



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΤΟΜΕΑΣ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθύντρια: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ευθυμία ΠΕΤΕΙΝΑΚΗ

---

*Διδακτορική Διατριβή*

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΤΕΡΟΓΕΝΟΥΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΙΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΕΣ  
ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΠΙΠΤΩΣΗΣ ΑΥΤΗΣ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ, ΣΕ  
ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ *A. BAUMANNII***

υπό

**ΕΥΑΓΓΕΛΙΑΣ ΝΕΟΥ**

Ιατρού, Ειδικευόμενης Αναισθησιολογίας

Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των  
απαιτήσεων για την απόκτηση του  
Διδακτορικού Διπλώματος  
Λάρισα, 2013

© 2013 Νέου Ευαγγελία

*Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 άρθρο 202 παράγραφος 2 ).*

**Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:**

- 1<sup>ος</sup> Εξεταστής  
(Επιβλέπων)** Δρ. Σπυρίδων **Πουρνάρας**  
*Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*
- 2<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Αθανάσιος **Τσακρής**  
*Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο  
Αθηνών*
- 3<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Επαμεινώνδας **Ζακυνθινός**  
*Αναπληρωτής Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*
- 4<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Γεώργιος **Συρογιαννόπουλος**  
*Καθηγητής Παιδιατρικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο  
Θεσσαλίας*
- 5<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Γεωργία **Βρυώνη**  
*Επίκουρος Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Αθηνών*
- 6<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Δημοσθένης **Μακρής**  
*Επίκουρος Καθηγητής Εντατικολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*
- 7<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Παναγιώτης **Μαρκουλάτος**  
*Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

## *Ευχαριστίες*

*Στην οικογένειά μου και στον Καθηγητή, κ.  
Σπύρο Πουρνάρα, για τη στήριξη και τη  
βοήθειά τους.*

# **ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ**

**ΝΕΟΥ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑΣ**

*ΙΑΤΡΟΥ*

## **ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ**

*ΕΠΙΘΕΤΟ* : ΝΕΟΥ  
*ΟΝΟΜΑ* : ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ  
*ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ* : ΒΟΥΡΒΕΡΗ 1  
*E-MAIL* : evne@mail.gr  
*ΤΗΛΕΦΩΝΟ ΟΙΚΙΑΣ* : 2413013571  
*ΤΗΛΕΦΩΝΟ ΚΙΝΗΤΟ* : 6980491010  
*ΟΙΚΟΓΕΝ. ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ* : ΕΓΓΑΜΟΣ  
*ΗΜΕΡ. ΓΕΝΝΗΣΗΣ* : 25.04.1982

## **ΣΠΟΥΔΕΣ:**

- Πτυχίο Σχολής Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Απρίλιος 2007), Βαθμός « Λίαν Καλώς »

## **ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ:**

- *Ιούνιος 2007 – Απρίλιος 2009* : Θεσσαλικό Κέντρο Αποκατάστασης «ΑΡΩΓΗ» .
- *Απρίλιος 2009- Μάιος 2010* : Θέση αγροτικού ιατρού στο Περιφερειακό Ιατρείο Σταυρού, Κέντρο Υγείας Φαρσάλων.
- *Φεβρουάριος 2010 – Απρίλιος 2010* : Υπηρεσία στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας του Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας.
- *Μάιος 2010* : Σύμβαση ανάθεσης έργου, στο επιστημονικό έργο «Βιομεμβράνες και Λοιμώξεις» της επιτροπής ερευνών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με ειδικότερο πεδίο την «Ευρεία βιβλιογραφική ανασκόπηση των μηχανισμών αντοχής βακτηρίων που προκαλούν λοιμώξεις.»

- *Ιούνιος 2010 – Οκτώβριος 2010*: Κέντρο Αποκατάστασης και Αποθεραπείας «ANIMUS».

- *Οκτώβριος 2010 έως και σήμερα*: Ειδικευόμενη Αναισθησιολογίας στο Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας

### **ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ**

- Εκπόνηση *διδακτορικής διατριβής*, με θέμα : « Διερεύνηση της ετεροαντοχής σε αντιβιοτικά, στελεχών *A. baumannii* » από το Νοέμβριο 2007, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

### **ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ- ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

- 47<sup>th</sup> Postgraduate Technical Workshop on “Gene expression during infection”, 2-5 March, 2008 Sienna, Italy

- 5<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, 9-12 Απριλίου 2008, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα.

- 19<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 16 – 19 May, 2009 Helsinki, Finland

- Acinetobacter Infections: Microbiological, Clinical and Therapeutical Aspects, ESCMID Postgraduate Education Course , 3 - 5 September 2009, Istanbul, Turkey

- ESCMID Conference on Antibiotic Treatment Failure in the Absence of Bacterial Resistance, 25 - 27 October 2009, Freiburg, Germany

- EMBNTrain workshop “*Membrane Proteins – production, purification, stabilisation and structures*” 15 - 20 November 2009, University of Leeds, UK

- 20<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 10-13 April 2010, Vienna, Austria
- 8<sup>th</sup> International Symposium on the Biology of *Acinetobacter*, 1-3 September 2010, Rome, Italy
- 19<sup>0</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Αναισθησιολογίας, 12-15 Μαΐου 2011, Αλεξανδρούπολη, Ελλάδα.

### **ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

- 19<sup>th</sup> ECCMID, Ελσίνκι 2009, Παρουσίαση Poster : “Διερεύνηση της αντίστασης στις καρβαπενέμες σε ευαίσθητα στελέχη *Acinetobacter baumannii*”, Poster No 1029, Κυριακή 17 Μαΐου 2009.
- 20<sup>th</sup> ECCMID, Βιέννη 2010, Προφορική Ανακοίνωση : “ Διερεύνηση της δράση της Τιγκεκυκλίνης σε συνδυασμό με Κολιστίνη ή Μεροπενέμη ενάντια σε Εντεροβακτηριακά που παράγουν KPC καρβαπενεμάσες, με τη μέθοδο time - kill. ” Abstract 2412, Δευτέρα 12 Απριλίου 2010.
- 21<sup>th</sup> ECCMID, Μιλάνο 2011, παρουσίαση Poster : “θεραπευτική αντιμετώπιση με μεροπενέμη, πειραματικών λοιμώξεων σε επίμυες, που προκλήθηκαν από ετερογενή, στη μεροπενέμη, στελέχη *A. baumannii*.” 7 Μαΐου 2011.
- 19<sup>0</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Αναισθησιολογίας, παρουσίαση Poster: “Επισκληρίδιο αιμάτων σε ασθενή με σπονδυλικό αιμαγγείωμα”, 13 Μαΐου 2011.

### **ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ:**

1. Pournaras S, Ikonomidis A, **Neou E**, Kantzanou M, Maniatis AN, Tsakris A. Piperacillin/tazobactam-heteroresistant *Pseudomonas aeruginosa* from urinary infection,



successfully treated by piperacillin/tazobactam. J Antimicrob Chemother 2008; 61: 757-758.

2. Ikonomidis A, Neou E, Gogou V, Vriovi G, Tsakris A, Pournaras S. Heteroresistance to meropenem in carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 2009 ;47(12):4055-9.

3. Pournaras S, Ikonomidis A, Neou E, Kantzanou M, Maniatis AN, Tsakris A. Piperacillin/tazobactam-heteroresistant *Pseudomonas aeruginosa* from urinary infection, successfully treated by piperacillin/tazobactam. J Antimicrob Chemother. 2008 Mar;61(3):757-8.

4. Neou E, Michail G, Tsakris A, Pournaras S. Virulence of *Acinetobacter baumannii* exhibiting phenotypic heterogeneous growth against meropenem in a murine thigh infection model. Efflux Pumps of Multi-Drug Resistant Pathogenic Bacteria: Their Genetic Regulation, Molecular Biology and Possible Control with Newly Designed Agents. *Under publication*

#### **ΣΥΓΓΡΑΦΙΚΟ ΕΡΓΟ:**

- Μετάφραση στην 2<sup>η</sup> ελληνική έκδοση του συγγράματος “Κλινική Αναισθησιολογία”, G. Edward Morgan, Jr. , Maged S. Michail, Micael J. Murray, Επιστημονικές Εκδόσεις ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ Α.Ε., 2012

#### **ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ:**

- Αγγλικά : Proficiency – University of Michigan

#### **ΆΛΛΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ-ΆΛΛΑ ΠΡΟΣΩΝΤΑ:**

- Πτυχίο κιθάρας , Δημοτικό Ωδείο Λάρισας (2001), Βαθμός «Άριστα»

**" ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΤΕΡΟΓΕΝΟΥΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΙΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΕΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΠΙΠΤΩΣΗΣ ΑΥΤΗΣ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ, ΣΕ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ Α. ΒΑΥΜΑΝΝII "**

**ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΝΕΟΥ**

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2013

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

- 1. Δρ. Σπυρίδων Πουρνάρας**, Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας- (Επιβλέπων),
- 2. Δρ. Αθανάσιος Τσακρής**, Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών
- 3. Δρ. Επαμεινώνδας Ζακυνθινός**, Αναπληρωτής Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## ***ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ***

Γενικό Μέρος	σελ. 13
Πρόλογος	σελ. 14
Ταξινόμηση	σελ. 16
Εργαστηριακή διάγνωση	σελ. 21
Μηχανισμοί ανάπτυξης αντοχής	σελ. 31
Επιδημιολογία	σελ. 41
Λοιμώξεις	σελ. 46
Θεραπευτική αντιμετώπιση	σελ. 46
Ειδικό Μέρος	σελ. 49
Σκοπός	σελ. 50
Υλικά και Μέθοδοι	σελ. 50
Αποτελέσματα	σελ. 55
Συμπεράσματα	σελ. 66
Περίληψη	σελ. 69
Αγγλική περίληψη	σελ. 74
Βιβλιογραφία	σελ. 78

***ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ***

## Πρόλογος

Ο έλεγχος των νοσοκομειακών λοιμώξεων, που προκαλούνται από Gram αρνητικά βακτήρια, απασχολεί τα τελευταία χρόνια όλες τις ανεπτυγμένες χώρες. Μετά την εισαγωγή νέων, ευρέως φάσματος αντιβιοτικών για την αντιμετώπιση ανθεκτικών κλινικών στελεχών του γένους *Enterobacteriaceae* κατά τη δεκαετία του '70, καινούργια αερόβια Gram αρνητικά παθογόνα διαδραμάτισαν καίριο ρόλο στο προσκήνιο της ενδονοσοκομειακής μικροβιακής αντοχής. Ανάμεσα σε αυτά είναι και τα είδη *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* και *Acinetobacter spp.*

Όσον αφορά το *A. baumannii*, είναι ένα ευκαιριακό νοσοκομειακό παθογόνο, υπεύθυνο για μια ποικιλία σοβαρών λοιμώξεων, κυρίως στις μονάδες Εντατικής Θεραπείας. (1). Οι περισσότερες περιπτώσεις νοσοκομειακής πνευμονίας, που εμφανίζονται κυρίως σε ασθενείς με μηχανική αναπνοή (2, 3), η βακτηριαιμία, η νοσοκομειακή μηνιγγίτιδα, (4) λοιμώξεις ανώτερου ουροποιητικού και σποραδικά περιστατικά ενδοκαρδίτιδας, αποτελούν τις πιο σοβαρές λοιμώξεις που προκαλούνται από το *A. baumannii* (5). Η δυνατότητα αυτών των βακτηρίων να επιβιώνουν σε ξηρές επιφάνειες και η ικανότητά τους να αναπτύσσουν αντοχή στα αντιβιοτικά, ανταλλάσσοντας γενετικό υλικό, ευθύνονται για την εξάπλωση επιδημιών. (6)

Όσον αφορά στις θεραπευτικές επιλογές, αυτές φαίνεται να περιορίζονται συνεχώς, λόγω της διασποράς ανθεκτικών στελεχών *A. baumannii* ακόμα και σε ευρέως φάσματος β-λακταμικά αντιβιοτικά όπως οι καρβαπενέμες (7,8). Σε περιπτώσεις αντοχής στις καρβαπενέμες, η σουλμπακτάμη μόνη της ή σε συνδυασμό με την αμικιλίνη φαίνεται να έχει καλύτερη δραστηριότητα (9). Η κολιστίνη (παράγωγο πολυμυξίνης E) επίσης είναι φάρμακο εκλογής σε περιπτώσεις πολυανθεκτικών στελεχών, με συνοδά ωστόσο νεφροτοξικά αποτελέσματα (10). Η τιγκεκυκλίνη (νέα γλυκυλκυκλίνη) εμφανίζει

αρκετές φορές ικανοποιητική δραστηριότητα έναντι στελεχών *A. baumannii*, αν και έχουν υπάρξει αρκετές αναφορές αντοχής (11,12). Σε σοβαρές λοιμώξεις από *A. baumannii* χρησιμοποιούνται συνήθως μικτά θεραπευτικά σχήματα, τα οποία μπορεί να περιλαμβάνουν α) β-λακτάμες σε συνδυασμό με αμινογλυκοσίδες ή φλουοροκινολόνες, β) σουλμπακτάμη με κεφεπίμη ή καρβαπενέμη και γ) πολυμυξίνη Β, μιπενέμη και ριφαμπικίνη (13). Ωστόσο, η συνδυασμένη χορήγηση αντιμικροβιακών παραγόντων δεν έχει ευρέως μελετηθεί σε κλινικό επίπεδο και το πρόβλημα της αντιμετώπισης πολυανθεκτικών στελεχών *A. baumannii* παραμένει άλυτο και ιδιαίτερα σημαντικό.

Η αντοχή στις καρβαπενέμες για το *A. baumannii* γίνεται τα τελευταία χρόνια όλο και συχνότερο φαινόμενο σε παγκόσμιο επίπεδο ενώ οι υποκείμενοι μοριακοί μηχανισμοί παραμένουν άγνωστοι, παρά τη συστηματική μελέτη τους. Οι περισσότερες σχετικές μελέτες αναφέρονται στη παραγωγή β-λακταμασών και τη περιγραφή τόσο ενδογενών ενζύμων (AmpC και OXA-51) όσο και εξωγενών, όπως οι τύπου VIM και IMP μεταλλο-β-λακταμάσες και η OXA-58 οξακιλλινάση (14). Το φάσμα υποστρωμάτων αυτών των ενζύμων ποικίλει και υπάρχουν αλληλόμορφα, όπως οι οξακιλλινάσες OXA-23 και OXA-24 που υδρολύουν ισχυρά τις καρβαπενέμες. Άλλοι μηχανισμοί, όπως η κακή διαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος, λόγω μειωμένης έκφρασης πορινών (π.χ. η CarO πορίνη), φαίνεται να δρουν συνεργικά με τις β-λακταμάσες και να προσδίδουν υψηλά επίπεδα αντοχής (15). Η ύπαρξη επίσης αντλιών ενεργού εκροής διερευνάται συστηματικά σε σχέση με το πολυανθεκτικό φαινότυπο του είδους αν και δεν έχουν ακόμα βρεθεί αντλίες που να επηρεάζουν σημαντικά τις καρβαπενέμες. Τέλος, η μελέτη της μειωμένης έκφρασης πενικιλλινο-δεσμευτικών πρωτεϊνών στο τοίχωμα της πεπτιδογλυκάνης, οι οποίες εκτός της σύνθεσης του στρώματος πεπτιδογλυκάνης προσδένουν και β-λακταμικά αντιβιοτικά, βρίσκεται σε πολύ πρώιμα στάδια.

Η εμφάνιση ετερογενούς φαινότυπου από στελέχη *A. baumannii* παρατηρήθηκε πρώτη φορά το 1997, από τους *Pascual et al* (16) αλλά δεν ακολούθησαν εκτενέστερες μελέτες. Το 2005, οι *Pournaras et al* (17) περιέγραψαν την ανάπτυξη αποικιών μέσα στη άλω αναστολής των e-test μεροπενέμης και ιμιπενέμης, στελεχών *A. baumannii*, που ήταν μετρίως ευαίσθητα ή ανθεκτικά στις καρβαπενέμες. Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκαν, *in vitro* και *in vivo*, τα χαρακτηριστικά και η συμπεριφορά στελεχών *A. baumannii*, που εμφάνιζαν ετερογενή φαινότυπο, αλλά ήταν ευαίσθητα στις καρβαπενέμες.

### **Ταξινόμηση – Διαχωρισμός των ειδών**

Παραδοσιακά, η έννοια «μικροβιακό είδος» καθορίζει το σύνολο των στελεχών ενός μικροοργανισμού με κοινά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Ωστόσο σήμερα, η δυνατότητα χαρτογράφησης του γενετικού υλικού των μικροοργανισμών με μοριακές μεθόδους παρέχει πιο αξιόπιστα και αντικειμενικά δεδομένα ταξινόμησης των μικροβίων. Επίσημως, ως «μικροβιακό είδος» ορίζεται το σύνολο των στελεχών με τουλάχιστον 70% DNA-DNA ομολογία και με μέγιστη διαφορά 5ο C στη θερμοκρασία αποδιάταξης του DNA (Tm) (18). Τα γενωμικά είδη που προκύπτουν με βάση αυτά τα μοριακά δεδομένα και που έχουν διαφορετικές φαινοτυπικές ιδιότητες, πληρούν τις προϋποθέσεις ώστε να υιοθετηθούν διαφορετικές δοκιμασίες για την ταυτοποίησή τους.

Η ιστορία του γένους *Acinetobacter* χρονολογείται από τις αρχές του 20ού αιώνα, όταν το 1911, ο Beijerinck, ένας Δανός μικροβιολόγος, περιέγραψε έναν οργανισμό που ονόμασε *Micrococcus calcoaceticus*, τον οποίο απομόνωσε από το χώμα, εμπλουτίζοντάς το με οξικό ασβέστιο (19). Τις επόμενες δεκαετίες περιγράφηκαν πολλοί παρόμοιοι μικροοργανισμοί και ταξινομήθηκαν σε τουλάχιστον 15 διαφορετικά γένη και είδη. Το σημερινό γένος *Acinetobacter*, η ονομασία του οποίου προέρχεται από την ελληνική λέξη «ακίνητος», προτάθηκε αρχικά από τους Brisou και Prevet το 1954, οι οποίοι θέλησαν με



τον τρόπο αυτό να διαχωρίσουν τους ακίνητους από τους κινητούς μικροοργανισμούς τους γένους *Achromobacter* (20) και έγινε ευρύτερα αποδεκτό από το 1968 (21). Εκτενείς μελέτες επί των τροφικών τους απαιτήσεων έδειξαν ότι τα οξειδάση-αρνητικά στελέχη διέφεραν από τα οξειδάση-θετικά. Το 1971, η «Επιτροπή Ταξινόμησης των *Moraxella* και σχετικών με αυτές Βακτηρίων» (Subcommittee on the Taxonomy of *Moraxella* and Allied Bacteria) πρότεινε ότι το γένος *Acinetobacter* αποτελείται αποκλειστικά από οξειδάση-αρνητικά στελέχη (22). Μερικά από τα Gram-αρνητικά, αζυμωτικά βακτήρια που τώρα ανήκουν στο γένος αυτό, είχαν παλαιότερες ονομασίες όπως *Bacterium anitratum*, *Herellea vaginicola* και *Mina polymorpha*, *Acchromobacter*, *Alcaligenes*, *Micrococcus calcoaceticus*, *Moraxella glucidolytica* και *Moraxella lwoffii*.

Σήμερα, το γένος *Acinetobacter* περιλαμβάνει Gram-αρνητικά βακτήρια, αυστηρά αερόβια, αζυμωτικά, μη απαιτητικά, ακίνητα, καταλάση-θετικά και οξειδάση-αρνητικά, με περιεκτικότητα βάσεων G + C στο DNA από 39% έως 47% (23), που αναπτύσσονται κανονικά σε σύνθετα θρεπτικά υλικά και σε θερμοκρασία μεταξύ 20°C και 30°C, χωρίς την ανάγκη ειδικών αναπτυξιακών παραγόντων, ενώ ανάγουν σπάνια τα νιτρικά. Τα περισσότερα στελέχη *Acinetobacter* μπορούν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό υλικό που περιέχει αμμώνιο ή νιτρικά άλατα ως πηγή αζώτου και οξικό ή γαλακτικό ή πυροσταφυλικό ως πηγή άνθρακα.

Με βάση νεώτερα δεδομένα, προτάθηκε τα μέλη του γένους *Acinetobacter* να ταξινομηθούν στη νέα οικογένεια *Moraxellaceae* στη σειρά *Gammaproteobacteria*, που περιλαμβάνει τα γένη *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter* και σχετιζόμενους μικροοργανισμούς (24). Μια σημαντική επανάσταση στη μεγάλη και περίπλοκη ιστορία του γένους επιτεύχθηκε το 1986 από τους Bouvet και Grimont, οι οποίοι διαχώρισαν 12 ομάδες DNA ή γενωμικών ειδών, με βάση μελέτες υβριδισμού DNA-DNA. Σε κάποιες από αυτές τις ομάδες δόθηκαν επίσημα ονόματα ειδών, συμπεριλαμβανομένων των *A.*

*baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii*, *A. junii* και *A. lwoffii* (25). Εργασίες των Bouvet και Jeanjean, Tjernberg και Ursing και Nishimura et al. (26, 27, 28) κατέληξαν στην περιγραφή περισσότερων γενομικών ειδών *Acinetobacter*, που συμπεριελάμβαναν και το είδος *A. radioresistens*, το οποίο αντιστοιχεί στο γενωμικό είδος *Acinetobacter* 12, που ήδη είχε περιγραφεί από τους Bouvet και Grimont (25). Επίσης, κάποια από τα περιγραφόμενα ως ανεξάρτητα γενομικά είδη κατέληξαν να είναι συνώνυμα, π.χ. το *A. lwoffii* με το γενωμικό είδος *Acinetobacter* 9 ή το γενωμικό είδος *Acinetobacter* 14, που περιγράφηκε από τους Bouvet και Jeanjean (14BJ) και το γενωμικό είδος *Acinetobacter* 13, που περιγράφηκε από τους Tjernberg και Ursing (13TU). Πιο πρόσφατα, περιγράφηκαν 10 επιπλέον είδη *Acinetobacter*, που περιλαμβάνουν 3 είδη ανθρώπινης προέλευσης *A. parvus*, *A. schindleri* και *A. ursingii* ( 29,30 ) και 7 είδη που απομονώθηκαν από ενεργό λάσπη (από εργοστάσια λυμάτων), με τα ονόματα *A. baylyi*, *A. bouvetii*, *A. grimontii*, *A. tjernbergiae*, *A. townneri*, *A. tandoii* και *A. generi* ( 31 ), αυξάνοντας έτσι τον αριθμό των έγκυρα περιγραφόμενων (γενομικών) ειδών σε 32, από τα οποία στα 17 έχουν δοθεί έγκυρα ονόματα ειδών .

Τέσσερα από τα παραπάνω περιγραφόμενα είδη, *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, το γενωμικό είδος 3 *Acinetobacter* και το γενωμικό είδος *Acinetobacter* 13TU σχετίζονται πολύ στενά και είναι πολύ δύσκολο να διαχωριστούν με φαινοτυπικές μεθόδους. Έτσι, έχει προταθεί να γίνεται αναφορά ως σύμπλεγμα *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* ( 32,33 ). Ωστόσο, αυτή η ομάδα μικροοργανισμών περιλαμβάνει τρία από τα πιο σημαντικά κλινικά είδη, που σχετίζονται με τη μεγάλη πλειοψηφία των νοσοκομειακών και αποκτημένων στην κοινότητα λοιμώξεων , ( *A. baumannii*, το γενωμικό είδος 3 *Acinetobacter* και το γενωμικό είδος *Acinetobacter* 13TU) καθώς και ένα περιβαλλοντικό είδος που απομονώθηκε από το νερό και το χώμα ( *A. calcoaceticus* ) αλλά δεν έχει ενοχοποιηθεί για σοβαρές ασθένειες μέχρι αυτή τη στιγμή. Έτσι, μιας και

το όνομα του συμπλέγματος δίνεται από το περιβαλλοντολογικό είδος, η αναφορά ως σύμπλεγμα *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* μπορεί να είναι παραπλανητική και ακατάλληλη για χρήση στην κλινική πράξη. Πρόσφατα, στα γενωμικά είδη 3 και 13, που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη κλινική σημασία από τα υπόλοιπα του συμπλέγματος *A. calcoaceticus* - *A. baumannii*, έχουν δοθεί τα ονόματα *Acinetobacter pittii* και *Acinetobacter nosocomialis* αντίστοιχα (34).

Τα μέλη της οικογένειας *Acinetobacter* μπορούν να θεωρηθούν πανταχού παρόντα στη φύση (36), μιας και μπορούν να ανακαλλιεργηθούν από όλα τα δείγματα που προέρχονται από το χώμα, από επιφανειακά νερά, φυτά, ζώα καθώς επίσης από τρόφιμα φυτικά και ζωικά (π.χ. ωμό κρέας). (35).

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 (37). Στον χώρο του νοσοκομείου διαβιεί 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. Τα περισσότερα είδη *Acinetobacter*, που απομονώνονται από ανθρώπινα κλινικά δείγματα, έχουν κλινική σημασία ως παθογόνα (38,39).

Τα είδη που απομονώνονται πιο συχνά, σε διάφορες εργασίες είναι τα *A. lwoffii* (58%), *A. johnsonii* (20%), *A. junii* (10%) και το γενωμικό είδος *Acinetobacter 3* (6%) (37,40). Το *A. baumannii*, αν και είναι το πιο σημαντικό νοσοκομειακό παθογόνο, βρίσκεται σπάνια στην ανθρώπινη επιδερμίδα ( 0.5%-3%) (37,40) και στα ανθρώπινα

κόπρανα (0.8%) (41). Τα πιο συχνά είδη που συναντώνται στην κλινική πράξη είναι το *A. baumannii* και το *A. lwoffii*.

Πίνακας 1. Τα 32 είδη του γένους *Acinetobacter*.

<i>A. baumannii</i>	<i>A. tandoii</i> ,
<i>A. baylyi</i>	<i>A. ursingii</i>
<i>A. bereziniae</i>	<i>A. venetianus</i>
<i>A. beijerinckii</i> ,	Τα λοιπά είδη παραμένουν
<i>A. bouvetii</i> ,	χωρίς όνομα και αναφέρο-
<i>A. calcoaceticus</i> ,	νται με αριθμούς:
<i>A. gernerii</i> ,	είδος 3 ( <i>A. pitii</i> )
<i>A. guillouiae</i> ,	«μεταξύ 1 και 3»
<i>A. gyllenbergii</i> ,	είδος 6
<i>A. haemolyticus</i> ,	είδος 13 TU ( <i>A. nosocomialis</i> )
<i>A. johnsonii</i> ,	«κοντά στο 13 TU»
<i>A. junii</i> ,	είδος 13 BJ/14TU
<i>A. lwoffii</i> ,	είδος 14 BJ
<i>A. parvus</i> ,	είδος 15 TU
<i>A. radioresistens</i> ,	είδος 15 BJ
<i>A. schindleri</i> ,	είδος 16
<i>A. tjernbergiae</i> ,	είδος 17
<i>A. towneri</i> ,	

## Εργαστηριακή Διάγνωση

Τα είδη *Acinetobacter* ανθρώπινης προέλευσης αναπτύσσονται καλά σε στερεά θρεπτικά υλικά, που χρησιμοποιούνται στη ρουτίνα του μικροβιολογικού εργαστηρίου, όπως το αιματούχο άγαρ ή το tryptic soy άγαρ, με επώαση στους 37ο C. Σχηματίζουν λείες, μερικές φορές βλενώδεις, γκριζωπές αποικίες. Οι αποικίες του συμπλέγματος *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* μοιάζουν με αυτές των Enterobacteriaceae, με διάμετρο αποικίας από 1.5 έως 3 mm, μετά από ολονύχτια επώαση, ενώ τα περισσότερα από τα υπόλοιπα είδη *Acinetobacter* παράγουν μικρότερες και περισσότερο ημιδιαφανείς αποικίες. (19) Τα στελέχη του είδους *A. haemolyticus* και αρκετών, ακόμα μη προσδιορισμένων ειδών, όπως τα γενομικά είδη *Acinetobacter* 6, 13BJ, 14BJ, 16 και 17, μπορεί να εμφανίζουν αιμόλυση σε αιματούχο άγαρ, κάτι που δεν εμφανίζεται ποτέ στα στελέχη του συμπλέγματος *A. calcoaceticus* - *A. baumannii*.

Δυστυχώς, δεν υπάρχει μία μόνο μεταβολική δοκιμασία που να διακρίνει τα *Acinetobacter* από τα υπόλοιπα όμοια μη αζυμωτικά gram-αρνητικά βακτήρια. Μία αξιόπιστη μέθοδος για σαφή αναγνώριση των *Acinetobacter* σε επίπεδο γένους, είναι η δοκιμασία μεταμόρφωσης του Jun1, που βασίζεται στη μοναδική ικανότητα του μεταλλακτικού στελέχους *Acinetobacter* BD413 trpE27, ενός φυσικά αυξοτροφικού στελέχους ως προς την τρυπτοφάνη, πρόσφατα αναγνωρισμένου ως το *A. baylyi*, να μεταλλάσσεται μέσω ελεύθερου DNA οποιουδήποτε είδους *Acinetobacter*, σε (μη αυξοτροφικό) φαινότυπο «αγρίου τύπου» (42).

Για την απομόνωση των *Acinetobacter* από δείγματα περιβαλλοντικά και κλινικά είναι απαραίτητη η επώαση της καλλιέργειας σε χαμηλό pH, σε έντονα αεριζόμενο υγρό υπόστρωμα με άλατα μετάλλων, εμπλουτισμένο με ακετόνη ή άλλη κατάλληλη πηγή άνθρακα καθώς και με νιτρικά, μιας και έχουν αποδειχθεί χρήσιμα (35). Για τον επιτυχή διαχωρισμό των *Acinetobacter* από πολλούς πληθυσμούς βακτηρίων έχουν αναπτυχθεί

κατά καιρούς διάφορα υποστρώματα. Ένα νέο θρεπτικό υπόστρωμα, το Leeds Acinetobacter Medium- LAM (43), επιτρέπει την ανάπτυξη περισσότερων στελεχών από τα προηγούμενα υλικά (π.χ. Herellea και Holton's agar), ενώ η διάκριση των άλλων οξειδάση-αρνητικών μικροβίων που αναπτύσσονται στο μέσο αυτό γίνεται εύκολα από την αλλαγή του χρώματος του θρεπτικού υλικού και τη μορφολογία των αποικιών τους. Επίσης, κλινικά στελέχη Acinetobacter αναπτύσσονται καλύτερα από περιβαλλοντικά, εκτός των *A. johnsonii* και *A. haemolyticus*, τα οποία όμως σπάνια απομονώνονται από κλινικά δείγματα.

Η φαινοτυπική μέθοδος απομόνωσης, που προτάθηκε από τους Bouvet και Grimont το 1986, βασίζεται σε 28 φαινοτυπικές δοκιμασίες (25), που περιλαμβάνουν ανάπτυξη στους 37oC, 41oC και 44oC, παραγωγή οξέως από γλυκόζη, υδρόλυση ζελατίνης και χρησιμοποίηση 14 πηγών άνθρακα (44). Αν και αυτή η μέθοδος επιτρέπει το διαχωρισμό ανάμεσα σε 11 από τα 12 γενομικά είδη που αρχικά περιγράφηκαν (25) και οδήγησε στη σωστή απομόνωση κατά 95,6% σε επίπεδο ειδών ανάμεσα σε 136 στελέχη Acinetobacter που απομονώθηκαν από δείγματα ανθρώπινου δέρματος (40), δεν επιτρέπει την ταξινόμηση των πιο πρόσφατα περιγραφέντων (γενομικών) ειδών. Πιο συγκεκριμένα, τα περισσότερο συγγενικά και κλινικά σχετιζόμενα είδη *A. baumannii* και *A. nosocomialis* δε μπορούν να διαχωριστούν, ενώ τα *A. calcoaceticus* και *A. pittii* μπορούν να διαχωριστούν μόνο επειδή αναπτύσσονται σε διαφορετικές θερμοκρασίες (33).

Τα περισσότερα εργαστήρια βασίζονται σε αυτοματοποιημένες ή ημιαυτοματοποιημένες φαινοτυπικές μεθόδους που χρησιμοποιούν τα διάφορα εμπορικά συστήματα για την ταυτοποίηση των βακτηριακών παθογόνων. Οι αλγόριθμοι και οι βάσεις δεδομένων που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση των αποτελεσμάτων στηρίζονται σε πρότυπα μικροβιακά στελέχη με γνωστές βιοχημικές και φυσιολογικές

ιδιότητες, υπό βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης. Ένα τέτοιο αυτοματοποιημένο σύστημα ταυτοποίησης μικροοργανισμών είναι το VITEK 2 (bioMérieux, Inc., Βόρεια Καρολίνα, ΗΠΑ), το οποίο ταυτοποιεί τα στελέχη σε λιγότερο από 10 ώρες. Η ταυτοποίηση βασίζεται στις βιοχημικές ιδιότητες που έχουν συλλεχθεί από πρότυπα στελέχη. Συγκεκριμένα, για τα Gram αρνητικά βακτήρια εξετάζονται 47 βιοχημικές δοκιμασίες πάνω σε μία μήτρα μίας χρήσης. Εάν δεν υπάρξει μοναδική ταυτοποίηση, δίνεται μία λίστα πιθανών παθογόνων μικροοργανισμών ή κρίνεται πως το στέλεχος βρίσκεται εκτός του πεδίου της βάσης δεδομένων. Ένα από τα κυριότερα πλεονεκτήματα του συστήματος είναι ότι διαθέτει μήτρες μίας χρήσης για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό του υπό μελέτη μικροοργανισμού στα αντιβιοτικά. Έχει διαπιστωθεί υψηλή επαναληψιμότητα τέτοιων αποτελεσμάτων σε μεγάλα δείγματα εντεροβακτηριακών και άλλων Gram αρνητικών στελεχών (45). Ο περιορισμός που αναφέρεται για το Vitek 2 είναι ότι δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε άμεσα κλινικά δείγματα ή άλλα δείγματα που περιέχουν μικτή χλωρίδα. Επίσης, είδη που είναι σπάνια ή πρόσφατα, ενδέχεται να μη συμπεριλαμβάνονται στη βάση δεδομένων του συστήματος.

Ένα άλλο ημιαυτόματο και ευρέως χρησιμοποιούμενο σύστημα ταυτοποίησης για μη απαιτητικά, μη εντεροβακτηριακά Gram αρνητικά βακτήρια είναι το API 20NE (bioMérieux). Το σύστημα αυτό αποτελείται από μία ταινία με 20 βοθρία που περιέχουν αφυδατωμένα υποστρώματα μικροβιακών μεταβολικών ενζύμων. Το μικροβιακό εναιώρημα ενοφθαλμίζεται στα βοθρία και προκαλεί ανασύσταση των υποστρωμάτων, ενώ με επώαση στην κατάλληλη θερμοκρασία, τα υποστρώματα αυτά μεταβολίζονται με εμφανείς χρωματικές αλλαγές. Μετά το πέρας της επώασης, το χρωματικό προφίλ της ταινίας συγκρίνεται με μία βάση δεδομένων και το λογισμικό εξάγει τα αποτελέσματα.

Η ταυτοποίηση ειδών που γίνεται με συμβατικά ή με ημιαυτοματοποιημένα συστήματα που χρησιμοποιούνται στις εξετάσεις ρουτίνας στα διαγνωστικά εργαστήρια,

όπως τα API 20NE, Vitek 2, Phoenix και το MicroScan WalkAway, παραμένει προβληματική (46,47,48). Αυτό μπορεί να εξηγηθεί εν μέρει από την περιορισμένη βάση δεδομένων που διαθέτουν, από το γεγονός πως το φαινοτυπικό προφίλ των υπό εξέταση βακτηρίων, που περιλαμβάνει τη Gram χρώση, τη μορφολογία των αποικιών, τις τροφικές απαιτήσεις και την ενζυμική και μεταβολική δραστηριότητα, μπορεί να είναι μεταβλητό υπό περιβαλλοντική πίεση ή για εξελικτικούς λόγους (49) αλλά και από το γεγονός πως δεν είναι προγραμματισμένα να ταυτοποιούν μόνο *Acinetobacter*. Πιο συγκεκριμένα, τα τρία κλινικά σχετιζόμενα μέλη του συμπλέγματος *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* δε μπορούν να διαχωριστούν με τα παραπάνω συστήματα. Στην πραγματικότητα, τα *A. baumannii*, το *A. pitii* και *A. nosocomialis* ταυτοποιούνται όλα ως *A. baumannii*. Για το λόγο αυτό ίσως είναι πιο σωστό να αναφερόμαστε στα *A. baumannii*, *A. pitii* και το *A. nosocomialis* με τον όρο «ομάδα *A. baumannii*», επισημαίνοντας πως τα είδη αυτά μοιράζονται σημαντικά κλινικά και επιδημιολογικά χαρακτηριστικά (50,51,52).

Με βάση τα παραπάνω, οι απλές φαινοτυπικές δοκιμασίες που χρησιμοποιούνται σε φάση ρουτίνας στα διαγνωστικά εργαστήρια, για το διαχωρισμό βακτηριακών γενών σε επίπεδο ειδών, είναι ακατάλληλες για τη σωστή ταξινόμηση ακόμα και των πιο συχνών ειδών *Acinetobacter*. Η μέθοδος εκλογής για την απομόνωση των *Acinetobacter* είναι ο υβριδισμός DNA-DNA (25).

Μοριακές τεχνικές που είναι έγκυρες για την ταυτοποίηση των *Acinetobacter* περιλαμβάνουν την μελέτη πολλαπλασιασμένου ριβοσωμικού DNA με τη χρήση ενζύμων περιορισμού (Amplified rDNA Restriction Analysis – ARDRA) (53), την ανάλυση του αποτυπώματος του DNA που προκύπτει από πολλαπλασιασμό με ειδικούς εκκινητές, μετά από κατατεμαχισμό ολόκληρου του γονιδιώματος σε ειδικές θέσεις (amplified fragment length polymorphism – AFLP) (54,29), τη ριβοτυπία (32), (ανάλυση αποτυπώματος tRNA) (55), την περιοριστική ανάλυση των ενδογενών περιοχών 16S-23S



rRNA (56), την ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου που κωδικοποιεί για την 16S-23S rRNA περιοχή (Intergenic Spacer -ITS) (57) και την ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου *groB*, που κωδικοποιεί για τη β- υπομονάδα της RNA πολυμεράσης (58).

Η τεχνική ARDRA περιλαμβάνει περιοριστική πέψη του ειδικού προϊόντος PCR για γονίδιο που κωδικοποιεί το ριβοσωμικό RNA με περιοριστικά ένζυμα και σύγκριση των προϊόντων πέψης με ηλεκτροφόρηση. Στην τεχνική αυτή αρχικά χρησιμοποιήθηκαν δέκα διαφορετικά ένζυμα για την ταυτοποίηση 18 γενωμικών ειδών *Acinetobacter* και τη ομαδοποίησή τους σε 20 rDNA υποσύνολα (59). Η διάκριση των ειδών του συμπλέγματος *A. calcoaceticus* – *A. baumannii* ήταν άμεση και η όλη διαδικασία εμφάνισε υψηλή επαναληψιμότητα όταν χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές καλλιέργειες, βακτηριακά εναιωρήματα, προϊόντα PCR και αντιδράσεις πέψης στο ίδιο είδος. Η ειδικότητα της τεχνικής ήταν επίσης υψηλή, αφού το ίδιο ένζυμο έδινε επαναλήψιμο πρότυπο πέψης σε επιδημιολογικά άσχετα μεταξύ τους στελέχη του ίδιου είδους, ωστόσο, για τη διάκριση των γενωμικών ειδών 4 (*A. haemolyticus*) και 7 (*A. johnsonii*), 5 (*A. junii*) και 17, 10 και 11 απαιτείται η τεχνική να συμπληρωθεί με τις φαινοτυπικές δοκιμασίες παραγωγής ζελατινάσης, αιμόλυσης, παραγωγής οξέως από γλυκόζη και ανάπτυξης στους 37°C. Το 1997 (60) η τεχνική αυτή βελτιώθηκε με τη χρήση του ενζύμου *Sau3AI* για την πέψη ενός προϊόντος περίπου 4.5kb, που περιελάμβανε τα γονίδια 16SrDNA και 23SrDNA καθώς και την περιοχή ITS.

Η τεχνική της ανάλυσης της αλληλουχίας του γονιδίου που κωδικοποιεί για την 16S-23S rRNA περιοχή (Intergenic Spacer -ITS) περιλαμβάνει τη διενέργεια PCR για τη διάμεση νουκλεοτιδική ακολουθία που χωρίζει τα γονίδια που κωδικοποιούν για 16SrRNA και 23SrRNA με εκκινητές που είναι συντηρημένοι, η οποία ακολουθείται από Sequencing του προϊόντος της PCR. Στο τέλος, η αλληλουχία συγκρίνεται σε βάση δεδομένων. (61). Μοναδικό ίσως μειονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι τα πολλαπλά

προϊόντα PCR που παράγονται σε κάποια είδη *Acinetobacter*. Η μέθοδος αυτή είναι ιδιαίτερα κατάλληλη για τη διάκριση των ειδών του συμπλόκου *A. calcoaceticus* – *A. baumannii*, γιατί η ITS περιοχή είναι ιδιαίτερα συντηρημένη στα είδη του συμπλόκου *A. calcoaceticus* – *A. baumannii* αλλά και περισσότερο ποικιλόμορφη από την αλληλουχία του 16SrDNA ενώ το παραγόμενο προϊόν είναι μόλις 600-9000 bp περίπου σε αντίθεση με το μήκος του γονιδίου του 16SrDNA (περίπου 1.5kb), οπότε και η αλληλουχοποίησή του είναι πιο αξιόπιστη.

Η ριβοτυπία είναι μία τεχνική με ιδιαίτερη διακριτική ικανότητα, που περιλαμβάνει την πέψη του γενωμικού DNA με περιοριστικά ένζυμα και στη συνέχεια την αποτύπωση κατά Southern με ειδικούς ανιχνευτές για το ριβοσωμικό 16SrDNA και 23SrDNA. Το προφίλ των ζωνών που προκύπτει θεωρείται αντιπροσωπευτικό κάθε είδους. Σε μία ανάλογη μελέτη (62) η μέθοδος έδειξε υψηλή επαναληψιμότητα και ειδικότητα για τη διάκριση των ειδών του συμπλέγματος *A. calcoaceticus* – *A. baumannii* με περιοριστικά ένζυμα EcoRI, ClaI και Sall. Η διαφοροποίηση των τεσσάρων ειδών (*A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, γενωμικά είδη 3 και 13 TU) ήταν ιδιαίτερα ικανοποιητική και κάλυπτε το 97% των περιπτώσεων, μόνο με τη χρήση του EcoRI.

Η μέθοδος AFLP περιλαμβάνει κατακερματισμό του χρωμοσωμικού DNA με δύο ένζυμα (όπως τα EcoRI και MseI), μη εκλεκτική PCR με αλληλουχίες ειδικές για τις θέσεις αναγνώρισης των δύο περιοριστικών ενζύμων και έπειτα δεύτερη εκλεκτική PCR με πρόσθετα εκλεκτικά νουκλεοτίδια [με υποτετραπλάσια μείωση του αριθμού των προϊόντων για κάθε νουκλεοτίδιο για ευκολότερη ανάλυση των ηλεκτροφορητικών προτύπων]. Στην παραλλαγή FAFLP, το ένα από τα εκλεκτικά PCR primers είναι σημασμένο με φθοριόχρωμα για ανίχνευση σε αυτόματο DNA sequencer.

Η ARDRA και η ανάλυση AFLP είναι ευρέως αποδεκτές και αποτελούν μεθόδους αναφοράς για την ταυτοποίηση των ειδών *Acinetobacter*, με ύπαρξη και μεγάλης

βιβλιοθήκης από προφίλ στελεχών αναφοράς αλλά και κλινικών. Η tRNA fingerprint, αν και είναι επίσης κατάλληλη για την ταυτοποίηση των ειδών, δεν διαχωρίζει τα *A. baumannii* από το γενωμικό είδος *Acinetobacter* 13TU. Τόσο η ριβοτυπία και η ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου που κωδικοποιεί για την 16S-23S rRNA περιοχή, μπορούν να διαχωρίσουν τα μέλη του συμπλέγματος *A. calcoaceticus*- *A. baumannii* αλλά δεν έχουν εφαρμογή σε άλλα είδη *Acinetobacter*, ενώ sequencing of the *groB* gene, αν και είναι πολλά υποσχόμενη, πρέπει να γίνει περισσότερο έγκυρη.

Η μέθοδος MLST (Multilocus sequence typing, τυποποίηση με νουκλεοτιδική ανάλυση πολλαπλών γενετικών τόπων) παρουσιάζει υψηλή διακριτική ικανότητα για την επιδημιολογική τυποποίηση μικροοργανισμών. Έχει εφαρμοστεί με επιτυχία στον επιδημιολογικό χαρακτηρισμό πολλών κλινικά σημαντικών βακτηρίων, όπως τα *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. aureus*, *C. jejuni*, *E. faecium*, *V. cholerae*, και *H. influenzae*. Η MLST στηρίζεται στην άμεση σύγκριση των αλληλουχιών DNA, γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες απαραίτητες για την επιβίωση του μικροβίου (housekeeping genes). Αυτά τα “housekeeping genes” έχουν επιλεγεί επειδή, ως ζωτικής σημασίας, υπάρχουν σε σχετικά συντηρημένη μορφή και εκφράζονται σε όλα τα στελέχη ενός συγκεκριμένου είδους και οι μεταλλάξεις στο εσωτερικό τους θεωρούνται “σιωπηλές”, επειδή σε αντίθετη περίπτωση το μικρόβιο πιθανόν δεν θα ήταν πια βιώσιμο. Για κάθε γονίδιο, οι διαφορετικές αλληλουχίες καταχωρούνται ως διακριτά αλλήλια και κάθε μικροβιακό στέλεχος διακρίνεται από το ειδικό αλλήλιο που έχει σε καθένα από τα “housekeeping genes” [προφίλ αλληλίων ή τύπος αλληλουχιών (sequence type, ST)]. Η MLST παρέχει τη δυνατότητα να μεταφερθούν τα δεδομένα της τυποποίησης από εργαστήριο σε εργαστήριο ή να συγκριθούν τα αποτελέσματα διαμέσου του διαδικτύου (<http://mlst.zoo.ox.ac.uk>). Έτσι, αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για τη διενέργεια μελετών σε μεγάλη γεωγραφική ή παγκόσμια κλίμακα, όπως και για μελέτες της

πληθυσμιακής βιολογίας των μικροβιακών ειδών. Τα στάδια που περιλαμβάνει η MLST είναι τα ακόλουθα:

- 1) εκτελείται PCR για συγκεκριμένα τμήματα των housekeeping γονιδίων
- 2) προσδιορίζεται η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων (sequencing) των προϊόντων της PCR – κάθε εξεταζόμενο στέλεχος αποκτά έναν κωδικό αριθμό ST που υποδηλώνει τον τύπο του αλληλόμορφου που διαθέτει για κάθε γονίδιο
- 3) εκτελείται πολλαπλή αντιστοίχιση (Multiple alignment) των αλληλουχιών σε τράπεζες δεδομένων, οπότε διακρίνονται φυλογενετικά τα μικροβιακά στελέχη

Όσον αφορά τα *A.baumannii*, τα τελευταία χρόνια προτάθηκαν και χρησιμοποιούνται δύο βασικά σχήματα MLST, με βάση τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες επτά ή τριών αντίστοιχα housekeeping γονιδιακών θέσεων:

I. Σχήμα με πολλαπλασιασμό 7 γονιδίων (έχουν περιγραφεί 2 τέτοια σχήματα, στις μελέτες i) *Bartual SG et al.* (63) και ii) *Diancourt L et al.* (64).

Στο πρώτο, μελετώνται γονιδιακές θέσεις που κωδικοποιούν συντηρημένες περιοχές από επτά «Housekeeping-genes»:

- 1) *recA* -ρεκομπινάση A
- 2) *gyrB* -γυράση B,
- 3) *groD* - RNA πολυμεράσης σίγμα - παράγοντας *groD*
- 4) *gltA*- κιτρική συνθάση
- 5) *gdhB*- δευδρογονάση της γλυκόζης
- 6) *cpn60*- 60-kDa chaperonin
- 7) *gpi*- γλυκόζη- 6, φωσφατο-ισομεράση

Στο δεύτερο, μελετώνται οι γονιδιακές θέσεις:

- 1) *fusA*
- 2) *rplB*

- 3) *groB* - RNA πολυμεράσης σίγμα - παράγοντας *groB*
- 4) *gltA*- κιτρική συνθάση
- 5) *recA*
- 6) *cpn60*- 60-kDa chaperonin
- 7) *pyrG*

Η μελέτη στην οποία εφαρμόστηκε το πρώτο σχήμα περιέλαβε τον ενδεδειγμένο έλεγχο με MLST (αλλά και PFGE, F-AFLP), 49 στελεχών (40 στελέχη *A. baumannii*, 2 πρότυπα στελέχη *A. baumannii* και 7 στελέχη του συμπλόκου *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*) από διάφορες Ευρωπαϊκές χώρες και έδωσε τα παρακάτω αποτελέσματα:

Ο αριθμός διαφορετικών αλληλίων ανά γενετικό τόπο ποικίλει από 10 ως 12 και η MLST-τυποποίηση προσδιόρισε 20 ST ομάδες, με κάθε ST τύπο να αποτελείται από 7 αριθμούς, καθένας από τους οποίους προσδιορίζει το αλληλίο για το συγκεκριμένο γονίδιο. Τα κλινικά στελέχη βρέθηκαν να ανήκουν στους ευρωπαϊκούς κλώνους EU I και EU II, με τα αποτελέσματα της MLST να είναι σε συμφωνία με την τυποποίηση με PFGE και AFLP. Φάνηκε λοιπόν ότι το σήμα της MLST προσφέρει υψηλή διακριτική ικανότητα και αποτελεί εξαιρετικό εργαλείο μελέτης της πληθυσμιακής δομής και της μακροχρόνιας επιδημιολογίας των *A. baumannii*. Ας σημειωθεί πάντως ότι όπως φαίνεται μέχρι τώρα στην Ελλάδα αλλά και σε άλλες χώρες, δεν παράγεται σε όλα τα στελέχη προϊόν για κάποιο από τα αλληλία, κάτι που σημαίνει ότι οι θέσεις στις οποίες υβριδίζουν οι εκκινητές του σχήματος αυτού δεν είναι συντηρημένες σε όλα τα *A. baumannii* παγκοσμίως.

Η μελέτη στην οποία εφαρμόστηκε το δεύτερο σχήμα (64), περιέγραψε 154 στελέχη *A. baumannii* από όλους τους τύπους που έχουν χαρακτηριστεί διεθνώς, τα οποία συνέκρινε με τα είδη του συμπλέγματος *A. calcoaceticus*- *A. baumannii* και φυσικά με τα *A. pitii* και *A. nosocomialis*. Με βάση την αλληλουχία των 2.976 νουκλεοτιδίων από τα

οποία αποτελούνται τα επτά γονίδια που προαναφέρθηκαν, παρατηρήθηκαν 589 (19,8%) πολυμορφικές περιοχές, χωρίς να παρατηρηθούν σημεία εισδοχής ή διαγραφής. Το ποσοστό των διαφορετικών αλληλίων ανά γενετικό τόπο, που παρατηρήθηκε ανάμεσα στα 154 στελέχη *A. baumannii*, κυμάνθηκε από 2% (*pyrG*) έως 4.8% (*recA*). Η MLST-τυποποίηση προσδιόρισε 59 ST ομάδες, 47 από τις οποίες αντιστοιχούσαν σε ένα στέλεχος, ενώ οι υπόλοιπες τρεις ομάδες ST αντιστοιχούσαν σε 15 ή και παραπάνω στελέχη (ST1, n =24, ST2, n= 33 and ST3, n= 15). Τα κλινικά στελέχη των τριών αυτών ομάδων ST, που αποτελούσαν το 47% του συνόλου των στελεχών, βρέθηκε να ανήκουν στους ευρωπαϊκούς κλώνους EU I και EU II και EU III, με τα αποτελέσματα της MLST να είναι σε συμφωνία με την τυποποίηση με PFGE και AFLP.

## II. Σχήμα MLST με πολλαπλασιασμό 3 γονιδίων (65)

Στη μελέτη αυτή διερευνήθηκε η πιθανή κλωνική συγγένεια 31 αντιπροσωπευτικών επιδημικών στελεχών από πέντε Ευρωπαϊκές χώρες και μελετήθηκε η αλληλουχία τριών μόνο γονιδίων, τα οποία δεν είναι Housekeeping και βρίσκονται υπό πίεση επιλογής, οπότε μπορεί να εμφανίζουν μεταλλάξεις. Αυτά είναι:

- 1) το γονίδιο της *omp A* πορίνης (εξωτερική μεμβρανική πρωτεΐνη που λαμβάνει μέρος στην απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων)
- 2) το γονίδιο της *csuE* πρωτεΐνης (κωδικοποιεί γονίδιο που βοηθά στην παραγωγή πρωτεϊνικού σωληνίσκου και συμμετέχει στη δημιουργία biofilm)
- 3) το γονίδιο *bla<sub>OXA-51-like</sub>* (εμπλέκεται στην παραγωγή της χρωμοσωμικής καρβαπανεμάσης του είδους).

Τα πλεονεκτήματα του δεύτερου σχήματος MLST είναι αρκετά. Αρχικά, υπάρχει μεγαλύτερος αριθμός πολυμορφισμών των υπό μελέτη γονιδιακών τόπων, το οποίο προσφέρει μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα. Μιας και τα γονίδια αυτά κωδικογραφούν πρωτεΐνες που προσδίδουν λοιμογόνες ιδιότητες, παρέχονται πληροφορίες σχετικά με την

παθογένεια του μικροβίου ενώ είναι πιο απλό στην εκτέλεση και πιο οικονομικό. Τέλος, όπως φαίνεται μέχρι τώρα, τουλάχιστον στον Ελληνικό χώρο, παράγεται προϊόν από όλα τα στελέχη *A.baumannii*. Όλες οι παραπάνω τεχνικές έχουν συνεισφέρει στην καλύτερη κατανόηση της επιδημιολογίας και της κλινικής σημασίας των ειδών *Acinetobacter* τα τελευταία χρόνια, αλλά η χρήση τους, ακόμα, περιορίζεται στα ερευνητικά κέντρα και όχι στην εργασία ρουτίνας των διαγνωστικών εργαστηρίων.

Η ανάγκη για διαχωρισμό των ειδών *Acinetobacter* σε επίπεδο ρουτίνας σε ένα διαγνωστικό εργαστήριο έχει αμφισβητηθεί από αρκετούς ερευνητές (33). Ωστόσο, φαίνεται πως είναι απαραίτητη η διάκριση μεταξύ της ομάδας *A. baumannii* και των υπόλοιπων ειδών *Acinetobacter*, μιας και οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί προκαλούν συνήθως σοβαρές λοιμώξεις και είναι ευαίσθητοι σε περιορισμένο αριθμό αντιβιοτικών.

### **Μηχανισμοί ανάπτυξης αντοχής στα αντιβιοτικά**

Το μεγάλο εύρος μηχανισμών αντοχής στα αντιβιοτικά που έχει περιγραφεί για τα *A. baumannii* είναι εντυπωσιακό και διαφέρει απ' ό,τι έχει περιγραφεί για άλλα αζυμοτικά gram- αρνητικά παθογόνα (66,67). Η ταχεία εξάπλωση παγκοσμίως στελεχών *A. baumannii* ανθεκτικών σε όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, συμπεριλαμβανομένων και των καρβαπενεμών, αντικατοπτρίζει την ικανότητα αυτού του μικροοργανισμού να αντιδρά ταχύτατα στις περιβαλλοντολογικές αλλαγές. Η ανάπτυξη εσωτερικών μηχανισμών αλλά και η απόκτηση ξένων παραγόντων αποτελούν τις βασικές ικανότητες των *A. baumannii*.

#### *B-λακτάμες*

Η αντοχή του *A. baumannii* στα β-λακταμικά αντιβιοτικά, και κυρίως στις καρβαπενέμες, γίνεται όλο και συχνότερο φαινόμενο σε παγκόσμιο επίπεδο τα τελευταία χρόνια, ενώ οι υποκείμενοι μοριακοί μηχανισμοί δεν έχουν ακόμα γίνει πλήρως κατανοητοί, παρά τη συστηματική μελέτη τους. Οι περισσότερες μελέτες αναφέρονται

στην παραγωγή β-λακταμασών, ενδογενών (AmpC και OXA-51) και εξωγενών (IMP, VIM, OXA-58). Η ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις λακταμάσες αυτές γίνεται πολλές φορές από στοιχεία εισδοχής (IS στοιχεία), τα οποία ενσωματώνονται κατά το ανάρρουν του γονιδίου και παρέχουν αλληλουχίες ισχυρού υποκινητή. Μη ενζυμικοί μηχανισμοί, φαίνεται επίσης πως δρουν συνεργικά με τις β-λακταμάσες, προσδίδοντας υψηλά επίπεδα αντοχής. Η ελαττωμένη διαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος, λόγω μειωμένης έκφρασης πορινών (π.χ. CarO πορίνη), η ύπαρξη αντλιών ενεργού εκροής και η μειωμένη έκφραση πενικιλλο-δεσμευτικών πρωτεϊνών στο τοίχωμα πεπτιδογλυκάνης, αποτελούν τους πιο σημαντικούς μη-ενζυματικούς μηχανισμούς μελέτης, για την κατανόηση της εμφάνισης αντοχής του *A. baumannii* στις β-λακτάμες.

Ενζυματικοί μηχανισμοί. Ο επικρατέστερος μηχανισμός αντοχής στα β-λακταμικά αντιβιοτικά είναι η ενζυματική αποδόμησή τους από τις β-λακταμάσες. Ωστόσο, σύμφωνα και με την πολύπλοκη φύση αυτού του μικροοργανισμού, πολλαπλοί μηχανισμοί εμπλέκονται στην παραγωγή του ίδιου φαινότυπου (68,69,70).

Οι πρώτες προσπάθειες ταξινόμησης των β-λακταμασών, βάση της λειτουργίας τους, άρχισαν όταν οι κεφαλοσπορινάσες διαχωρίστηκαν από τις πενικιλινάσες τη δεκαετία του 1970. Έκτοτε προτάθηκαν διάφορα ταξινομικά σχήματα. Τα επικρατέστερα σήμερα είναι η ταξινόμηση κατά Ambler και κατά η ταξινόμηση κατά Bush.

Η ταξινόμηση κατά Ambler διαχωρίζει τις β-λακταμάσες βάση της αμινοξικής τους αλληλουχίας. Αρχικά προτάθηκαν οι μοριακές τάξεις A και B (71), οι οποίες περιελάμβαναν ένζυμα με κατάλοιπο σερίνης στο ενεργό κέντρο και ένζυμα που χρειάζονται δισθενή κατιόντα μετάλλων (συνήθως Zn<sup>2+</sup>) για να δράσουν, αντίστοιχα. Αργότερα, άλλες σερινο-β-λακταμάσες, που δεν είχαν αμινοξική ομοιότητα με την τάξη A, καταχωρήθηκαν στις μοριακές τάξεις C (72) και D (73). Πρόσφατα, προτάθηκε μία



αναθεώρηση του σχήματος κατά Ambler (74) , για να εξυπηρετήσει την πιο ορθή κατηγοριοποίηση των νέων μελών. Σύμφωνα με αυτή, οι β-λακταμάσες χωρίζονται σε σερινο- και μεταλλο- β λακταμάσες (ομάδες S και M αντίστοιχα).

Στη λειτουργική ταξινόμηση κατά Bush προτείνονται τέσσερις κύριες ομάδες. Η ομάδα 1 περιλαμβάνει κεφαλοσπορινάσες που δεν αναστέλλονται επαρκώς από το κλαβουλανικό οξύ και τη σουλμπακτάμη, στην πλειοψηφεία τους είναι χρωμοσωμικές, συχνά η δράση τους είναι επαγωγίμη και ανήκουν στη μοριακή τάξη C κατά Ambler. Η ομάδα 2 υποδιαιρείται σε οκτώ ομάδες, λόγω της ποικιλομορφίας που παρουσιάζουν τα μέλη της ως προς τα υποστρώματα που υδρολύουν. Γενικά, τα ένζυμα αυτά αναστέλλονται περισσότερο από το κλαβουλανικό οξύ παρά από την αζτρεονάμη (75,76) και ανήκουν στη μοριακή τάξη A κατά Ambler. Η ομάδα 3 περιλαμβάνει β-λακταμάσες που χρειάζονται δισθενή κατιόντα μετάλλων για να δράσουν και για το λόγο αυτό αναστέλλονται από το EDTA (EthyleneDiamineTetraacetic Acid) και το pCMB (p-ChloroMercuriBenzoate) ενώ δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ (76) και ανήκουν στη μοριακή τάξη B κατά Ambler. Τέλος, η ομάδα 4 περιλαμβάνει ασυνήθιστες πενικιλινάσες, που δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ και δεν έχει οριστεί ακόμα σαφώς η αντιστοιχία τους στο σχήμα Ambler (76).

Οι ευρέως φάσματος β-λακταμάσες (ESBLs) της ομάδας A κατά Ambler, έχουν επίσης περιγραφεί για τα *A. baumannii* , αλλά οι δυσκολίες στην εργαστηριακή εντόπισή τους, κυρίως όταν υπάρχει AmpC, δυσχεραίνουν την εκτίμηση του ρόλου τους. Πιο πρόσφατα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον υπάρχει για τη VEB-1 β-λακταμάση, η οποία υδρολύει σημαντικά την αμοξυκολλίνη, τρικακιλίνη, πιπερακιλίνη, κεφοταξίμη, κεφατζιδίμη και αζτρεονάμη (77). Η δράση της αυτή αναστρέφεται παρουσία κλαβουλανικού οξέως και για το λόγο αυτό η VEB-1 λακταμάση ανιχνεύεται φαινοτυπικά από την παρατηρούμενη συνέργεια αυτών των αντιβιοτικών με το κλαβουλανικό οξύ. Κλωνική διασπορά

ανθεκτικών *A. baumannii* στελεχών, που έφεραν το blaVEB-1, σε νοσοκομεία της Γαλλίας και πρόσφατα στο Βέλγιο και στην Αργεντινή (VEB-1a) έχει αναφερθεί (78,79,80,81,82). Εξ'ίσου σημαντική είναι και η PER-1 β-λακταμάση, η οποία υδρολύει αποτελεσματικά τις αμοξυκιλίνη, τρικακιλίνη, κεφαλοθίνη και τις ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες, ενώ η δράση της αναστέλλεται από το κλαβουλανικό οξύ, τη σουλβακτάμη, την ιμιπενέμη και τις κεφαμυκίνες. Η φορεία του blaPER-1 έχει συσχετιστεί με ιδιαίτερα λοιμογόνους κλώνους *A. baumannii* (83). Η PER-1 έχει ανιχνευθεί στη Γαλλία, Τουρκία, Βέλγιο, Ρουμανία, Κορέα και Ηνωμένες Πολιτείες (84,79,85, 86, 87, 88) και η PER-2 στην Αργεντινή (81). Έχει ενδιαφέρον το γεγονός πως το γονίδιο blaVEB-1 βρέθηκε σε χρωμοσωμικό ιντεγκρόνιο τάξης 1 (was found to be integron borne (class 1) yet encoded on the chromosome) (82). Αυτό το ιντεγκρόνιο ήταν όμοιο με ιντεγκρόνιο που απομονώθηκε από στέλεχος *Pseudomonas aeruginosa* στην Ταϊλάνδη (89) και είχε αλληλουχία ανόδου IS (IS26) , η οποία έδειχνε την προέλευσή του και την πιθανή διάδοσή του στα *A. baumannii*. Το γονίδιο blaPER-1 είναι είτε πλασμιδιακό είτε χρωμοσωμικό και επίσης φέρει αλληλουχία IS (ISPa12), η οποία μπορεί να ενισχύσει την έκφρασή του (90).

Στις λακταμάσες τύπου B κατά Ambler ανήκουν οι μεταλλο-β-λακταμάσες (MBL), οι οποίες απαιτούν κατιόντα μετάλλων ως συμπαραγόντες και ενώ δεν απαντώνται τόσο συχνά στα *A. baumannii* όσο οι καρβαπενέμες τύπου OXA, η υδρολυτική τους ικανότητα ενάντια στις καρβαπενέμες είναι 100 με 1.000 φορές πιο ισχυρή (67). Αυτά τα ένζυμα έχουν την ικανότητα να υδρολύουν όλες τις β-λακτάμες, εκτός από την αζτρεονάμη. Με βάση την ιδιότητά τους να αναστέλλονται από χηλικούς παράγοντες, όπως το EDTA, έχουν αναπτυχθεί φαινοτυπικές δοκιμασίες ανίχνευσής τους, με πιο διαδεδομένη την Etest MBL (AB BIODISK, Solna, Sweden ). Η δοκιμασία αυτή αποτελείται από μία ταινία με βαθμίδωση συγκέντρωσης ιμιπενέμης, από τη μία πλευρά

και ιμιπενέμης με EDTA, από την άλλη. Διαφορά στην MIC από την πλευρά της ιμιπενέμης με το EDTA  $\geq 8$  φορές εκείνης από την πλευρά της ιμιπενέμης, θεωρείται ενδεικτική ύπαρξης μεταλλο-β-λακταμάσης. Η συγκεκριμένη δοκιμασία φαίνεται να έχει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα όταν το βακτήριο καλλιεργείται σε Mueller Hinton agar (91). Από τις πέντε ομάδες MBL που έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα, μόνο οι τρεις έχουν αναφερθεί για τα *A. baumannii* και περιλαμβάνουν τις IMP (92,93,94,95, 96), VIM (97,98,51,99) και SIM (100). Σε πολλές γεωγραφικές περιοχές, όπως η Ισπανία, Ελλάδα και Αυστραλία, έχει αναφερθεί η συνύπαρξη OXA και MBL ενζύμων στο ίδιο στέλεχος (101,102,103,97). Αντίθετα με τα OXA ενζύμα, οι MBL εντοπίζονται συνύθως σε ιντεγκρόνια, τα οποία αποτελούν ειδικές γενετικές δομές που εξυπηρετούν την απόκτηση και έκφραση (μέσω ενός απλού εκκινητή) στοιχείων αντοχής. Τα περισσότερα γονίδια MBL, των *A.baumannii*, εντοπίζονται σε ιντεγκρόνια τάξης 1 και συχνά περιέχουν μία συστοιχία γονιδιακών κασετών (96, 100). Τα στελέχη *A. baumannii*, τα οποία φέρουν ιντεγκρόνια παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντοχή στα φάρμακα, απ' ό,τι τα στελέχη που δε φέρουν τις δομές αυτές (104). Η κλινική σημασία των ιντεγκρονίων είναι πως η υπερδοσολογία ενός αντιμικροβιακού φαρμάκου μπορεί να οδηγήσει σε υπερέκφραση πολλαπλών στοιχείων αντοχής, από έναν κοινό εκκινητή. Τέλος, τα ιντεγκρόνια δεν είναι κινητά και γι αυτό μεταφέρονται με πλασμίδια ή τρανσποζόνια (105). Πρόσφατες μελέτες και σε άλλα γένη μικροβίων (106) υποδεικνύουν πως οι μεταλλο-β-λακταμάσες δεν επαρκούν για να προσδώσουν υψηλά επίπεδα αντοχής στις καρβαπενέμες, κάτι που πιθανόν να επιτυγχάνεται με τη συνύπαρξη κι άλλων μηχανισμών αντοχής, όπως της διαπερατότητας του κυτταρικού τοιχώματος.

Σε όλα τα στελέχη *A. baumannii* υπάρχουν χρωμοσωμικά κωδικοποιημένες κεφαλοσπορινάσες AmpC ( 107,84,108,109,110), γνωστές και ως κεφαλοσπορινάσες προερχόμενες από *A. baumannii* (108), οι οποίες ανήκουν στην τάξη C κατά Ambler.

Αντίθετα με ό,τι συμβαίνει με τις κεφαλοσπορινάσες που ανευρίσκονται σε άλλους gram-αρνητικούς μικροοργανισμούς, η επαγόμενη έκφρασή τους δε συμβαίνει στα *A. baumannii* (109, 112). Ο καθοριστικός παράγοντας για την έκφραση των ενζύμων αυτών στα *A. baumannii* είναι ένα στοιχείο εισδοχής IS, που βρίσκεται στην αρχή της αλληλουχίας του γονιδίου, γνωστό ως *ISAba1* (110, 111, 112, 113). Η παρουσία αυτού του στοιχείου σχετίζεται στενά με αυξημένη έκφραση του γονιδίου *AmpC* και με αντοχή στις ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες (110, 112). Η κεφεπίμη και οι καρβαπενέμες δεν επηρεάζονται από τα ένζυμα αυτά (108).

Στην τάξη D κατά Ambler ανήκουν οι οξακλιινάσες, οι οποίες προσδίδουν έστω και μερική αντοχή στις καρβαπενέμες. Το πρώτο ένζυμο τύπου OXA με ικανότητα υδρόλυσης των καρβαπενεμών απομονώθηκε το 1985 στο Εδιμβούργο από κλινικό στέλεχος *A. baumannii* (114). Το πλασμίδιο που το κωδικοποιούσε ήταν μεταβιβάσιμο και το γονίδιο αργότερα ονομάστηκε *bla<sub>OXA-23</sub>* (116). Αυτό το ένζυμο ευθύνεται για αντοχή στις καρβαπενέμες παγκοσμίως (84, 102, 117, 118). Τα OXA-27 και OXA-49 είναι ακόμα δύο ένζυμα της ομάδας *bla<sub>OXA-23</sub>* στα *A. baumannii* (119, 120). Έχουν περιγραφεί ακόμα δύο γονίδια που ευθύνονται για αντοχή στις καρβαπενέμες, τα *bla<sub>OXA-24-like</sub>* (που κωδικοποιεί για τις OXA- 24, -25, -26 και -40) και το *bla<sub>OXA-58-like</sub>* (121, 122, 123). Το τελευταίο αναγνωρίστηκε τα τελευταία χρόνια και είναι πλασμιδιακό (123), κάτι που εξηγεί εν μέρει την ευρεία διάδοσή του (124, 125). Η ομάδα γονιδίων *bla<sub>OXA-51-like</sub>* (που κωδικοποιούν για τις OXA- 51, -64, -65, -66, -68, -69, -70, -71, -78, -79, -80 και -82) είναι μοναδικό στο ότι έχει χρωμοσωμική εντόπιση στα *A. baumannii* (66, 98, 231, 250, 619) ενώ τα προϊόντα του έχουν μεγαλύτερη συγγένεια για την μιπενέμη απ' ό,τι για τη μεροπενέμη (126, 127). Ο ρόλος τους στην αντοχή στις καρβαπενεμάσες φαίνεται να σχετίζεται με την παρουσία της αλληλουχίας *ISAba1* (128), μιας και όταν απουσιάζει, η

επίδραση στην ευαισθησία του μικροβίου στις καρβαπενεμάσες είναι ελάχιστη, ακόμα και όταν συνυπάρχει υπερέκφραση των αντλιών εκροής (AdeABC) (129).

Από τις β-λακταμάσες των *A. baumannii*, οι πιο ανησυχητικές είναι οι καρβαπενεμάσες, οι οποίες περιλαμβάνουν τις σερίνο-οξακιλλινάσες (τάξη D κατά Ambler) και τις μεταλλο-β-λακταμάσες (MBLs- τάξη B κατά Ambler) (67, 105,130). Μέχρι στιγμής, δεν έχει περιγραφεί η ύπαρξη καρβαπενεμασών τάξης A κατά Ambler (KPC, GES, SME, NMC, IMI) στα *A. baumannii* (130).

Η σημασία των στοιχείων IS στην έκφραση αντοχής στις καρβαπενέμες από τις οξακιλλινάσες των *A. baumannii* εκτιμήθηκε μόλις τα τελευταία χρόνια (128,130,131). Αυτά τα στοιχεία έχουν δύο βασικές λειτουργίες. Πρώτον, είναι κινητά και δεύτερον, περιέχουν εκκινητές, οι οποίοι οδηγούν σε υπερέκφραση των στοιχείων καθόδου. Περισσότερο συχνά σχετίζονται με τα γονίδια *bla<sub>OXA-23</sub>* (84,131), *bla<sub>OXA-58</sub>* (123,132,133) και *bla<sub>OXA-51</sub>* (128). Έχει ενδιαφέρον το γεγονός πως ορισμένα στοιχεία IS, κυρίως το *ISAbal*, φαίνεται πως υπάρχουν μόνο στα *A. baumannii* (134).

Μη-ενζυματικοί μηχανισμοί. Η αντοχή στις β-λακτάμες, συμπεριλαμβανομένων των καρβαπενεμών, έχει αποδοθεί επίσης σε μη-ενζυματικούς μηχανισμούς, όπως σε αλλαγές στις πρωτεΐνες εξωτερικής μεμβράνης (OMP) (68,69,135, 136,137), σε ύπαρξη των αντλιών εκροής (138,139,140) και σε αλλαγές στη συγγένεια ή στην έκφραση των πενικίλλο-δεσμευτικών πρωτεϊνών (69, 141, 142, 143). Όπως συμβαίνει και με τους υπόλοιπους gram-αρνητικούς μικροοργανισμούς, πολύ λίγα είναι γνωστά για τις πορίνες της εξωτερικής μεμβράνης στα *A. baumannii*. Πρόσφατα, η απώλεια μιας πρωτεΐνης 29-kDa, γνωστής ως CarO, σχετίστηκε με αντοχή στη μεροπενέμη και την ιμιπενέμη (144,145). Μία ακόμα πρωτεΐνη, γνωστή ως Omp25, σχετίζεται με την CarO, αλλά δε συμμετέχει στο σχηματισμό πορινών (146). Η απώλεια της πορίνης CarO, σε στελέχη *A. baumannii* ανθεκτικά στη ιμιπενέμη, σχετίζεται με παρεμπόδιση της έκφρασης του

γονιδίου *carO* από διακριτά στοιχεία εισδοχής (147). Άλλες πρωτεΐνες εξωτερικής μεμβράνης, που σχετίζονται με αντοχή στις β-λακτάμες, περιλαμβάνουν την πρωτεΐνη HMP-AB (137), η οποία είναι ομόλογη με την OmpA των Enterobacteriaceae και την OmpF της *P. aeruginosa* (148), μία πρωτεΐνη 33-36kDa (136,149), μία πρωτεΐνη 43-kDa, ομόλογη με την OmpD της *P. aeruginosa* (150) και την OmpW, η οποία είναι ομόλογη με τις OmpW πρωτεΐνες που βρίσκονται στα *E. coli* και *P. aeruginosa* (143,148). Έχει ενδιαφέρον το γεγονός πως σε συγκριτικές μελέτες πολυανθεκτικών στελεχών *A. baumannii* και στελεχών αναφοράς, δεν υπήρξε διαφορά στην έκφραση για τις Omp33/36 ή την OmpD, αλλά η έκφραση της CarO και της OmpW ήταν διαφορετική (143).

Το γονιδίωμα, των πολυανθεκτικών *A. baumannii* στελεχών, κωδικοποιεί για ένα μεγάλο εύρος αντλιών εκροής (151). Η AdeABC αντλία, που ανήκει στην οικογένεια RND αντλιών, είναι η καλύτερα μελετημένη μέχρι τώρα και ευθύνεται για έκφραση αντοχής στις β-λακτάμες (138,139), αμινογλυκοσίδες, ερυθρομυκίνη, χλωραμφαινικόλη, τετρακυκλίνες, φλουοροκινολόνες, τριμεθοπρίμη και βρωμιούχο αιθίδιο (140, 152). Η δομή της AdeABC αντλίας αποτελείται από τρία στοιχεία: την AdeA, που σχηματίζει την εσωτερική πρωτεΐνη, την AdeB που είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη και την AdeC που είναι η πρωτεΐνη επιφανείας. Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την αντλία AdeABC είναι χρωμοσωμικό και η έκφρασή του ρυθμίζεται από ένα σύστημα δύοθ στοιχείων, με μία κινάση (AdeS) και το ρυθμιστή της (AdeR) (152). Σημειακές μεταλλάξεις στο ρυθμιστικό σύστημα σχετίζονται με υπερέκφραση της αντλίας (152). Απενεργοποίηση της έκφρασης της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης της αντλίας, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *adeB*, οδηγεί σε απώλεια της λειτουργικότητας της αντλίας και σε πολυανθεκτικό φαινότυπο του μικροβίου (140). Για άλλα γενωμικά είδη *Acinetobacter* έχουν περιγραφεί άλλες αντλίες RND τύπου (153,154).

Οι πενικιλιοδεσμευτικές πρωτεΐνες (Penicillin Binding Proteins- PBPs) αποτελούν πρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος των Gram αρνητικών βακτηρίων, οι οποίες συμμετέχουν στον πολυμερισμό και τη διασύνδεση των πενταπεπτιδίων, που σχηματίζουν το στρώμα πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος. Διακρίνονται σε αυτές που έχουν δράση γλυκοζυλτρανσφεράσης (GT) για τον πολυμερισμό του λιπιδίου II και ταυτόχρονη δράση τρανσπεπτιδάσης (TP) για τη σύνθεση των πενταπεπτιδίων (τάξης A PBPs) και σε εκείνες που καταλύουν μόνο την τρανσπεπτιδίωση (τάξης B PBPs). Αναστολή οποιασδήποτε από τις δύο δραστηριότητες αυτών των ενζύμων προκαλεί εξασθένιση της πεπτιδογλυκάνης και κυτταρικό θάνατο. Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά παρουσιάζουν συγγένεια για το ενεργό κέντρο σερίνης των PBPs, στο οποίο προσδένονται ομοιοπολικά. Το ακυλοένζυμο που παράγεται υδρολύεται με πολύ χαμηλό ρυθμό, παρεμποδίζοντας τη δράση των PBPs επί της πεπτιδογλυκάνης (155). Παρ' όλο που υπάρχουν ενδείξεις για ενδεχόμενη συμμετοχή των PBPs στην εμφάνιση αντοχής των *Acinetobacter* στην ιμιπενέμη, οι σχετικές αναφορές παραμένουν ελάχιστες και αμφιλεγόμενες. Σε μια πρόσφατη μελέτη, έγινε ανάλυση του γονιδιώματος, που κωδικοποιεί για τις PBPs, σε 26 στελέχη *A. baumannii* (ευαίσθητα ή ανθεκτικά στις καρβαπενέμες) και σύγκρισή του με το αντίστοιχο γονιδίωμα του πρότυπου στελέχους *A. baumannii* 17978. Στα αποτελέσματα αναφέρεται πως η αντιστοιχία του γονιδιώματος των *A. baumannii* με την αμινοξική αλληλουχία των PBPs είχε διατηρηθεί σε μεγάλο βαθμό. Μικρές αλλαγές στην αμινοξική αλληλουχία δε σχετίζονταν άμεσα με την ευαισθησία ή την ανθεκτικότητα του αντίστοιχου στελέχους στις β-λακτάμες (156).

#### *Αμινογλυκοσίδες*

Η παρουσία γονιδίων, που κωδικοποιούν για ένζυμα που τροποποιούν τις αμινογλυκοσίδες και εντοπίζονται στα ιντεγκρόνια τάξης 1, έχουν μεγάλη επικράτηση στα πολυανθεκτικά στελέχη *A. baumannii* (157,158,159,160). Έχουν περιγραφεί όλες οι

σημαντικές τάξεις ενζύμων, συμπεριλαμβανομένων των ακετυλοτρανσφερασών, νουκλεοτρανσφερασών και φωσφοτρανσφερασών (161). Τελευταία, έχει περιγραφεί σε ορισμένα στελέχη *A. baumannii*, η δυνατότητα μεθυλίωσης του 16S RNA (*armA*) (162,163,164), η οποία απαγορεύει τη σύνδεση των αμινογλυκοσιδών στο σημείο σύνδεσής τους, προσφέροντας έτσι υψηλό επίπεδο αντοχής σε όλες τις αμινογλυκοσίδες (γενταμυκίνη, τομπραμυκίνη και αμοκασίνη) (165). Έχει ενδιαφέρον το γεγονός πως το γενετικό περιβάλλον του *armA* φαίνεται πως έχει ομοιότητες ανάμεσα στα διάφορα είδη gram-αρνητικών μικροοργανισμών και πιθανόν να έχει μεταφερθεί μεταξύ τους, μιας και συνήθως φέρεται σε πλασμίδια εντός τρανσποζονίων (Tn1548) (162).

Εκτός από την αντλία εκροής AdeABC, η οποία είναι λιγότερο αποτελεσματική στη μεταφορά αμικασίνης και καναμυκίνης, οι αμινογλυκοσίδες αποτελούν υποστρώματα της πιο πρόσφατα περιγραφείσας αντλίας AbeM, η οποία ανήκει στην ομάδα MATE (166).

#### *Κιολόνες*

Τροποποιήσεις στην DNA γυράση ή στην τοποϊσομεράση IV, μέσω μεταλλαγών στα γονίδια *gyrA* και *parC*, που έχουν περιγραφεί για τα *A. baumannii* (167,168,169,170), εμπλέκονται με τα σημεία σύνδεσης. Οι κινολόνες αποτελούν επίσης, υποστρώματα αντλιών εκροής, συμπεριλαμβανομένων της AdeABC (139) και της AdeM (166).

#### *Τετρακυκλίνες και Γλυκυλκυκλίνες*

Η αντοχή στις τετρακυκλίνες και τα παράγωγά τους προκαλείται από αντλίες εκροής και από προστασία από τα ριβοσώματα (171). Οι αντλίες εκροής των τετρακυκλινών περιλαμβάνουν αυτές που κωδικοποιούνται από την ομάδα γονιδίων *tet(A)* έως *tet(E)*, που εντοπίζονται πιο συχνά στους gram-αρνητικούς μικροοργανισμούς. Οι *tet(A)* και *tet(B)* έχουν περιγραφεί για τα *A. baumannii* (172,173,174). Η *tet(A)* προσφέρει αντοχή στην τετρακυκλίνη, αλλά όχι στη μινוקυκλίνη, η οποία είναι πιο



ισχυρή ενάντια στα *A. baumannii*. Η ριβοσωμική προστασία κωδικοποιείται από την ομάδα γονιδίων *tet(M)* και *tet(O)*, από τους οποίους όμως έχει περιγραφεί στα *A. baumannii*, σπάνια, μόνο το γονίδιο *tet(M)* (174).

Εκτός από τις αντλίες εκροής των τετρακυκλινών, τα αντιμικροβιακά αυτά και ειδικά η τιγκεκυκλίνη (175), είναι ευαίσθητα και στις αντλίες άλλων οικογενειών, όπως η AdeABC αντλία (140). Έχει βρεθεί αυξημένη έκφραση του γονιδίου *adeB*, με τη μέθοδο της real-time PCR, σε στελέχη με αυξημένη MIC στην τιγκεκυκλίνη. Είναι επίσης σημαντικό το γεγονός πως η έκφραση αυτής της αντλίας μπορεί να αυξηθεί όταν ασκηθεί εκλεκτική πίεση αντιβιοτικού.

#### *Πολυμυξίνες*

Αν και υπάρχουν αναφορές για όλο και αυξανόμενη αντοχή και εμφάνιση ετερογενούς αντοχής των *A. baumannii* στις πολυμυξίνες, δεν έχει βρεθεί ακόμα ο μηχανισμός. Έχουν περιγραφεί μελέτες ανάλυσης του γονιδιώματος στελεχών

#### **Επιδημιολογία του *A. baumannii* παγκοσμίως**

Πολυανθεκτικό ορίζεται το στέλεχος το οποίο παρουσιάζει αντοχή σε περισσότερες από δύο, από τις παρακάτω κατηγορίες αντιβιοτικών: αντιψευδομοναδικές κεφαλοσπορίνες (κεφταζιδίμη, κεφιπίμη), αντιψευδομοναδικές καρβαπενέμες (ιμιπενέμη, μεροπενέμη), αμικιλίνη-σουλβακτάμη, φλουοροκινιλόνες (σιπροφλοξασίνη ή λεβοφλοξασίνη) και αμινογλυκοσίδες (γενταμυκίνη, τομπραμυκίνη ή αμικασίνη).

#### *Ευρώπη*

Οι λοιμώξεις από *A. baumannii* αποτελούν σοβαρό κλινικό πρόβλημα σε πολλές περιοχές της Ευρώπης (176). Από τις αρχές τις δεκαετίας του 1980 είχαν ήδη να αναφέρονται νοσοκομειακές επιδημίες, κυρίως σε Αγγλία, Γαλλία, Γερμανία, Ιταλία, Ισπανία και Σκανδιναβικές χώρες (177,178,179). Έχει παρατηρηθεί επίσης, πως η

εξάπλωση των πολυανθεκτικών στελεχών *A. baumannii* δεν περιορίζεται μόνο σε ένα νοσοκομείο, αλλά συμβαίνει σε εθνική κλίμακα. Παραδείγματα αποτελούν η εξάπλωση του Southern κλώνου και των Oxa-23 κλώνων 1 και 2 στην Ανατολική Αγγλία (180,181) και η εξάπλωση στελέχους *A. baumannii* VEB-1, που παράγει ESBL, σε 55 νοσοκομεία στη βόρεια και ανατολική Γαλλία (80). Επιπλέον, έχει καταγραφεί η εξάπλωση διεθνών κλώνων *A. baumannii*, των λεγόμενων «Ευρωπαϊκών κλώνων I, II και III» σε νοσοκομεία στη Βόρεια Ερώπη ( Βέλγιο, Δανία, Γαλλία, Ισπανία, Σκανδιναβία και Ηνωμένο Βασίλειο), στην Ανατολική Ευρώπη (Ιταλία, Ισπανία, Ελλάδα και Τουρκία ) (182,183,184) και στη Δυτική Ευρώπη (99). Τέλος, η αντοχή των *A. baumannii* στις καρβαπενέμες αποτελεί σοβαρό πρόβλημα σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες, ενώ τα μεγαλύτερα, αλλά και συνεχώς αυξανόμενα, ποσοστά αντοχής αναφέρονται στην Τουρκία, Ελλάδα, Ιταλία, Ισπανία και Αγγλία (99,185).

#### *Βόρεια Αμερική*

Λοιμώξεις από πολυανθεκτικά στελέχη *A. baumannii* αναφέρονται ήδη από το 1990 στις Ηνωμένες Πολιτείες (186). Δεδομένα από το Εθνικό Σύστημα Επιτήρησης Λοιμώξεων (National Nosocomial Infection Surveillance system) από την περίοδο 1986-2003 καταγράφουν σημαντική αύξηση των λοιμώξεων από ανθεκτικά στελέχη *A. baumannii* (187). Σημαντική συμβολή στην επιδημιολογία των λοιμώξεων από *A. baumannii* είχε η επιστροφή του στρατιωτικού προσωπικού από το Ιράκ και το Αφγανιστάν (188,189,190,191,192).

#### *Λατινική Αμερική*

Τα επίπεδα αντοχής των *A. baumannii* στη μεροπενέμη, ιμιπενέμη, κεφταζιδίμη, πιπερακιλλίνη-ταζοβακτάμη, σιπροφλοξασίνη και γενταμυκίνη στη Λατινική Αμερική, είναι μεταξύ των υψηλότερων παγκοσμίως (193). Για το γεγονός αυτό ευθύνεται ένα πλήθος καρβαπεμενασών, που έχει απομονωθεί από στελέχη *A. baumannii*,

συμπεριλαμβανομένων των IMP-1 και IMP-6 στη Βραζιλία (95), OXA-23 στη Βραζιλία και Κολομβία (194,195) και OXA-58 στην Αργεντινή (196).

#### *Αφρική*

Τα δεδομένα για την επιδημιολογία της αντοχής των *A. baumannii* στα αντιβιοτικά, στην Αφρική, περιορίζονται προς το παρόν μόνο στη Νότια Αφρική. Το 30% των απομονωμένων από το αίμα *A. baumannii* είναι ανθεκτικά στις καρβαπενέμες, >40% είναι ανθεκτικά στις κεφεπίμη και πιπερακιλλίνη-ταζοβακτάμη και > 30% είναι ανθεκτικά σε σιπροφλοξασίνη και λεβοφλοξασίνη (197).

#### *Ασία και Μέση Ανατολή*

Μεγάλος αριθμός outbreaks από πολυανθεκτικά στελέχη *A. baumannii* έχει καταγραφεί σε νοσοκομεία της Ασίας και της Μέσης Ανατολής, όπως επίσης και ποικιλία καρβαπενεμασών φαίνεται να ενδημεί στις περιοχές αυτές (198,199,200).

#### *Αυστραλία*

Οι αρχικές αναφορές για λοιμώξεις από *A. baumannii* στην Αυστραλία προήλθαν από τη Βόρεια περιοχή και αφορούσαν λοιμώξεις από στελέχη κοινότητας (201,202) ενώ ακολούθησε η πρώτη νοσοκομειακή εξάπλωση *A. baumannii* στην Ανατολική Αυστραλία (203). Έκτοτε, καταγράφεται διασπορά νοσοκομειακών στελεχών *A. baumannii* σε πολλές πόλεις και δυστυχώς, αυτές οι λοιμώξεις προκαλούνται από ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *A. baumannii*, που εκφράζουν την OXA-23 (204). Πιο πρόσφατα, έχει αναφερθεί μειωμένη ευαισθησία στην τιγκεκυκλίνη σε πολυανθεκτικά στελέχη *A. baumannii* (205).

#### *Ελλάδα*

Στην Ελλάδα, τα στελέχη *A. baumannii* που απομονώνονται, εμφανίζουν συχνά πολυανθεκτικό φαινότυπο, αν και μέχρι το 1990 ήταν ευαίσθητα στις καρβαπενέμες (206). Έκτοτε, η αντοχή στις καρβαπενέμες άρχισε να εμφανίζεται σταδιακά και στις αρχές του 2000 έγινε αρκετά συχνό φαινόμενο (207). Την τελευταία δεκαετία, τα στελέχη

*A. baumannii* που είναι ανθεκτικά στις καρβαπενέμες υπερισχύουν στα νοσοκομεία και συχνά προκαλούν επιδημίες (208,209). Σε πρόσφατη δεκαετή μελέτη που έγινε στην Ελλάδα και περιελάμβανε στελέχη *A. baumannii* από οκτώ τριτοβάθμια νοσοκομεία, αναφέρθηκε πως τα πολυανθεκτικά στελέχη *A. baumannii* σχετίζονταν με τους διεθνείς κλώνους CC1 και CC2 και συχνά έφεραν το γονίδιο *bla<sub>OXA-58</sub>*. (210)

### **Λοιμώξεις οφειλόμενες σε *A. baumannii***

Στα περισσότερα ιδρύματα, η πλειοψηφία των στελεχών *A. baumannii* απομονώνεται από το αναπνευστικό σύστημα των νοσηλευόμενων ασθενών. Σε πολλές περιπτώσεις είναι πολύ δύσκολο να γίνει διάκριση μεταξύ του αποικισμού του ανώτερου αεραγωγού από την πνευμονία. Ωστόσο δεν υπάρχει αμφιβολία πως η πνευμονία που σχετίζεται με τη χρήση αναπνευστήρα, οφείλεται πολύ συχνά σε *A. baumannii*. Σε μεγάλες μελέτες από τις Ηνωμένες Πολιτείες, το 5-10% των περιπτώσεων πνευμονίας σε Μονάδες Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ) οφείλεται σε *A. baumannii* (187), ενώ είναι χαρακτηριστικό το γεγονός πως ασθενείς με λοιμώξεις από *A. baumannii* είχαν παρατεταμένη νοσηλεία σε ΜΕΘ (211).

Περιπτώσεις πνευμονίας της κοινότητας οφειλόμενης σε *A. baumannii* έχουν περιγραφεί στις τροπικές περιοχές της Αυστραλίας και της Ασίας (201,202,212). Εμφανίζονται κυρίως την περίοδο των βροχών, σε άτομα με ιστορικό κατάχρησης αλκοόλ, στα οποία ο αποικισμός του φάρυγγα από *A. baumannii* φτάνει το 10%, στις περιοχές αυτές (201).

Σε μια μεγάλη μελέτη που έγινε στις Ηνωμένες Πολιτείες, την περίοδο 1995-2002, το *A. baumannii* ήταν σε σειρά το δέκατο πιο συχνό αίτιο βακτηριαμίας, υπεύθυνο για το 1,3% όλων των περιπτώσεων νοσοκομειακής βακτηριαμίας, οφειλόμενης σε έναν μικροβιακό παράγοντα (213). Το *A. baumannii* αποτελεί συχνότερο αίτιο βακτηριαμίας σε

ασθενείς των ΜΕΘ, απ'ότι των υπόλοιπων κλινικών, ενώ η θνητότητα στις ΜΕΘ ,στις περιπτώσεις αυτές, φτάνει το 34- 43,4%, σε αντίθεση με το 16,3% των υπόλοιπων κλινικών. Επίσης, η βακτηριαμία από *A. baumannii* αποτελεί το τρίτο πιο συχνό αίτιο θνητότητας στις ΜΕΘ, μετά από τη βακτηριαμία από *P.aeruginosa* και από *Candida*. Εστίες για αιματογενή διασπορά αποτελούν η υποκείμενη πνευμονία, οι ουρολοιμώξεις και τα τραύματα (214).

Το *A. baumannii* προκαλεί λοιμώξεις δέρματος και μαλακών ιστών μόνο σποραδικά, σε μη στρατιωτικό πληθυσμό και οι περιπτώσεις αυτές αφορούν κυρίως ασθενείς νοσηλευόμενους σε Μονάδες Εγκαυμάτων (215). Όσον αφορά τις λοιμώξεις τραυμάτων σε στρατιωτικό πληθυσμό, το *A. baumannii* αποτελεί το συχνότερα απομονούμενο παθογόνο, σε ποσοστό που φθάνει το 32,5% , σύμφωνα με μελέτες που έγιναν στους στρατιώτες που επέστρεφαν από το Ιράκ και το Αφγανιστάν (216,217).

Το *A. baumannii* αποτελεί ευκαιριακό παθογόνο του ουροποιητικού συστήματος και είναι υπεύθυνο για το 1,6% των ουρολοιμώξεων σε ΜΕΘ (187). Τυπικά, σχετίζεται με την παρουσία ουροκαθετήρων στους νοσηλευόμενους στις ΜΕΘ, ενώ πολύ σπάνια προκαλεί μη επιπλεγμένες ουρολοιμώξεις σε υγιή άτομα.

Η μετεγχειρητική μηνιγγίτιδα, σε νευροχειρουργικούς ασθενείς, οφειλόμενη σε *A. baumannii* αποτελεί πολύ σοβαρό πρόβλημα (218,219,220,221). Συνήθως οι ασθενείς αυτοί φέρουν εξωτερικούς ενδοκοιλιακούς καθετήρες, οι οποίοι αποτελούν την εστία εισόδου του παθογόνου, ενώ η θνητότητα αγγίζει και το 70% (222).

Τέλος, έχουν αναφερθεί μεμονωμένες περιπτώσεις ενδοκαρδίτιδας οφειλόμενης σε *A. baumannii*, κυρίως σε ασθενείς με προσθετικές βαλβίδες (223,224,225,226). Λίγες είναι και οι περιπτώσεις ενδοφθαλμίτιδας ή κερατίτιδας από *A. baumannii*, κυρίως μετά από χρήση φακών επαφής και οφθαλμολογικές χειρουργικές επεμβάσεις (227,228,229,230).

## Θεραπευτικές επιλογές λοιμώξεων από *A. baumannii*

Το μεγάλο εύρος των ενδογενών αλλά και αποκτηθέντων μηχανισμών αντοχής που έχει βρεθεί στο *A. baumannii* έχει εγείρει το επιστημονικό ενδιαφέρον, ενώ σύμφωνα με την Αμερικανική Εταιρεία Λοιμώξεων (Infectious Diseases Society of America) το *A. baumannii* αποτελεί ένα από τα πιο επικίνδυνα παθογόνα “red alert”, που απειλούν τις δυνατότητες του αντιβιοτικού οπλοστασίου (231). Πριν το 1970, ήταν δυνατή η αντιμετώπιση των λοιμώξεων από *A. baumannii* με διάφορα αντιβιοτικά, συμπεριλαμβανομένων των αμινογλυκοσιδών, β-λακταμών και τετρακυκλινών. Σήμερα, η εμφάνιση αντοχής σχεδόν σε όλα τα γνωστά αντιβιοτικά, δημιουργεί τεράστιο πρόβλημα. Μιας και η χορήγηση εμπειρικής θεραπείας σε σοβαρές λοιμώξεις από *A. baumannii* έχει συνδεθεί με αύξηση της νοσηρότητας και θνητότητας (232,233,234), το αντιβιοτικό σχήμα που θα ακολουθείται πρέπει να αποφασίζεται με βάση τα αποτελέσματα των δοκιμασιών ευαισθησίας.

Η σουλβακτάμη είναι ένας από τους τρεις διαθέσιμους αναστολείς β-λακταμασών, που, σε αντίθεση με το κλαβουλανικό οξύ και την ταζοβακτάμη, έχει ενδογενή αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε συγκεκριμένους μικροοργανισμούς, ιδιαίτερα στα *Acinetobacter* (235,236,237,238) και *Bacteroides* spp (240), η οποία διαμεσολαβείται από τη σύνδεσή της στην πενικιλιοδεσμευτική πρωτεΐνη 2 (241). Η σουλβακτάμη χορηγείται σε συνδυασμό με αμπικιλίνη ή κεφοπεραζόνη (236,237). Η ευαισθησία των *A. baumannii* στη σουλβακτάμη ποικίλλει στις διάφορες περιοχές (242), ενώ ορισμένες μελέτες time-kill δείχνουν βακτηριοκτόνο δράση ενάντια στα ευαίσθητα και όχι στα ενδιάμεσης ευαισθησίας στελέχη *A. baumannii* (243) όταν άλλες μελέτες καταγράφουν βακτηριοστατική δράση (236). Σε βακτηριαμία από *A. baumannii* η σουλβακτάμη έχει αποδειχθεί εξ' ίσου δραστική με την ιμιπενέμη (244,245,246), όταν το στέλεχος είναι

ευαίσθητο σ' αυτή, ενώ υπάρχουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα για τη χρήση αμπικιλίνης- σουλβακτάμης στη θεραπεία νοσοκομειακής μηνιγγίτιδας από *A. baumannii* (238,247). Η συνδυασμένη θεραπεία σουλβακτάμης με κεφεπίμη (248), ιμιπενέμη (249,250), μεροπενέμη (251,252), αμικασίνη (253), ριφαμπικίνη (254) και τρικακιλλίνη- κλαβουλανικό (255) φαίνεται πως είναι πιο δραστική σε σχέση με τη μονοθεραπεία με σουλβακτάμη. Δυστυχώς, η αντοχή στη σουλβακτάμη αυξάνεται τα τελευταία χρόνια, περιορίζοντας τη χρησιμοποίησή της.

Οι πολυμυξίνες ( κολιστίνη ή πολυμυξίνη Ε και πολυμυξίνη Β) αποτελούν μια κατηγορία αντιβιοτικών, γνωστή από το 1947, που προέρχεται από το *Bacillus polymyxa* (256). Συνδέονται στα ανιονικά λιπίδια LPS της εξωτερικής μεμβράνης του κυττάρου των gram-αρνητικών βακτηρίων, οδηγώντας σε διαταραχές ανταλλαγής λιπιδίων, ωσμωτική αστάθεια, καταστροφή της μεμβράνης και τελικά σε κυτταρικό θάνατο (257,258). Υπάρχουν δύο μορφές κολιστίνης στο εμπόριο, το colistin sulfate, για τοπική και χρήση από το στόμα και το sodium colistin methanesulfonate, για παρεντερική χρήση (259). Και οι δύο μορφές μπορούν να χορηγηθούν με νεφελοπόηση. Σε in vitro πειράματα, η κολιστίνη επιδεικνύει βακτηριοκτόνο δράση, ανάλογα με τη συγκέντρωση, σε στελέχη *A. baumannii* (255,256,257,258). Σε αρκετές προοπτικές μελέτες, αναφέρεται πως οι ασθενείς που έλαβαν κολιστίνη ως μονοθεραπεία, για λοιμώξεις από πολυανθεκτικά στελέχη *A. baumannii*, ευαίσθητα μόνο στην κολιστίνη, είχαν το ίδιο θεραπευτικό αποτέλεσμα με ασθενείς που έλαβαν συνδυασμένη θεραπεία για λοιμώξεις από πιο ευαίσθητα στελέχη (259,260).

Οι καρβαπενέμες (ιμιπενέμη, μεροπενέμη, δοριμενέμη), παρά την απουσία τυχαιοποιημένων μελετών, παραμένουν μία από τις σημαντικότερες θεραπευτικές επιλογές για τις σοβαρές λοιμώξεις που προκαλούνται από πολυανθεκτικά στελέχη *A. baumannii* (261). Έχουν εξαιρετική βακτηριοκτόνα δράση και σταθερότητα ενάντια σε

μεγάλο εύρος β-λακταμασών. Ωστόσο, η όλο και αυξανόμενη ανθεκτικότητα των *A. baumannii* σ' αυτές, δημιουργεί θεραπευτικά προβλήματα, δεδομένου ότι τα περισσότερα στελέχη *A. baumannii* που είναι ανθεκτικά στις καρβαπενέμες είναι επίσης ανθεκτικά και στην πλειοψηφία των υπόλοιπων αντιβιοτικών (εξαιρουμένων των πολυμυξινών και της τετρακυκλίνης). Η ευαισθησία στις καρβαπενέμες ποικίλλει από >90% έως 32%, ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή (262,263). Σε μελέτη που έγινε στην Ελλάδα (264) παρατηρήθηκε πως το 59% των στελεχών ήταν ευαίσθητα στη μεροπενέμη ενώ μόλις το 32% των στελεχών ήταν ευαίσθητα στην ιμιπενέμη, σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στις περισσότερες χώρες (265). Πρόσφατα, έχει παρατηρηθεί πως πολυανθεκτικά στελέχη *A. baumannii*, που με κλασικές φαινοτυπικές δοκιμασίες εμφανίζονται ευαίσθητα στις καρβαπενέμες, αναπτύσσουν ετερογενή αντοχή σε αυτά τα αντιμικροβιακά (17). Αυτά τα στελέχη παράγουν υποπληθυσμούς που εκφράζουν ασταθή ετεροαντοχή στις καρβαπενέμες και που εμφανίζουν φαινότυπο όμοιο με το πατρικό στέλεχος. Επίσης, απομονώθηκαν στελέχη με σταθερά ετεροάντοχο φαινότυπο. Οι ακριβείς μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την έκφραση αυτού του φαινοτύπου, δεν είναι ακόμα γνωστοί, όπως επίσης και ο ρόλος που παίζει στη δραστηριότητα των καρβαπενεμών, κατά τη χορήγησή τους στις λοιμώξεις από *A. baumannii*. Τέλος, η δοριπενέμη είναι μια νέα καρβαπενέμη, η οποία όμως, δε φαίνεται να υπερέχει σε δράση ενάντια στις λοιμώξεις από *A. baumannii*, σε σχέση με την ιμιπενέμη και τη μεροπενέμη (267).

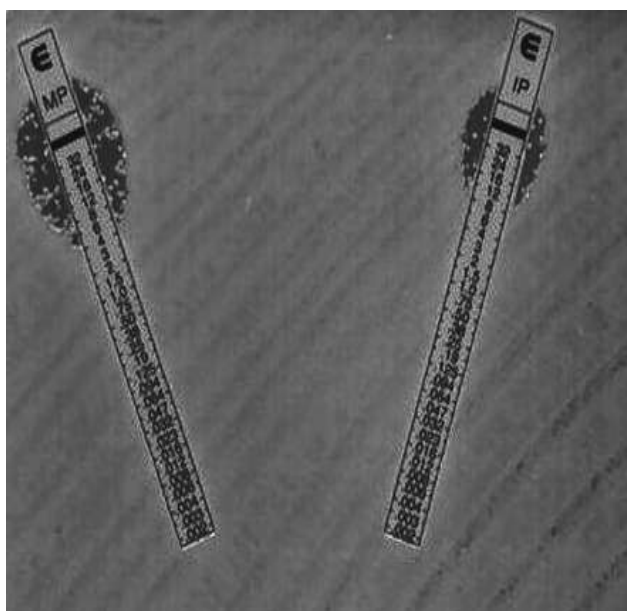


***ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ***

## Σκοπός της μελέτης

Την περίοδο της έρευνας, υπήρχαν κάποιες αναφορές σχετικές με την εμφάνιση ετερογένειας (Εκόνα 1) σε στελέχη *A. baumannii*, χωρίς ωστόσο να έχει μελετηθεί η συμπεριφορά των στελεχών αυτών μετά τη χορήγηση αντιβιοτικών, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της ετερογενούς αντοχής στα αντιβιοτικά και της επίπτωσης αυτής στην αντιμικροβιακή θεραπεία, σε νοσοκομειακά στελέχη *A. baumannii*, δίνοντας έμφαση στη χορήγηση καρβαπενεμών.

Εικόνα 1. Ετερογενής φαινότυπος *A. baumannii*



## Υλικά και μέθοδοι

Στελέχη και ταυτοποίηση. Κατά τη διάρκεια της μελέτης, απομονώθηκαν, από ασθενείς του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, 340 κλινικά στελέχη *A. baumannii*, την περίοδο Σεπτέμβριος 2007 – Μάρτιος 2009. Τα στελέχη προήλθαν από ασθενείς όλων σχεδόν των κλινικών του νοσοκομείου ( Ορθοπαιδική, Χειρουργική, Νευροχειρουργική, Μονάδα Εντατικής Θεραπείας, Παθολογικές Κλινικές, Μονάδα Στεφανιαίας Νόσου, Ογκολογική, Καρδιολογική, Αγγειοχειρουργική, Αιματολογική, Πνευμονολογική,

Νευρολογική, ΑΚΑ, Νεφρολογική), με τα περισσότερα να ανήκουν στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (>25%) και την Πνευμονολογική Κλινική (>10%). Όλα τα στελέχη συντηρήθηκαν σε θρεπτικό ζωμό Mueller Hinton Broth (Biolife, Milano, Italy), με περιεκτικότητα γλυκερόλης 16% w/v στους -80°C. Η ταυτοποίηση των στελεχών έγινε αρχικά με το αυτοματοποιημένο σύστημα VITEK 2 (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) και η ταυτοποίηση του είδους επιβεβαιώθηκε με PCR για το ενδογενές γονίδιο blaOXA-51 (268).

Από τα παραπάνω στελέχη επιλέχθηκαν 19 στελέχη, τα οποία παρουσίαζαν ευαισθησία στις καρβαπενέμες, ώστε να ερευνηθεί περαιτέρω η τυχόν εμφάνιση ετερογένειας.

Μελέτη ευαισθησίας. Η ευαισθησία των στελεχών στα αντιβιοτικά (β-λακτάμες, αμινογλυκοσίδες, κινολόνες, κολιστίνη) καθορίστηκε αρχικά με το αυτοματοποιημένο σύστημα VITEK 2 (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France). Ειδικά για τις καρβαπενέμες, η MIC καθορίστηκε με τη μέθοδο αραίωσης του αντιβιοτικού σε άγαρ, ακολουθώντας διεθνή κριτήρια αξιολόγησης (269). Πιο συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν τριβλία Mueller Hinton Agar (Biolife), τα οποία περιείχαν υποδιπλάσιες συγκεντρώσεις καρβαπενεμών, από 512 έως 0,25 mg/L. Σε καθένα τρυβλίο ενοφθαλμίστηκε εναιώρημα, το οποίο περιείχε περίπου  $10^4$  CFUs από κάθε στέλεχος ( 10μL από αραίωση 1:100 αρχικού εναιωρήματος με πυκνότητα 0,5 της κλίμακας McFarland). Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37°C για 18 ώρες. Ως MIC καθορίστηκε η μικρότερη συγκέντρωση αντιβιοτικού, που δεν επέτρεψε την ορατή ανάπτυξη του κάθε στελέχους. Το στέλεχος *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας.

Τυποποίηση. Η τυποποίηση των στελεχών της μελέτης έγινε με μακροπεριοριστική πέψη του γενωμικού DNA, με το περιοριστικό ένζυμο Apa1 (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Germany) και την ακόλουθη ανάλυση των νουκλεϊνικών τμημάτων με ηλεκτροφόρηση σε μεταβαλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι το παρακάτω:

- Τα στελέχη επωάστηκαν σε Tryptic Soy Broth (Biolife) στους 37°C για 18 ώρες και τα εναιωρήματα φωτομετρήθηκαν και αραιώθηκαν με τον κατάλληλο όγκο νερού (Water for Injection- WFI), ώστε να αποκτήσουν πυκνότητα ίση με 4.0 της κλίμακας McFarland.
- Από το αραιωμένο διάλυμα, όγκος 1mL φυγοκεντρήθηκε στις 13000rpm για 2 λεπτά και το ίζημα εναιωρήθηκε σε 200μl διαλύματος PIV (0.01 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 M NaCl).
- Παρασκευάστηκε 2% αγαρόζη χαμηλού μοριακού σημείου τήξεως (LMT – Low Melting Temperature Agarose, Cambrex Bio Science Rockland Inc., ME, USA) σε 10 ml διαλύματος PIV και διατηρήθηκε μαζί με τα εναιωρημένα στελέχη στους 42°C για 10 λεπτά.
- Όγκος 200μl αγαρόζης αναμείχθηκε με το δείγμα και ετοιμάστηκαν 7 πλακίδια μείγματος αγαρόζης- μικροβίου (από 20 μl) για κάθε στέλεχος, ανάμεσα σε υάλινες επιφάνειες. Τα πλακίδια έμειναν στους -30°C για 5 λεπτά αυστηρά και στη συνέχεια σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.
- Τα πλακίδια επωάστηκαν μέσα σε 500μl διαλύματος EC (6 mM Tris pH 8.0, 1M NaCl, 100 mM EDTA pH 8.0, 0,2% Na deoxycholate, 0,5% Na laurylsarcosine) που περιείχαν 100 μg/ml λυσοζύμης (Sigma-Aldrich) και 50 μg/ml RNaseA (Sigma-Aldrich) στους 37 °C, για τουλάχιστον 6 ώρες.

- Το EC διάλυμα αντικαταστάθηκε από 1ml ES διαλύματος (0.5 M EDTA pH 9.0, 1% sarcosyl), που περιείχε 1 mg/ml πρωτεΐνάση K (Sigma-Aldrich) και τα πλακίδια επώασθηκαν ολονύχτια στους 50°C.
- Ακολούθησε πλύσιμο των πλακιδίων 5 φορές για 30 λεπτά κάθε φορά, με 12ml διαλύματος TE (10mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA pH 8.0).
- Έγινε ολονύχτια πέψη ενός πλακιδίου από κάθε στέλεχος μέσα σε 80 µl restriction buffer 1x με 40U ApaI (Fermentas), στους 37°C.
- Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε ειδική αгарόζη 1%, για ηλεκτροφόρηση σε μεταβαλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Agarose for Pulse Field Gel Electrophoresis: Running Gel, Sigma-Aldrich), η οποία παρασκευάστηκε σε διάλυμα 0.5x TBE (BioRad, Hercules, CA, USA). Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε συσκευή CHEF-DRIII με 2lt 0,5x TBE και τις εξής συνθήκες: initial switch time 5 sec, final switch time 13 sec, total time 20 hors, volts/cm 6, angle 160°, temperature 11,3°C. Ως μάρτυρας μοριακού βάρους χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό σκεύασμα PULSE MARKERTM 50-1.000 kb (Sigma-Aldrich), που περιέχει τεμάχια γενώματος λ φάγου, γνωστού μεγέθους.
- Τα κριτήρια που εφαρμόστηκαν για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων είναι αυτά που πρότειναν οι Tenover et al (270). Η ψηφιακή ανάλυση και η εξαγωγή της φυλενετικής σχέσης των στελεχών έγινε με το λογισμικό Quantity One (BioRad).

Δοκιμασίες PCR. Η ύπαρξη γονιδίων που κωδικοποιούν για γνωστές καρβαπενεμάσες των τάξεων B και D (*bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>SIM</sub>, *bla*<sub>GIM</sub>, *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-24-like</sub>, *bla*<sub>OXA-58-like</sub>) διερευνήθηκε με δοκιμασίες PCR (208,271,272) Η ύπαρξη του ενδογενούς γονιδίου *bla*<sub>OXA-51</sub> (268) η οποία επιβεβαιώνει το χαρακτηρισμό των στελεχών της

μελέτης ως *A. baumannii*, έγινε επίσης με PCR. Οι αλληλουχίες εισδοχής *ISAbA1* and *ISAbA3*, οι οποίες σχετίζονται με β-λακταμάσες, μελετήθηκαν με PCR, ενώ έγινε και έλεγχος της θέσης τους σε σχέση με τα γονίδια *bla<sub>OXA-51</sub>* and *bla<sub>OXA-58</sub>*. Ο έλεγχος αυτός πραγματοποιήθηκε με δοκιμασίες PCR, με εκκινητές τους *ISAbA1* forward and *OXA-51-like reverse* και *ISAbA3* forward and *OXA-58 reverse*, αντίστοιχα (273) Η αλληλουχία των νουλεοτιδίων από τα προϊόντα των PCR καθορίστηκε στο Lark Technologies, Inc. και η ανάλυση του γονιδιώματος έγινε με χρήση του λογισμικού DNASTar software (version 5.07; Lasergene, Madison, WI).

Πληθυσμιακή Ανάλυση και Διερεύνηση της σταθερότητας του ετερογενούς φαινότυπου. Οι πληθυσμιακές αναλύσεις με ιμιπενέμη και μεροπενέμη έγιναν με βάση δημοσιευμένο πρωτόκολλο για *P. Aeruginosa* (274), στο οποίο έγιναν κάποιες τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, ενοφθαλμίστηκαν  $10^8$  αποικίες από κάθε στέλεχος (100 μl αρχικού διαλύματος που περιείχε  $10^9$  CFU/ml) σε τρυβλία με Mueller-Hinton άγαρ, τα οποία περιείχαν ιμιπενέμη ή μεροπενέμη σε υποδιπλάσιες αραιώσεις από 0.5 έως 32 mg/liter και επώαστηκαν για 48 ώρες. Η ανάλυση επαναλήφθηκε τρεις φορές για κάθε στέλεχος και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν σε ημιλογαριθμικό πίνακα. Το πρότυπο στέλεχος *P. aeruginosa* ATCC 27853 χρησιμοποιήθηκε ως control. Η συχνότητα εμφάνισης ετερογενών πληθυσμών στη μεγαλύτερη συγκέντρωση αντιβιοτικού εκτιμήθηκε διαιρώντας τον αριθμό των αποικιών που αναπτύχθηκαν στο τρυβλίο με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση αντιβιοτικού με τον αριθμό των αποικιών που αναπτύχθηκε σε τρυβλίο χωρίς αντιβιοτικό. Επίσης, από κάθε στέλεχος επιλέχθηκαν τρεις διακριτές αποικίες, οι οποίες αναπτύχθηκαν στο τρυβλίο με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση αντιβιοτικού και ανακαλλιεργούνταν καθημερινά, για μία εβδομάδα, σε τρυβλία χωρίς αντιβιοτικό. Έπειτα, ελέγχθηκε η MIC τους στις καρβαπενέμες με τη μέθοδο αραιώσεων του

αντιβιοτικού σε άγαρ και με τη μέθοδο Kirby – Bauer, ώστε να ελεγχθεί η σταθερότητα του ετερογενούς φαινότυπου.

Καμπύλες μικροβιοκτόνου δράσης μεροπενέμης. Καμπύλες μικροβιοκτόνου δράσης για τη μεροπενέμη έγιναν με όλα τα στελέχη, όπως επίσης και για το πρότυπο στέλεχος *P. aeruginosa* ATCC 27853, με βάση δημοσιευμένα πρωτόκολλα για *A. baumannii* (275,276,277,278). Συγκεκριμένα, από ένα αρχικό διάλυμα βακτηρίου, το οποίο περιείχε περίπου  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml, ενοφθαλμίστηκαν 100μl σε 3ml ζωμού Mueller-Hinton, ώστε το τελικό διάλυμα να περιέχει περίπου  $5 \times 10^6$  CFU/ml. Το διάλυμα αυτό περιείχε μεροπενέμη σε συγκέντρωση 4 mg/liter. Η συγκέντρωση της μεροπενέμης επιλέχθηκε με βάση το ότι αποτελεί το χαμηλότερο σταθερό επίπεδο αντιβιοτικού που μπορεί να επιτευχθεί στον ορό υγιών εθελοντών, μετά από χορήγηση των συνηθισμένων δόσεων μεροπενέμης (279). Από το παραπάνω διάλυμα, γινόταν επινέμηση 50 μl υποπολλαπλάσιων  $10^2$  και  $10^4$  διαλυμάτων σε τρυβλία με Mueller-Hinton άγαρ, τα οποία δεν περιείχαν αντιβιοτικό, τις ώρες 1, 3, 6, 9, 12, 24, 36, και 48, μετά την προσθήκη αντιβιοτικού, ώστε να γίνει καταμέτρηση των βιώσιμων κυττάρων. Η διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές για όλα τα στελέχη, υπολογίστηκαν οι ελάχιστες τιμές βιώσιμων αποικιών και αναλύθηκαν σε ημιλογαριθμικό πίνακα.

Μελέτη των πρωτεϊνών εξωτερικής μεμβράνης. Η μελέτη των πρωτεϊνών εξωτερικής μεμβράνης έγινε ακολουθώντας δημοσιευμένα πρωτόκολλα (280)

- Συγκεκριμένα, τα βακτήρια επώασθηκαν σε ζωμό Mueller-Hinton (Biolife) στους 37°C για 18 ώρες και ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 3700g για 15 λεπτά, στους 4°C.

- Το ίζημα των κυττάρων εναιωρήθηκε σε 2ml διαλύματος 10mM PB (7,2 mM  $K_2HPO_4$ , 2,8mM  $KH_2PO_4$ , pH 7,2) και το εναιώρημα εκτέθηκε σε υπερήχους 8 φορές για 10 λεπτά, με ενδιάμεση παύση 0,7 λεπτών. Η όλη διαδικασία διεξήχθη σε πάγο.
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 7000 rpm για 15 λεπτά, στους 4°C και το υπερκείμενο φυγοκεντρήθηκε στις 13000rpm για 45 λεπτά, στους 4°C, ώστε να απομακρυνθούν τα κύτταρα που δεν υπέστησαν λύση.
- Το ίζημα εναιωρήθηκε σε 1 ml διαλύματος 2% sodium lauryl sarcosinate σε 10 mM PB (pH 7,2) και επωάστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 45 λεπτά.
- Το νέο διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 11000 rpm για 60 λεπτά στους 4°C και το ίζημα εναιωρήθηκε σε 200 ml διαλύματος 6.25 mM Tris-HCl buffer, pH 6.8.
- Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση 10  $\mu$ l από το διάλυμα κάθε στελέχους, σε γέλη πολυακρυλαμίδης, με το εμπορικό kit NUPAGE™ 4% - 12% Bis-Tris Gel 1.0 mm Kit (Invitrogen).
- Τέλος, έγινε χρώση της γέλης με το αντιδραστήριο SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen).

Πειραματικές λοιμώξεις. Η διενέργεια πειραματικών λοιμώξεων εγκρίθηκε από την Επιτροπή Δεοντολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και ήταν σύμφωνη με τις κατευθυντήριες οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Χρησιμοποιήθηκαν επίμυες, ηλικίας έξι εβδομάδων, βάρους 23 έως 27 g (281). Οι επίμυες φυλάχθηκαν σε ειδικά κλουβιά, με νερό και φαγητό *ad libitum*. Τέσσερις, καθώς και μία ημέρα πριν την έναρξη του πρωτοκόλλου, έγινε ενδοπεριτοναϊκή έγχυση κυκλοφωσφαμίδης, 150 mg/kg και 100 mg/kg, αντίστοιχα, ώστε να καθιστούν οι επίμυες ουδετεροπενικοί (282). Η αναισθησία έγινε με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση 30  $\mu$ l διαλύματος κεταμίνης/συσσαλαζίνης



(5:1). Στη συνέχεια, έγινε έγχυση σε κάθε μηρό, 0,1 ml εναιωρήματος μικροβίων, με συγκέντρωση  $7 \log_{10}$  CFU/ml (283). Έπειτα από 2 ώρες ξεκίνησε η χορήγηση μεροπενέμης σε τρία δοσολογικά σχήματα, 20 mg/kg/8h (284), 100 mg/kg/12h (285) και 400 mg/kg/8h (286). Για κάθε στέλεχος έγιναν τρεις επαναλήψεις ενώ σε ισάριθμους επίμυες δε δόθηκε θεραπεία (controls). Μετά τη συμπλήρωση 24ωρης θεραπείας, όσοι επίμυες επέζησαν, θανατώθηκαν. Ακολούθησε ομογενοποίηση όλων των μηριαίων μυών και καλλιέργεια των μικροβιακών εναιωρημάτων, ώστε να γίνει καταμέτρηση των αποικιών που αναπτύχθηκαν από κάθε στέλεχος. Οι τιμές εκφράστηκαν ως  $\log_{10}$  CFU/μηρό. Το t-test χρησιμοποιήθηκε για στατιστική ανάλυση, ενώ σε όλα τα πειράματα τιμή  $P \leq 0,05$  θεωρήθηκε ενδεικτική στατιστικά σημαντικής διαφοράς. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με το λογισμικό Minitab (version 13.31).

Καμπύλες ανάπτυξης. Καμπύλες ανάπτυξης έγιναν μόνο για τα πέντε κλινικά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στις πειραματικές λοιμώξεις καθώς για τους ετερογενείς υποπληθυσμούς τους. Σε 15 mL ζωμού Mueller–Hinton, διαλύσαμε 0.1 mL υγρής καλλιέργειας, μετά από ολονύκτια επώαση, του κάθε στελέχους σε ζωμό Mueller–Hinton. Το τελικό διάλυμα επώασθη στους 37°C, με συνεχή ανάδευση και κάθε μία ώρα, γινόταν μέτρηση της οπτικής πυκνότητας του διαλύματος, για τις επόμενες 16 ώρες.

## **Αποτελέσματα**

Ταυτοποίηση στελεχών και μελέτη ευαισθησίας. Από τα 340 στελέχη *A. baumannii* που απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια της μελέτης, τα 19 επιλέχθηκαν να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω έρευνα. Τα στελέχη αυτά επιλέχθηκαν αρχικά με βάση την ευαισθησία

τους στις καρβαπενέμες, σύμφωνα με το αυτοματοποιημένο σύστημα Vitek 2. Το αντιμικροβιακό τους προφίλ φαίνεται στον Πίνακα 2.

Στη συνέχεια ακολούθησε μελέτη της ευαισθησίας των κλινικών στελεχών στις καρβαπενέμες με τη μέθοδο αραιώσης του αντιβιοτικού σε άγαρ. Οι MICs των κλινικών στελεχών στην ιμιπενέμη και τη μεροπενέμη κυμάνθηκαν από 0.25 έως 4 mg/lit (Πίνακας 2).

Τυποποίηση. Η τυποποίηση των στελεχών της μελέτης έγινε με μακροπεριοριστική πέψη του γενωμικού DNA, με το περιοριστικό ένζυμο Apa1 (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Germany) και την ακόλουθη ανάλυση των νουκλεϊνικών τμημάτων με ηλεκτροφόρηση σε μεταβαλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE). Μεταξύ των 19 στελεχών, αναγνωρίστηκαν εννέα διαφορετικοί γονότυποι. Τα κλινικά στελέχη και οι αντίστοιχοι υποπληθυσμοί τους είχαν πάντα τον ίδιο γονότυπο, κάτι που δείχνει ότι δεν υπάρχει επιμόλυνση και ότι οι αλλαγές που οδηγούν στην ετερογενή αντοχή δεν μεταβάλλουν δραστικά τη γενετική σύσταση των μικροβίων (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά στελεχών μελέτης.

Isolate	<i>bla<sub>oxa51</sub>-like alleles</i>	Susceptibility status to antimicrobials other than IMP, MEM, COL	PFGE	Agar MIC (mg/L)		Highest conc. in PA (mg/L)		Agar MIC of heterogenous subpopulations in IMP		Agar MIC of heterogenous subpopulations in MEM	
				IMP	MEM	IMP	MEM	IMP	MEM	IMP	MEM
5	66	SAM	I	3	3	8	8	8	1.5	3	32
13	66	AMK, GEM,	VI	3	0.375	4	2	3	0.5	6	3

		PTZ, SAM									
27	91	PTZ, GEM, LVX, CIP, TOB, SAM	VII	0.375	1	2	8	1	1	1	>32
32	66	PTZ, SAM	I	1.5	2	2	8	4	1	2	12
49	66	SAM	I	6	4	16	24	8	1.5	2	32
68	66	AMK, SAM	I	3	2	16	32	3	6	4	>32
71	66	PTZ, GEM, LVX, MOX, SAM	I	0.375	<0.25	12	8	2	1	2	24
72	94	NET, TOB, MOX, SAM	II	1.5	1.5	6	8	1	1	2	24
78	94	AMK, TOB, LVX, MOX, SAM	II	2	2	6	12	3	0.75	3	32
79	69	AMK	III	1	1	6	8	1	1	2	8
119	66	AMK, GEM, TOB, CIP, LVX, MOX, PTZ, SAM	VIII	<0.25	0.75	2	8	1	0.75	1	8
129	69	-	III	3	1	24	16	1.5	1	3	>32
133	66	AMK, PTZ, SAM	IX	3	1.5	8	32	3	1	1.5	>32
135	69	NET, OFX, TOB, SAM	IV	1.5	0.75	8	16	1.5	1	2	16
142	66	SAM, CIP, COL, MEM	I	3	4	8	16	8	1.5	2	32
156	66	GEN, TOB, CIP, SAM, MEM, COL	II	0.375	1	2	8	2	2	1	1

158	91	GEN, TOB, SAM, MEM, COL	I	1.5	2	2	8	4	2	1	1
174	66	GEN, SAM, MEM, COL	I	6	4	16	16	4	2	1	2
188	66	GEN, TOB, SAM, MEM, COL	III	3	2	8	32	3	1	2	>32

Δοκιμασίες PCR. Οι δοκιμασίες PCR για γονίδια που κωδικοποιούν για τις γνωστές καρβαπενεμάσες των τάξεων B και D (*bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>SPM</sub>*, *bla<sub>SIM</sub>*, *bla<sub>GIM</sub>*, *bla<sub>OXA-23-like</sub>*, *bla<sub>OXA-24-like</sub>*, *bla<sub>OXA-58-like</sub>*) ήταν αρνητικές σε όλα τα στελέχη. Θετική ήταν μόνο η ύπαρξη του ενδογενούς γονιδίου για τα *A. baumannii*, *bla<sub>OXA-51-like</sub>*. Στην αλληλουχία των νουλεοτιδίων από τα προϊόντα των PCR ήταν πιο συχνά απαντώμενα τα αλληλία *bla<sub>OXA-66</sub>* και *bla<sub>OXA-69</sub>*, όπως ήταν αναμενόμενο, σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη (287). Επίσης, δεν ανιχνεύθηκαν στοιχεία εισδοχής *ISAbal* στην άνοδο του γονιδίου *bla<sub>OXA-51-like</sub>* τα οποία συμβάλλουν στην αντοχή στις καρβαπενέμες.

Πληθυσμιακή ανάλυση και διερεύνηση της σταθερότητας του ετερογενούς φαινότυπου. Οι πληθυσμιακές αναλύσεις με ιμιπενέμη ανέδειξαν αποικίες που αναπτύχθηκαν σε συγκέντρωση αντιβιοτικού 8 mg/l για 3 στελέχη, ενώ για τα υπόλοιπα 16 στελέχη η ανάπτυξη των αποικιών κυμάνθηκε σε συγκεντρώσεις μέσα στα όρια ευαισθησίας. Από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν στις υψηλότερες συγκεντρώσεις ιμιπενέμης επιλέχθηκαν τρεις από κάθε στέλεχος και ανακαλλιεργήθηκαν σε ζωμό Muller-Hinton χωρίς αντιβιοτικό για μία εβδομάδα. Ο έλεγχος της MIC στην ιμιπενέμη και στη μεροπενέμη, που ακολούθησε, για τις συγκεκριμένες αποικίες, έδειξε πως η MIC τους ήταν ίση με αυτή των αντίστοιχων κλινικών στελεχών και στα δύο αντιβιοτικά (Πίνακας 2.).

Οι πληθυσμιακές αναλύσεις με μεροπενέμη, που έγιναν στα 19 στελέχη *A. baumannii* της μελέτης, ανεδείξαν την ανάπτυξη αποικιών σε συγκεντρώσεις από 8 έως 32

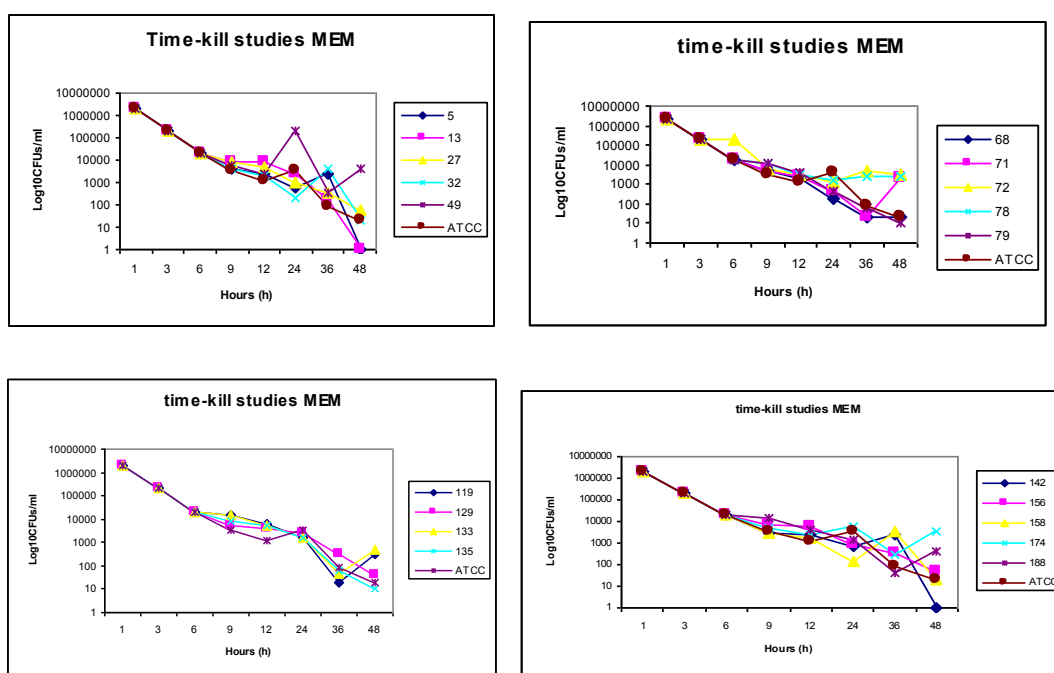
mg/L για τα 18 στελέχη. Μόνο το στέλεχος Ab13 αναπτύχθηκε μέχρι τη συγκέντρωση των 2 mg/L μεροπενέμης. Από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν στις υψηλότερες συγκεντρώσεις μεροπενέμης επιλέχθηκαν τρεις από κάθε στέλεχος και ανακαλλιεργήθηκαν σε ζωμό Muller-Hinton χωρίς αντιβιοτικό για μία εβδομάδα. Οι MICs των αποικιών αυτών, που ελέγχθηκαν με τη μέθοδο αραιώσης της μεροπενέμης σε άγαρ και με e-test μεροπενέμης και ιμιπενέμης (Εικόνα 2), αποκάλυψαν τα εξής: οι υποπληθυσμοί από τέσσερα κλινικά στελέχη είχαν MIC ίση με αυτή των κλινικών στελεχών (Ab13, Ab156, Ab158, Ab174), ενώ οι υποπληθυσμοί από τα υπόλοιπα 15 κλινικά στελέχη (Ab5, Ab27, Ab32, Ab49, Ab68, Ab 71, Ab72, Ab78, Ab79, Ab119, Ab129, Ab133, Ab135, Ab142, Ab188) είχαν σταθερά αυξημένη MIC, που ήταν στα όρια της αντοχής στη μεροπενέμη (Πίνακας 2.). Οι MICs όλων των υποπληθυσμών αυτών στην ιμιπενέμη ήταν μέσα στα όρια ευαισθησίας.

Εικόνα 2. e-test ετερογενούς υποπληθυσμού, από τη μέγιστη συγκέντρωση μεροπενέμης στην πληθυσμιακή ανάλυση



Μελέτες μικροβιοκτόνου δράσης. Στις μελέτες μικροβιοκτόνου δράσης με μεροπενέμη, τέσσερα κλινικά στελέχη θανατώθηκαν σε συνάρτηση με το χρόνο (Ab5, Ab13, Ab79, Ab135). Στα υπόλοιπα στελέχη, η αρχική μείωση του βακτηριακού φορτίου ακολουθήθηκε από εκ νέου ανάπτυξη, μετά από 9 έως 12 ώρες επώασης για έξι στελέχη (Ab27, Ab49, Ab68, Ab156, Ab158, Ab174) και μετά από 24 ώρες επώασης για εννέα στελέχη (Ab32, Ab71, Ab72, Ab78, Ab119, Ab129, Ab133, Ab142, Ab188). Οι καμπύλες ανάπτυξης από τις μελέτες μικροβιοκτόνου δράσης της μεροπενέμης φαίνονται στο Σχήμα 1. Το πρότυπο στέλεχος *P. aeruginosa* ATCC 27853 παρουσίασε ελάττωση του βακτηριακού φορτίου, ανάλογη με το χρόνο.

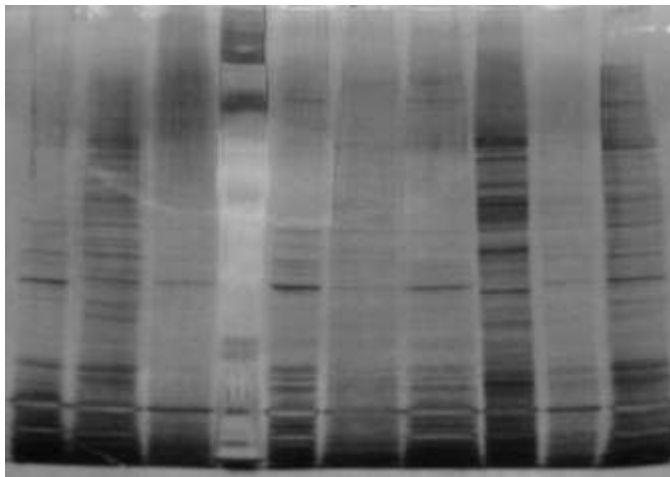
Σχήμα 1. μελέτες μικροβιοκτόνου δράσης μεροπενέμης



Μελέτη των πρωτεϊνών εξωτερικής μεμβράνης. Στις μελέτες ανάλυσης των πρωτεϊνών εξωτερικής μεμβράνης δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των κλινικών στελεχών και των αντίστοιχων υποπλυθυσμών, που αναπτύχθηκαν στις υψηλότερες συγκεντρώσεις τόσο ιμιπενέμης όσο και μεροπενέμης (Εικόνα 3).

Πειραματικές λοιμώξεις. Για τη διενέργεια των πειραματικών λοιμώξεων χρησιμοποιήθηκαν πέντε κλινικά στελέχη, τα Ab142, Ab156, Ab158, Ab174 και Ab188. Η κάθε λοίμωξη έγινε σε τρεις επαναλήψεις.

Εικόνα 3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών εξωτερικής μεμβράνης



*Ποντίκια που δεν έλαβαν θεραπεία.* Όλα τα ποντίκια (15/15) που επιμολύνθηκαν με τα κλινικά στελέχη και που δεν έλαβαν θεραπεία, πεθάνανε σε λιγότερες από 24 ώρες. Από τα δεκαπέντε ποντίκια που επιμολύνθηκαν από τους υποπληθυσμούς (που αναπτύχθηκαν στη μεγαλύτερη συγκέντρωση στις πληθυσμιακές αναλύσεις μεροπενέμης), τα έξι που επιμολύνθηκαν με τους υποπληθυσμούς Ab158h και Ab174h πεθάνανε το πρώτο 24ωρο, ενώ τα υπόλοιπα εννέα, που επιμολύνθηκαν από τους υποπληθυσμούς Ab142h, Ab156h και Ab188h, έζησαν για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν υψηλότερη μολυσματικότητα των κλινικών στελεχών σε σχέση με τους αντίστοιχους υποπληθυσμούς.

*Ποντίκια που έλαβαν θεραπεία με 20 mg/kg μεροπενέμης.* Συνολικά, τα εικοσιένα από τα τριάντα ποντίκια (21/30), που επιμολύνθηκαν με τα κλινικά στελέχη και τους

υποπλυθησμούς έζησαν για 24 ώρες. Πιο συγκεκριμένα, τα οκτώ από τα δεκαπέντε (8/15) ποντίκια, που επιμολύνθηκαν από τα κλινικά στελέχη και μόλις το ένα από τα δεκαπέντε ποντίκια, που επιμολύνθηκαν από τους υποπλυθησμούς, πεθάνανε το πρώτο 24ωρο, γεγονός που επίσης υποδεικνύει υψηλότερη μολυσματικότητα των κλινικών στελεχών. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ελάττωση του αριθμού των αποικιών ανάμεσα σε όλα τα ποντίκια (30/30) που έλαβαν τη συγκεκριμένη θεραπεία και στα ποντίκια που δεν έλαβαν καθόλου θεραπεία ( $P>0,05$ ).

*Ποντίκια που έλαβαν θεραπεία με 100 mg/kg μεροπενέμης.* Συνολικά, τα εικοσιεπτά από τα τριάντα ποντίκια (27/30), που επιμολύνθηκαν με τα κλινικά στελέχη και τους υποπλυθησμούς έζησαν για 24 ώρες. Τα 13 εξ'αυτών είχαν επιμολυνθεί με τα κλινικά στελέχη και τα 14 ποντίκια είχαν επιμολυνθεί με τους υποπλυθησμούς. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ελάττωση του αριθμού των αποικιών ανάμεσα σε όλα τα ποντίκια (30/30) που έλαβαν τη συγκεκριμένη θεραπεία και στα ποντίκια που δεν έλαβαν καθόλου θεραπεία ( $P>0,05$ ).

*Ποντίκια που έλαβαν θεραπεία με 400 mg/kg μεροπενέμης.* Όλα τα ποντίκια (30/30) που επιμολύνθηκαν τόσο από τα κλινικά στελέχη όσο και από τους υποπλυθησμούς επέζησαν για 24 ώρες, με το συγκεκριμένο δοσολογικό σχήμα. Επιπλέον, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση ( $P<0.05$ ) στον αριθμό των αποικιών που αναπτύχθηκαν από τα εναιωρήματα των ομογενοποιημένων μηρών, των δώδεκα (12/15) ποντικών που είχαν επιμολυνθεί με τα κλινικά στελέχη Ab156, Ab158, Ab174 και Ab188, καθώς και όλων των ποντικών (15/15) που είχαν επιμολυνθεί με τους ετερογενείς υποπλυθησμούς, σε σχέση με των αντίστοιχων ποντικών που δεν έλαβαν καθόλου θεραπεία. Ο αριθμός των αποικιών που αναπτύχθηκε από τα εναιωρήματα των τριών ποντικών που επιμολύνθηκαν από το κλινικό στέλεχος Ab142 δεν παρουσίασε σημαντική

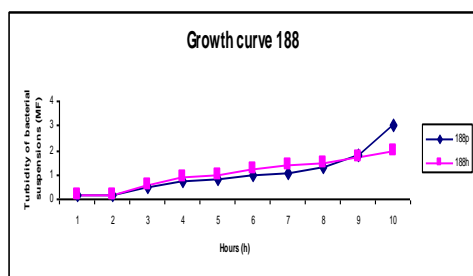
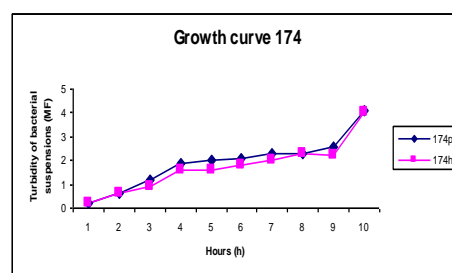
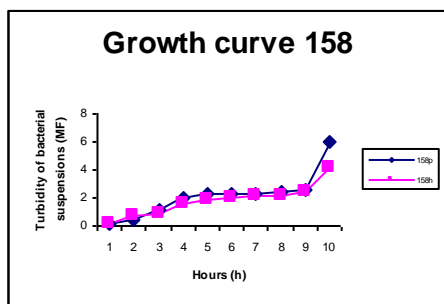
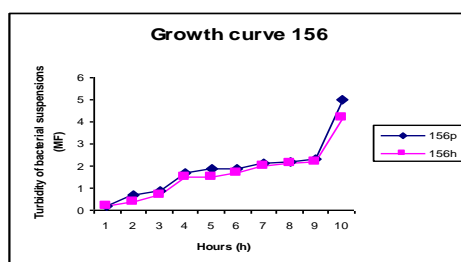
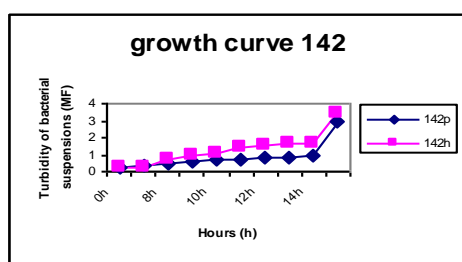


στατιστικά διαφορά ( $P>0.05$ ) σε σχέση με τις αποικίες που προήλθαν από τα αντίστοιχα ποντίκια που δεν έλαβαν θεραπεία.

Τα ποντίκια που επιμολύνθηκαν από το πρότυπο στέλεχος *E. coli* ATCC 25922 έζησαν για 24 ώρες όλα, (12/12), ανεξάρτητα από το δοσολογικό σχήμα της θεραπείας (20, 100 and 400 mg/kg μεροπενέμης.)

Καμπύλες ανάπτυξης. Οι καμπύλες ανάπτυξης των κλινικών στελεχών και των υποπληθυσμών τους, δε διέφεραν σημαντικά (Σχήμα 2).

Σχήμα 2. Καμπύλες ανάπτυξης



## Συμπεράσματα

Τα τελευταία χρόνια, απομονώνονται όλο και περισσότερα στελέχη *A. baumannii* που παρουσιάζουν αντίσταση στις καρβαπνέμες, προκαλώντας προβλήματα στην αντιμετώπιση των λοιμώξεων, σε πολλές χώρες (187). Επιπλέον, η παρατήρηση πως φαινομενικά ευαίσθητα στις καρβαπενέμες στελέχη *A. baumannii*, μπορεί να περιέχουν υποπληθυσμούς φαινομενικά ανθεκτικούς σ'αυτές (17, 289), θέτει πολλά ερωτήματα σχετικά με τη δυνατότητα αντιμετώπισης των λοιμώξεων που προκαλούν. Αυτοί οι υποπληθυσμοί μπορεί να έχουν σταθερά αυξημένες τιμές MIC στη μεροπενέμη, είτε εξαιτίας μόνιμων αλλαγών στο γονιδίωμα, οπότε και θεωρούνται ετερογενείς είτε παραμένουν σε λανθάνουσα φάση παρουσία αντιβιοτικού, παρουσιάζοντας MIC στα όρια της ευαισθησίας όταν αναπτύσσονται σε υλικό χωρίς αντιβιοτικό (290).

Η αντίσταση των βακτηρίων στα αντιβιοτικά μπορεί επίσης να συσχετισθεί με βιολογικό κόστος ανάπτυξής τους (291). Έχει προταθεί πως το μέγεθος του κόστους αυτού είναι ο πρωταρχικός παράγοντας που επηρεάζει το ρυθμό ανάπτυξης αντίστασης, τη σταθερότητα της αντίστασης των βακτηρίων στα αντιβιοτικά καθώς και το ρυθμό με τον οποίο η αντίσταση μπορεί να μειωθεί, εάν η χρήση αντιβιοτικών ελαττωθεί (292).

Τα υπό μελέτη στελέχη ανήκαν σε διάφορους τύπους PFGE, κάποιοι από τους οποίους σχετίζονται με τους Ευρωπαϊκούς κλώνους I και II και που έχουν ανιχνευθεί και παλαιότερα σε στελέχη *A. baumannii* στον ελλαδικό χώρο (288). Όλα τα κλινικά στελέχη ήταν ευαίσθητα και στην ιμιπενέμη και στη μεροπενέμη, σύμφωνα με τη μέθοδο αραίωσης του αντιβιοτικού σε άγαρ ( $MICs \leq 4mg/liter$ ). Στις πληθυσμιακές αναλύσεις αναπτύσσονταν υποπληθυσμοί σε συγκεντρώσεις αντιβιοτικού διπλάσιες έως δεκαπλάσιες από τις αντίστοιχες MIC των κλινικών στελεχών, που στις περισσότερες περιπτώσεις ξεπερνούσαν και τα όρια ευαισθησίας του CLSI. Ωστόσο, έπειτα από επαναλαμβανόμενες καλλιέργειες σε θρεπτικό υλικό χωρίς αντιβιοτικό, οι υποπληθυσμοί

που αναπτύχθηκαν στις υψηλότερες συγκεντρώσεις ιμιπενέμης, στις πληθυσμιακές αναλύσεις, εμφάνιζαν MIC ίση με αυτή των αντίστοιχων κλινικών στελεχών. Αντίθετα, οι υποπληθυσμοί που αναπτύχθηκαν στις υψηλότερες συγκεντρώσεις μεροπενέμης, στις πληθυσμιακές αναλύσεις, από τέσσερα κλινικά στελέχη είχαν MIC ίση με αυτή των κλινικών στελεχών (Ab13, Ab156, Ab158, Ab174), ενώ οι υποπληθυσμοί από τα υπόλοιπα δεκαπέντε κλινικά στελέχη (Ab5, Ab27, Ab32, Ab49, Ab68, Ab71, Ab72, Ab78, Ab79, Ab119, Ab129, Ab133, Ab135, Ab142, Ab188) είχαν σταθερά αυξημένη MIC, που ήταν στα όρια της αντοχής στη μεροπενέμη (Πίνακας 2). μετά από επαναλαμβανόμενες καλλιέργειες μίας εβδομάδας. Επίσης, τα δεκατρία στελέχη (Ab27, Ab32, Ab49, Ab68, Ab71, Ab72, Ab78, Ab79, Ab119, Ab133, Ab158, Ab174, Ab188) στις μελέτες time-kill παρουσίασαν εκ νέου ανάπτυξη. Αντίθετα, τα υπόλοιπα στελέχη (Ab5, Ab129, Ab135, Ab142, Ab156), καθώς και το Ab13, το οποίο δεν εμφάνιζε ετερογένεια, παρουσίασαν ελάττωση σε συνάρτηση με το χρόνο.

Όσον αφορά τους μοριακούς μηχανισμούς στους οποίους μπορεί να οφείλεται η εμφάνιση ετερογενούς φαινότυπου, αυτοί παραμένουν ακόμα αδιευκρίνιστοι. Στις δοκιμασίες PCR που έγιναν, δε βρέθηκαν γονίδια που να εκφράζουν γνωστές καρβαπενεμάσες (εκτός της ενδογενούς *bla*<sub>OXA-51-like</sub> καρβαπενεμάσης), ούτε και στοιχεία εισδοχής που να προκαλούν υπερέκφραση του γονιδίου *bla*<sub>OXA-51-like</sub>. Στη μελέτη πρωτεϊνών εξωτερικής μεμβράνης δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στη σύσταση της μεμβράνης μεταξύ των κλινικών στελεχών και των αντίστοιχων υποπληθυσμών, που αναπτύχθηκαν τόσο παρουσία ιμιπενέμης όσο και παρουσία μεροπενέμης. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε απώλεια καμίας εκ των πρωτεϊνών που φαίνεται να σχετίζονται με εμφάνιση αντίστασης στις καρβαπενέμες, τόσο στα κλινικά στελέχη, όσο και στους ετερογενείς υποπληθυσμούς (15,146)

Τέλος, στις πειραματικές λοιμώξεις παρατηρήθηκε πως οι ετερογενείς υποπληθυσμοί είχαν μικρότερη λοιμογόνο δύναμη, σε σύγκριση με τα κλινικά στελέχη, μιας και 9/15 ποντίκια που επιμολύνθηκαν από ετερογενείς (ή «εμμένοντες») υποπληθυσμούς επέζησαν, σε αντίθεση με τα ποντίκια που μολύνθηκαν από τα κλινικά στελέχη και πέθανα όλα το πρώτο 24ωρο. Αυτά τα αποτελέσματα πιθανόν να αντανακλούν το βιολογικό κόστος που προκαλείται από τις μεταλλάξεις που σχετίζονται με την έκφραση του ετερογενούς φαινότυπου, στη μεροπενέμη. Η μικρότερη λοιμογόνος δύναμη των φαινοτυπικά ετερογενών υποπληθυσμών αποδुकνύεται και από την παρατήρηση πως όταν δόθηκε η ελάχιστη θεραπευτική δόση των 20mg/kg/8h μεροπενέμης, επέζησαν τα 14 από τα 15 ποντίκια που επιμολύνθηκαν από αυτούς τους υποπληθυσμούς, σε αντίθεση με τα 7 από τα 15 ποντίκια που επέζησαν και που ήταν επιμολυσμένα από τα κλινικά στελέχη. Η έκβαση των λοιμώξεων που προκλήθηκαν, δε φάνηκε να σχετίζεται με τη δόση της μεροπενέμης που δόθηκε ως θεραπεία, ακόμα και σε όσες οφείλονταν στους υποπληθυσμούς με σταθερή ετερογένεια, υποδηλώνοντας των επηρεασμένη λοιμογόνο δύναμη.

Συμπερασματικά, η εμφάνιση ετερογένειας σε ευαίσθητα στις καρβαπενέμες, *A. baumannii*, αποτελεί ένα φαινόμενο που μπορεί να είναι αντιστρεπτό σε ορισμένα στελέχη ή και μόνιμο, όταν πιθανώς να σχετίζεται με μεταλλάξεις στο γονιδίωμά τους. Ωστόσο, η κλινική σημασία του φαινομένου αυτού παραμένει άγνωστη. Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, υποδεικνύουν πως η ετερογενούς ανάπτυξη των *A. baumannii*, παρουσία καρβαπενεμών, παίζει αμφιλεγόμενο ρόλο στην εξέλιξη της λοίμωξης. Η λοιμογόνος δύναμη των φαινομενικά ετερογενών υποπληθυσμών είναι μικρότερη από αυτή των κλινικών στελεχών, ενώ το αποτέλεσμα της θεραπείας με μεροπενέμη δε φαίνεται να επηρεάζεται από τις αυξημένες MIC των υποπληθυσμών, στη μεροπενέμη.

## ***ΠΕΡΙΛΗΨΗ***

Ο έλεγχος των νοσοκομειακών λοιμώξεων, που προκαλούνται από Gram αρνητικά βακτήρια, με κυριότερα τα είδη *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* και *Acinetobacter* απασχολεί όλες τις ανεπτυγμένες χώρες, τα τελευταία χρόνια.

Τα μέλη της οικογένειας *Acinetobacter* μπορούν να θεωρηθούν πανταχού παρόντα στη φύση, ενώ στον άνθρωπο αποικίζουν υγρά και ζεστά σημεία του σώματος, καθώς και το δέρμα, που αποτελεί την κυριότερη πηγή μόλυνσης. Στον χώρο του νοσοκομείου διαβιούν κυρίως σε περιοχές με υγρασία, ενώ συχνά βρίσκονται στα χέρια γιατρών και νοσηλευτών. Η δυνατότητα αυτών των βακτηρίων να επιβιώνουν σε ξηρές επιφάνειες και η ικανότητά τους να αναπτύσσουν αντοχή στα αντιβιοτικά, ανταλλάσσοντας γενετικό υλικό, ευθύνονται για την εξάπλωση επιδημιών. Τα πιο συχνά είδη που συναντώνται στην κλινική πράξη είναι το *A. baumannii* και το *A. lwoffii*.

Οι λοιμώξεις από *A. baumannii* αποτελούν σοβαρό κλινικό πρόβλημα σε πολλές περιοχές της Ευρώπης από τις αρχές τις δεκαετίας του 1980, οπότε και άρχισαν να αναφέρονται οι πρώτες νοσοκομειακές επιδημίες. Οι περισσότερες περιπτώσεις νοσοκομειακής πνευμονίας, που εμφανίζονται κυρίως σε ασθενείς με μηχανική αναπνοή, η βακτηριαμία, η νοσοκομειακή μηνιγγίτιδα, λοιμώξεις ανώτερου ουροποιητικού και σποραδικά περιστατικά ενδοκαρδίτιδας, αποτελούν τις πιο σοβαρές λοιμώξεις που προκαλούνται από το *A. baumannii*.

Θεραπεία εκλογής για λοιμώξεις από *A. baumannii* αποτελούν ακόμα οι καρβαπενέμες. Σε περιπτώσεις αντοχής στις καρβαπενέμες, χρησιμοποιούνται η σουλμπακτάμη μόνη της ή σε συνδυασμό με την αμικικιλίνη, η κολιστίνη και η τιγκεκυκλίνη. Σε σοβαρές λοιμώξεις από *A. baumannii* χρησιμοποιούνται συνήθως μικτά θεραπευτικά σχήματα. Σύμφωνα με την Αμερικανική Εταιρεία Λοιμώξεων (Infectious

Diseases Society of America) το *A. baumannii* αποτελεί ένα από τα πιο επικίνδυνα παθογόνα “red alert”, που απειλούν τις δυνατότητες του αντιβιοτικού οπλοστασίου.

Η εμφάνιση ετερογενούς φαινότυπου από στελέχη *A. baumannii* παρατηρήθηκε πρώτη φορά το 1997, από τους *Pascual et al* αλλά δεν ακολούθησαν εκτενέστερες μελέτες. Την περίοδο της έρευνας, υπήρχαν κάποιες αναφορές σχετικές με την εμφάνιση ετερογένειας σε στελέχη *A. baumannii*, χωρίς ωστόσο να έχει μελετηθεί η συμπεριφορά των στελεχών αυτών μετά τη χορήγηση αντιβιοτικών, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της ετερογενούς αντοχής στα αντιβιοτικά και της επίπτωσης αυτής στην αντιμικροβιακή θεραπεία, σε νοσοκομειακά στελέχη *A. baumannii*, δίνοντας έμφαση στη χορήγηση καρβαπενεμών.

Στα στελέχη της μελέτης, έγινε διερεύνηση της ευαισθησίας στις καρβαπενέμες με πρότυπες μεθόδους, τυποποίηση με τη μέθοδο PFGE και αναζήτηση γονιδίων που κωδικοποιούν για γνωστές καρβαπενεμάσες, με δοκιμασίες PCR. Ακολούθησε η διενέργεια πληθυσμιακών αναλύσεων με μιπενέμη και μεροπενέμη, καμπυλών μικροβιοκτόνου δράσης για τη μεροπενέμη, μελέτη των πρωτεϊνών εξωτερικής μεμβράνης των στελεχών και τέλος πειραματικών λοιμώξεων.

Τα υπό μελέτη στελέχη ανήκαν σε διάφορους τύπους PFGE, κάποιοι από τους οποίους σχετίζονται με τους Ευρωπαϊκούς κλώνους I και II και που έχουν ανιχνευθεί και παλαιότερα σε στελέχη *A. baumannii* στον ελλαδικό χώρο. Όλα τα κλινικά στελέχη ήταν ευαίσθητα και στην μιπενέμη και στη μεροπενέμη, σύμφωνα με τη μέθοδο αραίωσης του αντιβιοτικού σε άγαρ (MICs ≤ 4mg/liter). Στις πληθυσμιακές αναλύσεις αναπτύσσονταν υποπληθυσμοί σε συγκεντρώσεις αντιβιοτικού διπλάσιες έως δεκαπλάσιες από τις αντίστοιχες MIC των κλινικών στελεχών, που στις περισσότερες περιπτώσεις ξεπερνούσαν και τα όρια ευαισθησίας του CLSI. Ωστόσο, έπειτα από επαναλαμβανόμενες καλλιέργειες σε θρεπτικό υλικό χωρίς αντιβιοτικό, οι υποπληθυσμοί

που αναπτύχθηκαν στις υψηλότερες συγκεντρώσεις ιμιπενέμης, στις πληθυσμιακές αναλύσεις, εμφάνιζαν MIC ίση με αυτή των αντίστοιχων κλινικών στελεχών. Αντίθετα, οι υποπληθυσμοί που αναπτύχθηκαν στις υψηλότερες συγκεντρώσεις μεροπενέμης, στις πληθυσμιακές αναλύσεις, από τέσσερα κλινικά στελέχη είχαν MIC ίση με αυτή των κλινικών στελεχών ενώ οι υποπληθυσμοί από τα υπόλοιπα δεκαπέντε κλινικά στελέχη είχαν σταθερά αυξημένη MIC, που ήταν στα όρια της αντοχής στη μεροπενέμη, μετά από επαναλαμβανόμενες καλλιέργειες μίας εβδομάδας. Επίσης, τα δεκατρία στελέχη στις μελέτες time-kill παρουσίασαν εκ νέου ανάπτυξη, ενώ τα υπόλοιπα στελέχη παρουσίασαν ελάττωση σε συνάρτηση με το χρόνο.

Όσον αφορά τους μοριακούς μηχανισμούς στους οποίους μπορεί να οφείλεται η εμφάνιση ετερογενούς φαινότυπου, αυτοί παραμένουν ακόμα αδιευκρίνιστοι. Στις δοκιμασίες PCR που έγιναν, δε βρέθηκαν γονίδια που να εκφράζουν γνωστές καρβαπενεμάσες (εκτός της ενδογενούς *bla*<sub>OXA-51-like</sub> καρβαπενεμάσης), ούτε και στοιχεία εισδοχής που να προκαλούν υπερέκφραση του γονιδίου *bla*<sub>OXA-51-like</sub>. Στη μελέτη πρωτεϊνών εξωτερικής μεμβράνης δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στη σύσταση της μεμβράνης μεταξύ των κλινικών στελεχών και των αντίστοιχων υποπληθυσμών, που αναπτύχθηκαν τόσο παρουσία ιμιπενέμης όσο και παρουσία μεροπενέμης. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε απώλεια καμίας εκ των πρωτεϊνών που φαίνεται να σχετίζονται με εμφάνιση αντίστασης στις καρβαπενέμες, τόσο στα κλινικά στελέχη, όσο και στους ετερογενείς υποπληθυσμούς.

Τέλος, στις πειραματικές λοιμώξεις παρατηρήθηκε πως οι ετερογενείς υποπληθυσμοί είχαν μικρότερη λοιμογόνο δύναμη, σε σύγκριση με τα κλινικά στελέχη. Αυτά τα αποτελέσματα πιθανόν να αντανakλούν το βιολογικό κόστος που προκαλείται από τις μεταλλάξεις που σχετίζονται με την έκφραση του ετερογενούς φαινότυπου, στη μεροπενέμη. Η έκβαση των λοιμώξεων που προκλήθηκαν, δε φάνηκε να σχετίζεται με τη



δόση της μεροπενέμης που δόθηκε ως θεραπεία, ακόμα και σε όσες οφείλονταν στους υποπληθυσμούς με σταθερή ετερογένεια, υποδηλώνοντας των επηρεασμένη λοιμογόνο δύναμη.

Συμπερασματικά, η εμφάνιση ετερογένειας σε ευαίσθητα στις καρβαπενέμες, *A. baumannii*, αποτελεί ένα φαινόμενο που μπορεί να είναι αντιστρεπτό σε ορισμένα στελέχη ή και μόνιμο, όταν πιθανώς να σχετίζεται με μεταλλάξεις στο γονιδίωμά τους. Ωστόσο, η κλινική σημασία του φαινομένου αυτού παραμένει άγνωστη. Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, υποδεικνύουν πως η ετερογενούς ανάπτυξη των *A. baumannii*, παρουσία καρβαπενεμών, παίζει αμφιλεγόμενο ρόλο στην εξέλιξη της λοίμωξης. Η λοιμογόνος δύναμη των φαινομενικά ετερογενών υποπληθυσμών είναι μικρότερη από αυτή των κλινικών στελεχών, ενώ το αποτέλεσμα της θεραπείας με μεροπενέμη δε φαίνεται να επηρεάζεται από τις αυξημένες MIC των υποπληθυσμών, στη μεροπενέμη.

***ΑΓΓΛΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ***

Surveillance and control of hospital infections caused by Gram- negative bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Acinetobacter* spp, has been a major concern over the last few years, for the developed countries.

The members of the *Acinetobacter* spp. are ubiquitous in nature and they colonize not only warm and moist surfaces on the human body, such as the mucosa, but also the skin, which is the main contamination source. In hospitals, they colonize areas with moisture and the hands of the staff. The members of the *Acinetobacter* family can exchange genetic material, developing antibiotic resistance and can also live on dry surfaces for a long time, being responsible for the spread of epidemics. The species most frequently encountered in clinical practice are *A. baumannii* and *A. lwoffii*.

Infections caused by *A. baumannii* are a major clinical problem in many European countries since 1980, when it began reporting the first hospital epidemics. *A. baumannii*, besides causing bacteremia, urinary track infections, endocarditis and meningitis, is highly associated with nosocomial pneumonia, in patients with mechanical ventilation.

Carbapenems are the most effective antibiotics for infections caused by *A. baumannii*. In case of carbapenem resistance, alternative treatments are sulbactam alone or in combination with ampicillin, colistin, tigecycline or drug combinations. According to the Infectious Diseases Society of America, *A. baumannii* is one of the most dangerous pathogens (“red alert pathogen”) threatening the capabilities of the antibiotic arsenal.

Heteroresistant phenotype of *A. baumannii* strains was first noticed in 1997, by *Pascual et al.* So far, there are scarce reports of the in vitro and in vivo characteristics of the *A. baumannii* isolates that exhibit heteroresistant phenotype. Herein, are presented the characteristics of *A. baumannii* clinical isolates with phenotypic heterogeneous growth against meropenem and imipenem as well as their infectivity and the meropenem therapeutic efficacy evaluated in neutropenic murine thigh infections.

The MICs of the study isolates for carbapenems were determined by agar dilution method, and the isolates were genotyped by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Population analysis, testing of the stability of the heteroresistant subpopulations, and time-killing assays were performed. PCR assays for genes coding for known class B and D carbapenemases, study of outer membrane protein and experimental infections were also performed.

PFGE analysis discriminated several distinct genotypes among the *A. baumannii* clinical isolates and some of them related with the European clones I and II. All clinical isolates were initially classified as meropenem susceptible to meropenem and imipenem, by agar dilution method (MICs  $\leq$  4mg/liter). However, population analysis assays yielded colonies that grew in the presence of carbapenems at 8 to 32 mg/L for all clinical isolates. After seven daily subcultures, colonies grown in the highest imipenem concentration reversed to low imipenem MICs that were similar to those of the respective clinical isolates (persistence). On the contrary, colonies grown in the highest meropenem concentration exhibited stable meropenem resistance (heteroresistance). In time-kill studies with meropenem, thirteen isolates exhibited substantial regrowth, while the remaining isolates dyed in a time depending manner.

PCR was positive only for the intrinsic bla<sub>OXA-51-like</sub> carbapenemase, while was negative for IS*Abal* elements upstream of the bla<sub>OXA-51-like</sub> carbapenemase gene and also for genes encoding acquired carbapenemases. The study of the outer membrane proteins revealed no differences between the clinical isolates and the heteroresistant subpopulations.

The results of the experimental infections suggested that heterogeneously grown *A. baumannii* subpopulations have lower virulence compared with the clinical isolates. These results probably reflect a fitness cost conferred by mutations related to the

expression of the heterogeneous mode of growth against meropenem. Finally, the infection outcome under meropenem treatment was not correlated with the meropenem MICs, even in stably resistant heterogeneous populations, further suggesting their impaired virulence.

In conclusion, in vitro meropenem exposure may induce phenotypic expression of heteroresistance to *A. baumannii*. This phenomenon is reversible for some isolates (persisters), but could also be permanent when associated with stable changes in genome of *A. baumannii* (heteroresistance). However, the clinical importance of this phenomenon remains unknown. Our results indicate that the effect of the meropenem heterogeneous growth to the infectious process seems to be equivocal, as the virulence of the heterogeneous isolates is lower than that of the clinical isolates, while the meropenem treatment outcome seems not to be affected due to the elevated meropenem MICs.

## ***ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ***

1. Monterrubio-Villar J., C. González-Velasco, 407 S. Valdezate-Ramos, A. Córdoba-López, P. Villalón-Panzano, and J. A. Saéz-Nieto.. Outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a polyvalent intensive care unit: clinical, epidemiological analysis and PFGE-printing evolution. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2009, 28:1281-1284.
2. Chastre J, Fagon JY.. Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 165: 867-903.
3. Ferrara AM. Potentially multidrug-resistant non-fermentative gram-negative pathogens causing nosocomial pneumonia. *Int J Antimicrob Agents*, 2006, 27: 183-195.
4. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Microbiological, clinical and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev*, 1996, 9: 148-165.
5. Olut AI, Erkek E.. Early prosthetic valve endocarditis due to *Acinetobacter baumannii*: a case report and brief review of the literature. *Scand J Infect Dis*, 2005, 37: 912-921
6. Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H, Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2010, 65:233-238.
7. Turner PJ, Greenhalgh JM., The activity of meropenem and comparators against *Acinetobacter* strains isolated from European hospitals, 1997-2000. *Clin Microbiol Infect*, 2003, 9: 563-567. ,
8. Gales CA, Jones RN, Forward KR, Linares J, Sader HS, Verhoef J., Emerging importance of multidrug-resistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–1999). *Clin Infect Dis*, 2001, 32: S104-S113.

9. Montero A, Ariza J, Corbella X, Domenech A, Cabellos C, Ayats J, Tubau F, Borraz C, Gudiol F. , Antibiotic combinations for serious infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a mouse pneumonia model. *J Antimicrob Chemother*, 2004, 54: 1085-1091
10. Li J, Nation RL, Milne RW, Turnidge JD, Coulthard K., Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents*, 2005, 25: 11-25
11. Insa R, Cercenado E, Goyanes MJ, Morente A, Bouza E., In vitro activity of tigecycline against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother*, 2007, 59:583-585
12. Ozbek B, Otük G, In vitro activities of tigecycline alone and in combination with colistin sulfate or sulbactam against carbapenem susceptible and -resistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated from Intensive Care Units. *Int J Antimicrob Agents*. 2010, 36(2):191-2.
13. Rahal JJ. Novel antibiotic combinations against infections with almost completely resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clinical Infectious Diseases*, 2006, 43: 95-99.
14. Poirel L, Nordmann P., Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect*, 2006, 12:826-836.
15. Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J., Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*, 2007, 59:1210-1215.
16. Pascual A., Martinez-Martinez L, Clavijo M. J, García-Perea M. D, Perea E. J, Comparison of three methods of determining the in-vitro susceptibilities of *Acinetobacter baumannii* isolates to imipenem. *J. Antimicrob. Chemother*, 1997, 40:742–743.



17. Pournaras, S, Ikonomidis A., Markogiannakis A., Maniatis A., Tsakris A, Heteroresistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. J. Antimicrob. Chemother, 2005, 55:1055–1056.
18. Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, Moore LH, Moore WEC, Murray RGE, Stackebrandt E, Starr MP, Truper HG, Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics., Int J Syst Bacteriol, 1987, 37: 463-464.
19. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev. 2008 Jul;21(3):538-82.
20. Brisou, J., and A. R. Prevot. 1954. Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Achromobacter* group. Ann. Inst. Pasteur (Paris) 86:722–728.
21. Baumann, P., M. Doudoroff, and R. Y. Stanier., A study of the *Moraxella* group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). J. Bacteriol., 1968, 95:1520–1541.
22. Lessel EF, Minutes of the Subcommittee on the Taxonomy of *Moraxella* and Allied Bacteria., Int J Syst Bacteriol, 1971, 21: 213-214.
23. Bergogne-Berezin E, Towner KJ, *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Microbiological, clinical and epidemiological features., C;in Microbiol Rev, 1996, 9: 148-165.
24. Rossau R., Landschoot A, Gillis M, Ley J. Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms. Int. J. Syst. Bacteriol. ,1991, 41:310–319.
25. Bouvet PJ, Grimont PA. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov., and emended description of

*Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1986, 36:228–240.

26. Bouvet PJ, Jeanjean S, Delineation of new proteolytic genomic species in the genus *Acinetobacter*. *Res. Microbiol*, 1989, 140:291–299.

27. Nishimura Y, Ino T, Iizuka H., *Acinetobacter radioresistens* sp. nov. isolated from cotton and soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1988, 38:209–211.

28. Tjernberg I, Ursing J, Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. *APMIS* , 1989, 97:595–605..

29. Nemeč A, Baere T, Tjernberg I, Vaneechoutte M, Reijden TJ, Dijkshoorn L, *Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 2001, 51:1891–1899.

30. Nemeč A, Dijkshoorn L, Cleenwerck I, Baere T, Janssens D, Reijden TJ, Jezek P, Vaneechoutte M., *Acinetobacter parvus* sp. nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 2003, 53:1563–1567.

31. Carr EL, Kampf P, Patel BK, Gurtler V, Seviour RJ. Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 2003, 53:953–963.

32. Gerner-Smidt P., Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, 30:2680–2685.

33. Gerner-Smidt P, Tjernberg I, Ursing J., Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *J. Clin. Microbiol.*, 1991, 29:277–282.

34. Nemeč A, Krizova L, Maixnerova M, van der Reijden TJ, Deschaght P, Passet V, Vaneechoutte M, Brisse S, Dijkshoorn L. 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). *Res Microbiol.* 2011,162: 393-404.
35. Baumann P., Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. *J. Bacteriol.* 1968, 96:39–42.
36. Fournier PE, Richet H., The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin. Infect. Dis.*, 2006, 42:692– 699.
37. Berlau J, Aucken H, Malnick H, Pitt T., Distribution of *Acinetobacter* species on skin of healthy humans. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis.*, 1999, 18:179–183.
38. Seifert H, Baginski R, Schulze A, Pulverer G., The distribution of *Acinetobacter* species in clinical culture materials. *Zentralbl. Bakteriol.*, 1993, 279:544–552.
39. Seifert H., Strate A, Schulze A, Pulverer G., Bacteremia due to *Acinetobacter* species other than *Acinetobacter baumannii*. *Infection*, 1994, 22:379– 38.
40. Seifert H., Dijkshoorn H, Gerner-Smidt P, Pelzer N, Tjernberg I, Vaneechoutte M., Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, 35:2819–2825.
41. Dijkshoorn L., Aken E, Shunburne L, Reijden TJ, Bernards AT, Nemec A, Towner KJ. Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter* spp. in faecal samples from non-hospitalised individuals. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2005, 11:329–332.
42. Juni E. Interspecies transformation of *Acinetobacter*: genetic evidence for a ubiquitous genus. *J. Bacteriol.* 1972, 112:917–931.
43. Jawad A., Hawkey PM, Heritage J, Snelling AM. Description of Leeds *Acinetobacter* medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important *Acinetobacter* spp., and comparison with Herellea agar and Holton’s agar. *J. Clin. Microbiol.*, 1994, 32: 2353–2358..

44. Bouvet PJ, Grimont PA. Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol*, 1987, 138: 569–578..
45. Ling TK, Tam PC, Liu ZK, Cheng AF., Evaluation of VITEK 2 rapid identification and susceptibility testing system against gram-negative clinical isolates., *J Clin Microbiol*. 2001, 39: 2964-6.
46. Bernards AT, Dijkshoorn L, Toorn J, Bochner BR, Boven CP., Phenotypic characterisation of *Acinetobacter* strains of 13 DNA-DNA hybridisation groups by means of the biolog system. *J. Med. Microbiol.*, 1995, 42: 113–119.
47. Bernards, AT., Toorn J, Boven CP, Dijkshoorn L., Evaluation of the ability of a commercial system to identify *Acinetobacter* genomic species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1996, 15: 303–308.
48. Horrevorts A., Bergman K, Kollee L, Breuker I, Tjernberg I, Dijkshoorn L., Clinical and epidemiological investigations of *Acinetobacter* genomospecies 3 in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.*, 1995, 33: 1567–1572.
49. Ochman H, Lerat E, Daubin V.S, Examining bacterial species under the specter of gene transfer and exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 3;102.
50. Dijkshoorn L., Aucken HM, Gerner-Smidt P, Kaufmann ME, Ursing J, Pitt TL., Correlation of typing methods for *Acinetobacter* isolates from hospital outbreaks. *J. Clin. Microbiol*, 1993, 31: 702–705.
51. Lim YM., Shin KS, Kim J. Distinct antimicrobial resistance patterns and antimicrobial resistance-harboring genes according to genomic species of *Acinetobacter* isolates. *J. Clin. Microbiol*, 2007., 45: 902–905.
52. Seifer H., Gerner-Smidt P., Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Acinetobacter* isolates., *J. Clin. Microbiol.*, 1995, 33:1402–1407.

53. Vaneechoutte M., Dijkshoorn L, Tjernberg I, Elaichouni A, Vos P, Claeys G, Verschraegen G., Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis., *J. Clin. Microbiol.*, 1995, 33: 11–15.
54. Janssen P, Maquelin K, Coopman R, Tjernberg I, Bouvet P, Kersters K, Dijkshoorn L., Discrimination of *Acinetobacter* genomic species by AFLP fingerprinting. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1997, 47: 1179–1187.
55. Ehrenstein B, Bernards AT, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Towner KJ, Bouvet PJ, Daschner PD, Grundmann H. *Acinetobacter* species identification by using tRNA spacer fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.*, 1996, 34: 2414–2420.
56. Dolzani L., Tonin E, Lagatolla C, Prandin L, Monti-Bragadin C., Identification of *Acinetobacter* isolates in the *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenicspacer sequences. *J. Clin. Microbiol.*, 1995, 33:1108–1113.
57. Chang HC, Wie YF, Dijkshoorn L, Vaneechoutte M, Tang CT, Chang TC. Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43: 1632–1639.
58. La Scola B., Gundi VA, Khamis A, Raoult D. Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, 44:827–832.
59. Vaneechoutte M, Dijkshoorn L, Tjernberg I, Elaichouni A, de Vos P, Claeys G, Verschraegen G. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *J Clin Microbiol.* 1995 33: 11-5.

60. García-Arata MI, Gerner-Smidt P, Baquero F, Ibrahim A. PCR-amplified 16S and 23S rDNA restriction analysis for the identification of *Acinetobacter* strains at the DNA group level. *Res Microbiol.* 1997 ;148: 777-84.
61. Chang HC, Wei YF, Dijkshoorn L, Vaneechoutte M, Tang CT, Chang TC. Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region. *J Clin Microbiol.* 2005, 43: 1632-9.
62. Gerner-Smidt P. Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *J Clin Microbiol.* 1992, 30: 2680-5.
63. Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MA, Wisplinghoff H, Rodríguez-Valera F. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* 2005, 43: 4382-90.
64. Diancourt L, Passet V, Nemeš A, Dijkshoorn L, Brisse S. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS ONE* 2010; 5: e10034.
65. Turton JF, Gabriel SN, Valderrey C, Kaufmann ME, 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: 807-15.
66. Perez F., Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007, 51: 3471–3484.
67. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 2006, 12: 826– 836.
68. Bou G., Cervero G, Dominguez MA, Quereda C, Martinez- Beltran J. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter*

baumannii strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of beta-lactamases. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38: 3299–3305.

69. Fernandez-Cuenca F, Martinez-Martinez L, Conejo MC, Ayala JA, Perea EJ, Pascual A. Relationship between beta-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.

70. 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.

71. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980, 16;289: 321-31.

72. Jaurin B, Grundström T. ampC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of beta-lactamases of the penicillinase type. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981, 78: 4897-901.

73. Ouellette M, Bissonnette L, Roy PH. Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1 beta-lactamase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987, 84: 7378-82.

74. Hall BG, Barlow M. Revised Ambler classification of {beta}-lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 2005, 55: 1050-1.

75. Bush K. Classification of beta-lactamases: groups 1, 2a, 2b, and 2b'. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989, 33: 264-70.

76. Bush K. Classification of beta-lactamases: groups 2c, 2d, 2e, 3, and 4. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989, 33: 271-6.

77. Poirel L, Naas T, Guibert M, Chaibi EB, Labia R, Nordmann P. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999, 43: 573-81.
78. Carbonne A., Naas T, Blanckaert K, Couzigou C, Cattoen C, Chagnon JL, Nordmann P, Astagneau P. Investigation of a nosocomial outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a hospital setting. *J. Hosp. Infect.*, 2005, 60: 14–18.
79. Naas T., Bogaerts P, Bauraing C, Degheldre Y, Glupczynski Y, Nordmann P. Emergence of PER and VEB extended-spectrum betalactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2006, 58: 178–182.
80. Naas T., Coignard B, Carbonne A, Blanckaert K, Bajolet O, Bernet C, Verdeil X, Astagneau P, Desenclos J, Nordmann P. VEB-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* France. *Emerg. Infect. Dis.* 2006, 12: 1214–1222.
81. Pasteran F., Rapoport M, Petroni A, Faccone D, Corso A, Galas M, Vazquez M, Procopio A, Tokumoto M, Cagnoni V. Emergence of PER-2 and VEB-1a in *Acinetobacter baumannii* strains in the Americas. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006, 50: 3222–3224.
82. Poirel L., Menuteau O, Agoli N, Cattoen C, Nordmann P. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41: 3542–3547.
83. Vahaboglu H, Coskuncan F, Tansel O, Ozturk R, Sahin N, Koksali I, Kocazeybek B, Tatman-Otkun M, Leblebicioglu H, Ozinel MA, Akalin H, Kocagoz S, Korten V Clinical importance of extended-spectrum beta-lactamase (PER-1-type)-producing *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J Med Microbiol.* 2001, 50: 642-5.



84. Hujer KM., Hujer AM, Hulten EA , Bajaksouzian S, Adams JM , Donskey CJ, Ecker DJ, Massire C, Eshoo MW, Sampath R, Thomson JM, Rather PM, Craft DW, Fishbain JT, Ewell AJ, Jacobs MR, Paterson DL, Bonomo RA. Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006, 50: 4114–4123.
85. Naas T., Nordmann P, Heidt A, Intercountry transfer of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* from Romania. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2007, 29: 226–228.
86. Poirel L., Karim A, Mercat A, Thomas I, Vahaboglu H, Richard C, Nordmann P. Extended-spectrum beta-lactamase-producing strain of *Acinetobacter baumannii* isolated from a patient in France. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1999, 43: 157–158.
87. Vahaboglu H., Ozturk R, Aygun G, Coskuncan F, Yaman A, Kaygusuz A, Leblebicioglu H, Balik I, Aydin K, Otkun M. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997, 41: 2265- 2269.
88. Yong D., Shin J.H., Kim S, Lim Y, Yum YH, Lee K, Chong Y, Bauernfeind A. High prevalence of PER-1 extended-spectrum betalactamase producing *Acinetobacter* spp. in Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003, 47:1749–1751.
89. Girlich D., Naas T, Leelaporn A, Poirel L, Fennewald M, Nordmann P. Nosocomial spread of the integron-located *veb-1*-like cassette encoding an extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Thailand. *Clin. Infect. Dis.* 2002, 34:603–611.

90. Poirel L., Cabanne L, Vahaboglu H, Nordmann P. Genetic environment and expression of the extended-spectrum beta-lactamase bla PER-1 gene in gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005. 49: 1708–1713.
91. Walsh TR, Bolmström A, Qwörnström A, Gales A, Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing. *J Clin Microbiol.* 2002, 40: 2755-9.
92. Chu YM , Afzal-Shah M, Houang ET, Palepou MI, Lyon DJ, Woodford N, Livermore DM., IMP-4, a novel metallo-beta-lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001,45: 710–714.
93. Cornaglia G., Riccio ML, Mazzariol A, Lauretti L, Fontana R, Rossolini GM. Appearance of IMP-1 metallo-beta-lactamase in Europe. *Lancet*, 1999, 353: 899–900.
94. Da Silva GJ, Correia M, Vital C, Ribeiro G, Sousa JS, Leitao R, Peixe L, Duarte A. Molecular characterization of bla(IMP-5), a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2002, 215: 33–39.
95. 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.
96. Houang ET, Chu YW, Lo WS, Chu KY, Cheng AF. Epidemiology of rifampin ADP-ribosyltransferase (arr-2) and metallo-beta-lactamase (blaIMP-4) gene cassettes in class 1 integrons in *Acinetobacter* strains isolated from blood cultures in 1997 to 2000. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003, 47:1382–1390.

97. Tsakris A., Ikonomidis A, Pournaras S, Tzouveleki LS, Sofianou D, Legakis NJ, Maniatis AN. VIM-1 metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Emerg. Infect. Dis.* 2006, 12: 981– 983.
98. Lee K., Lee WG, Uh Y, Ha GY, Cho J, Chong Y. VIM- and IMP-type metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean hospitals. *Emerg. Infect. Dis.* 2003, 9: 868–871.
99. 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.
100. Lee K., Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, Rossolini GM, Chong Y. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla(SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, 49:4485–4491.
101. Canduela MJ, Gallego L, Sevillano E, Valderrey C, Calvo F, Perez J. Evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates obtained from elderly patients with respiratory tract infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006, 57: 1220– 1222.
102. Koh TH, Sng LH, Wang GC, Hsu LY, Zhao Y. IMP-4 and OXA beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Singapore. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007, 59: 627– 632.
103. Peleg AY, Franklin C, Walters LJ, Bell JM, Spelman DW. OXA-58 and IMP-4 carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases in an *Acinetobacter junii* blood culture isolate from Australia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006, 50: 399–400.
104. Gu B, Tong , Zhao W, Liu G, Ning , Pan S, Zhao W. Prevalence and characterization of class I integrons among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter*

baumannii isolates from patients in Nanjing, China. *J. Clin. Microbiol.* 2007, 45: 241–243.

105. Walsh TR., Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallobeta -lactamases: the quiet before the storm? *Clin. Microbiol. Rev.* 2005, 18: 306– 325.

106. Loli A, Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Carattoli A, Vatopoulos AC, Tassios PT, Miriagou V. Sources of diversity of carbapenem resistance levels in *Klebsiella pneumoniae* carrying blaVIM-1. *J Antimicrob Chemother.* 2006, 58: 669-72.

107. Perilli M, Felici A, Oratore A, Cornaglia G, Bonfiglio G, Rossolini GM, Amicosante G. Characterization of the chromosomal cephalosporinases produced by *Acinetobacter lwoffii* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996, 40: 715–719.

108. Hujer KM, Hamza NS, Hujer AM, Perez F, Helfand MS, Bethel CR, Thomson JM, Anderson VE, Barlow M, Rice LB, Tenover FC, Bonomo RA. 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.

109. Bou G, Martinez-Beltran J. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000, 44: 428–432.

110. Ruiz M, Marti S, Fernandez-Cuenca F, Pascual A, Vila J, Prevalence of IS(Aba1) in epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *FEMS Microbiol. Lett.* 2007, 274: 63–66.

111. Heritier C, Poirel L, Nordmann P. Cephalosporinase overexpression resulting from insertion of ISAba1 in *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect.* 2006, 12: 123–130.

112. Corvec S, Caroff N, Espaze E, Giraudeau C, Drugeon H, Reynaud A, AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003, 52: 629–635.
113. Segal H, Nelson EC, Elisha BG. Genetic environment and transcription of ampC in an *Acinetobacter baumannii* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48: 612–614.
114. Paton R., Miles RS, Hood J, Amyes SG. ARI-1:  $\beta$ -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 1993, 2: 81–88.
115. Donald HM, Scaife W, Amyes SG, Young HK. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000, 44: 196–199.
116. Scaife W, Young HK, Paton RH, Amyes SG. Transferable imipenem-resistance in *Acinetobacter* species from a clinical source. *J. Antimicrob. Chemother.* 1995, 36: 585–586.
117. Boo TW, Walsh F, Crowley B. First report of OXA-23 carbapenemase in clinical isolates of *Acinetobacter* species in the Irish Republic. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006, 58: 1101–1102.
118. Zhou H, Pi BR, Yang Q, Yu YS, Chen YG, Li LG, Zheng SS. Dissemination of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains carrying the ISAbal blaOXA-23 genes in a Chinese hospital. *J. Med. Microbiol.* 2007, 56: 1076–1080.
119. Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, 45: 583–588.

120. Brown S, Amyes S. OXA (beta)-lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006, 57: 1–3.
121. Bertini Ad, Giordano A, Varesi P, Villa L, Mancini C, Carattoli A. First report of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter baumannii* isolates in Italy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006, 50: 2268–2269.
122. Bogaerts P, Naas T, Wybo I, Bauraing C, Soetens O, Pierard D, Nordmann P, Glupczynski Y. Outbreak of infection by carbapenem -resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-58 in Belgium. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 44: 4189–4192
123. Poirel L, Marque S, Heritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordmann P. OXA-58, a novel class D -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, 49: 202–208.
124. Marque S, Poirel L, Heritier C, Brisse S, Blasco MD, Filip R, Coman G, Naas T, Nordmann P. Regional occurrence of plasmidmediated carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter* spp. in Europe. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43: 4885–4888.
125. Coelho J, Woodford N, Afzal-Shah M, Livermore D. Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter* spp. collected over 10 years in three continents. *Antimicrob. Agents Chemother. J Antimicrob Chemother.* 2006 Sep;58(3):669-72.
126. 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.
127. Heritier C, Poirel L, Aubert D, Nordmann P. Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzi oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003, 47 :268–273.

128. Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, Pitt TL. The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2006, 258: 72–77.
129. Heritier C, Poirel L, Fournier PE, Claverie JM, Raoult D, Nordmann P. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, 49: 4174–4179.
130. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile betalactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 2007, 20: 440–458.
131. 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.
132. Poirel L, Lebessi E, Heritier C, Patsoura A, Foustoukou M, Nordmann P. Nosocomial spread of OXA-58-positive carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in a paediatric hospital in Greece. *Clin. Microbiol. Infect.* 2006, 12:1138–1141.
133. Giordano A, Varesi P, Bertini A, Villa L, Dionisi AM, Venditti M, Carfagna P, Luzzi I, Mancini C, Carattoli A. Outbreak of *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in Rome, Italy. *Microb. Drug Resist.* 2007, 13: 37–43.
134. Segal H, Garny S, Elisha BG. Is IS(ABA-1) customized for *Acinetobacter*? *FEMS Microbiol. Lett.*, 2005, 243: 425–429.
135. Costa SF, Woodcock J, Gill M, Wise R, Barone AA, Caiaffa H, Levfrom AS. Outer-membrane proteins pattern and detection of betalactamases in clinical isolates of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2000, 13: 175–182.

136. del Mar Tomas M, Beceiro A, Perez a, Velasco D, Moure R, Villanueva R, Martinez-Beltran J, Bou G. Cloning and functional analysis of the gene encoding the 33- to 36-kilodalton outer membrane protein associated with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, 49: 5172–5175.
137. 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.
138. Heritier C, Poirel L, Lambert T, Nordmann P. Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, 49: 3198–3202.
139. 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.
140. 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.
141. Gehrlein M, Leying H, Cullmann W, Wendt S, Opferkuch W. Imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* is due to altered penicillinbinding proteins. *Chemotherapy*, 1991, 37: 405–412.
142. Obara M, Nakae T. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 1991, 28: 791–800.
143. Siroy A, Cosette P, Seyer D, Lemaitre-Guillier C, Vallenet D, Dorselaer A, Boyer-Mariotte S, Jouenne T, De E. Global comparison of the membrane subproteomes between a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain and a reference strain. *J. Proteome Res.* 2006, 5: 3385–3398.



144. Catel-Ferreira M, Coadou G, Molle V, Mugnier P, Nordmann P, Siroy A, Jouenne T, Dé E. Structure-function relationships of CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 2011, 66: 2053-6.
145. Fernández Cuenca F, Sánchez Mdel C, Caballero-Moyano FJ, Vila J, Martínez-Martínez L, Bou G, Baño JR, Pascual A. Prevalence and analysis of microbiological factors associated with phenotypic heterogeneous resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 2012, 39, 472-7.
146. Siroy A., Molle V, Lemaitre-Guillier C, Vallenet D, Pestel-Caron M, Cozzone AJ, Jouenne T, De E. Channel formation by CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, 49: 4876–4883.
147. 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 beta-barrel outer membrane proteins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, 49: 1432–1440.
148. Fernando D, Kumar A., Growth phase-dependent expression of RND efflux pump- and outer membrane porin-encoding genes in *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606. *J Antimicrob Chemother.* 2012, 67: 569-72.
149. Clark RB, Imipenem resistance among *Acinetobacter baumannii*: association with reduced expression of a 33–36 kDa outer membrane protein. *J. Antimicrob. Chemother.* 1996, 38: 245–251.
150. Dupont M.J, Pages M, Lafitte D, Siroy A, Bollet C. Identification of an OprD homologue in *Acinetobacter baumannii*. *J. Proteome Res.* 2005, 4: 2386–2390.

151. Fournier PE, Vallenet D, Barbe V, Audic S, Ogata H, Poirel L, Richet H, Robert C, Mangenot S, Abergel C, Nordmann P, Weissenbach J, Raoult D, Claverie JM. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet.* 2006, 2:e7.
152. 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.
153. Chau SL, Chu YW, Houang ET. Novel resistance-nodulation-cell division efflux system AdeDE in *Acinetobacter* genomic DNA group 3. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48: 4054–4055.
154. 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.
155. Gordon E, Mouz N, Duée E, Dideberg O., The crystal structure of the penicillin-binding protein 2x from *Streptococcus pneumoniae* and its acyl-enzyme form: implication in drug resistance. *J Mol Biol.* 2000, 2;299: 477-85.
156. Cayo R, Rodríguez M, Espinal P, Fernández-Cuenca F, Ocampo-Sosa A, Pascual A, Ayala J, Vila J, Martínez-Martínez L, Analysis of Genes Encoding for Penicillin-Binding Proteins in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011, 55: 5907-13.)
157. Nemec A, Dolzani L, Brisse S, Broek P, Dijkshoorn L. Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. *J. Med. Microbiol.* 2004, 53: 1233–1240.

158. Riccio ML, Franceschini N, Boschi L, Caravelli B, Cornaglia G, Fontana R, Amicosante G, Rossolini GM. Characterization of the metallo-beta-lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC- 54/97 reveals the existence of bla(IMP) allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000, 44: 1229– 1235.
159. Seward RJ, Lambert T, Towner KJ. Molecular epidemiology of aminoglycoside resistance in *Acinetobacter* spp. *J. Med. Microbiol.* 1998, 47: 455–462.
160. Zarrilli R., Crispino M, Bagattini M, Barretta E, Di Popolo A, Triassi M, Villari P. Molecular epidemiology of sequential outbreaks of *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit shows the emergence of carbapenem resistance. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42: 946–953.
161. Nemec A, Dolzani L, Brisse S, Broek P, Dijkshoorn P. Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. *J. Med. Microbiol.* 2004, 53: 1233–1240.
162. 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.
163. Lee H, Yong D, Yum JH, Roh KH, Lee K, Yamane K, Arakawa Y, Chong Y. Dissemination of 16S rRNA methylase-mediated highly amikacin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Korea. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2006, 56: 305–312.
164. Yamane K, Wachino J, Doi Y, Kurokawa H, Arakawa Y. Global spread of multiple aminoglycoside resistance genes. *Emerg. Infect. Dis.* 2005, 11: 951– 953.

165. Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin. Infect. Dis.* 2007, 45: 88–94.
166. Su XZ, Chen J, Mizushima T, Kuroda T, Tsuchiya T. AbeM, an H<sub>2</sub>-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, 49: 4362–4364.
167. 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.
168. Seward R.J, Towner KJ. Molecular epidemiology of quinolone resistance in *Acinetobacter* spp. *Clin. Microbiol. Infect.* 1998, 4: 248–254.
169. Vila J, Ruiz J, Goni P, Jimenez de Anta T. Quinolone resistance mutations in the topoisomerase IV *parC* gene of *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 1997, 39: 757–762.
170. 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.
171. Fluit AC, Florijn A, Verhoef J, Milatovic D. Presence of tetracycline resistance determinants and susceptibility to tigecycline and minocycline. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, 49: 1636–1638.
172. 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.
173. 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.* 2003, 52: 477–480.

174. Ribera A, Ruiz J, Vila J. Presence of the Tet M determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003, 47: 2310–2312.
175. 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.
176. Van Looveren M, Goossens H. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2004, 10: 684–704.
177. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin. Microbiol. Rev.* 1996, 9: 148–165.
178. Fournier PE, Richet H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin. Infect. Dis.* 2006, 42: 692– 699.
179. Villegas MV, Hartstein AI. *Acinetobacter* outbreaks, 1977– 2000. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2003, 24: 284–295.
180. Coelho JM, Turton JF, Kaufmann ME, Glover J, Woodford N, Warner M, Palepou MF, Pike R, Pitt TL, Patel BC, Livermore DM. Occurrence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones at multiple hospitals in London and Southeast England. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 44: 3623–3627.
181. Turton JF, Kaufmann ME, Warner M, Coelho J, Dijkshoorn L, Reijden T, Pitt TL. A prevalent, multiresistant clone of *Acinetobacter baumannii* in Southeast England. *J. Hosp. Infect.*, 2004, 58: 170–179.
182. Dijkshoorn L, Aucken H, Gerner-Smidt P, Janssen P, Kaufmann ME, Garaizar J, Ursing J, Pitt TL. Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34: 1519–1525.

183. Nemeč A, Dijkshoorn L, Reijden T. 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.
184. van Dessel H, Dijkshoorn L, Reijden T, Bakker N, Paauw A, Broek PJ, Verhoef J, Brisse S. Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. *Res. Microbiol.* 2004, 155: 105–112.
185. Dobrewski R., Savov E, Bernards AT, Barselaar M, Nordmann P, Broek PJ, Dijkshoorn L. Genotypic diversity and antibiotic susceptibility of *Acinetobacter baumannii* isolates in a Bulgarian hospital. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2006, 12: 1135–1137.
186. Go ES, Urban C, Burns J, Kreiswirth B, Eisner W, Mariano N, Mosinka-Snipas K, Rahal JJ. Clinical and molecular epidemiology of acinetobacter infections sensitive only to polymyxin B and sulbactam. *Lancet*, 1994, 344: 1329–1332.
187. Gaynes R, Edwards JR. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin. Infect. Dis.*, 2005, 41: 848–854.
188. CDC. *Acinetobacter baumannii* infections among patients at military medical facilities treating injured U.S. service members, 2002–2004. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 2004, 53: 1063–1066.
189. Davis KA, Moran KA, McAllister CK, Gray PJ. Multidrug-resistant *Acinetobacter* extremity infections in soldiers. *Emerg. Infect. Dis.*, 2005, 11: 1218–1224.
190. Murray CK, Roop SA, Hospenthal DR, Dooley DP, Wenner K, Hammock J, Taufen N, Gourdi E. Bacteriology of war wounds at the time of injury. *Mil. Med.*, 2006, 171: 826–829.
191. Scott P, Deye G, Srinivasan A, Murray C, Moran K, Hulten E, Fishbain J, Craft D, Riddell S, Lindler L, Mancuso J, Milstrey E, Bautista CT, Patel J, Ewell A, Hamilton T, Gaddy C, Tenney M, Christopher G, Petersen K, Endy T, Petrucci B. An outbreak of

multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex infection in the US military health care system associated with military operations in Iraq. *Clin. Infect. Dis.*, 2007, 44: 1577–1584.

192. Turton JF, Kaufmann ME, Gill MJ, Pike R, Scott PT, Fishbain J, Craft D, Deye G, Riddell S, Lindler LE, Pitt TL. 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.

193. Unal S, Garcia-Rodriguez JA, Activity of meropenem and comparators against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. isolated in the MYSTIC Program, 2002–2004. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2005, 53: 265–271.

194. Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HA, Castro ME, Stier CJ, Bragagnolo KL, Rea-Neto A, Pentead-Filho SR, Livermore DM, Woodford N. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, 41: 3403–3406.

195. Villegas MV, Kattan JN, Correa A, Lolans K, Guzman AM, Woodford N, Livermore D, Quinn JP. Dissemination of *Acinetobacter baumannii* clones with OXA-23 carbapenemase in Colombian hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2007, 51: 2001–2004.

196. Coelho J, Woodford N, Afzal-Shah M, Livermore D. Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter* spp. collected over 10 years in three continents. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006, 50: 756–758.

197. Brink A, Moolman J, Silva MC, Botha M. Antimicrobial susceptibility profile of selected bacteraemic pathogens from private institutions in South Africa. *S. Afr. Med. J.*, 2007, 97: 273–279.

198. Abbo A, Navon-Venezia S, Hammer-Muntz O, Krichali T, Siegman-Igra Y, Carmeli Y. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Emerg. Infect. Dis.*, 2005, 11: 22–29.
199. Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, 45: 583–588.
200. Chan PC, Huang LM, Lin HC, Chang LY, Chen ML, Lu CY, Lee PI, Chen JM, Lee CY, Pan HJ, Wang JT, Chang SC, Chen YC. Control of an outbreak of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* colonization and infection in a neonatal intensive care unit. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2007, 28: 423–429.
201. Anstey NM, Currie BJ, Hassell M, Palmer D, Dwyer B, Seifert H. Community-acquired bacteremic *Acinetobacter pneumonia* in tropical Australia is caused by diverse strains of *Acinetobacter baumannii*, with carriage in the throat in at-risk groups. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40: 685–686.
202. Anstey NM, Currie BJ, Withnall KM. Community-acquired *Acinetobacter pneumonia* in the Northern Territory of Australia. *Clin. Infect. Dis.* 1992, 14: 83–91.
203. Riley TV, Webb SA, Cadwallader H, Briggs BD, Christiansen L, Bowman RA. Outbreak of gentamicin-resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit: clinical, epidemiological and microbiological features. *Pathology*, 1996, 28: 359–363.
204. Valenzuela JK, Thomas L, Partridge SR, Reijden T, Dijkshoorn L, Iredell J. Horizontal gene transfer in a polyclonal outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.*, 2007, 45: 453–460.
205. Iredell J, Thomas L, Power D, Mendes E. Tigecycline resistance in Australian antibiotic-resistant gram-negative bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007, 59: 816–818.



206. Maniatis AN, Pournaras S, Orkopoulou S, Tassios PT, Legakis NJ, Bacterial Resistance Study Group. Multi-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in intensive care units in Greece. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 547–53.
207. Tsakris A, Tsioni C, Pournaras S, Polyzos S, Maniatis AN, Sofianou D. Spread of low-level carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones in a tertiary care Greek hospital. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 1046–7.
208. Pournaras S, Markogiannakis A, Ikonomidis A, Kondyli L, Bethimouti K, Maniatis AN, Legakis NJ, Tsakris A. Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 557–61.
209. Markogiannakis A, Fildisis G, Tsiplakou S, Ikonomidis A, Koutsoukou A, Pournaras S, Manolis EN, Baltopoulos G, Tsakris A. Cross-transmission of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal strains causing episodes of sepsis in a trauma intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008; 29: 410–7.
210. 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: 2767-72.
211. Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Fernandez-Hinojosa E, Aldabo-Pallas T, Cayuela A, Marquez-Vacaro JA, Garcia-Curiel A, Jimenez-Jimenez FJ. *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia: epidemiological and clinical findings. *Intensive Care Med*. 2005, 31: 649–655.
212. Bick JA, Semel JD. Fulminant community-acquired *Acinetobacter* pneumonia in a healthy woman. *Clin. Infect. Dis*. 1993, 17:820–821.

213. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin. Infect. Dis.* 2004, 39: 309–317.
214. Seifert H, Strate A, Pulverer G. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*. Clinical features, epidemiology, and predictors of mortality. *Medicine*, 1995, 74: 340–349.
215. Trottier V, Segura PG, Namias N, King D, Pizano LR, Schulman CI. Outcomes of *Acinetobacter baumannii* infection in critically ill burned patients. *J. Burn Care Res.* 2007, 28: 248–254.
216. Johnson EN, Burns TC, Hayda RA, Hospenthal DR, Murray CK. Infectious complications of open type III tibial fractures among combat casualties. *Clin. Infect. Dis.* 2007, 45: 409–415.
217. Petersen K, Riddle MS, Danko JR, Blazes DL, Hayden R, Tasker SA, Dunne JR. Trauma-related infections in battlefield casualties from Iraq. *Ann. Surg.* 2007, 245: 803–811.
218. Metan G, Alp E, Aygen B, Sumerkan B. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: an emerging threat for patients with post-neurosurgical meningitis. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2007, 29: 112–113.
219. Nguyen MH, Harris SP, Muder RR, Pasculle AW. Antibiotic-resistant *Acinetobacter meningitis* in neurosurgical patients. *Neurosurgery*, 1994, 35: 851–855.
220. Nunez ML, Martinez-Toldos MC, Bru M, Simarro E, Segovia M, Ruiz J. Appearance of resistance to meropenem during the treatment of a patient with meningitis by *Acinetobacter*. *Scand. J. Infect. Dis.* 1998, 30: 421–423.
221. O'Neill E, Humphreys H, Phillips J, Smyth EG. Third generation cephalosporin resistance among gram-negative bacilli causing meningitis in neurosurgical patients:

- significant challenges in ensuring effective antibiotic therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006, 57: 356–359.
222. Metan G, Alp E, Aygen B, Sumerkan B. *Acinetobacter baumannii* meningitis in post-neurosurgical patients: clinical outcome and impact of carbapenem resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007, 60: 197–199.
223. Menon T, Shanmugasundaram S, Nandhakumar B, Nalina K, Balasubramaniam. Infective endocarditis due to *Acinetobacter baumannii* complex—a case report. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 2006, 49: 576–578.
224. Olut AI, Erkek E. Early prosthetic valve endocarditis due to *Acinetobacter baumannii*: a case report and brief review of the literature. *Scand. J. Infect. Dis.* 2005, 37: 919–921.
225. Rizos I, Tsiodras S, Papathanasiou S, Rigopoulos A, Barbetseas J, Stefanadis C. Prosthetic valve endocarditis due to *Acinetobacter* spp: a rare case and literature review. *Am. J. Med. Sci.* 2007, 333: 197–199.
226. Starakis I, Blikas A, Siagris D, Marangos M, Karatza C, Bassaris H. Prosthetic valve endocarditis caused by *Acinetobacter lwoffii*: a case report and review. *Cardiol. Rev.* 2006, 14: 45–49.
227. Corrigan KM, Harmis NY, Willcox MD. Association of *Acinetobacter* species with contact lens-induced adverse responses. *Cornea*, 2001, 20: 463–466.
228. Kau HC, Tsai CC, Kao SC, Hsu WM, Liu JH. Corneal ulcer of the side port after phacoemulsification induced by *Acinetobacter baumannii*. *J. Cataract Refract. Surg.* 2002, 28: 895–897.
229. Levy J, Oshry T, Rabinowitz R, Lifshitz T. *Acinetobacter* corneal graft ulcer and endophthalmitis: report of two cases. *Can. J. Ophthalmol.* 2005, 40: 79–82.

230. Lindbohm N, Moilanen JA, Vesaluoma MH, Tervo TM. Acinetobacter and Staphylococcus aureus ulcerative keratitis after laser in situ keratomileusis treated with antibiotics and phototherapeutic keratectomy. *J. Refract. Surg.* 2005, 21: 404–406.
231. Talbot GH, Bradley J, Edwards JE, Gilbert D, Scheld M, Bartlett JG. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 2006, 42: 657–668.
232. Kwon KT, Oh WS, Song JH, Chang HH, Jung SL, Kim SW, Ryu SY, Heo ST, Jung DS, Rhee JY, Shin SY, Ko KS, Peck KR, Lee NY. Impact of imipenem resistance on mortality in patients with Acinetobacter bacteraemia. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007, 59: 525–530.
233. Lin SY, Wong WW, Fung CP, Liu CE, Liu CY. Acinetobacter calcoaceticus-baumannii complex bacteremia: analysis of 82 cases. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 1998, 31: 119–124.
234. Rodriguez-Bano J, Pascual A, Galvez J, Muniain MA, Rios MJ, Martinez-Martinez L, Perez-Cano R, Perea EJ. Acinetobacter baumannii bacteremia: clinical and prognostic features. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2003, 21: 242–247.
235. Brauers J, Frank U, Kresken M, Rodloff AC, Seifert H. Activities of various beta-lactams and beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations against Acinetobacter baumannii and Acinetobacter DNA group 3 strains. *Clin. Microbiol. Infect.* 2005, 11: 24–30.
236. Corbella X, Ariza J, Ardanuy C, Vuelta M, Tubau F, Sora M, Pujol M, Gudiol F. Efficacy of sulbactam alone and in combination with ampicillin in nosocomial infections caused by multiresistant Acinetobacter baumannii. *J. Antimicrob. Chemother.* 1998, 42: 793–802.

237. Higgins PG, Wisplinghoff H, Stefanik D, Seifert H. In vitro activities of the beta-lactamase inhibitors clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam alone or in combination with beta-lactams against epidemiologically characterized multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48: 1586–1592.
238. Levin AS, Levy CE, Manrique AE, Medeiros EA, Costa SF. Severe nosocomial infections with imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* treated with ampicillin/sulbactam. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2003, 21: 58–62.
239. Obana Y, Nishino T. In-vitro and in-vivo activities of sulbactam and YTR830H against *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 1990, 26: 677–682.
240. Williams JD, Lactamase inhibition and in vitro activity of sulbactam and sulbactam/cefoperazone. *Clin. Infect. Dis.* 1997, 24: 494–497.
241. Noguchi JK, Gill MA. Sulbactam: a beta-lactamase inhibitor. *Clin. Pharm.* 1988, 7: 37–51.
242. Levin AS. Multiresistant *Acinetobacter* infections: a role for sulbactam combinations in overcoming an emerging worldwide problem. *Clin. Microbiol. Infect.* 2002, 8: 144–153.
243. Rodriguez-Hernandez MJ, Cuberos L, Pichardo C, Caballero FJ, Moreno I, Jimenez-Mejias ME, Garcia-Curiel A, Pachon J. Sulbactam efficacy in experimental models caused by susceptible and intermediate *Acinetobacter baumannii* strains. *J. Antimicrob. Chemother.* 2001, 47: 479–482.
244. Choi JY, Kim CO, Park YS, Yoon HJ, Shin SY, Kim YK, Kim MS, Kim YA, Song YG, Yong D, Lee K, Kim JM. Comparison of efficacy of cefoperazone/sulbactam and imipenem/cilastatin for treatment of *Acinetobacter* bacteremia. *Yonsei Med. J.* 2006, 47: 63–69.

245. Cisneros JM, Reyes MJ, Pachon J, Becerril B, Caballero FJ, Garcia-Garmendia JL, Ortiz C, Cobacho AR. Bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical findings, and prognostic features. *Clin. Infect. Dis.* 1996, 22: 1026–1032
246. Jellison TK, McKinnon PS, Rybak MJ. Epidemiology, resistance, and outcomes of *Acinetobacter baumannii* bacteremia treated with imipenem-cilastatin or ampicillin-sulbactam. *Pharmacotherapy*, 2001, 21: 142– 148.
247. Jimenez-Mejias ME, Pachon J, Becerril B, Palomino-Nicas J, Rodriguez-Cobacho J, Revuelta M. Treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* meningitis with ampicillin/sulbactam. *Clin. Infect. Dis.* 1997, 24: 932–935.
248. Sader HS, Jones RN. Comprehensive in vitro evaluation of cefepime combined with aztreonam or ampicillin/sulbactam against multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2005, 25: 380–384.
249. Choi JY, Park YS, Cho CH, Park YS, Shin SY, Song YG, Yong D, Lee K, Kim JM. Synergic in-vitro activity of imipenem and sulbactam against *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004, 10: 1098–1101.
250. Song JY, Kee SY, Hwang IS, Seo YB, Jeong HW, Kim WJ, Cheong HJ. In vitro activities of carbapenem/sulbactam combination , colistin, colistin/rifampicin combination and tigecycline against carbapenem - resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007, 60: 317–322.
251. Kiffer CR, Sampaio JL, Sinto S, Oplustil CP, Koga PC, Arruda AC, Turner PJ, Mendes C. In vitro synergy test of meropenem and sulbactam against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2005, 52: 317–322.
252. Ko WC, Lee HC, Chiang SR, Yan JJ, Wu JJ, Lu CL, Chuang YC. In vitro and in vivo activity of meropenem and sulbactam against a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain. *J. Antimicrob. Chemother.* 2004, 53: 393–395.

253. Savov E, Chankova D, Vatcheva R, Dinev N. In vitro investigation of the susceptibility of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from clinical specimens to ampicillin/sulbactam alone and in combination with amikacin. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2002, 20: 390–392.
254. Appleman MD, Belzberg H, Citron DM, Heseltine PN, Yellin AE, Murray J, Berne TV. In vitro activities of nontraditional antimicrobials against multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated in an intensive care unit outbreak. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000, 44: 1035–1040.
255. Joly-Guillou ML, Decre D, Herrman JL, Bourdelier E, Bergogne-Berezin E. Bactericidal in-vitro activity of beta-lactams and beta-lactamase inhibitors, alone or associated, against clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: effect of combination with aminoglycosides. *J. Antimicrob. Chemother.* 1995, 36: 619–629.
256. Montero A, Ariza J, Corbella X, Domenech A, Cabellos C, Ayats J, Tubau F, Ardanuy C, Gudiol F. Efficacy of colistin versus betalactams, aminoglycosides, and rifampin as monotherapy in a mouse model of pneumonia caused by multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002, 46: 1946–1952.
257. Owen RJ, Li J, Nation RL, Spelman D. In vitro pharmacodynamics of colistin against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007, 59: 473–477.
258. Rodriguez-Hernandez MJ, Jimenez-Mejias ME, Pichardo C, Cuberos L, Garcia-Curiel A, Pachon J. Colistin efficacy in an experimental model of *Acinetobacter baumannii* endocarditis. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004, 10: 581–584.
259. Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Jimenez-Jimenez FJ, Barrero –Almodovar AE, Garcia-Garmendia JL, Bernabeu-Wittel IM, Gallego-Lara SL, Madrazo-Osuna J. Treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated

pneumonia (VAP) with intravenous colistin: a comparison with imipenem-susceptible VAP. *Clin. Infect. Dis.* 2003, 36: 1111–1118.

260. Reina R, Estenssoro E, Saenz G, Canales HS, Gonzalvo R, Vidal G, Martins G, Das Neves A, Santander O, Ramos C. Safety and efficacy of colistin in *Acinetobacter* and *Pseudomonas* infections: a prospective cohort study. *Intensive Care Med.* 2005, 31: 1058–1065.

261. Fishbain J, Peleg AY. Treatment of *Acinetobacter* infections. *Clin Infect Dis.* 2010, 51:79-84.

262. Fraenkel CJ, Ullberg M, Bernander S, Ericson E, Larsson P, Rydberg J, Törnqvist E, Melhus A. In vitro activities of three carbapenems against recent bacterial isolates from severely ill patients at Swedish hospitals. *Scand J Infect Dis* 2006, 38:853–859. .

263. Scott P, Deye G, Srinivasan A, , Murray C, Moran K, Hulten E, Fishbain J, Craft D, Riddell S, Lindler L, Mancuso J, Milstrey E, Bautista CT, Patel J, Ewell A, Hamilton T, Gaddy C, Tenney M, Christopher G, Petersen K, Endy T, Petrucci B. An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex infection in the US military health care system associated with military operations in Iraq. *Clin Infect Dis*, 2007, 44: 1577–1584.

264. Ikonomidis A, Pournaras S, Maniatis AN, Legakis NJ, Tsakris A. Discordance of meropenem versus imipenem activity against *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 2006, 28: 376–377.

265. Norskov-Lauritsen N, Marchandin H, Dowzicky MJ. Antimicrobial susceptibility of tigecycline and comparators against bacterial isolates collected as part of the TEST study in Europe (2004–2007). *Int J Antimicrob Agents* 2009,Z 34: 121–130.



266. Babinchak T, Ellis-Grosse E, Dartois N, Rose GM, Loh E. The efficacy and safety of tigecycline for the treatment of complicated intra-abdominal infections: analysis of pooled clinical trial data. *Clin. Infect. Dis.*, 41: 354–367.
267. Paterson DL, Depestel DD. Doripenem. *Clin Infect Dis* 2009, 49: 291–298.
268. Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, Pitt TL. The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett.* 2006, 258: 72-7.
269. Wayne, PA, CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Sixteenth Informational Supplement M100-S16.
270. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33: 2233–2239.
271. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a  $\beta$ -lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo- $\beta$ -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48: 4654–4661.
272. Oh EJ, Lee S, Park YJ, Park JJ, Park K, Kim SI, Kang MW, Kim BW. Prevalence of metallo- $\beta$ -lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean university hospital and comparison of screening methods for detecting metallo- $\beta$ -lactamase. *J. Microbiol. Methods*, 2003, 54: 411–418.
273. Tsakris A, Ikonomidis A, Pournaras S, Spanakis N, Markogiannakis A. Carriage of OXA-58 but not of OXA-51  $\beta$ -lactamase gene correlates with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006, 58:1097–1099.

274. Pournaras S, Ikonomidis A, Markogiannakis A, Spanakis N, Maniatis AN, Tsakris A. Characterization of clinical isolates of *Pseudomonasaeruginosa* heterogeneously resistant to carbapenems. *J. Med. Microbiol.* 2007, 56: 66–70.
275. Li, J., C. R. Rayner, R. L. Nation, R. J. Owen, D. Spelman, K. E. Tan, and L. Liolios. 2006. Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:2946–2950.
276. Sakoulas, G., J. Alder, C. Thauvin-Eliopoulos, R. C. Moellering, Jr., and G. M. Eliopoulos. Induction of daptomycin heterogeneous susceptibility in *Staphylococcus aureus* by exposure to vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006, 50: 1581-5.
277. Swenson, J. M., J. F. Hindler, and J. H. Jorgensen..Special phenotypic methods for detecting antimicrobial resistance, 2003, p. 1178–1195. *In* P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC.
278. Peck KR, Kim MJ, Choi JY, Kim HS, Kang CI, Cho YK, Park DW, Lee HJ, Lee MS, Ko KS. In vitro time-kill studies of antimicrobial agents against blood isolates of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, including colistin- or tigecycline-resistant isolates. *J Med Microbiol.* 2012, 61:353-60.
279. Lee CH, Su LH, Tang YF, Liu JW. Treatment of ESBLproducing *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia with carbapenems or flomoxef: a retrospective study and laboratory analysis of the isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006, 58: 1074–1077.
280. Cuenca FF, Pascual A, Martínez Martínez L, Conejo MC, Perea EJ, Evaluation of SDS-polyacrylamide gel systems for the study of outer membrane protein profiles of clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. *J Basic Microbiol.* 2003, 43: 194-201.

281. Hegde SS, Reyes N, Skinner R, Difuntorum S. Efficacy of telavancin in a murine model of pneumonia induced by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *S. Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2008, 61, 169–172.
282. Andes D, Craig WA. In vivo activities of amoxicillin and amoxicillin-clavulanate against *Streptococcus pneumoniae*: application to breakpoint determinations. *Antimicrob Agents Chemother* 1998, 42, 2375–2379.
283. Dudhani RV, Turnidge JD, Nation RL, Li J. fAUC/MIC is the most predictive pharmacokinetic/pharmacodynamic index of colistin against *Acinetobacter baumannii* in murine thigh and lung infection models. *J Antimicrob Chemother* 2010, 65, 1984-90.
284. Ko WC, Lee HC, Chiang SR, Yan JJ, Wu JJ, Lu CL, Chuang YC. In vitro and in vivo activity of meropenem and sulbactam against a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004, 53: 393-395.
285. Morinaga Y, Yanagihara K, Nakamura S, Yamamoto K, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yamada Y, Kohno S, Kamihira S. In vivo efficacy and pharmacokinetics of tomopenem (CS-023), a novel carbapenem, against *Pseudomonas aeruginosa* in a murine chronic respiratory tract infection model. *J Antimicrob Chemother* 2008, 62: 1326-31.
286. Tam VH, Ledesma KR, Schilling AN, Lim TP, Yuan Z, Ghose R, Lewis RE.. In vivo dynamics of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* selection after suboptimal dosing. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009, 64: 427-33.
287. Ikonomidis A, Pournaras S, Markogiannakis A, Maniatis AN, Manolis EN, Tsakris A. Low genetic diversity of the intrinsic OXA-51-like class D carbapenemases among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Greece. *Epidemiol. Infect.* 2007, 135: 877–881.

288. Giannouli M, Tomasone F, Agodi A, Vahaboglu H, Daoud Z, Triassi M, Tsakris A, Zarrilli R. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in intensive care units of multiple Mediterranean hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009, 63: 828–830.
289. Ikonomidis A, Neou E, Gogou V, Vrioni G, Tsakris A, Pournaras S. Heteroresistance to meropenem in carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2009, 47: 4055-9.
290. Balaban NQ, Merrin J, Chait R, Kowalik L, Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* 2004, 305: 1622–5.
291. 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: 1632-45.
292. Guo B, Abdelraouf K, Ledesma KR, Nikolaou M, Tam VH. Predicting bacterial fitness cost associated with drug resistance. *J Antimicrob Chemother* 2012, 67: 928–932