογές ή να αποθηκευτεί στους -20°C για μελλοντική χρήση.

2.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction)

Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική της PCR παρουσιάζει ευαισθησία και επιτρέπει την γρήγορη ανίχνευση ειδικών περιοχών DNA που βρίσκονται σε μικρή ποσότητα στο δείγμα και χρησιμοποιείται για την αντιγραφή των συγκεκριμένων περιοχών του μορίου του DNA.



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής PCR

Για να εφαρμόσουμε την μέθοδο της PCR πρέπει να γνωρίζουμε τη σειρά των νουκλεοτιδίων που βρίσκονται στα άκρα του τμήματος του DNA που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Η γνωστή αλληλουχία χρησιμοποιείται για την χημική σύνθεση δύο ολιγονουκλεοτιδίων, συμπληρωματικών προς τα άκρα κάθε αλυσίδας DNA. Τα

ολιγονουκλεοτίδια αυτά λειτουργούν ως πρωταρχικά τμήματα για την σύνθεση συμπληρωματικών αλυσίδων DNA. Η σύνθεση καταλύεται από μια ειδική DNA πολυμεράση, όπως η Taq πολυμεράση η οποία είναι ανθεκτική στις υψηλές θερμοκρασίες.

Το δίκλωνο μόριο DNA τοποθετείται υπό μορφή διαλύματος στο δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με τα ολιγονουκλεοτίδια, ελεύθερα δεοξυριβονουκλεοτίδια, DNA πολυμεράση και ιχνοστοιχεία που κάνουν την DNA πολυμεράση πιο αποδοτική.

Η μέθοδος περιλαμβάνει 35 επαναλαμβανόμενους κύκλους πολλαπλασιασμού του μορίου του DNA.

Κάθε κύκλος περιλαμβάνει τρία στάδια (εικόνα 6):

1. Θερμική μετουσίωση του μορίου του DNA, η οποία επιτρέπει την αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου.
2. Προσαρμογή των εκκινητών με την αλληλουχία-στόχο του μορίου DNA.
3. Επιμήκυνση των εκκινητών με την επίδραση της Taq πολυμεράσης και σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων του DNA.

Σε όλους τους πολλαπλασιασμούς, εκτός των δειγμάτων, συστηματικά χρησιμοποιείται ένας αρνητικός μάρτυρας (H₂O) και ένας θετικός μάρτυρας που μπορεί να είναι ένα στέλεχος *Acinetobacter baumannii* στο οποίο έχει διαπιστωθεί εκ των προτέρων η ύπαρξη του γονιδίου που μελετάται.

Υλικά

- Θερμοκυκλοποιητής
- Vortex
- Θάλαμος νηματικής ροής
- Στείρα σωληνάρια eppendorf
- PCR tubes
- Πιπέτες
- Tips

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

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

Διαδικασία

Οι χειρισμοί γίνονται σε θάλαμο νηματικής ροής (Εικόνα 8) με υλικά και αντιδραστήρια αποκλειστικής χρήσης, ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος μόλυνσης από εξωγενές DNA.

Αρχικά προετοιμάζουμε το δείγμα αντίδρασης προσθέτουμε τις κατάλληλες ποσότητες των αντιδραστηρίων, που αναφέρονται στον πίνακα 4, πολλαπλασιασμένες με τον αριθμό των δειγμάτων που θέλουμε να ελέγξουμε σε στείρο erpendorf. Στη συνέχεια, το περιεχόμενο του erpendorf ανακατεύεται και μοιράζεται στα PCR tubes (45μl στο καθένα). Στον πάγκο εργασίας προσθέτουμε τα δείγματα του DNA (5μl στο καθένα) στα αντίστοιχα PCR tubes. Προγραμματίζουμε τη συσκευή της PCR (εικόνα 7) με το κατάλληλο πρόγραμμα και τοποθετούμε τα tubes για PCR.



Εικόνα 7: Συσκευή PCR



Εικόνα 8: Θάλαμος νηματικής ροής

Στο τέλος της PCR, τα προϊόντα διατηρούνται στους 4°C μέχρι να επιβεβαιωθεί η επιτυχία του πολλαπλασιασμού με την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (ο τρόπος παρασκευής του περιγράφεται στο επόμενο υποκεφάλαιο).

Οι primers που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο των βακτηρίων ως προς την ύπαρξη των γονιδίων *bla_{OXA 23}* και *bla_{OXA 58}* ήταν οι εξής:

bla_{oxa 23}: bla_{oxa 23} F 5'-AAGCATGATGAGCGCAAA-3'

bla_{oxa 23} R 5'-AAAAGGCCCATTTATCTC-3'

bla_{oxa 58}: bla_{oxa 58} F 5'-TTATCAAAAATCCAA-3'

bla_{oxa 58} R 5'-TAACCTCAAACCTTC-3'

bla_{oxa 24}: bla_{oxa 24} F 5'-GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA-3'

bla_{oxa 58} R 5'-AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT-3'

bla_{oxa 51}: bla_{oxa 51} F 5'-TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG-3'

bla_{oxa 51} R 5'-TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG-3'

Οι primers που χρησιμοποιήθηκαν για την 3LST (tri-locus sequence typing) ήταν οι εξής:

ompA: OmpAF183 5'-CAATTGTTATCTCTGGAG-3'

OmpAR1149 5'-ACCTTGAGTAGACAAACGA-3'

csuE: CsuEF 5'-ATGCATGTTCTCTGGACTGATGTTGAC-3'

CsuER 5'-CGACTTGTACCGTGACCGTATCTTGATAAG-3'

bla_{OXA-51-like}: 5'OXA-51-like-all F, 5'-ATGAACATTAAGCACTC-3'

3'OXA-51-like-all R, 5'-CTATAAAATACCTAATTGTTC-3'

Οι primers που χρησιμοποιήθηκαν για την MLST (multi-locus sequence typing) ήταν οι εξής:

cpn60:F:cpn60F ACTGTACTTGCTCAAGC

cpn60:F:cpn60R TTCAGCGATGATAAGAAGTGG

fusA:F: fusA7 ATCGGTATTTCTGCKCACATYGAT
fusA:R: fusA8 CCAACATACKYTGWACACCTTTGTT

gltA:F: gltAF AATTTACAGTGGCACATTAGGTCCC
gltA:R: gltAR GCAGAGATACCAGCAGAGATACACG

pyrG:F: pyrG7 GGTGTTGTTTCATCACTAGGWAAAGG
pyrG:R: pyrG8 ATAAATGGTAAAGAYTCGATRTCACCMA

recA:F: RA1 CCTGAATCTTCYGGTAAAAC
recA:R: RA2 GTTTCTGGGCTGCCAAACATTAC

rplB:F: rplB7 GTAGAGCGTATTGAATACGATCCTAACC
rplB:R: rplB8 CACCACCACRTGYGGGTGATC

rpoB:F: Vic4 GGCGAAATGGC(AGT)GA(AG)AACCA
rpoB:R: Vic6 GA(AG)TC(CT)TCGAAGTTGTAACC

2.5. Ηλεκτροφόρηση

Αρχή της μεθόδου

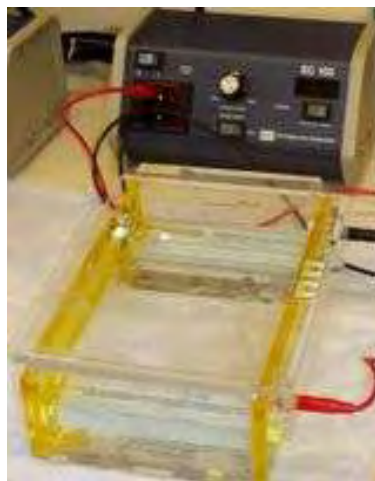
Το DNA είναι ένα μόριο αρνητικά φορτισμένο, λόγω των φωσφορικών ομάδων που βρίσκονται στον φωσφοδιεστερικό σκελετό του μορίου. Αυτό όταν βρεθεί μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο κινείται προς τον θετικό πόλο με ταχύτητα που εξαρτάται από το μέγεθος του και το σχήμα του. Η τεχνική που χρησιμοποιείται είναι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η αγαρόζη είναι πολυσακχαρίτης που σε κατάλληλες συνθήκες δημιουργεί ένα πορώδες πήκτωμα. Η συγκέντρωση της αγαρόζης καθορίζει το μέγεθος των πόρων άρα και το μέγεθος των κομματιών DNA που μπορούν να διαχωριστούν.

Η επιτυχία και η ειδικότητα του πολλαπλασιασμού του DNA επιβεβαιώνονται σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Το μέγεθος του προϊόντος της PCR υπολογίζεται με τη

βοήθεια των δεικτών μοριακού βάρους. Στη συνέχεια γίνεται σύγκριση με το μέγεθος του PCR προϊόντος του θετικού μάρτυρα.

Υλικά

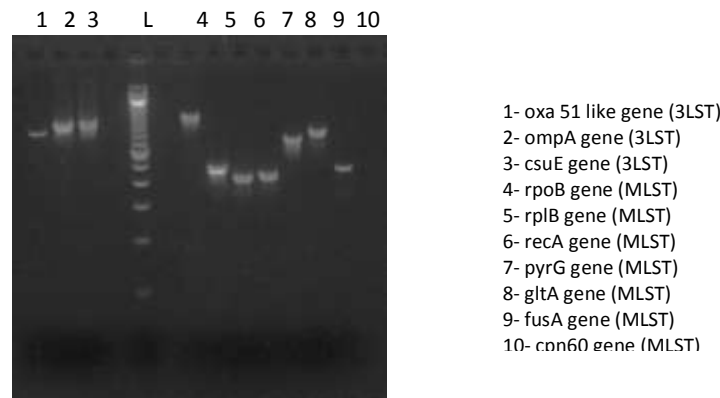
- Ζυγός
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Πιπέτες
- Tips
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Συσκευή τροφοδοσίας
- Πηγή φωτός UV
- Θάλαμος για φωτογράφιση
- Φωτογραφική συσκευή
- Αντιδραστήρια
 - Αγαρόζη ηλεκτροφόρησης
 - Βρωμιούχο αιθίδιο
 - Διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE 1X και βρωμιούχο αιθίδιο 0,5μg/ml
 - Δείκτες μοριακού βάρους DNA
 - Διάλυμα χρωστικής (loading buffer)



Εικόνα 9: Συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδεδεμένη με συσκευή τροφοδοσίας

Διαδικασία

- Προετοιμάζουμε το διάλυμα αγαρόζης 2% σε TBE 1X (Η αγαρόζη διαλυτοποιείται με βρασμό).
- Αφήνουμε το διάλυμα να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου ή το κρατάμε προσεκτικά σε τρεχούμενο νερό βρύσης.
- Προσθέτουμε βρωμιούχο αιθίδιο και το διάλυμα αγαρόζης τοποθετείται στο εκμαγείο της συσκευής ηλεκτροφόρησης όπου έχουμε προσθέσει μία ή περισσότερες χτένες και αφήνουμε να πήξει.
- Το πήκτωμα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, αφαιρείται η χτένα και προσθέτουμε TBE 1X μέχρι να καλυφθεί.
- Τοποθετούμε τα προϊόντα της PCR (10μl) σε χρωστική (2μl) και στη συνέχεια μεταφέρονται στα πηγάδια της πηκτής. Πάντα μαζί με τα δείγματα φορτώνουμε και δείκτες μοριακών βαρών DNA.
- Μετά από μία ώρα περίπου τρεξίματος στα 100 volts, η πηκτή τοποθετείται σε πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV).
- Εάν υπάρχουν θετικά δείγματα τότε φωτογραφίζεται η πηκτή αγαρόζης για την παρατήρηση των αποτελεσμάτων (εικόνα 10).



Εικόνα 10: Ηλεκτροφόρηση καθαρισμένων προϊόντων γονιδίων για 3LST και MLST στελεχών *Acinetobacter baumannii* του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας

Ο θετικός μάρτυρας πρέπει να περιέχει την χαρακτηριστική μάντα των εκκινητών (primers) που χρησιμοποιήθηκαν. Τα δείγματα είναι θετικά όταν

εμφανίζουν όμοια μπάντα με αυτήν του θετικού μάρτυρα. Ο αρνητικός μάρτυρας δεν περιέχει μπάντα. Εάν και αυτός περιέχει σημαίνει ότι υπάρχει επιμόλυνση κατά τη διαδικασία της PCR.

2.6. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR

Αρχή της μεθόδου

Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR είναι απαραίτητος ώστε να απομακρυνθούν αποτελεσματικά εκκινητές, dNTPs, ένζυμα και τα άλατα. Η μέθοδος βασίζεται στην επιλεκτική πρόσδεση του δίκλωνου DNA σε μεμβράνη πυριτίου υπό την παρουσία χαοτροπικών αλάτων.

Για τον καθαρισμό των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήθηκε το PureLink[®] PCR Purification Kit (Invitrogen).

Υλικά

- Φυγόκεντρος
- Πιπέτες
- Tips
- Στήλες (περιέχονται στο kit)
- Σωληνάρια συλλογής/αποθήκευσης (περιέχονται στο kit)
- Αντιδραστήρια (περιέχονται στο kit)
 - Binding buffer (έτοιμο για χρήση αφού προσθέσουμε 48 ml ισοπραπανόλης)
 - Wash buffer (έτοιμο για χρήση αφού προσθέσουμε 160 ml αιθανόλης)
 - Elution buffer ή απιονισμένο νερο

Διαδικασία

1. Προσθέτουμε 4 όγκους από το Binding Buffer B2 ή B3 που περιέχει ισοπροπανόλη σε 1 όγκο προϊόντος PCR (50-100μl). Με τη βοήθεια της πιπέτας αναμειγνύουμε καλά.
2. Τοποθετούμε το μείγμα του Binding Buffer με το προϊόν PCR σε μια στήλη στο κάτω μέρος της οποίας έχουμε βάλει ένα σωληνάριο συλλογής. Φυγοκεντρούμε την στήλη στις 10,000 x g για 1 λεπτό. Πετάμε το υποκείμενο.
3. Τοποθετούμε ξανά την στήλη στο σωληνάριο συλλογής και προσθέτουμε 650 μl Wash Buffer (W1) με αιθανόλη. Φυγοκεντρούμε τη στήλη στις 10,000 x g για 1 λεπτό. Πετάμε το υποκείμενο. Τοποθετούμε την στήλη στο σωληνάριο συλλογής και φυγοκεντρούμε στη μέγιστη ταχύτητα για 2-3 λεπτά.
4. Τοποθετούμε τη στήλη σε ένα καθαρό 1,7-ml σωληνάριο έκλουσης (περιλαμβάνεται στο kit). Προσθέτουμε 50 μl Elution Buffer ή απιονισμένο νερό στο κέντρο της στήλης. Επιάζουμε τη στήλη σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό. Φυγοκεντρούμε τη στήλη στη μέγιστη ταχύτητα για 2 λεπτά. Τώρα το σωληνάριο έκλουσης περιέχει το καθαρισμένο πρίον της PCR. Φυλάσσουμε το DNA στους 4°C αν σκοπεύουμε να το χρησιμοποιήσουμε άμεσα ή στους -20 °C για μακροπρόθεσμη αποθήκευση.

Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία καθαρισμού των προϊόντων της PCR επαναλαμβάνεται η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, ώστε να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη προϊόντος χωρίς παραπροϊόντα.

2.7. Αλληλούχιση (sequencing)

Αρχή της μεθόδου

Η αποκρυπτογράφηση της αλληλουχίας ενός τμήματος DNA γίνεται με τη διαδικασία της αλληλούχισης (sequencing). Η αλληλούχιση βασίζεται στη μέθοδο Sanger. Το κλειδί της μεθόδου Sanger είναι η χρήση διδεοξυ – τριφωσφορικών – νουκλεοτιδίων (ddNTPs), τα οποία σταματούν την επέκταση της αλληλουχίας DNA. Η κλασική μέθοδος Sanger προϋποθέτει ένα μονόκλωνο εκμαγείο DNA, έναν εκκινητή, μια DNA πολυμεράση, ραδιενεργά ή φθορίζοντα σημασμένα νουκλεοτίδια

και τροποποιημένα νουκλεοτίδια που τερματίζουν την επιμήκυνση του DNA κλώνου. Το δείγμα του DNA χωρίζεται σε τέσσερις ξεχωριστές αντιδράσεις αλληλούχισης που περιέχουν τα τέσσερα δεσοξυνουκλεοτίδια (dATP, dGTP, dCTP και dTTP), την DNA πολυμεράση και μόνο ένα από τα τέσσερα διδεοξυνουκλεοτίδια (ddATP, ddGTP, ddCTP ή ddTTP). Τα διδεοξυνουκλεοτίδια στερούνται την 3'-OH ομάδα που απαιτείται για τον σχηματισμό φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ δύο νουκλεοτιδίων κατά τη διάρκεια της επιμήκυνσης του DNA κλώνου. Ενσωμάτωση ενός διδεοξυνουκλεοτιδίου εντός του σχηματιζόμενου DNA κλώνου τερματίζει την περαιτέρω επέκτασή του, με αποτέλεσμα τη δημιουργία διάφορων θραυσμάτων DNA του ποικίλου μήκους.

Τα σχηματιζόμενα τμήματα DNA διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης-ουρίας. Καθεμία από τις τέσσερις αντιδράσεις σύνθεσης DNA εξελίσσεται ξεχωριστά. Οι μπάντες του DNA μπορούν να οπτικοποιηθούν με αυτοραδιογραφία ή υπεριώδες φως και η αλληλουχία DNA μπορεί να διαβαστεί απευθείας από το φιλμ ακτίνων X ή από την εικόνα του πηκτώματος.

Υλικά

- Θερμοκυκλοποιητής
- Θάλαμος νηματικής ροής
- Γενετικός αναλυτής (μοντέλο 3730 XL, Applied Biosystems)
- Στείρα σωληνάρια eppendorf
- Πιάτο (96 θέσεων)
- Ρυθμιζόμενες μικροπιπέτες
- Tips με φίλτρο
- Αντιδραστήρια για αλληλούχιση (περιλαμβάνονται στο Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit)
 - Ready reaction mix
 - Sequencing buffer
 - pGEM DNA (θετικός μάρτυρας)
 - pGEM primer

- Αντιδραστήρια για καθαρισμό των προϊόντων της Sanger (περιλαμβάνονται στο Big Dye XTerminator TM Purification kit)
 - XTerminator
 - Sam solution

Διαδικασία

Η ποσότητα του DNA που απαιτείται για την αλληλούχιση εξαρτάται από το μέγεθός του, όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα 5:

Πίνακας 5: οι ποσότητες γενετικού υλικού που απαιτούνται για την αλληλούχιση

Γενετικό υλικό	Ποσότητα
Προϊόν PCR: 100–200 bp	1–3 ng
200–500 bp	3–10 ng
500–1000 bp	5–20 ng
1000–2000 bp	10–40 ng
>2000 bp	20–50 ng
Μονής έλικας προϊόν	25–50 ng
Διπλής έλικας προϊόν	150–300 ng

Αρχικά γίνεται προετοιμασία του βασικού μείγματος της αντίδρασης (master mix) σύμφωνα με τις ποσότητες που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα 6:

Πίνακας 6: ποσότητες αντιδραστηρίων για την προετοιμασία του master mix

Αντιδραστήριο	Όγκος ανά αντίδραση (μL)
Ready reaction mix (RR)	1
Ρυθμιστικό διάλυμα	3,5
Απιονισμένο νερό	3,5
Σύνολο	8

Το μείγμα μοιράζεται στις 96 θέσεις του πιάτου. Στη συνέχεια προστίθεται 1 μl από τον εκκινητή (χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και στην PCR) για κάθε αντίδραση καθώς και 1 μl από το γενετικό υλικό. Σε κάθε πιάτο προστίθεται και ένας θετικός μάρτυρας (pGEM).

Αφού ετοιμαστεί το πιάτο αναμειγνύονται καλά όλα τα συστατικά (vortex) και έπειτα φυγοκεντρείται στις 300 περίπου στροφές για 15 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια το πιάτο τοποθετείται στη συσκευή για τη Sanger. Οι συνθήκες για την αντίδραση Sanger είναι οι εξής (πίνακας 7):

Πίνακας 7: συνθήκες για τη μέθοδο Sanger

Πρώτη αποδιάταξη	96°	1 λεπτό	25 κύκλοι συνολικά
Δεύτερη αποδιάταξη	96°	10 δευτερόλεπτα	
Αναδιάταξη	50°	5 δευτερόλεπτα	
Επέκταση	60°	4 λεπτά	
Συντήρηση	4°	Συντήρηση επ' αόριστον	

Αφού ολοκληρωθεί η Sanger (διαρκεί περίπου 2.5 ώρες) προετοιμάζεται το μείγμα του XTerminator και του Sam solution (πίνακας 8):

Πίνακας 8: ποσότητες για την προετοιμασία του XTerminator

Αντιδραστήριο	Όγκος ανά αντίδραση (μl)	Όγκος ανα plate (96 θέσεις)
XTerminator	45	4320
Sam	10	960
Συνολικός όγκος	55	5280

Έπειτα γίνεται ανάμειξη (vortex) στις 2000 rpm για 30 λεπτά, η οποία ακολουθείται από φυγοκέντρηση στις 1000 x g για 2 λεπτά. Όταν ολοκληρωθεί και η φυγοκέντρηση το πιάτο είναι έτοιμο να μπει στο μηχάνημα για αλληλούχιση.

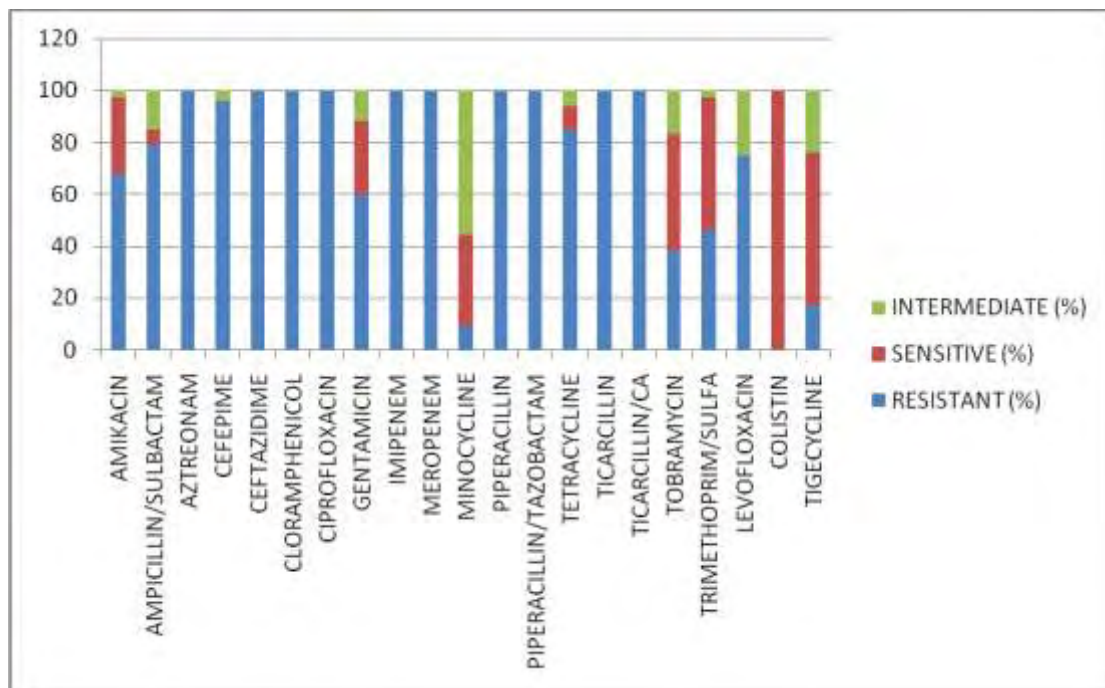
Έχοντας πλέον την αλληλουχία του γονιδίου και την κατάλληλη βάση δεδομένων (<http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/AB/> για την 3LST και

<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Abaumannii.html> για την MLST) αποκαλύπτεται ο τύπος αλληλουχίας (sequence type, ST) στον οποίο ανήκει το συγκεκριμένο στέλεχος.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν όλα τα κλινικά δείγματα Νοεμβρίου-Δεκεμβρίου του έτους 2012 του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας για την ύπαρξη λοιμογόνων παραγόντων. Σε ορισμένα από τα δείγματα αυτά ταυτοποιήθηκαν βακτήρια *Acinetobacter baumannii*. Αφού έγινε απομόνωση των βακτηρίων επακολούθησε έλεγχος ανθεκτικότητάς τους στα αντιβιοτικά, έλεγχος για την ύπαρξη γονιδίων bla_{OXA} 23 και bla_{OXA} 58 και τέλος μοριακή τυποποίηση με τη μέθοδο tri-locus sequence typing (3LST).

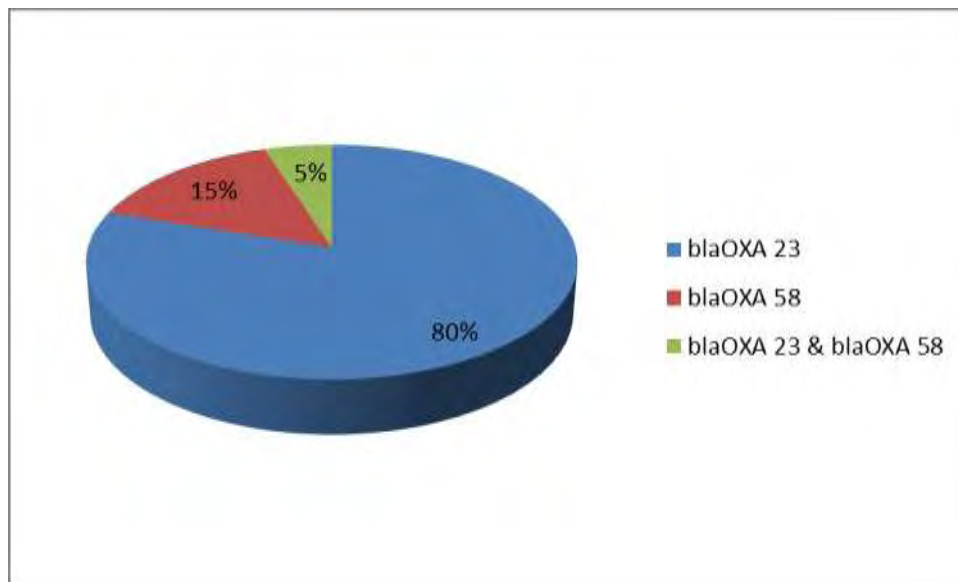
Αρχικά, στα βακτήρια *Acinetobacter baumannii* που ταυτοποιήθηκαν έγινε έλεγχος ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά αμικασίνη, αμπικιλίνη/σουλβακτάμη, αζτρεονάμη, σιπροφλοξασίνη, γενταμικίνη, κεφεπίμη, κεφταζιδίμη, ιμιπενέμη, λεβοφλοξασίνη, μεροπενέμη, μινοκυκλίνη, τιγκεκυκλίνη, τετρακυκλίνη, τικαρκιλίνη, τικαρκιλίνη/κλαβουλανικό οξύ, τομπραμυκίνη, τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη, πιπερακιλλίνη, πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη και κολιστίνη.



Διάγραμμα 1: Αποτελέσματα ελέγχου ανθεκτικότητας των βακτηρίων *Acinetobacter baumannii* σε αντιβιοτικά

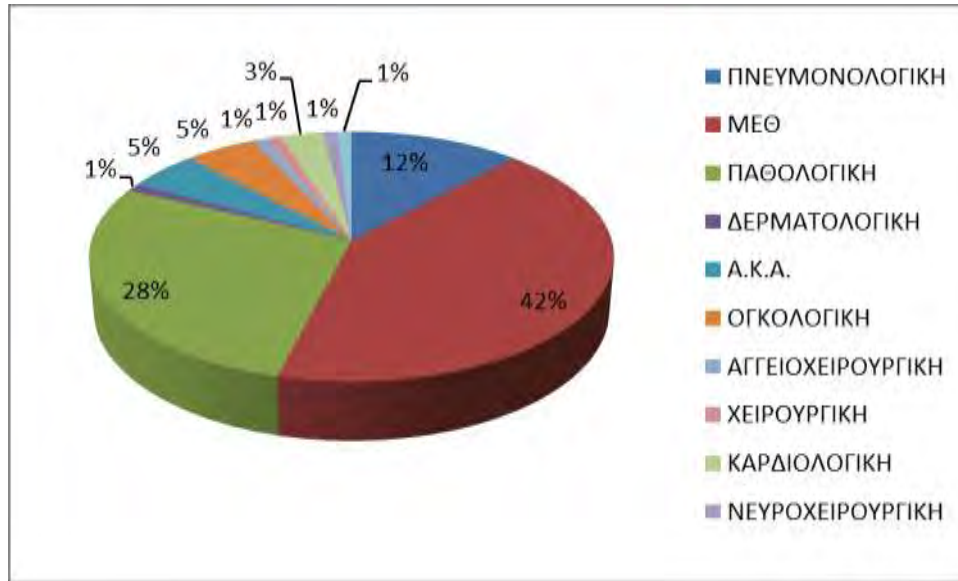
Από τα αποτελέσματα που φαίνονται στο διάγραμμα 1 είναι εμφανής η ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα περισσότερα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν, κυρίως στην μιπενέμη και την μεροπενέμη όπου διαπιστώθηκε 100% ανθεκτικότητα. Αντίθετα, στην κολιστίνη το 100% των βακτηρίων εμφάνισε ευαισθησία.

Στο διάγραμμα 2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον έλεγχο που έγινε στα βακτήρια για την ύπαρξη γονιδίων bla_{OXA 23} και bla_{OXA 58} στο γονιδιώμα τους. Το μεγαλύτερο ποσοστό των βακτηρίων που απομονώθηκαν (80%) έφερε το γονίδιο bla_{OXA 23} ενώ μόλις το 15% έφερε το γονίδιο bla_{OXA 58}. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε ένα ποσοστό της τάξης του 5% ανιχνεύθηκαν και τα δυο γονίδια.



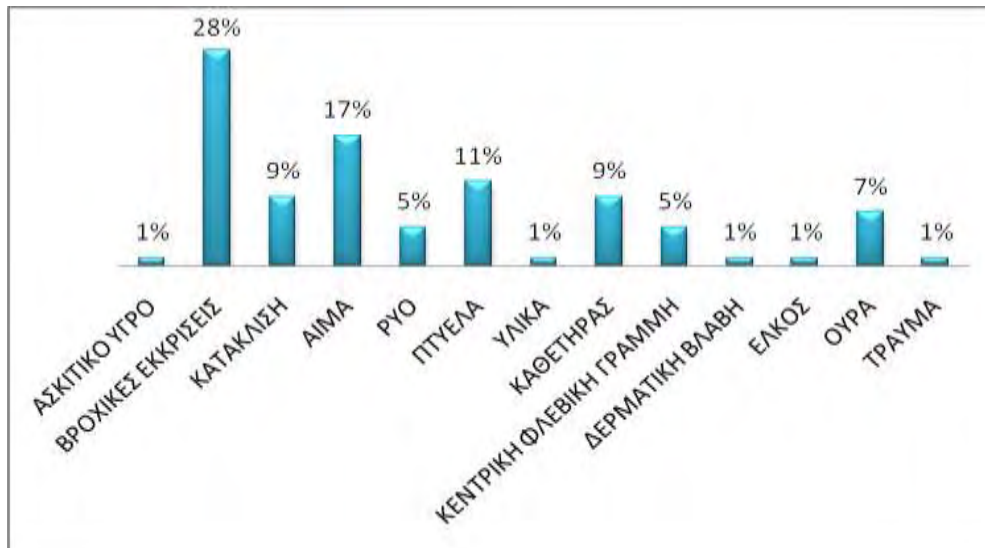
Διάγραμμα 2: Ποσοστά των *Acinetobacter baumannii* που έχουν τα γονίδια ανθεκτικότητας bla_{OXA 23} και bla_{OXA 58}

Τα δείγματα από τα οποία απομονώθηκαν τα βακτήρια *Acinetobacter baumannii* προήλθαν κυρίως από ασθενείς που νοσηλεύονταν στην Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ) του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Λάρισας, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 3. Σημαντικά επίσης ήταν και τα ποσοστά των βακτηρίων που απομονώθηκαν από ασθενείς της Παθολογικής και της Πνευμονολογικής Κλινικής του Νοσοκομείου.



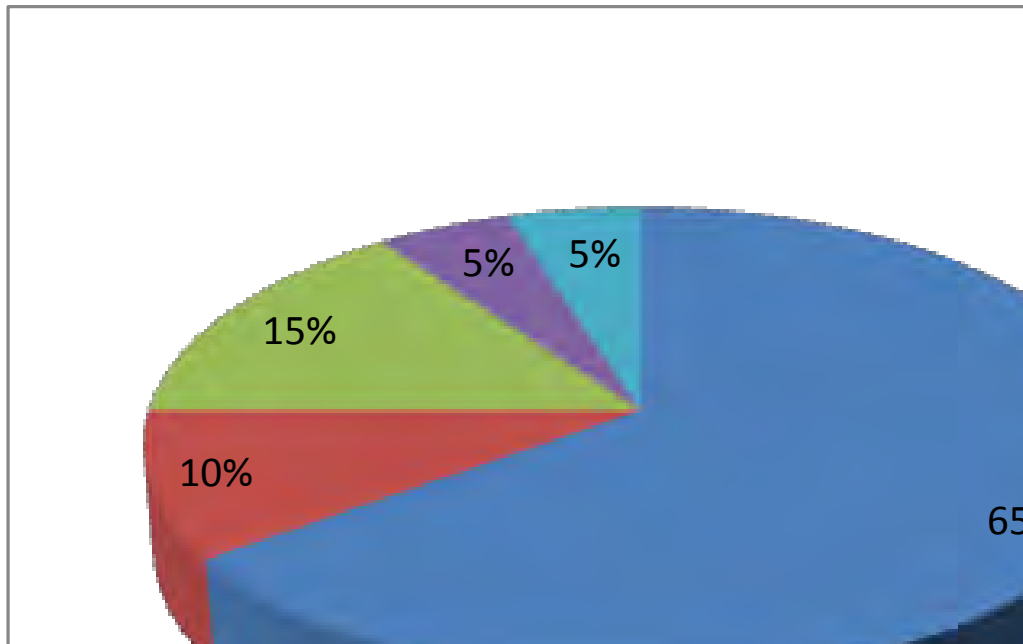
Διάγραμμα 3: Ποσοστά των κλινικών του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας όπου έγινε ταυτοποίηση των βακτηρίων *Acinetobacter baumannii*.

Τα κλινικά δείγματα στα οποία ταυτοποιήθηκαν τα βακτήρια *Acinetobacter baumannii* ποικίλλαν, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 4, με την πλειοψηφία των βακτηρίων να απομονώθηκαν από βροχικές εκκρίσεις και να ακολουθούν σε μικρότερα ποσοστά αίμα, πτύελα, κατάκλιση, καθετήρες και ούρα.



Διάγραμμα 4: προέλευση των κλινικών δειγμάτων στα οποία ταυτοποιήθηκαν τα βακτήρια *Acinetobacter baumannii*

Η τυποποίηση των βακτηρίων *Acinetobacter baumannii* με τη μέθοδο 3LST. Από τα αποτελέσματα του διαγράμματος 5 είναι φανερό η επικράτηση των στελεχών που ανήκουν στον τύπο αλληλουχίας (sequence type, ST) 101 τόσο μεταξύ αυτών που φέρουν το γονίδιο bla_{OXA} 23 όσο και μεταξύ αυτών που φέρουν το bla_{OXA} 58. Επιπλέον, ανιχνεύθηκε και ένα πολύ μικρό ποσοστό απομονώσεων που δεν μπορεί να ενταχθεί σε κάποιον από τους υπάρχοντες STs (πίνακας 9).



Διάγραμμα 5: Αποτελέσματα 3LST

Στον πίνακα 9 φαίνονται τα αλληλικά προφίλ των ST^{3LST} 101 και ο ST^{3LST} 201.

Πίνακας 9: αλληλικά προφίλ των ST^{3LST} 101 και ο ST^{3LST} 201

Γονίδια	ST		
	101	201	δεν έχει προσδιοριστεί
OXA 51 like	αλληλίο 1	αλληλίο 2	αλληλίο 2
OmpA	αλληλίο 1	αλληλίο 2	αλληλίο 2
CsuE	αλληλίο 1	αλληλίο 2	αλληλίο 1

Έπειτα ακολούθησε τυποποίηση μερικών ενδεικτικών στελεχών και με την μέθοδο MLST, ώστε να ελεγχθεί αν υπάρχει η αντιστοιχία του ST^{3LST} 101 με τον

ST^{MLST} 2 και του ST^{3LST} 201 με τον ST^{MLST} 1. Το γεγονός αυτό αποδείχτηκε πειραματικά. Στον πίνακα 10 φαίνονται τα αλληλικά προφίλ των ST^{MLST} 2 και ο ST^{MLST} 1

Πίνακας 9: αλληλικά προφίλ των ST^{MLST} 2 και ο ST^{MLST} 1

ΓΟΝΙΔΙΑ	ST	
	1	2
rpoB	αλληλίο 2	αλληλίο 1
rplB	αλληλίο 2	αλληλίο 1
recA	αλληλίο 2	αλληλίο 5
pyrG	αλληλίο 2	αλληλίο 1
gltA	αλληλίο 2	αλληλίο 1
fusA	αλληλίο 2	αλληλίο 1
cpn60	αλληλίο 2	αλληλίο 1

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενες σελίδες βασικό χαρακτηριστικό του βακτηρίου *Acinetobacter baumannii* είναι η ανθεκτικότητα που εμφανίζει σε πολλά αντιβιοτικά. Στα 75 στελέχη *Acinetobacter baumannii* που ταυτοποιήθηκαν την περίοδο Νοεμβρίου-Δεκεμβρίου του 2012 στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Λάρισας πραγματοποιήθηκε έλεγχος για την ύπαρξη ανθεκτικότητας στα εξής αντιβιοτικά: αμικασίνη, αμπικιλίνη/σουλβακτάμη, αζτρεονάμη, σιπροφλοξασίνη, γενταμικίνη, κεφεπίμη, κεφταζιδίμη, ιμιπενέμη, λεβοφλοξασίνη, μεροπενέμη, μινोकυκλίνη, τιγκεκυκλίνη, τετρακυκλίνη, τικαρκιλίνη, τικαρκιλίνη/κλαβουλανικό οξύ, τομπραμυκίνη, τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη, πιπερακιλλίνη, πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη και κολιστίνη. Στα αντιβιοτικά αζτρεονάμη, κεφταζιδίμη, ιμιπενέμη, μεροπενέμη, πιπερακιλλίνη, πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη, τικαρκιλίνη και τικαρκιλίνη/κλαβουλανικό οξύ και τα 75 στελέχη παρουσίασαν ανθεκτικότητα. Στα αντιβιοτικά κεφταζιδίμη, αμικασίνη, αμπικιλίνη/σουλβακτάμη, τετρακυκλίνη, λεβοφλοξασίνη και γενταμικίνη τα ανθεκτικά στελέχη υπερετερούσαν των ευαίσθητων σε ποσοστά 96, 68, 72, 74.66, 65,33 και 52 % αντίστοιχα. Αντίθετα, στα αντιβιοτικά μινोकυκλίνη, τομπραμυκίνη, τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη και τιγκεκυκλίνη τα στελέχη εμφάνισαν ευαισθησία σε ποσοστά 42, 38.66, 50.66 και 49.33 % αντίστοιχα. Στο αντιβιοτικό κολιστίνη και τα 75 στελέχη εμφάνισαν ευαισθησία, γεγονός που έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες (Gogou *et al* 2011, Higgins *et al* 2010, Durante-Mangoni *et al* 2011, Van Looveren *et al* 2004).

Οι καρβαπενέμες συγκαταλέγονται στα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά για την θεραπεία νοσοκομειακών λοιμώξεων που προκαλούνται από στελέχη *Acinetobacter baumannii*. Για το λόγο αυτό κρίθηκε σκόπιμη η εξέταση των στελεχών ως προς την παρουσία γονιδίων ανθεκτικότητας έναντι των συγκεκριμένων αντιβιοτικών. Έχει αποδειχθεί ότι η απόκτηση των καρβαπενεμασών τάξης D (OXA-23, OXA-40-like και OXA-58 οξακιλλινάσες) συμβάλλει στην εξάπλωση των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών (Poirel *et al* 2006). Στην παρούσα εργασία τα βακτήρια εξετάστηκαν για την παρουσία των γονιδίων bla_{OXA 23} και bla_{OXA 58}. Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 2, από τα 75 στελέχη *Acinetobacter baumannii* που ταυτοποιήθηκαν την περίοδο Νοεμβρίου-Δεκεμβρίου 2012 στο Πανεπιστημιακό

Νοσοκομείο Λάρισας τα περισσότερα (80%) είχαν το γονίδιο ανθεκτικότητας στις καρβαπενέμες bla_{oxa} 23. Αντίθετα, ένα πολύ μικρό ποσοστό των βακτηρίων είχε το γονίδιο bla_{oxa} 58 (15%), ενώ σε ένα ακόμη μικρότερο ποσοστό (5%) εντοπίστηκαν και τα δυο γονίδια.

Η επικράτηση του γονιδίου bla_{oxa} 23 μεταξύ των πολυανθεκτικών στελεχών *Acinetobacter baumannii* έχει καταγραφεί πρόσφατα σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες (Brigante *et al* 2012, Karah *et al* 2011, Bonnin *et al* 2011, D'Arezzo *et al* 2011), παρόλο που την περίοδο 1999 έως 2009 φαίνεται να επικρατούσαν τα στελέχη *Acinetobacter baumannii* που έφεραν το γονίδιο bla_{oxa} 58 μεταξύ ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών αυτού του είδους σε νοσοκομεία μεσογειακών χωρών όπως η Ιταλία, η Ελλάδα, ο Λίβανος και η Τουρκία (Gogou *et al* 2011, Di Popolo *et al* 2011). Αυτή η αύξηση των στελεχών που φέρουν το γονίδιο bla_{oxa} 23 παρατηρήθηκε και σε μελέτη που έγινε στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας την περίοδο 2010-2011 (Liakopoulos *et al* 2012).

Η κατανομή των στελεχών ανά κλινική (διάγραμμα 3) αποκαλύπτει ότι τα περισσότερα απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα της ΜΕΘ (Μονάδα Εντατικής Θεραπείας) του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Λάρισας (42%), ενώ ακολουθούν η Παθολογική (28%), η Πνευμονολογική (12%), η Ογκολογική κλινική και η Α.Κ.Α. (5%). Σε πολύ μικρά ποσοστά ταυτοποιήθηκαν στελέχη σε κλινικά δείγματα από την Νεφρολογική, την Νευροχειρουργική, την Αγγειοχειρουργική, την Καρδιολογική και την Δερματολογική κλινική του νοσοκομείου. Η ταυτοποίηση των συγκεκριμένων βακτηρίων σε κλινικά δείγματα από ΜΕΘ αποτελεί συχνό φαινόμενο (Chastre 2003, Garcia-Garmendia *et al* 2001, Levin *et al* 2003, Zarrilli *et al* 2003), καθώς τα βακτήρια αυτά προσβάλλουν κυρίως ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς στους οποίους χρησιμοποιούνται ευρέως ιατρικά μηχανήματα που αποτελούν σημεία αποίκισης των βακτηρίων. Επιπλέον, η νοσηλεία των ασθενών στις ΜΕΘ διαρκεί συνήθως αρκετό χρονικό διάστημα, διευκολύνοντας μια ενδεχόμενη λοίμωξη από τα βακτήρια.

Τα κλινικά δείγματα στα οποία ταυτοποιήθηκαν σε μεγαλύτερο βαθμό τα βακτήρια *Acinetobacter baumannii* αποδείχθηκε ότι είναι οι βροχικές εκκρίσεις σε ποσοστό 28% και ακολουθούν το αίμα, πτύελα, καθετήρας, κατάκλιση, ούρα (17, 11, 9, 9 και 7% αντίστοιχα) (διάγραμμα 4). Το γεγονός ότι οι βροχικές εκκρίσεις

αποτελούν την πιο συχνή πηγή των βακτηρίων στο περιβάλλον του νοσοκομείου δεν προκαλεί έκπληξη αν αναλογιστεί κανείς ότι η περισσότερη συχνή πάθηση που προκαλείται από τα συγκεκριμένα βακτήρια είναι η νοσοκομειακή πνευμονία.

Τα πολυανθεκτικά στελέχη *Acinetobacter baumannii* τυποποιήθηκαν με τη μέθοδο 3LST. Από τα αποτελέσματα (διάγραμμα 5) είναι εμφανής η επικράτηση του ST^{3LST} 101 έναντι του ST^{3LST} 201, τόσο μεταξύ των στελεχών που έφεραν το γονίδιο bla_{oxa} 23 όσο και μεταξύ των στελεχών που έφεραν το γονίδιο bla_{oxa} 58. Επιπλέον, ένα μικρό ποσοστό της τάξης του 5% δεν ανήκε σε κάποιον από τους υπάρχοντες STs (το αλληλικό προφίλ ήταν: αλληλικό 2 για το γονίδιο oxa 51 like, αλληλικό 2 για το ompA και αλληλικό 1 για το csuE). Η επικράτηση του ST^{3LST} 101 μεταξύ των στελεχών που έφεραν το γονίδιο bla_{oxa} 23 έχει διαπιστωθεί και σε προηγούμενη μελέτη που έγινε στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας (Liakopoulos *et al* 2012).

Μετά την τυποποίηση με την μέθοδο 3LST ακολούθησε τυποποίηση μερικών ενδεικτικών στελεχών και με την μέθοδο MLST, ώστε να ελεγχθεί αν υπάρχει η αντιστοιχία των ST^{3LST} με τους ST^{MLST}, δηλαδή αν ο ST^{3LST} 101 ταυτίζεται με τον ST^{MLST} 2 και ο ST^{3LST} 201 με τον ST^{MLST} 1. Όντως τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όσα στελέχη ανήκαν στον ST^{3LST} 101 ανήκαν και στον ST^{MLST} 2 και όσα ανήκαν στον ST^{3LST} 201 ανήκαν και στον ST^{MLST} 1. Επιπρόσθετα, στελέχη που είχαν αλληλικό προφίλ αλληλικό 2 για το γονίδιο oxa 51 like, αλληλικό 2 για το ompA και αλληλικό 1 για το csuE στην 3LST ανήκαν στον ST^{MLST} 1. Σύμφωνα με τα παραπάνω διαπιστώνουμε λοιπόν ότι μεταξύ των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών της μελέτης επικρατούσε ο ST^{MLST} 2.

Ο ST^{MLST} 2 αποτελεί επίσης τον βασικότερο ST^{MLST} σε πολλές άλλες χώρες όπως Ιταλία, Ισπανία, Γερμανία, Ηνωμένο Βασίλειο, Δανία, Ολλανδία, Δημοκρατία της Τσεχίας, Γαλλία, Πολωνία, Τουρκία, Νορβηγία, Σουηδία, Πορτογαλία, Ιρλανδία, Βέλγιο, Ρουμανία, Ιαπωνία, Κίνα, Κορέα, Ταϊλάνδη, Ινδία, Μαλαισία, Φιλιππίνες, Ταϊβάν, Σιγκαπούρη, Βιετνάμ, Λίβανο, Βραζιλία, Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής και Αυστραλία (Karah *et al* 2012). Σε μια πρόσφατη μελέτη (Giannouli *et al* 2013) παρατηρήθηκε ότι τα στελέχη που ανήκουν στον ST^{MLST} 2 έχουν μεγαλύτερη ικανότητα να σχηματίζουν βιομεμβράνες σε σχέση με αυτά που ανήκουν στον ST^{MLST} 1 που μπορούν να επιβιώσουν περισσότερο σε ξηρές επιφάνειες. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως να εξηγεί αυτή τη μεγάλη επικράτηση του ST^{MLST} 1.

Πιθανές μελλοντικές θεραπευτικές λύσεις

Η εμφάνιση των βακτηρίων που είναι ανθεκτικά στα περισσότερα από τα διαθέσιμα αντιβιοτικά έχει οδηγήσει στην έκφραση διαφόρων άποψεων όσον αφορά την ανθεκτικότητα. Μόνο λίγο καιρό πριν οι εμπειρογνώμονες για το θέμα έλαβαν υπόψη όλες τις απόψεις και στην περίπτωση του *Acinetobacter baumannii* κατέληξαν στα εξής: πολυανθεκτικό (MDR, multi drug resistant) θα ονομάζεται ένα στέλεχος όταν δεν είναι επιρρεπές σε ≥ 1 αντιμικροβιακούς παράγοντες σε ≥ 3 αντιμικροβιακές κατηγορίες. Όταν το στέλεχος εμφανίζει εκτεταμένη ανθεκτικότητα, δηλαδή δεν είναι επιρρεπές σε ≥ 1 αντιμικροβιακούς παράγοντες αλλά σε ≤ 2 κατηγορίες θα ονομάζεται εκτεταμένης αντοχής (XDR, extensive drug resistant). Τέλος, πανανθεκτικό (PDR, pan-drug resistant) θα θεωρείται όταν είναι μη-επιρρεπές σε όλους τους αντιμικροβιακούς παράγοντες σε όλες τις αντιμικροβιακές κατηγορίες (Magiorakos *et al* 2012).

Όσον αφορά τις πιθανές μελλοντικές θεραπευτικές λύσεις, οι προοπτικές δεν είναι καλές, τουλάχιστον εντός της επόμενης δεκαετίας (Payne *et al* 2007). Παρόλα αυτά, υπάρχουν δύο βασικές επιλογές για το σχεδιασμό νέων φαρμάκων που θα στοχεύουν στη θεραπεία των λοιμώξεων που προκαλούνται από PDR στελέχη *Acinetobacter baumannii*. Η πρώτη στηρίζεται στις βιοχημικές βάσεις της ανθεκτικότητας και ακολουθεί δυο πορείες: (α) την τροποποίηση της βασικής δομής του αντιβακτηριακού παράγοντα, ώστε να παρακάμπτονται οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας και (β) δημιουργία ενώσεων που θα αναστέλλουν τους μηχανισμούς αντοχής, όπου μαζί με τον αντιβακτηριακό παράγοντα θα χορηγείται και ο αναστολέας, ενισχύοντας τη δράση του (Li and Heide, 2005). Μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει αυτή τη στρατηγική για την ανάπτυξη φαρμάκων κατά του MDR *Acinetobacter baumannii*. Ένα παράγωγο της σιπροφλοξασίνης (UB-8902) έδειξε καλή δραστηριότητα εναντίον στελεχών του βακτηρίου που φέρουν μία μετάλλαξη στο γονίδιο *gyrA*, με τιμές MIC₅₀ των 4 mg/L (εύρος <0,06-8 mg/L) σε σύγκριση με τη σιπροφλοξασίνη που εμφανίζει τιμές MIC₅₀ των 64 mg/L (Vila *et al* 2006). Και άλλες *in vivo* μελέτες που χρησιμοποιούν αυτή τη νέα κινολόνη έχουν πραγματοποιηθεί σε μοντέλα ποντικών με πνευμονία απέδειξαν ότι η UB-8902 παρουσίασε βακτηριοκτόνο δράση έναντι στελεχών του βακτηρίου που ήταν ανθεκτικά στην σιπροφλοξασίνη. Η BAL30072 είναι μία νέα μονοκυκλική β-

λακτάμη που ανήκει στην κατηγορία των αντιβιοτικών σουλβακτάμης που είναι δραστικά έναντι MDR *Acinetobacter baumannii*. Η BAL30072 κατέχει μια σιδηροφόρο διυδροπυριμιδινόνη στην πλευρική αλυσίδα της και έχει δείξει καλύτερη δραστηριότητα από ό,τι η μεροπενέμη σε πέντε MDR στελέχη, ενώ παρατηρήθηκε αυξημένη δραστηριότητα όταν χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός των δύο (Russo *et al* 2011).

Η δεύτερη επιλογή είναι να σχεδιαστεί μια νέα ένωση που περιλαμβάνει αντιμικροβιακά πεπτιδία (AMPs). Η χρήση των AMP αντιβιοτικών έχει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, με κύριο μειονέκτημα την αστάθεια της ένωσης έναντι πρωτεασών που υπάρχουν στο αίμα και τον ορό. Αρκετές μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να ξεπεραστεί αυτό πρόβλημα, αν και κάποιες φορές ενδέχεται να μην είναι εύκολο να εφαρμοσθούν, λόγω πιθανής απώλειας της αποτελεσματικότητας των πεπτιδίων, εφόσον επέλθουν μεταβολές στη δομή τους. D-αμινοξέα, τα οποία δεν επηρεάζονται από πρωτεάσες (Chen *et al* 2006, Friedman 2010), μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο για μεθυλίωση όσο και για φθορίωση συγκεκριμένων αμινοξέων (Meng and Kumar 2007). Από την άλλη πλευρά, βασικό πλεονέκτημα των AMP είναι ότι αποτελούν λιγότερο συγκεκριμένους στόχους και, σε σύγκριση με αντιβιοτικά, η απόκτηση ανθεκτικότητας εναντίον τους είναι δύσκολη (Marr *et al* 2006).

Η προέλευση των πεπτιδίων που εξετάστηκαν μέχρι τώρα διαφέρει, με μερικά να είναι συνθετικά, κάποια να έχουν απομονωθεί από ανθρώπους και άλλα από ζώα. Στην περίπτωση των ζώων, τα αμφίβια αποτελούν μία μεγάλη πηγή πεπτιδίων, όπως δείχνει η περίπτωση της μελέτης που δημοσιεύθηκε από τους Mangoni *et al* (2008). Στη μελέτη αυτή η πλειονότητα των πεπτιδίων απομονώθηκαν από βατράχους, δείχνοντας καλές τιμές MIC κατά MDR *Acinetobacter baumannii*. Η ίδια στρατηγική χρησιμοποιήθηκε στην έρευνα που δημοσιεύθηκε από τους Conlon *et al* (2009), ωστόσο οι τιμές MIC ήταν υψηλότερες σε σύγκριση με τα άλλα πεπτιδία. Άλλα πεπτιδία που απομονώνονται από τις εκκρίσεις του δέρματος βατράχου εξετάστηκαν, επίσης, έναντι στελεχών XDR απόκτηση τιμές από 112,8 σε 2,8 mg/L (Conlon *et al* 2010). Το A3-APO πεπτιδίο, που απομονώθηκε από τις εκκρίσεις του δέρματος βατράχου, φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματικό και λιγότερο τοξικό ενάντια σε *Acinetobacter baumannii* από ό,τι η κολιστίνη. Το αποτέλεσμα αυτό έχει

παρατηρηθεί μόνο *in vivo* και όχι *in vitro*, γεγονός που υποδηλώνει ότι το πεπτίδιο αυτό μπορεί να εμποδίσει τη φλεγμονή στο σημείο της λοίμωξης (Ostorhazi *et al* 2010, 2011).

Διαφορετικές AMP έχουν δοκιμαστεί εναντίον του *Acinetobacter baumannii*, ωστόσο το πεπτίδιο που αποτελείται από κεκροπίνη A και μελιττίνη (Andreu *et al* 1992) είναι αυτό που έχει μελετηθεί εκτεταμένα. Το πρώτο υβρίδιο που δοκιμάστηκε κατά MDR *Acinetobacter baumannii* είναι αυτό που περιείχε κεκροπίνη A (1-8) και μελιττίνη (1-18), ή αλλιώς CA (1-8) M (1-18). Αυτό το υβρίδιο δοκιμάστηκε υπό διαφορετικές πειραματικές συνθήκες, με όλες να οδηγούν σε χαμηλότερο MIC σε σχέση με την πολυμιξίνη B (Saugar *et al* 2002). Η επόμενη δοκιμή έγινε στο υβρίδιο CA (1-7) M (2-9) και, σε σύγκριση με τα αρχικά πεπτίδια κεκροπίνης A και μελιττίνης καθώς και με άλλα αντιβιοτικά, το MIC ήταν 0,25-8 mg/L, που είναι η χαμηλότερη τιμή σε σχέση με άλλα υβριδικά πεπτίδια. Επιπλέον, αυτό το υβριδικό πεπτίδιο έδειξε συνέργεια με συν-αμοξικλαβ, κεφταζιδίμη, πιπερακιλλίνη, και ιμιπενέμη (Giacometti *et al* 2003). Αρκετά εμπορικά πεπτίδια έχουν επίσης δοκιμαστεί έναντι ανθεκτικών στην κολιστίνη στελεχών *Acinetobacter baumannii*. Τα περισσότερα δεν έδειξαν καμία δραστηριότητα, αν και η ινδολισιδίνη και η μαστοπαράν έδειξαν τιμές MIC 2 και 1 mg/L, αντίστοιχα, σε σύγκριση με το MIC της κολιστίνης που είναι 256 mg/L.

Παρά το γεγονός ότι τα AMP μόνα τους και τα AMP σε συνδυασμό με αντιβιοτικά είναι πιθανές μελλοντικές θεραπευτικές λύσεις έναντι των PDR στελεχών *Acinetobacter baumannii*, μια άλλη εναλλακτική θα μπορούσε να περιλαμβάνει τη χρήση των εμβολίων, ειδικά εκείνων που χορηγούνται μέσω OMVs (McConnell *et al* 2011a, b).

5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

http://en.wikipedia.org/wiki/Acinetobacter_baumannii

<http://microbewiki.kenyon.edu/index.php>

ADAMS MD, CHAN ER, MOLYNEAUX ND, BONOMO RA. Genomewide analysis of divergence of antibiotic resistance determinants in closely related isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010, 54: 3569–3577

ADAMS MD, GOGLIN K, MOLYNEAUX N, HUIER KM, LAVENDER H, JAMISON JJ, ET AL. Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol* 2008, 190: 8053–8064

ADAMS-HADUCH JM, ONUOHA EO, BOGDANOVICH T, TIAN GB, MARSCHALL J, URBAN CM, ET AL. Molecular epidemiology of carbapenem-non-susceptible *Acinetobacter baumannii* in the United States. *J Clin Microbiol* 2011, 49: 3849–3854

ADAMS-HADUCH JM, PATERSON DL, SIDJABAT HE, PASCULLE AW, POTOSKI BA, MUTO CA, ET AL. Genetic basis of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates at a tertiary medical center in Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother* 2008, 52: 3837–3843

ADAMS MD, NICKEL GC, BAJAKSOUZIAN S, LAVENDER H, MURTHY AR, JACOBS MR, ET AL. Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system. *Antimicrob Agents Chemother* 2009, 53: 3628–3634

AFZAL-SHAH M, WOODFORD N, LIVERMORE DM. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D β -lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001, 45: 583–588

AL-SWEIH NA, AL-HUBAIL MA, ROTIMI VO. Emergence of tigecycline and colistin resistance in *Acinetobacter species* isolated from patients in Kuwait hospitals. *J Chemother* 2011, 23: 13–16

ANDREU D, UBACH J, BOMAN A, WAHLIN B, WADE D, MERRIFIELD RB ET AL. Short- ened cecropin A-melittin hybrids. Significant size reduction retains potent antibiotic activity. *FEBS Lett* 1992, 296: 190–194.

ARROYO LA, HERRERA CM, FERNANDEZ L, HANKINS JV, TRENT MS, HANCOCK RE. The pmrCAB operon mediates polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 and clinical isolates through phosphoethanolamine modification of lipid A. *Antimicrob Agents Chemother* 2011, 55: 3743–3751

BECEIRO A, LLOBET E, ARANDA J, BENGOCHEA JA, DOUMITH M, HORNSEY M, *ET AL.* Phosphoethanolamine modification of lipid A in colistin-resistant variants of *Acinetobacter baumannii* mediated by the pmrAB two-component regulatory system. *Antimicrob Agents Chemother* 2011, 55: 3370–3379

BONIN RA, POIREL L, LICKER M, NORDMANN P. Genetic diversity of carbapenem hydrolysing β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Romanian hospitals. *Clinical Microbiology and Infection* 2011, 17: 1524–1528.

BONNIN RA, POTRON A, POIREL L, LECUYER H, NERI R, NORDMANN P. PER-7, an extended-spectrum beta-lactamase with increased activity toward broad-spectrum cephalosporins in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011b, 55: 2424–2427

BOU G, CERVERO G, DOMINGUEZ MA, QUEREDA C, MARTINEZ-BELTRAN J. PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem- and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2000, 6:635-643

BOU G, MARTINEZ-BELTRAN J. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000b, 44: 428–432

BOU G, OLIVER A, MARTÍNEZ-BELTRAN J. OXA-24, a novel class D β -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2000c, 44: 1556–1561

BRIGANTE G, MIGLIAVACCA R, BRAMATI S, MOTTA E, NUCLEO E, MANENTI M, *ET AL.* Emergence and spread of a multidrugresistant *Acinetobacter baumannii* clone producing both the OXA-23 carbapenemase and the 16S rRNA methylase ArmA. *JMed Microbiol* 2012, Jan 26

BROWN S, YOUNG HK, AMYES SG. Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. *Clin Microbiol Infect* 2005, 11: 15–23.

BUSE K, JACOBY GA. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010, 54: 969–976

CAMARENA L, BRUNO V, EUSKIRCHEN G, POGGIO S, SNYDER M. Molecular mechanisms of ethanol-induced pathogenesis revealed by RNA-sequencing. *PLoS Pathog* 2010, 6 e1000834

CAYO R, RODRÍGUEZ MC, ESPINAL P, FERNÁNDEZ-CUENCA F, OCAMPO-SOSA AA, PASCUAL A, *ET AL.* Analysis of genes encoding for penicillin-binding proteins in

clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011, 55: 5907–5913

CHASTRE J. Infections due to *Acinetobacter baumannii* in the ICU. *Semin Respir Crit Care Med*. 2003, 24:69-78.

CHEN Y, VASIL AI, REHAUME L, MANT CT, BURNS JL, VASIL ML *ET AL*. Comparison of biophysical and biologic properties of alpha- helical enantiomeric antimicrobial peptides. *Chem Biol DrugDes* 2006, 67: 162–173.

CHEN Y, ZHOU Z, JIANG Y, YU Y. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China. *J Antimicrob Chemother* 2011, 66: 1255–1259

CHO YJ, MOON DC, JIN JS, CHOI CH, LEE YC, LEE JC. Genetic basis of resistance to aminoglycosides in *Acinetobacter* spp. and spread of *armA* in *Acinetobacter baumannii* sequence group 1 in Korean hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009, 964: 185–190

CHOI CH, LEE EY, LEE YC, PARK TI, KIM HJ, HYUN SH, *ET AL*. Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cell Microbiol* 2005, 7: 1127–1138

CHU YW, AFZAL-SHAH M, HOUANG ET, PALEPOU MI, LYON DJ, WOODFORD N, *ET AL*. IMP-4, a novel metallo- β -lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp collected in Hong Kong between 1994 and 1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2001, 45: 710–714

CHU YW, CHAU SL, HOUANG ET. Presence of active efflux systems AdeABC, AdeDE and AdeXYZ in different *Acinetobacter* genomic DNA groups. *J Med Microbiol* 2006, 55: 477–478

CONLON JM, AHMED E, PAL T, SONNEVEND A. Potent and rapid bactericidal action of alyteserin-1c and its [E4K] analog against multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *Peptides* 2010, 31: 1806–1810

CORNAGLIA G, GIAMARELLOU H AND ROSSOLINI GM. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? *Lancet Infect Dis* 2011, 11: 381–393.

CORVEC S, POIREL L, NAAS T, DRUGEON H, NORDMANN P. Genetics and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *blaOXA-23* in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007, 51: 1530–1533

COSTERTON J. Overview of microbial biofilm. *J Ind Microbiol* 1995, 15: 137–140. doi: 10.1007/BF01569816.

COYNE S, GUIGON G, COURVALIN P, PÉRICHON B. Screening and quantification of the expression of antibiotic resistance genes in *Acinetobacter baumannii* with a microarray. *Antimicrob Agents Chemother* 2010a , 54: 333–340

COYNE S, ROSENFELD N, LAMBERT T, COURVALIN P, PÉRICHON B. Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010b, 54: 4389–4393

DAMIER-PIOLLE L, MAGNET S, BRÉMONT S, LAMBERT T, COURVALIN P. AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008, 52: 557–562

D'AREZZO S, CAPONE A, PETROSILLO N, VISCA P, BALLARDINI M, BARTOLINI S, ET AL. Epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* related to European Clonal Types I and II in Rome (Italy). *Clin Microbiol Infect* 2009, 15: 347–357

D'AREZZO S, PRINCIPE L, CAPONE A, PETROSILLO N, PETRUCCA A, VISCA P. Changing carbapenemase gene pattern in an epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* lineage causing multiple outbreaks in central Italy. *J Antimicrob Chemother* 2011, 66:54–61

DA SILVA GJ, CORREIA M, VITAL C, RIBEIRO G, SOUSA JC, LEITAO R, ET AL. Molecular characterization of blaIMP-5, a new integron-borne metallo-β-lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. *FEMS Microbiol Lett* 2002, 215: 33–39

DEL MAR TOMAS, BECEIRO M, PEREZ A, VELASCO A, MOURE D, VILLANUEVA ET AL. Cloning and functional analysis of the gene encoding the 33-to36-kilodalton outer membrane protein associated with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agent Chemother* 2005, 49: 5172–5175.

DI NOCERA PP, ROCCO F, GIANNOULI M, TRIASSI M, ZARRILLI R. Genome organization of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains. *BMC Microbiol* 2011, 11: 224

DI POPOLO A, GIANNOULI M, TRIASSI M, BRISSE S, ZARRILLI R. Molecular epidemiological investigation of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in four Mediterranean countries with a multilocus sequence typing scheme. *Clin Microbiol Infect* 2011, 17:197-201

DOCQUIER JD, LAMOTTE-BRASSEUR J, GALLEN M, AMICOSANTE G, FRERE JM, ROSSOLINI GM. On functional and structural heterogeneity of VIM-type metallo-β-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2003, 51: 257–266

DOI Y, ARAKAWA Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis* 2007, 45: 88–94

- DURANTE-MANGONI E, ZARRILLI R. Global spread of drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: molecular epidemiology and management of antimicrobial resistance. *Future Microbiol* 2011, 6:407-22. [doi:10.2217/fmb.11.23](https://doi.org/10.2217/fmb.11.23)
- DOI Y, ADAMS JM, YAMANE K, PATERSON DL. Identification of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical strains in North America. *Antimicrob Agents Chemother* 2007, 51: 4209–4210
- DRAWZ SM, BABIC M, BETHEL CR, TARACILA M, DISTLER AM, ORI C, ET AL. Inhibition of the class C β -lactamase from *Acinetobacter* spp.: insights into effective inhibitor design. *Biochemistry* 2010, 49: 329–340
- DUPONT M, PAGES JM, LAFITTE D, SIROY A, BOLLET C. Identification of an OprD homologue in *Acinetobacter baumannii*. *J Proteome Res* 2005, 4: 2386–2390
- ESPINAL P, FUGAZZA G, LOPEZ Y, KASMA M, LERMAN Y, MALHOTRA-KUMAR S, ET AL. Dissemination of the NDM-2-producing *Acinetobacter baumannii* clone in an Israeli Rehabilitation Center. *Antimicrob Agents Chemother* 2011a 55, 5396–5398
- FÀBREGA A, MADURGA S, GIRALT E, VILA J. Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microb Biotechnol* 2009, 2:40–61
- FALAGAS ME, KASIAKOU SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis* 2005, 40: 1333–1341
- FERNÁNDEZ-CUENCA F, MARTÍNEZ-MARTÍNEZ L, CONEJO MC, AYALA JA, PEREA EJ, PASCUAL A. Relationship between β -lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2003, 51: 565–574
- FERNÁNDEZ-CUENCA F, SMANI Y, GÓMEZ-SÁNCHEZ MC, DOCOBO-PÉREZ F, CABALLERO-MOYANO FJ, DOMÍNGUEZ-HERRERA J ET AL. Attenuated virulence of a slow-growing pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* is associated with decreased expression of genes encoding the porins CarO and OprD-like. *Int J Antimicrob Agents* 2011, 38: 548–549.
- FERNÁNDEZ-REYES M, RODRÍGUEZ-FALCÓN M, CHIVA C, PACHÓN J, ANDREU D, RIVAS L. The cost of resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii*: a proteomic perspective. *Proteomics* 2009, 9: 1632–1645
- FIGUEIREDO S, POIREL L, PAPA A, KOULOURIDA V, NORDMANN P. Overexpression of the naturally occurring blaOXA-51 gene in *Acinetobacter baumannii* mediated by novel insertion sequence ISAb9. *Antimicrob Agents Chemother* 2009, 53: 4045–4047

FIGUEIREDO S, POIREL L, PAPA A, KOULOURIDA V, NORDMANN P. First identification of VIM-4 metallo- β -lactamase in *Acinetobacter* spp. *Clin Microbiol Infect* 2008, 14: 289–290

FOURNIER PE, RICHEL H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin Infect Dis* 2006, 42:692-699

FOURNIER PE, VALLENET D, BARBE V, AUDIC S, OGATA H, POIREL L, ET AL. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet* 2006, 2, e7

FRIEDMAN M. Origin, microbiology, nutrition, and pharmacology of D-amino acids. *Chem Biodivers* 2010, 7: 1491–1530

GADDY JA, TOMARAS AP, ACTIS LA. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. *Infect Immun* 2009, 77: 3150–3160

GALES AC, TOGNIM MC, REIS AO, JONES RN, SADER HS. Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003, 45:77–79

GEHRLEIN M, LEYING H, CULLMANN W, WENDT S, OPFERKUCH W. Imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* is due to altered penicillin-binding proteins. *Chemotherapy* 1991, 37: 405–412

GIACOMETTI A, CIRIONI O, KAMYSZ W, D'AMATO G, SILVESTRI C, DEL PRETE MS, ET AL. Comparative activities of cecropin A, melittin, and cecropin A-melittin peptide CA(1-7)M(2-9)NH₂ against multidrug-resistant nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Peptides* 2003, 24: 1315–1318

GIANNOULI M, ANTUNES L, MARCHETTI V, TRIASSI M, VISCA P, ZARRILLI R. Virulence-related traits of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains belonging to the international clonal lineages I-III and to the emerging genotypes ST25 and ST78. *BMC Infect Dis*. 2013, 13: 282

GIANNOULI M, TOMASONE F, AGODI A, VAHABOGLU H, DAOUD Z, TRIASSI M, ET AL. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in intensive care units of multiple Mediterranean hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2009, 63: 828–830

GOGOU V, POURNARAS S, GIANNOULI M, VOULGARI E, PIPERAKI ET, ZARRILLI R, TSAKRIS A. Evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages: a 10 year study in Greece (2000-09). *J Antimicrob Chemother* 2011, 66: 2767–2772

GOIC-BARISIC I, TOWNER KJ, KOVACIC A, SSKO-KRALJEVIC K, TONKIC M, NOVAK A, PUNDA-POLIC V. Outbreak in Croatia caused by a new carbapenem-resistant clone of *Acinetobacter baumannii* producing OXA-72 carbapenemase. *J Hosp Infect* 2011, 77:368–369

GRIBUN A, NITZAN Y, PECHATNIKOV I, HERSHKOVITS G, KATCOFF DJ. Molecular and structural characterization of the HMP-AB gene encoding a pore-forming protein from a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Curr Microbiol* 2003, 47: 434–443

GUARDABASSI L, DIJKSHOORN L, COLLARD JM, OLSEN JE, DALSGAARD A. Distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. *J Med Microbiol* 2000, 49: 929–936

GRIBUN A, NITZAN Y, PECHATNIKOV I, HERSHKOVITS G AND KATCOFF DJ. Molecular and structural characterization of the HMP-AB gene encoding a pore-forming protein from a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Curr Microbiol* 2003, 47: 434–443.

HAMOUDA A, AMYES SG. Novel gyrA and parC point mutations in two strains of *Acinetobacter baumannii* resistant to ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemother* 2004, 54: 695–696

HÉRITIER C, POIREL L, FOURNIER PE, CLAVERIE JM, RAOULT D, NORDMANN P. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005a, 49: 4174–4179

HÉRITIER C, POIREL L, NORDMANN P. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAbal in *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2006, 12: 123–130

HIGGINS PG, DAMMHAYN C, HACKEL M, SEIFERT H. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2010, 65: 233–238

HIGGINS P G, POIREL L, LEHMANN M, NORDMANN P, SEIFERT H. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009, 53: 5035–5038

HIGGINS PG, WISPLINGHOFF H, STEFANIK D, SEIFERT H. Selection of topoisomerase mutations and overexpression of adeB mRNA transcripts during an outbreak of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2004, 54: 821–823

HUANG LY, CHEN TL, LU PL, TSAI CA, CHO WL, CHANG FY, ET AL. Dissemination of multidrug-resistant, class 1 integron-carrying *Acinetobacter baumannii* isolates in Taiwan. *Clin Microbiol Infect* 2008, 14: 1010–1019

HUJER KM, HAMZA NS, HUJER AM, PEREZ F, HELFAND MS, BETHEL CR, *ET AL.* Identification of a new allelic variant of the *Acinetobacter baumannii* cephalosporinase, ADC-7 beta-lactamase: defining a unique family of class C enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, 49: 2941–2948

HUYS G, CNOCKAERT M, NEMEC A, SWINGS J. Sequence-based typing of *adeB* as a potential tool to identify intraspecific groups among clinical strains of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2005a, 43: 5327–5331

HUYS G, CNOCKAERT M, VANECHOUTTE M, WOODFORD N, NEMEC A, DIJKSHOORN L, *ET AL.* Distribution of tetracycline resistance genes in genotypically related and unrelated multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains from different European hospitals. *Res Microbiol* 2005b, 156: 348–355

JACOBS AC, HOOD I, BOYD KL, OLSON PD, MORRISON JM, CARSON S, *ET AL.* Inactivation of phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. *Infect Immun* 2010, 78:1952–1962

JUNI E. Genetics and physiology of *Acinetobacter*. *Ann Rev Microbiol* 1978, 32:349-371

KARAH N, GISKE CG, SUNDSFIJORD A, SAMUELSEN O. A diversity of OXA-carbapenemases and class 1 integrons among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Sweden belonging to different international clonal lineages. *Microb Drug Resist* 2011, 17:545-549

KARAH N, SUNDSFIJORD A, TOWNER K, SAMUELSEN O. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug Resistance Updates* 2012, 15: 237-247

KARTHIKEYAN K, THIRUNARAYAN MA, KRISHNAN P. Coexistence of blaOXA-23 with blaNDM-1 and armA in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. *J Antimicrob Chemother* 2010, 65: 2253–2254

ΚΑΤΡΑΜΑΔΟΥ Μ. Λοιμώξεις από *Acinetobacter* spp. *Εφαρμοσμένη Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διαγνωστική* 2010, 15:148-158

KIM JW, HEO ST, JIN JS, CHOI CH, LEE YC, JEONG YG, *ET AL.* Characterization of *Acinetobacter baumannii* carrying blaOXA-23, blaPER-1 and armA in a Korean hospital. *Clin Microbiol Infect* 2008, 14: 716–718.

KOH TH, SNG LH, WANG GC, HSU LY AND ZHAO Y. Carbapenemase and efflux pump genes in *Acinetobacter calcoaceticus* – *Acinetobacter baumannii* complex strains from Singapore. *J Antimicrob Chemother* 2007a, 60: 1173–1174.

KRIZOVA L, DIJKSHOORN L, NEMEC A. Diversity and evolution of AbaR genomic resistance islands in *Acinetobacter baumannii* strains of European clone I. *Antimicrob Agents Chemother* 2011, 55: 3201–3206

KWON SO, GHO YS, LEE JC, KIM SI. Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate. *FEMS Microbiol Lett* 2009, 297: 150–156

LAURETTI L, RICCIO ML, MAZZARIOL A, CORNAGLIA G, AMICOSANTE G, FONTANA R, ET AL. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999, 43:1584–1590

LEE YT, HUANG LY, CHEN TL, SIU LK, FUNG CP, CHO WL, ET AL. Gene cassette arrays, antibiotic susceptibilities, and clinical characteristics of *Acinetobacter baumannii* bacteremic strains harboring class 1 integrons. *J Microbiol Immunol Infect* 2009b, 42: 210–219

LEE K, KIM MN, CHOI TY, CHO SE, LEE S, WHANG DH, ET AL. Wide dissemination of OXA-type carbapenemases in clinical *Acinetobacter* spp isolates from South Korea. *Int J Antimicrob Agents* 2009a, 33: 520–524

LEE Y, KIM CK, LEE H, JEONG SH, YONG D, LEE K. A novel insertion sequence, ISAbal10, inserted into ISAbal adjacent to the blaOXA-23 gene and disrupting the outer membrane protein gene carO in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011b, 55: 361–363

LEE K, LEE WG, UH Y, HA GY, CHO J, CHONG Y. VIM- and IMP-type metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean hospitals. *Emerging Infect Dis* 2003, 9:868–871

LEE MF, PENG CF, HSU HJ, CHEN YH. Molecular characterisation of the metallo- β -lactamase genes in imipenem-resistant Gram-negative bacteria from a university hospital in southern Taiwan. *Int J Antimicrob Agents* 2008, 32: 475–480

LEE K, YUM JH, YONG D, LEE HM, KIM HD, DOCQUIER JD, ET AL. Novel acquired metallo- β -lactamase gene, blaSIM-1, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, 49: 4485–4491

LEE H, YONG D, YUM JH, ROH KH, LEE K, YAMANE K, ET AL. Dissemination of 16S rRNA methylase-mediated highly amikacin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006a, 56: 305–312

LI XZ, NIKAIIDO H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs* 2009, 69: 1555–1623

LIAKOPOULOS A, MIRIAGOU V, KATSIFAS EA, KARAGOUNI AD, DAIKOS GL, TZOUVELEKIS LS *ET AL.* Identification of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* in Greece, 2010 to 2011. *Euro Surveill* 2012, 17:1-3.

LIN L, LING BD, LI XZ. Distribution of the multidrug efflux pump genes, adeABC, adeDE and adeIJK, and class 1 integron genes in multiple-antimicrobial-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*-*Acinetobacter calcoaceticus* complex. *Int J Antimicrob Agents* 2009, 33: 27–32

LIMANSKY AS, MUSSI MA, VIALE AM. Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance. *J Clin Microbiol* 2002, 40: 4776–4778

LOLANS K, RICE TW, MUNOZ-PRICE LS, QUINN JP. Multicity outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing the carbapenemase OXA-40. *Antimicrob Agents Chemother* 2006, 50: 2941–2945

MAGIORAKOS AP, SRINIVASAN A, CAREY RB, CARMELI Y, FALAGAS ME, GISKE CG, *ET AL.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012, 18: 268–281

MAGNET S, COURVALIN P, LAMBERT T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother* 2001, 45: 3375–3380

MAK JK, KIM MJ, PHAM J, TAPSALL J, WHITE PA. Antibiotic resistance determinants in nosocomial strains of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2009, 63: 47–54

MARCHAND I, DAMIER-PIOLLE L, COURVALIN P, LAMBERT T. Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrob Agents Chemother* 2004, 48: 3298–3304

MARR AK, GOODERHAM WJ, HANCOCK RE. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Curr Opin Pharmacol* 2006, 6: 468–472

MARTÍ S, FERNÁNDEZ-CUENCA F, PASCUAL A, RIBERA A, RODRÍGUEZ-BAÑO J, BOU G, *ET AL.* Prevalence of the tetA and tetB genes as mechanisms of resistance to tetracycline and minocycline in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006, 24: 77–80

MAZEL D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol* 2006, 4: 608–620

MCCONNELL MJ, DOMÍNGUEZ-HERRERA J, SMANI Y, LÓPEZ-ROJAS R, DOCOBO-PÉREZ F, PACHÓN J. Vaccination with outer membrane complexes elicits rapid protective immunity to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Infect Immun* 2011a, 79:518–526

MCCONNELL MJ, RUMBO C, BOU G, PACHON J. Outer membrane vesicles as an acellular vaccine against *Acinetobacter baumannii*. *Vaccine* 2011b, 29: 5705–5710

MENG H, KUMAR K. Antimicrobial activity and protease stability of peptides containing fluorinated amino acids. *J Am Chem Soc* 2007, 129: 15615–15622

MERINO M, ACOSTA J, POZA M, SANZ F, BECEIRO A, CHAVES F ET AL. OXA-24 carbapenemase gene flanked by XerC/XerD-like recombination sites in different plasmids from different *Acinetobacter* species isolated during a nosocomial outbreak. *Antimicrob. Agents Chemother* 2010, 54: 2724–2727.

MOFFATT JH, HARPER M, ADLER B, NATION RL, LI J, BOYCE JD. Insertion sequence ISAba11 is involved in colistin resistance and loss of lipopolysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011, 55: 3022–3024

MOFFATT JH, HARPER M, HARRISON P, HALE JD, VINOGRADOV E, SEEMANN T, ET AL. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother* 2010, 54: 4971–4977

MOUBARECK C, BREMONT S, CONROY MC, COURVALIN P AND LAMBERT T. GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009, 53: 3579–3581.

MUSSI MA, LIMANSKY AS, VIALE AM. Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of β -barrel outer membrane proteins. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, 49: 1432–1440

NAAS T, COIGNARD B, CARBONNE A, BLANCKAERT K, BAJOLET O, BERNET C, ET AL. VEB-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*, France. *Emerg Infect Dis* 2006, 12:1214-1222

NAAS T, KERNBAUM S, ALLALI S, NORDMANN P. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, Russia. *Emerg Infect Dis* 2007, 13:669-671

NAVIA MM, RUIZ J AND VILA J. Characterization of an integron carrying a new classD β - lactamase (OXA-37) in *Acinetobacter baumannii*. *Microb Drug Resist* 2002, 8: 261–265.

NEMEC A, KRIZOVA L, MAIXNEROVA M, VAN DER REIJDE TJK, DESCHAGHTD P, PASSETE V, ET AL. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). *Research in Microbiology* 2011, 162: 393–404

NEMEC A, DIJKSHOORN L, VAN DER REIJDE TJ. Long-term predominance of two pan-European clones among multi-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in the Czech Republic. *J Med Microbiol* 2004, 53:147-153

NIGRO SJ, POST V, HALL RM. The multiresistant *Acinetobacter baumannii* European clone I type strain RUH875 (A297) carries a genomic antibiotic resistance island AbaR21, plasmid pRAY and a cluster containing ISAbal-sul2-CR2-strB-strA. *J Antimicrob Chemother* 2011b, 66: 1928–1930

NORDMANN P, COUARD JP, SANSOT D, POIREL L. Emergence of an autochthonous and community-acquired NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Europe. *Clin Infect Dis* 2012, 54: 150–151

NORDMANN P, POIREL L, TOLEMAN MA, WALSH TR. Does broad-spectrum β -lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? *J Antimicrob Chemother* 2011, 66: 689–692

OSTORHAZI E, HOLUB MC, ROZGONYI F, HARMOS F, CASSONE M, WADE JD, ET AL. Broad-spectrum antimicrobial efficacy of peptide A3-APO in mouse models of multidrug-resistant wound and lung infections cannot be explained by in vitro activity against the pathogens involved. *Int J Antimicrob Agents* 2011, 37: 480–484

OSTORHAZI E, ROZGONYI F, SZTODOLA A, HARMOS F, KOVALSZKY I, SZABO D, ET AL. Preclinical advantages of intramuscularly administered peptide A3-APO over existing therapies in *Acinetobacter baumannii* wound infections. *J Antimicrob Chemother* 2010, 65: 2416–2422

PASTERÁN F, RAPOPORT M, PETRONI A, FACCONI D, CORSO A, GALAS M, ET AL. Emergence of PER-2 and VEB-1a in *Acinetobacter baumannii* strains in the Americas. *Antimicrob Agents Chemother* 2006, 50: 3222–3224

PATON R, MILES RS, HOOD J, AMYES SG, MILES RS, AMYES SG. ARI 1: β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 1993, 2: 81–87

PAYNE DJ, GWYNN MN, HOLMES DJ, POMPLIANO DL. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2007, 6: 29–40

PEREZ F, PONCE-TERASHIMA R, ADAMS MD, BONOMO RA. Are we closing in on an “elusive enemy?” The current status of our battle with *Acinetobacter baumannii*. *Virulence* 2011, 2: 86–90

PFEIFER Y, WILHARM G, ZANDER E, WICHELHAUS TA, GOTTIG S, HUNFELD KP, ET AL. Molecular characterization of blaNDM-1 in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. *J Antimicrob Chemother* 2011, 66: 1998–2001

PIDDOCK L. J. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006, 19: 382–402.

POIREL L, CABANNE L, VAHABOGLU H, NORDMANN P. Genetic environment and expression of the extended-spectrum β -lactamase blaPER-1 gene in Gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2005a, 49: 1708–1713

POIREL L, CORVEC S, RAPOPORT M, MUGNIER P, PETRONI A, PASTERAN F, ET AL. Identification of the novel narrow-spectrum β -lactamase SCO-1 in *Acinetobacter* spp. from Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* 2007, 51: 2179–2184.

POIREL L, DORTET L, BERNABEU S, NORDMANN P. Genetic features of blaNDM-1-positive *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011a, 44: 5403–5407

POIREL L, MARQUÉ S, HÉRITIER C, SEGONDS C, CHABANON G, NORDMANN P. OXA-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005b, 49: 202–208

POIREL L, MENUTEAU O, AGOLI N, CATTOEN C, NORDMANN P. Outbreak of extended-spectrum β -lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J Clin Microbiol* 2003, 41: 3542–3547

POIREL L, NORDMANN P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 2006a, 12: 826–836

POIREL L, NORDMANN P. Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene blaOXA-58 in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006b, 50: 1442–1448

POTRON A, MUNOZ-PRICE LS, NORDMANN P, CLEARY T AND POIREL L. Genetic features of CTX- M-15-producing *Acinetobacter baumannii* from Haiti. *Antimicrob Agents Chemother* 2011, 55: 5946–5948.

POTRON A, POIREL L, CROIZE J, CHANTEPERDRIX V, NORDMANN P. Genetic and biochemical characterization of the first extended-spectrum CARB-type β -lactamase, RTG-4, from *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009, 53:3010–3016

POURNARAS S, MARKOGIANNAKIS A, IKONOMIDIS A, KONDYLI L, BETHIMOUTI K, MANIATIS AN, *ET AL.* Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother* 2006, 57: 557–561

QUALE J, BRATU S, LANDMAN D, HEDDURSHETTI R. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* endemic in New York City. *Clin Infect Dis* 2003, 37: 214–220

QUEENAN AM, BUSH K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007, 20: 440–

QI C, MALCZYNSKI M, PARKER M AND SCHEETZ MH. Characterization of genetic diversity of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains collected from 2004 to 2007. *J Clin Microbiol* 2008, 46: 1106–1109

QUINTEIRA S, GROSSO F, RAMOS H, PEIXE L Molecular epidemiology of imipenem-resistant *Acinetobacter haemolyticus* and *Acinetobacter baumannii* isolates carrying plasmid-mediated OXA-40 from a Portuguese hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2007, 51; 3465–3466

RAJAMOHAN G, SRINIVASAN VB, GEBREYES WA. Molecular and functional characterization of a novel efflux pump, AmvA, mediating antimicrobial and disinfectant resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2010, 65: 1919–1925

RAMÍREZ MS, BELLO H, GONZÁLEZ ROCHA G, MÁRQUEZ C, CENTRÓN D. Tn7::In2-8 dispersion in multidrug resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* from Chile. *Rev Argent Microbiol* 2010a, 42: 138–140

RAMÍREZ MS, PIÑEIRO S, CENTRÓN D. Novel insights about class 2 integrons from experimental and genomic epidemiology. *Antimicrob Agents Chemother* 2010b, 54: 699–706

RAVASI P, LIMANSKY AS, RODRIGUEZ RE, VIALE AM, MUSSI MA. ISAb825, a functional insertion sequence modulating genomic plasticity and blaOXA-58 expression in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011, 55: 917–920

RIBERA A, ROCA I, RUIZ J, GIBERT I, VILA J. Partial characterization of a transposon containing the tet(A) determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2003a, 52: 477–480

RIBERA A, RUIZ J, VILA J. Presence of the Tet M determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003b, 47: 2310–2312

RICCIO ML, FRANCESCHINI N, BOSCHI L, CARAVELLI B, CORNAGLIA G, FONTANA R, ET AL. Characterization of the metallo- β -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of blaIMP allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrob Agents Chemother* 2000, 44:1229–1235

ROBERTS AP, CHANDLER M, COURVALIN P, GUEDON G, MULLANY P, PEMBROKE T, ET AL. Revised nomenclature for transposable genetic elements. *Plasmid* 2008, 60: 167–173

ROBLEDO IE, AQUINO EE, SANTÉ MI, SANTANA JL, OTERO DM, LEÓN CF ET AL. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrob Agents Chemother* 2010, 54: 1354–1357.

ROCA I, ESPINAL P, VILA-FARRES X, VILA J. The *Acinetobacter baumannii* Oxyoron: Commensal Hospital Dweller Turned Pan-Drug-Resistant Menace. *Front Microbiol* 2012, v.3: 3-148

ROCA I, MARTI S, ESPINAL P, MARTINEZ P, GIBERT I, VILA J. CraA, a major facilitator superfamily efflux pump associated with chloramphenicol resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009, 53: 4013–4014

RUIZ M, MARTI S, FERNANDEZ-CUENCA F, PASCUAL A, VILA J. High prevalence of carbapenem-hydrolysing oxacillinases in epidemiologically related and unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Spain. *Clin Microbiol Infect* 2007, 13: 1192–1198

RUMBO C, FERNANDEZ-MOREIRA E, MERINO M, POZA M, MENDEZ JA, SOARES NC, ET AL. Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011, 55: 3084–3090

RUSSO TA, LUKE NR, BEANAN JM, OLSON R, SAUBERAN SL, MACDONALD U, ET AL. The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor. *Infect Immun* 2010, 78: 3993-4000

RUSSO TA, PAGE MG, BEANAN JM, OLSON R, HUJER AM, HUJER KM ET AL. In vivo and in vitro activity of the siderophore monosulfactam BAL30072 against *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2011, 66: 867–873.

RUZIN A, KEENEY D, BRADFORD PA. AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *J Antimicrob Chemother* 2007, 59: 1001–1004

SAUGAR JM, ALARCÓN T, LÓPEZ-HERNÁNDEZ S, LÓPEZ-BREA M, ANDREU D, RIVAS L. Activities of polymyxin B and cecropin A-,melittin peptide CA(1-8)M(1-18) against a multiresistant strain of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002, 46: 875–878

SCHABERG DR, TOMPKINS LS, FALKOW S. Use of agarose gel electrophoresis of plasmid deoxyribonucleic acid to fingerprint gram negative bacilli. *J Clin Microbiol* 1981, 13: 1105-1110.

SEWARD RJ, TOWNER KJ. Molecular epidemiology of quinolone resistance in *Acinetobacter* spp. *Clin Microbiol Infect* 1998, 4: 248–254

SHAIKH F, SPENCE RP, LEVI K, OU HY, DENG Z, TOWNER KJ, *ET AL*. ATPase genes of diverse multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates frequently harbour integrated DNA. *J Antimicrob Chemother* 2009, 63: 260–264

SHAKIL S AND KHAN AU. Detection of CTX-M-15-producing and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains from urine from an Indian hospital. *J Chemother* 2010, 22: 324–327.

SIGUIER P, PEROCHON J, LESTRADE L, MAHILLON J, CHANDLER M. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res* 2006, 34: 32–36.

SIROY A, COSETTE P, SEYER D, LEMAITRE-GUILLIER C, VALLENET D, VAN DORSSELAER A *ET AL*. Global comparison of the membrane sub-proteomes between a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain and a reference strain. *J Proteome Res* 2006, 5: 3385–3398.

SIROY A, MOLLE V, LEMAITRE-GUILLIER C, VALLENET D, PESTEL-CARON M, *ET AL*. Channel formation by CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, 49: 4876–4883

SMITH CA, BAKER EN. Aminoglycoside antibiotic resistance by enzymatic deactivation. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2002, 2: 143–160

SMITH MG, GIANOULIS TA, PUKATZKI S, MEKALANOS JJ, ORNSTON LN, GERSTEIN M, *ET AL*. New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. *Genes Dev* 2007, 21: 601–614

SNITKIN ES, ZELAZNY AM, MONTERO CI, STOCK F, MIJARES L, PROGRAM NCS, *ET AL.* Genome-wide recombination drives diversification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2011, 108: 13758–13763

SPENCE RP, TOWNER KJ. Frequencies and mechanisms of resistance to moxifloxacin in nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2003, 52: 687–690

SRINIVASAN VB, RAJAMOHAN G AND GEBREYES WA. Role of AbeS, a novel efflux pump of the SMR family of transporters, in resistance to antimicrobial agents in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009a, 53: 5312–5316.

SRINIVASAN VB, RAJAMOHAN G, PANCHOLI P, STEVENSON K, TADESSE D, PATCHANEE P, *ET AL.* Genetic relatedness and molecular characterization of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* isolated in central Ohio, USA. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2009b, 8: 21

SU XZ, CHEN J, MIZUSHIMA T, KURODA T, TSUCHIYA T. AbeM, an H⁺-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, 49: 4362–4364

TANEJA N, SINGH G, SINGH M, SHARMA M. Emergence of tigecycline & colistin resistant *Acinetobacter baumannii* in patients with complicated urinary tract infections in north India. *Indian J Med Res* 2011, 133: 681–684

TENOVER FC, ARBEIT RD, GOERING RV. How to Select and Interpret Molecular Strain Typing Methods for Epidemiological Studies of Bacterial Infections: A Review for Healthcare Epidemiologists. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 1997, 18: 426–439.

TOWNER KJ, GEE T, BOSWELL T. An unwanted import to the UK: a carbapenem-resistant clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* producing metallo- β -lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2002, 50: 1092–1093

TAYLOR DN, WASHSMOUTH IK, SHANGKUAN Y, *ET AL.* Salmonellosis associated with marijuana—a multistate outbreak traced by plasmid fingerprinting. *N Engl J Med* 1982, 306: 1249–1253

TSAKRIS A, IKONOMIDIS A, POULOU A, SPANAKIS N, VRIZAS D, DIOMIDOUS M, *ET AL.* Clusters of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones producing different carbapenemases in an intensive care unit. *Clin Microbiol Infect* 2008, 14: 588–594

TSAKRIS A, IKONOMIDIS A, POURNARAS S, TZOUVELEKIS LS, SOFIANOU D, LEGAKIS NJ, *ET AL.* VIM-1 metallo- β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Emerging Infect Dis* 2006, 12: 981–983

TURTON JF, GABRIEL SN, VALDERREY C, KAUFMANN ME AND PITT TL. Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2007, 13: 807–815

TURTON JF, KAUFMANN ME, GILL MJ, PIKE R, SCOTT PT, FISHBAIN J, *ET AL.* Comparison of *Acinetobacter baumannii* isolates from the United Kingdom and the United States that were associated with repatriated casualties of the Iraq conflict. *J Clin Microbiol* 2006, 44:2630-2644

URBAN C, GO E, MARIANO N, RAHAL JJ. Interaction of sulbactam, clavulanic acid and tazobactam with penicillin-binding proteins of imipenem-resistant and -susceptible *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett* 1995, 125: 193–197

VALENTINE SC, CONTRERAS D, TAN S, REAL LJ, CHU S, XU HH. Phenotypic and molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from nosocomial outbreaks in Los Angeles County, California. *J Clin Microbiol* 2008, 46: 2499–2507

VAN LOOVEREN M, GOOSSENS H. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2004, 10:684-704. doi:10.1111/j.1469-0691.2004.00942.x.

VILA J, MARTÍ S, SÁNCHEZ-CÉSPEDES J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2007, 59: 1210–1215

VILA J, NAVIA M, RUIZ J, CASALS C. Cloning and nucleotide sequence analysis of a gene encoding an OXA-derived β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997a, 41: 2757–2759

VILA J, RUIZ J, GONI P AND JIMENEZ DE ANTA T. Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV *parC* gene of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 1997b, 39: 757–762.

VILA J, RUIZ J, GONI P, MARCOS A, JIMENEZ DE ANTA T. Mutation in the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995, 39,1201–1203

VILA J, SÁNCHEZ-CÉSPEDES J, SIERRA JM, PIQUERAS M, NICOLÁS E, FREIXAS J, *ET AL.* Antibacterial evaluation of a collection of norfloxacin and ciprofloxacin derivatives against multiresistant bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 2006, 28: 19–24

WANG H, GUO P, SUN H, WANG H, YANG Q, CHEN M, *ET AL.* Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from Chinese hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2007, 51: 4022–4028

WATANABE M, IYOBE S, INOUE M, MITSUHASHI S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991, 35:147–151

WISPLINGHOFF H, DECKER M, HAEFS C, KRUT O, PLUM G, SEIFERT H. Mutations in *gyrA* and *parC* associated with resistance to fluoroquinolones in epidemiologically defined clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2003, 51: 177–180

WROBLEWSKA MM, TOWNER KJ, MARCHEL H, LUCZAK M. Emergence and spread of carbapenem-resistant strains of *Acinetobacter baumannii* in a tertiary-care hospital in Poland. *Clin Microbiol Infect* 2007, 13:490-496

YAMAMOTO M, NAGAO M, MATSUMURA Y, MATSUSHIMA A, ITO Y, TAKAKURA S, *ET AL*. Interspecies dissemination of a novel class 1 integron carrying *blaIMP-19* among *Acinetobacter* species in Japan. *J Antimicrob Chemother* 2011, 66: 2480–2483.

YAMANE K, WACHINO J, DOI Y, KUROKAWA H, ARAKAWA Y. Global spread of multiple aminoglycoside resistance genes. *Emerging Infect Dis* 2005,11: 951–953

YONG D, TOLEMAN MA, GISKE CG, CHO HS, SUNDMAN K, LEE K, *ET AL*. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *blaNDM-1*, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2009, 53: 5046–5054

YU YS, ZHOU H, YANG Q, CHEN YG, LI LJ. Widespread occurrence of aminoglycoside resistance due to ArmA methylase in imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in China. *J Antimicrob Chemother* 2007, 60: 454–455

YUM JH, YI K, LEE H, YONG D, LEE K, KIM JM, *ET AL*. Molecular characterization of metallo- β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomospecies 3 from Korea: identification of two new integrons carrying the *blaVIM-2* gene cassettes. *J Antimicrob Chemother* 2002, 49: 837–840

ZHAO WH, HU ZQ. IMP-type metallo- β -lactamases in Gram-negative bacilli: distribution, phylogeny, and association with integrons. *Crit Rev Microbiol* 2011, 37: 214–226

ZHAO WH, HU Z. *Acinetobacter*: a potential reservoir and dispenser for β -lactamases. *Crit Rev Microbiol* 2012, 38: 30–51

ZHOU H, ZHANG T, YU D, PI B, YANG Q, ZHOU J, *ET AL*. Genomic analysis of the multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain MDR-ZJ06 widely spread in China. *Antimicrob Agents Chemother* 2011, 55: 4506–4512

