



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

**Δ' ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ - ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ
ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ**

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ : ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΜΠΟΥΜΠΑΣ

**«ΠΟΛΥΚΕΝΤΡΙΚΗ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΥΠΑΡΞΗΣ
ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝ 16S rRNA ΜΕΘΥΛΑΣΕΣ
ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΔΟΥΝ ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΙΣ ΑΜΙΝΟΓΛΥΚΟΣΙΔΕΣ
ΣΕ GRAM-ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΝΟΝΤΑΙ
ΑΠΟ ΝΟΣΗΛΕΥΟΜΕΝΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ»**

**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΝΑΥΠΛΙΩΤΗ
ΕΙΔΙΚΟΣ ΓΕΝΙΚΗΣ – ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2022

Ημερομηνία Αίτησης Έναρξης Διδακτορικής Διατριβής: 30/03/2016
Ημερομηνία Ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 20/05/2016
Ημερομηνία Ορισμού Θέματος: 20/09/2016
Ημερομηνία Καταθέσεως Διδακτορικής Διατριβής: 21/09/2022

ΑΡΧΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

Καθηγήτρια κα. Μαρία Σουλή (Επιβλέπων μέλος ΔΕΠ)

Καθηγητής κ. Σωτήριος Τσιόδρας

Καθηγήτρια κα. Γεωργία Βρυώνη

Μετά την παραίτηση της, η Καθηγήτρια κα. Μ. Σουλή, αντικαταστάθηκε από τον Καθηγητή κ. Σ. Τσιόδρα ως επιβλέπων μέλος ΔΕΠ της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής και ως μέλος ανέλαβε η Καθηγήτρια κα. Α. Αντωνιάδου.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Καθηγητής κ. Σωτήριος Τσιόδρας (Επιβλέπων μέλος ΔΕΠ)

Καθηγήτρια κα. Αναστασία Αντωνιάδου

Καθηγήτρια κα. Γεωργία Βρυώνη

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Τσιόδρας Σωτήριος	Καθηγητής Παθολογίας-Λοιμώξεων, Δ' Παθολογική Κλινική ΕΚΠΑ
Αντωνιάδου Αναστασία	Καθηγήτρια Παθολογίας-Λοιμώξεων, Δ' Παθολογική Κλινική ΕΚΠΑ
Βρυώνη Γεωργία	Καθηγήτρια Ιατρικής Μικροβιολογίας, Εργαστήριο Μικροβιολογίας ΕΚΠΑ
Παπαδόπουλος Αντώνιος	Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας-Λοιμώξεων Δ' Παθολογική Κλινική ΕΚΠΑ
Πουλάκου Γαρυφαλλιά	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογίας Γ' Παθολογική Κλινική ΕΚΠΑ
Ψυχογιού Μήνα	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογίας-Λοιμώξεων Α' Παθολογική Κλινική ΕΚΠΑ
Μαρίνος Γεώργιος	Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Ιατρικής-Προληπτικής Ιατρικής, Εργαστήριο Υγιεινής, Επιδημιολογίας και Ιατρικής Στατιστικής ΕΚΠΑ

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ: Καθηγητής κ. Γεράσιμος Δ. Σιάσος

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΡΙΣΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: 3/11/2022

ΒΑΘΜΟΣ: ΆΡΙΣΤΑ

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

 ΜΝΥΜΙ ΑΓΟΛΛΑΝΑ ΙΗΤΡΟΝ, ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ,
ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝ
ΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙ
ΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ
ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ ΗΓΗΣΑΣΘ
ΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗ
Ν ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ, Κ
ΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, Κ
ΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΑΥΤΕΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝ
ΕΕΙΝ ΑΡΡΗΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ
ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥ
ΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣ
ΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝ
ΤΟΣ, ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΛΟ
ΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ, ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ
ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΛΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟ
ΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗ
ΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗΝ, ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ
ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕΥ
ΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥ
ΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΪΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ Δ
Ε ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝ
ΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΛ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘ
ΙΛΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡ
ΗΞΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΩ
ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΛΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤ
ΟΣ ΕΛΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΗΣ, Τ
ΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΔΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥ
ΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡ
ΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ,
Η ΙΔΩ, Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΗΗΣ ΚΑΤΑ Β
ΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Δ ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ
ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟ
ΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕ
Δ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘ
ΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ Π
ΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΔΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙ
ΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΛΝ.

■

Στη μητέρα μου

Ἡ δὲ μελέτη φύσεως ἀγαθὰ πλείονα δωρεῖται.

Επίχαρμος

ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Σε "αχίλλειο πτέρνα" για την Δημόσια Υγεία αναδεικνύεται το πρόβλημα της μικροβιακής αντοχής εν μέσω της πανδημίας του νέου κορονοϊού, που έχει φέρει στην επιφάνεια αδυναμίες και διαρθρωτικά προβλήματα στα συστήματα υγειονομικής περίθαλψης παγκοσμίως. Εδώ και χρόνια, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) και άλλοι κορυφαίοι οργανισμοί δημόσιας υγείας προειδοποιούν ότι η αντοχή στα αντιβιοτικά, η οποία προκαλείται κυρίως από την υπερβολική χρήση τους, είναι μια από τις σοβαρότερες απειλές για τη δημόσια υγεία και την ανάπτυξη παγκοσμίως και με την πανδημία να έχει εξαπλωθεί ταχύτατα σε όλο τον κόσμο, το πρόβλημα της αντοχής στα αντιβιοτικά έχει ήδη εξελιχθεί σε ακόμη σοβαρότερη απειλή. Οι βακτηριακές λοιμώξεις είναι συχνά η κύρια αιτία υψηλού ποσοστού θνησιμότητας κατά τη διάρκεια ιογενών πανδημιών, λόγω της αυξημένης εξάπλωσης τους σε κέντρα υγειονομικής περίθαλψης με αυξημένο φόρτο περιστατικών, όπου πλήττουν ήδη εξασθενημένους και ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Η απειλή αυτή είναι ιδιαίτερα σοβαρή για την Ελλάδα, η οποία ιστορικά έχει από τα υψηλότερα ποσοστά χρήσης και αντοχής στα αντιβιοτικά στην Ευρώπη, αλλά και αρκετά υψηλά ποσοστά νοσοκομειακών λοιμώξεων από πολυανθεκτικά στελέχη. Το πιο αποτελεσματικό όπλο που διαθέτουμε για την καταπολέμηση της μικροβιακής αντοχής είναι απλό, οικονομικό και τεκμηριωμένο με ισχυρά στοιχεία: πρόκειται για την αντιμικροβιακή διαχείριση, η οποία στοχεύει στη βελτιστοποίηση της χρήσης των αντιβιοτικών, προκειμένου να αποτρέψει ταυτόχρονα της ανάπτυξη αντοχής και να βελτιώσει τα θεραπευτικά αποτελέσματα στους ασθενείς.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή ασχολείται με την επιδημιολογική μελέτη των 16S rRNA μεθυλοτρανσφερασών που προσδίδουν αντοχή στις αμινογλυκοσίδες σε Gram-αρνητικά βακτήρια που απομονώνονται από νοσηλευόμενους ασθενείς σε νοσοκομεία της Αθήνας, αλλά και της επαρχίας. Θα ήταν ευτύχημα αν η προσπάθεια αυτή συντελέσει, έστω και στο ελάχιστο, στην κατανόηση του προβλήματος της μικροβιακής αντοχής και στην ευαισθητοποίηση για την ανάσχεσή του.

Το πειραματικό μέρος της διατριβής εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Λοιμώξεων και Αντιμικροβιακής Θεραπείας της Δ' Παθολογικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό τη διεύθυνση του Καθηγητή κ. Δημητρίου Μπούμπα.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου:

Στην πρώην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Μαρία Σουλή, που μου εμπιστεύτηκε την εκπόνηση της συγκεκριμένης μελέτης και εμπνευσμένα και υπομονετικά με καθοδήγησε στον αρχικό σχεδιασμό της.

Στους σεβαστούς Καθηγητές/-τριες κ. Σωτήριο Τσιόδρα, κα. Αναστασία Αντωνιάδου και κα. Γεωργία Βρυώνη, για την επιστημονική συμβολή τους και τη συνολική εποπτεία της μελέτης έως την ολοκλήρωσή της.

Στη Βιολόγο του τμήματος Μοριακής Βιολογίας του Εργαστηρίου και αγαπημένη μου μητέρα κα. Ειρήνη Γαλάνη, για τη μύησή μου στον κόσμο της έρευνας, για την εκπαίδευσή μου στις εργαστηριακές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία και για το θεμελιώδη ρόλο της στην περάτωση αυτής της μελέτης. Η προσφορά της δεν μπορεί να περιγραφεί με λόγια.

Στον Καθηγητή κ. Δημήτριο Μπούμπα, υπό τη Διεύθυνση του οποίου ολοκληρώθηκε η μελέτη στο Ερευνητικό Εργαστήριο Λοιμώξεων και Αντιμικροβιακής Θεραπείας της Δ' Παθολογικής Κλινικής.

Στο προσωπικό του Ερευνητικού Εργαστηρίου Λοιμώξεων και Αντιμικροβιακής Θεραπείας της Δ' Παθολογικής Κλινικής, τις κ.κ. Αναστασία Μόλλα, Παναγιώτα Αδάμου, Δήμητρα Κατσαλά, Κωνσταντίνα Ορλάνδου, χωρίς τη συμβολή των οποίων θα ήταν αδύνατη η ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας.

Στους Βιοπαθολόγους των Μικροβιολογικών Εργαστηρίων των συνεργαζόμενων Νοσοκομείων, τους κ.κ. Ελένη Μωραΐτου, Ευάγγελο Βογιατζάκη, Παναγιώτα Γιαννοπούλου, Ελευθερία Τρίκκα-Γραφάκου, Παρασκευή Χρα, Βασιλική Μπάκα, Μαρία Δαμαλά, Ελένη Πρίφτη, για την άριστη συνεργασία.

Τέλος, στην οικογένειά μου για την ηθική, συναισθηματική και οικονομική υποστήριξη που μου παρείχαν σε όλη την πορεία της ζωής μου, και ιδιαίτερα τα χρόνια των σπουδών μου, κάνοντας εφικτή την ολοκλήρωση μιας διδακτορικής διατριβής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<u>ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ</u>	10
<u>ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ / ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ</u>	11
<u>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	
<i>I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</i>	15
1. Αμινογλυκοσίδες	15
1.1 Ιστορικά στοιχεία	15
1.2 Ονοματολογία και ιδιότητες	17
1.2.1 Χημική δομή	17
1.2.2 Δράση και αντιμικροβιακό φάσμα	19
1.2.3 Φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες	19
1.3 Μηχανισμός δράσης	20
1.3.1 Βακτηριακή πρόσληψη	20
1.3.2 Μοριακός μηχανισμός δράσης	21
1.4 Χρήση των αμινογλυκοσιδών	23
1.4.1 Κλινική χρήση	23
1.4.2 Άλλες χρήσεις των αμινογλυκοσιδών	24
1.5 Τοξικότητα των αμινογλυκοσιδών	27
1.5.1 Ωτοτοξικότητα	28
1.5.2 Νεφροτοξικότητα	30
1.5.3 Αποκλεισμός νευρομυϊκών συνάψεων	31
1.6 Ανακάλυψη νέων αμινογλυκοσιδών	31
1.6.1 Πλαζομικίνη	31
1.6.2 Αρμπεκασίνη	32
1.6.3 Απραμικίνη	33
2. Μικροβιακή αντοχή στις αμινογλυκοσίδες	34
2.1 Ελαττωμένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση	35
2.1.1 Ελαττωμένη πρόσληψη αμινογλυκοσιδών	35
2.1.2 Ενεργή εξώθηση (Efflux)	36
2.2 Ενζυμική τροποποίηση των αμινογλυκοσιδών	39
2.2.1 N-Ακετυλοτρανσφεράσες	41
2.2.1.1 AAC(6')	44
2.2.1.2 AAC(2')	46
2.2.1.3 AAC(1)	46
2.2.1.4 AAC(3)	47
2.2.2 O-Φωσφοτρανσφεράσες	48
2.2.2.1 APH(3')	49
2.2.3 O-Νουκλεοτρανσφεράσες	50
2.2.4 Επιδημιολογία στην Ελλάδα	53
2.3 Τροποποίηση ριβοσώματος-στόχου	54
2.3.1 Ριβοσωμικές μεταλλάξεις	54
2.3.2 Μεθυλίωση του 16S rRNA	54

3. Οι 16S rRNA-Μεθυλοτρανσφεράσες (RMTs): ένας μηχανισμός υψηλής αντοχής στις αμινογλυκοσίδες	55
3.1 Εγγενείς RMTs σε παραγωγούς αμινογλυκοσιδών	56
3.2 Επίκτητες RMTs σε Gram-αρνητικά βακτήρια	58
3.2.1 Πρώτες αναφορές και νεότερες RMTs	58
3.2.2 Ονοματολογία	60
3.2.3 Φαινότυποι αντοχής	62
3.2.4 Προέλευση επίκτητων RMTs	65
3.3 Επίκτητες RMTs σε Gram-θετικά βακτήρια	67
3.4 Επιδημιολογία των επίκτητων RMTs	67
3.4.1 Επιπολασμός και κατανομή	67
3.4.2 Πηγές και τρόποι μετάδοσης	73
3.5 Γενετικό υπόβαθρο των επίκτητων RMTs	75
3.5.1 Θέση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις RMTs	75
3.5.1.1 Πλασμίδια που φέρουν γονίδια επίκτητων RMTs	75
3.5.2 Δομές στο γενετικό περιβάλλον επίκτητων RMTs που παρακινούν τη μεταφορά τους	77
3.6 Συσχέτιση των επίκτητων RMTs με άλλους μηχανισμούς αντοχής σε άλλα αντιβιοτικά	86
3.6.1 Συσχέτιση με μηχανισμούς αντοχής στις κινολόνες	86
3.6.2 Συσχέτιση με μηχανισμούς αντοχής στις β-λακτάμες	86
3.6.3 Συσχέτιση με άλλους μηχανισμούς αντοχής	88
3.7 Ανάπτυξη νέων φαρμάκων κατά των μικροβίων που παράγουν RMT	89
3.7.1 Ανάπτυξη αμινογλυκοσιδών ανθεκτικών στις RMTs	89
3.7.2 Ανάπτυξη άλλων αντιμικροβιακών φαρμάκων κατά βακτηρίων που φέρουν RMT	90

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

<i>II. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ</i>	93
<i>III. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ</i>	93
1. Περίληψη πειραματικής διαδικασίας	93
2. Βακτηριακά στελέχη	94
3. Προσδιορισμός ελάχιστων ανασταλτικών συγκεντρώσεων στις αμινογλυκοσίδες	95
4. Ανίχνευση γονιδίων RMTs	96
5. Απομόνωση ολικού γενωμικού DNA	99
6. Αντιμικροβιακή ευαισθησία	99
6.1 Έλεγχος αντιβιογράμματος κατά Kirby-Bauer	99
6.2 Προσδιορισμός MICs σε επιλεγμένα αντιβιοτικά	102

6.3 Ανίχνευση γονιδίων β-λακταμασών	102
6.3.1 Ανίχνευση της μεταλλαγής G238S που οδηγεί σε SHV ESBL- τύπου (PCR/NheI)	104
6.3.2 Ανίχνευση των ESBL παραγώγων της OXA-10 β-λακταμάσης	105
7. Επιδημιολογική τυποποίηση	106
7.1 Ηλεκτροφόρηση εναλλασσόμενου πεδίου (PFGE)	106
7.1.1 Παρασκευή ολικού DNA σε πλακίδια αγαρόζης	106
7.1.2 Πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση	106
7.1.3 Ηλεκτροφόρηση	107
7.2 Επιδημιολογική τυποποίηση στελεχών <i>Acinetobacter</i> (tri-locus PCR group typing)	107
8. Βακτηριακή σύζευξη	109
9. Έλεγχος πλασμιδιακού περιεχομένου	110
9.1 Πέψη με S1 νουκλεάση	110
9.2 Ηλεκτροφόρηση εναλλασσόμενου πεδίου (PFGE)	110
10. Ταξινόμηση πλασμιδίων σε ομάδες ασυμβατότητας	110
11. Ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των πλασμιδίων που φέρουν την 16S rRNA μεθυλοτρανσφεράση <i>rmtB</i>	112
IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	113
1. Σχηματική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της πειραματικής διαδικασίας	113
2. Πηγές βακτηριακών στελεχών	114
3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	115
4. <i>Acinetobacter baumannii</i>	116
5. Εντεροβακτηριακά	121
5.1 <i>Providencia stuartii</i>	124
5.2 <i>Proteus mirabilis</i>	127
5.3 <i>Escherichia coli</i>	130
5.4 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	130
5.5 Μεταφορά γονιδίων που κωδικοποιούν RMT	139
5.6 Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των πλασμιδίων	142
V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	145
VI. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	152
<u>ΠΕΡΙΛΗΨΗ/ ABSTRACT</u>	154
<u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>	158

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνοματεπώνυμο:	Κωνσταντίνα Ε. Ναυπλιώτη
Ημερομηνία γέννησης:	22/07/1991
Ξένες Γλώσσες:	Γερμανικά Αγγλικά
Πτυχίο Ιατρικής:	Ιατρική Σχολή του Παν/μίου του Μάρμπουργκ Γερμανίας, Philipps-Universität Marburg, Νοέμβριος 2015, Καλώς
Υπηρεσία Υπαίθρου:	2017-2018, Γ.Ν. Σύρου/Π.Π.Ι. Κέας
Ιατρική Ειδικότητα:	Γενική Οικογενειακή Ιατρική, Γ.Ν.Α. «Λαϊκό», 2018-2022
Επιστημονικές εργασίες:	2 Δημοσιεύσεις σε Ελληνικά συνέδρια 7 Δημοσιεύσεις σε Διεθνή συνέδρια 5 Δημοσιεύσεις σε Διεθνή περιοδικά Β' Βραβείο Εφαρμοσμένης Έρευνας 2017, Ιατρική Εταιρεία Αθηνών

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΑ ΙΑΤΡΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

Nafplioti K, Souli M, Adamou P, Moraitou E, Giannopoulou P, Chra P, Damala M, Vogiatzakis E, Trikka-Graphakos E, Baka V, Prifti E, Antoniadou A, Galani I. Characterization of 16S rRNA methylase genes in Enterobacterales and *Pseudomonas aeruginosa* in Athens Metropolitan area, 2015-2016. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2021; 40(1):111-121

Nafplioti K, Galani I, Angelidis E, Adamou P, Moraitou E, Giannopoulou P, Chra P, Damala M, Vogiatzakis E, Trikka-Graphakos E, Baka V, Prifti E, Antoniadou A, Souli M. Dissemination of International Clone II *Acinetobacter baumannii* Strains coproducing OXA-23 carbapenemase and 16S rRNA methylase ArmA in Athens, Greece. Microb Drug Resist. 2020; 26(1):9-13

Galani I, **Nafplioti K**, Adamou P, Karaiskos I, Giamarellou H, Souli M; Study Collaborators. Nationwide epidemiology of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Greek hospitals, with regards to plazomicin and aminoglycoside resistance. BMC Infect Dis. 2019; 19(1):167. Erratum in: BMC Infect Dis. 2019; 19(1):230

Galani I, Souli M, **Nafplioti K**, Adamou P, Karaiskos I, Giamarellou H, Antoniadou A; Study Collaborators. *In vitro* activity of imipenem-relebactam against non-MBL carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in Greek hospitals in 2015-2016. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2019; 38(6):1143-1150. Erratum in: Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2019. 38(6):1151-1152

Galani I, **Nafplioti K**, Chatzikonstantinou M, Souli M. *In vitro* evaluation of double-carbapenem combinations against OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates using time-kill studies. J Med Microbiol. 2018; 67(5):662-668

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

I. Galani, H. Moraitou, K. Orlandou, **K. Nafplioti**, E. Vogiatzakis, G. Petrikkos, M. Souli. Prevalence of 16S rRNA methylase genes in Enterobacterial isolates in two Greek hospitals in a three-year period. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2014, Barcelona, Spain, Abstr P1010.

I. Galani, H. Moraitou, **K. Nafplioti**, M. Chatzikonstantinou, E. Vogiatzakis, G. Petrikkos, M. Souli. Association of 16S rRNA methylases and KPC-2 /VIM-1 in isolates from Greece collected during 2009–2012. 54th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy - ICAAC 2014, Washington, D.C, USA, Abstr C-138a.

K. Nafplioti, I. Galani, H. Moraitou, P. Giannopoulou, P. Chra, M. Damala, E. Vogiatzakis, E. Trikka-Graphakos, V. Baka, E. Prifti, M. Souli. Prevalence of 16S rRNA methylase genes in Gram negative isolates in Athens Metropolitan area in a six-month period. 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2017, Vienna, Austria, Abstr P0208.

I. Galani, **K. Nafplioti**, P. Adamou, I. Karaiskos, H. Giamarellou, M. Souli. Nationwide epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Greek hospitals, in regards to plazomicin and aminoglycoside resistance. 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2017, Vienna, Austria, Abstr P0406.

K. Nafplioti, I. Galani, P. Adamou, E. Moraitou, P. Giannopoulou, P. Chra, M. Damala, E. Vogiatzakis, E. Trikka-Graphakos, V. Baka, E. Prifti, M. Souli. Epidemic Dissemination of a Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clone Carrying *armA*. 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2018, Madrid, Spain, Abstr P1105.

I. Galani, **K. Nafplioti**, P. Adamou, I. Karaiskos, H. Giamarellou, M. Souli, A. Antoniadou and Multicenter Study Group. *In vitro* activity of Imipenem/Relebactam vs. carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from Greek hospitals. 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2018, Madrid, Spain, Abstr P1048.

I. Galani, **K. Nafplioti**, M. Chatzikonstantinou, H. Giamarellou, M. Souli and Study Collaborators. Evaluation of apramycin activity against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii*. 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2018, Madrid, Spain, Abstr P0096.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Κ. Ναυπλιώτη, Ε. Γαλάνη, Ε. Μωραΐτου, Π. Γιαννοπούλου, Π. Χρα, Μ. Δαμαλά, Ε. Βογιατζάκης, Ε. Τρίκκα-Γραφάκου, Β. Μπάκα, Ε. Πρίφτη, Ε. Γιαμαρέλλου, Μ. Σουλή. 16S rRNA Μεθυλοτρανσφεράσες. Ένας νέος αναδυόμενος μηχανισμός αντοχής έναντι των αμινογλυκοσιδών. 43ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, 2017, Περιλ.127.

Κ. Ναυπλιώτη, Ε. Γαλάνη, Π. Αδάμου, Η. Καραΐσκος, Ε. Γιαμαρέλλου, Μ. Σουλή. Πανελλαδική επιδημιολογική μελέτη πολυανθεκτικών νοσοκομειακών στελεχών *Klebsiella pneumoniae*, σε σχέση με τη δραστηριότητα της πλαζομικίνης και των μηχανισμών αντοχής στις αμινογλυκοσίδες. 43ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, 2017, Περιλ.128. Δεύτερο Βραβείο Καλύτερης Εργασίας Εφαρμοσμένης Έρευνας, 2017.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Αμινογλυκοσίδες

1.1 Ιστορικά στοιχεία

Μετά την ανακάλυψη της πενικιλίνης από τον Alexander Fleming το 1928 ως αντιμικροβιακή ουσία, που παρήχθη από το *Penicillium rubens*, οι αμινογλυκοσίδες ήταν οι πρώτες σημαντικές θεραπευτικές ουσίες, που παρήχθησαν με βακτηριακή ζύμωση. Η πρώτη αμινογλυκοσίδη, η στρεπτομυκίνη, εμφανίστηκε το 1944. Απομονώθηκε από στέλεχος *Streptomyces griseus* στα πλαίσια μιας καλά σχεδιασμένης έρευνας των Albert Schatz και Selman Waksman για αντιμικροβιακές ουσίες και πιο συγκεκριμένα για την ύπαρξη ανασταλτικής δράσης κατά του *Mycobacterium tuberculosis* (Schatz *et al.*, 1944). Έτσι, η στρεπτομυκίνη έγινε το πρώτο αντιβιοτικό με θεραπευτική δράση στη φυματίωση. Για αυτήν την ανακάλυψη, ο S. Waksman τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ Ιατρικής το 1952.

Το 1949 απομονώθηκε από το *Streptomyces fradiae* η δεύτερη αμινογλυκοσίδη, η νεομυκίνη (Waksman & Lechevalier, 1949), της οποίας οι ενδείξεις τοξικών επιδράσεων συνέπεσαν χρονικά με την εμφάνιση αντοχής στη στρεπτομυκίνη. Έτσι, πυροδοτήθηκαν νέες έρευνες και ακολούθησαν ανακαλύψεις νέων αμινογλυκοσιδών, όπως η καναμυκίνη από *Streptomyces kanamyceticus* το 1957 (Umezawa *et al.*, 1957), η γενταμικίνη, που απομονώθηκε από *Micromonospora purpurea* το 1963 (Weinstein *et al.*, 1963), με την κατάληξη '-μικίνη' να επισημαίνει τη διαφορά στο γένος προέλευσης και έπειτα η τομπραμυκίνη, η οποία παρήχθη από *Streptomyces tenebrarius* το 1967 (Higgins & Kastners, 1967).

Η σταδιακή εξάπλωση ανθεκτικών στελεχών, που παρήγαγαν ένζυμα ικανά να τροποποιούν το μόριο του αντιβιοτικού, οδήγησε σταδιακά στην έρευνα και στη δημιουργία συνθετικών παραγώγων αμινογλυκοσιδών (Kondo & Hotta, 1999). Η αμικασίνη, ημισυνθετικό παράγωγο της καναμυκίνης, παρουσιάστηκε το 1972 με το όνομα BBK8 (Kawaguchi *et al.*, 1972). Το 1975 η διβεκακίνη έγινε το πρώτο σχεδιασμένο ημισυνθετικό παράγωγο αμινογλυκοσίδης που εγκρίθηκε για θεραπευτική χρήση (Jana & Deb, 2006). Η νετιλμικίνη, που εισήχθη το 1976, είναι ένα ημισυνθετικό παράγωγο της σισομικίνης, η οποία προήλθε από το γένος του *Micromonospora* (Kabins *et al.*, 1976).

Οι αμινογλυκοσίδες έχουν διανύσει πολύ δρόμο από την πρώτη εμφάνισή τους πριν από 80 χρόνια. Πρόκειται για μια από τις πολύ σημαντικές κατηγορίες φαρμάκων στην ιστορία της σύγχρονης ιατρικής και έχουν επιβιώσει απόπειρες περιθωριοποίησης από πενικιλίνες νεότερης γενιάς, κεφαλοσπορίνες και κινολόνες (Begg & Barclay, 1995a). Απαιτείται όμως, σύνεση και προσοχή στη χρήση τους, για να αποτραπεί η διάδοση μηχανισμών

αντοχής στις αμινογλυκοσίδες και να συνεχίσουν να αποτελούν και στο μέλλον ένα χρήσιμο όπλο στη μάχη κατά των λοιμώξεων και όχι μόνο.

Πίνακας 1. Έτη ανακάλυψης και είδη προέλευσης αμινογλυκοσιδών

ΦΥΣΙΚΕΣ ΑΜΙΝΟΓΛΥΚΟΣΙΔΕΣ			
Αμινογλυκοσίδη	Έτος	Είδος προέλευσης	Αναφορά
Στρεπτομυκίνη	1944	<i>Streptomyces griseus</i>	Jones <i>et al.</i> , 1944
Νεομυκίνη	1949	<i>Streptomyces fradiae</i>	Walksman & Lechevalier, 1949
Υγρομυκίνη Β	1953	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Pittenger <i>et al.</i> , 1953
Καναμυκίνη	1957	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Umezawa, 1958
Παρομομυκίνη	1959	<i>Streptomyces rimosus</i>	Coffey <i>et al.</i> , 1959
Σπεκτινομυκίνη	1961	<i>Streptomyces spectabilis</i>	Mason <i>et al.</i> , 1961
Γενταμικίνη	1963	<i>Micromonospora purpurea</i>	Weinstein <i>et al.</i> , 1963
Τομπραμυκίνη	1967	<i>Streptomyces tenebrarius</i>	Higgins & Kastners, 1967
Απραμυκίνη	1968	<i>Streptomyces tenebrarius</i>	Wick & Welles, 1967
Ριβοσταμυκίνη	1970	<i>Streptomyces ribosidificus</i>	Shomura <i>et al.</i> , 1970
Σισομικίνη	1970	<i>Micromonospora iniyensis</i>	Weinstein <i>et al.</i> , 1970
Λιβιδομυκίνη	1971	<i>Streptomyces lividus</i>	Oda <i>et al.</i> , 1971
Φορτιμικίνη Α	1977	<i>Micromonospora olivasterospora</i>	Nara <i>et al.</i> , 1977
ΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΑΜΙΝΟΓΛΥΚΟΣΙΔΕΣ			
Αμινογλυκοσίδη	Έτος	Προέλευση	Αναφορά
Αμικασίνη	1972	Καναμυκίνη	Kawaguchi <i>et al.</i> , 1972
Αρμπτεκασίνη	1973	Καναμυκίνη	Kondo & Hotta, 1999
Νετιλμικίνη	1973	Σισομικίνη	Rahal <i>et al.</i> , 1976
Διβεκακίνη	1975	Καναμυκίνη	Oizumi <i>et al.</i> , 1974
Ισεπαμισίνη	1975	Γενταμικίνη	Nagabhushan <i>et al.</i> , 1978
Πλαζομικίνη	2009	Σισομικίνη	Aggen <i>et al.</i> , 2010

1.2 Ονοματολογία και ιδιότητες

Όπως προαναφέρθηκε, οι περισσότερες αμινογλυκοσίδες, που έχουν ανακαλυφθεί έως σήμερα, έχουν απομονωθεί από παραγωγούς αντιμικροβιακών ουσιών, και πιο συγκεκριμένα από Ακτινοβακτήρια είτε του γένους *Streptomyces* είτε του γένους *Micromonospora*. Συμβατικά οι αμινογλυκοσίδες του γένους *Streptomyces* ονομάζονται με το επίθημα –μυκίνη (-mycin), ενώ αυτές του γένους *Micromonospora* με το επίθημα –μικίνη (-micin). Παραδείγματα της πρώτης κατηγορίας αποτελούν οι στρεπτομυκίνη, νεομυκίνη, καναμυκίνη και τομπραμυκίνη και της δεύτερης η γενταμικίνη και η σισομικίνη.

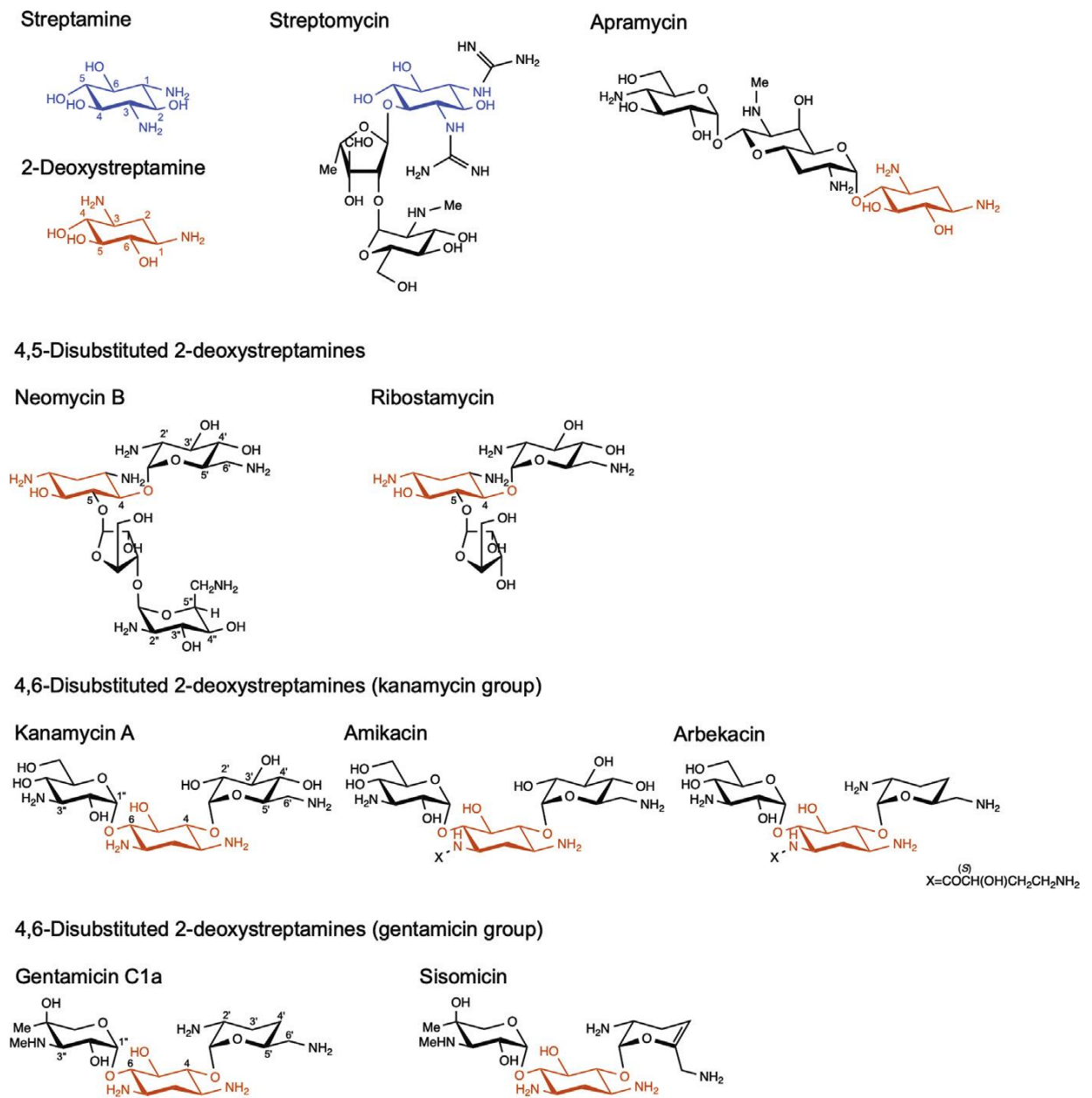
Στην κατηγορία των αμινογλυκοσιδών ανήκουν σημαντικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται στην ιατρική και την κτηνιατρική. Η στρεπτομυκίνη, η αμικασίνη, η γενταμικίνη και η τομπραμυκίνη είναι οι σπουδαιότερες αμινογλυκοσίδες που χρησιμοποιούνται στην κλινική ιατρική, ενώ η απραμυκίνη και η φορτιμικίνη είναι κοινές στην κτηνιατρική (Lambert, 2012).

1.2.1 Χημική δομή (Magnet & Blanchard, 2005)

Οι αμινογλυκοσίδες είναι αντιμικροβιακά που ανήκουν στην κατηγορία των ολιγοσακχαριτών και αποτελούνται από ένα κυκλοεξάνιο, την αμινοκυκλιτόλη, ενωμένη με ένα ή περισσότερα αμινοσάκχαρα με γλυκοσιδικό δεσμό, εξού και η ονομασία αμινογλυκοσίδες. Όπου αυτή δεν ενώνεται με αμινοσάκχαρα μπορεί να κορεστεί με αμινομάδες ή ομάδες υδροξυλίου (Benveniste & Davies, 1973). Στην περίπτωση της σπεκτινομυκίνης δεν υπάρχει καμία ένωση με αμινοσάκχαρο, γι' αυτό και πολλοί επιστήμονες διαφωνούν με τον όρο αμινογλυκοσίδες και θεωρούν πιο σωστό τον όρο αμινοκυκλιτόλες (Jana & Deb, 2006).

Σύμφωνα με τη δομή τους, οι αμινογλυκοσίδες χωρίζονται σε διαφορετικές ομάδες (Εικόνα 1). Η κεντρική δομή της αμινογλυκοσίδης, η αμινοκυκλιτόλη δηλαδή, μπορεί να είναι στρεπταμίνη (όπως στη σπεκτινομυκίνη), 2-δεοξυ-στρεπταμίνη (2-DOS), στρεπτιδίνη (όπως στη στρεπτομυκίνη) ή φορταμίνη (όπως στη φορτιμικίνη) (Veyssier & Bryskier, 2005). Οι περισσότερες σε κλινική χρήση αμινογλυκοσίδες περιέχουν την 2-δεοξυ-στρεπταμίνη (2-DOS) και ονομάζονται τυπικές αμινογλυκοσίδες. Η 2-DOS μπορεί να ενώνεται με ένα μόνο αμινοσάκχαρο στη θέση 4 (4- 2-DOS), όπως στην απραμυκίνη, ή με δύο αμινοσάκχαρα στις θέσεις 4 και 5 (4,5- 2-DOS), όπως στη νεομυκίνη, ή στις θέσεις 4 και 6 (4,6- 2-DOS), όπως στις περισσότερες αμινογλυκοσίδες (γενταμικίνη, καναμυκίνη, τομπραμυκίνη και τα ημισυνθετικά παράγωγά τους) (Magnet & Blanchard, 2005; Park *et al.*, 2013). Η στρεπτομυκίνη, η σπεκτινομυκίνη και η φορτιμικίνη, που περιέχουν άλλες αμινοκυκλιτόλες, όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, θεωρούνται άτυπες αμινογλυκοσίδες (Piepersberg, 1995).

Εικόνα 1. Χημικές δομές σημαντικών αμινογλυκοσιδών (Wachino *et al.*, 2020)



1.2.2 Δράση και αντιμικροβιακό φάσμα (Jackson *et al*, 2013; Πετρίκκος, 2009)

Οι αμινογλυκοσίδες έχουν ισχυρή και ταχεία βακτηριοκτόνο δράση, φαινόμενο μη διαδεδομένο στους αναστολείς της πρωτεϊνικής σύνθεσης, που προκύπτει από τη δυνατότητά τους να προκαλούν οξειδωτικό στρες. Διαθέτουν ένα ευρύ αντιμικροβιακό φάσμα, το οποίο περιλαμβάνει κυρίως Gram-αρνητικά βακτήρια και δευτερευόντως Gram-θετικούς κόκκους (Πετρίκκος, 2009). Πιο συγκεκριμένα δρουν κατά αερόβιων Gram-αρνητικών μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των περισσότερων Εντεροβακτηριακών, των *Pseudomonas species* και των *Acinetobacter species*. Αντίθετα δεν επιδεικνύουν δράση έναντι των *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* και *Pasteurella multocida*, όπως επίσης και κατά των αναερόβιων μικροοργανισμών. Οι Gram-θετικοί μικροοργανισμοί είναι σχετικά ανθεκτικοί στις αμινογλυκοσίδες και έτσι η χρήση τους κατά των οργανισμών αυτών περιορίζεται σε συνεργικό ρόλο με ευρέος φάσματος β-λακτάμες. Οι αερόβιοι οργανισμοί που ανήκουν στην κατηγορία *Actinomycetales*, συμπεριλαμβανομένων των *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Gordonia*, *Tsukamurella* και *Rhodococcus*, είναι συχνά ευαίσθητοι σε ορισμένες αμινογλυκοσίδες. Η αρμπτεκασίνη είναι μια αμινογλυκοσίδα με ιδιαίτερη δράση κατά του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus* (MRSA). Η παρομομυκίνη δρα κατά των *Protozoa*, *Cestodes* και *Leishmania*. (Jackson *et al.*, 2013)

1.2.3 Φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες (Πετρίκκος, 2009; Jackson *et al.*, 2013)

Οι αμινογλυκοσίδες είναι ισχυρά κατιόντα, σταθερά σε pH 6-8, με χαρακτήρα βάσεως. Είναι υδρόφιλα μόρια, δηλαδή εξαιρετικά διαλυτά στο νερό και γι' αυτό κατανέμονται στον εξωκυττάριο χώρο, ενώ λόγω της πολικότητάς τους ελάχιστα εισέρχονται στον ενδοκυττάριο χώρο. Αυτά τα χαρακτηριστικά δικαιολογούν την μειωμένη απορρόφησή τους από το γαστρεντερικό σωλήνα. Οι αμινογλυκοσίδες απορροφώνται όμως ικανοποιητικά μετά από ενδομυϊκή χορήγηση και μπορούν να χορηγηθούν σε ενδοφλέβια στάγδην έγχυση.

Όσον αφορά τη διείσδυση στους ιστούς, διέρχονται τον πλακούντα αλλά ελάχιστα διεισδύουν στο ΕΝΥ και στο υδατοειδές υγρό του οφθαλμού ακόμα και επί παρουσίας φλεγμονής. Οι αμινογλυκοσίδες διεισδύουν καλά στο αρθρικό, στο πλευριτικό, στο περικαρδιακό υγρό και στην περιτοναϊκή κοιλότητα, αλλά ελάχιστα στον οστίτη ιστό, στο προστατικό υγρό και καθόλου στο σίελο. Δεν συγκεντρώνονται στα χοληφόρα όταν υπάρχει απόφραξη, η δε κινητική τους στις βρογχικές εκκρίσεις δεν δίνει ικανοποιητικά επίπεδα για την αντιμετώπιση χρόνιων λοιμώξεων των βρόγχων από *P. aeruginosa*. Σε μεγάλη πυκνότητα συγκεντρώνονται στο νεφρικό παρέγχυμα και στα ούρα.

Τέλος, οι αμινογλυκοσίδες συνδέονται ελάχιστα με τα λευκώματα και δεν μεταβολίζονται, ενώ απεκκρίνονται σχεδόν αποκλειστικά με σπειραματική διήθηση από τους νεφρούς και έχουν κάθαρση ανάλογη με αυτή της ενδογενούς κρεατινίνης. Ο χρόνος υποδιπλασιασμού τους στον ορό κυμαίνεται μεταξύ 2 και 4 ωρών επί φυσιολογικής νεφρικής λειτουργίας, παρατεινόμενος επί νεφρικής ανεπάρκειας, ώστε να είναι αναγκαία η τροποποίηση του δοσολογικού σχήματος ανάλογα με το βαθμό της.

Όσον αφορά τη φαρμακοδυναμική τους, οι αμινογλυκοσίδες είναι δοσοεξαρτώμενα αντιμικροβιακά. Η δραστηριότητα των αμινογλυκοσιδών εξαρτάται από τη δοσολογία τους, όσο υψηλότερη είναι δηλαδή η στάθμη τους στον ορό τόσο μεγαλύτερη και ταχύτερη είναι η δραστηριότητά τους. Επίσης χαρακτηρίζονται από το αποκαλούμενο *post-antibiotic effect* (δράση μετά την επίδραση του αντιβιοτικού), δηλαδή οι αμινογλυκοσίδες μετά από μερικές ώρες βακτηριοκτόνου δράσεως, και ενώ η στάθμη στον ορό έχει μηδενιστεί, συνεχίζουν να ασκούν και βακτηριοστατική δράση που δεν επιτρέπει την ανάπτυξη των μικροβίων. Τα δεδομένα αυτά συνηγορούν υπέρ της εφάπαξ χορηγήσεως των αμινογλυκοσιδών (Begg & Barclay, 1995b; Freeman *et al.*, 1997).

1.3 Μηχανισμός δράσης

1.3.1 Βακτηριακή πρόσληψη

Η βακτηριακή πρόσληψη των αμινογλυκοσιδών είναι μια σημαντική διαδικασία για την βιολογική τους δραστηριότητα. Οι αμινογλυκοσίδες εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα ακολουθώντας μια διαδικασία με τρία βήματα, μια μη-ενεργοεξαρτώμενη και δύο ενεργοεξαρτώμενες φάσεις (Taber *et al.*, 1987; Tolmasky, 2007; Vakulenko & Mobashery, 2003; Veyssier & Bryskier, 2005). Οι αμινογλυκοσίδες, όπως προαναφέρθηκε, είναι θετικά φορτισμένα μόρια, τα οποία συνάπτουν αρχικά ηλεκτροστατικούς δεσμούς με την αρνητικά φορτισμένη εξωτερική στοιβάδα του βακτηριακού τοιχώματος των Gram-θετικών μικροβίων ή της κυτταρικής μεμβράνης των Gram-αρνητικών μικροβίων (τεϊχοϊκά οξέα και φωσφολιπίδια αντίστοιχα). Ως αποτέλεσμα των δεσμών αυτών, τα δισθενή κατιόντα (κυρίως Mg^{2+}) που γεφυρώνουν γειτονικά λιποπολυσακχαρίδια εκτοπίζονται, προκαλώντας έτσι χαλάρωση της συνοχής της εξωτερικής στοιβάδας του τοιχώματος και αύξηση της διαπερατότητάς της για τις αμινογλυκοσίδες (Shakil *et al.*, 2008). Η διαδικασία αυτής της διείσδυσης στον περιπλασματικό χώρο των Gram-θετικών μικροβίων αποκαλείται αυτοπροωθούμενη πρόσληψη (Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999; Vanhoof *et al.*, 1995). Ακολουθεί η ενεργοεξαρτώμενη βραδεία είσοδος μικρού αριθμού μορίων αμινογλυκοσίδης στο βακτηριακό κύτταρο, η διαπέραση δηλαδή και της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, με τη βοήθεια του διαμεμβρανικού δυναμικού (energy-dependent phase I: EDP-I) και έπειτα η πρόσδεση αυτών στην 30S

υπομονάδα των ριβοσωμάτων σε μία επίσης ενεργοεξαρτώμενη φάση (energy-dependent phase II: EDP-II) (Shakil *et al.*, 2008) (Εικόνα 2). Οι EDP-I και EDP-II απαιτούν την παρουσία οξυγόνου, υπαγορεύοντας έτσι την ανάγκη αερόβιων συνθηκών (Magnet & Blanchard, 2005) και εξηγώντας τη μειωμένη δραστηριότητα των αμινογλυκοσιδών σε αναερόβιες συνθήκες, όπως για παράδειγμα σε αποστηματικές κοιλότητες, αλλά και την ενδογενή αντοχή των αναερόβιων μικροβίων στις αμινογλυκοσίδες. Η είσοδος στο μικροβιακό κύτταρο μπορεί να ανασταλλεί και από αυξημένη ωσμωτικότητα ή από χαμηλό pH, επηρεάζοντας έτσι τη δραστηριότητα των αμινογλυκοσιδών, π.χ. στον πνεύμονα (Jana & Deb, 2006; Shakil *et al.*, 2008).

1.3.2 Μοριακός μηχανισμός δράσης

Αφού εισέλθουν στο κυτταρόπλασμα οι αμινογλυκοσίδες προσδένονται στην 30S υπομονάδα του προκαρυωτικού ριβοσώματος και διαταράσσουν τη μετάφραση του mRNA με ποικίλους τρόπους, αναστέλλοντας έτσι την βακτηριακή πρωτεϊνοσύνθεση στο στάδιο της έναρξης, της επιμήκυνσης ή του τερματισμού (Lambert, 2012).

Πιο πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι οι 4,6-2-DOS αμινογλυκοσίδες προσδένονται στο 16S ριβοσωμικό (r)RNA της 30S υπομονάδας και επάγουν την αναδιαμόρφωση της θέσης A (Lambert, 2012; Bryan & Kwan, 1983). Είναι πλέον καλά τεκμηριωμένο, ότι η θέση A είναι το κέντρο αποκωδικοποίησης του ριβοσώματος, καθώς αποτελεί τη θέση υποδοχής του αμινοάκυλο-tRNA (Ramirez & Tolmasky, 2010). Η αναδιαμόρφωση της θέσης αυτής λοιπόν επιτρέπει την πρόσδεση και άλλων tRNA (μη συμβατών με το εκάστοτε κωδικόνιο του mRNA) με αποτέλεσμα τη λανθασμένη ανάγνωση του γενετικού κώδικα και την παραγωγή και συσσώρευση μη λειτουργικών πρωτεϊνών (Lambert, 2012). Οι λανθασμένες πρωτεΐνες που παράγονται μπορούν να ενσωματωθούν στην κυτταρική μεμβράνη, οδηγώντας έτσι σε δυσλειτουργία της με αυξημένη μεταφορά αμινογλυκοσιδών στο εσωτερικό του μικροβίου (Carter *et al.*, 2000; Ramirez & Tolmasky, 2010), αλλά και διαφυγή Na⁺, K⁺ και αμινοξέων από το πρωτόπλασμα. Μπορούν επίσης, με τη δημιουργία ελεύθερων ριζών, να προκαλέσουν οξειδωτικό στρες και συνεπώς κυτταρικό θάνατο, ξεδιπλώνοντας έτσι τη βακτηριοκτόνο δράση τους (Kohanski *et al.*, 2008) (Εικόνα 2).

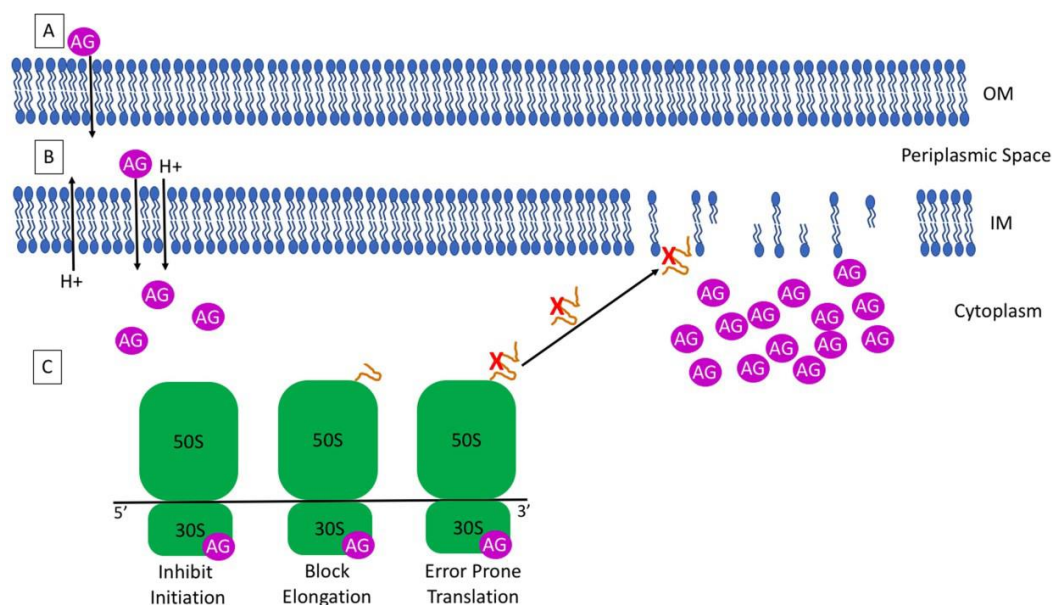
Η πρόσδεση των αμινογλυκοσιδών στα ριβοσώματα πραγματοποιείται σε μια θέση που οριοθετείται από τα νουκλεοτίδια A1492 και A1493, αλλά και την αδενίνη στο νουκλεοτίδιο 1408, που συναντάται μόνο στα προκαρυωτικά. Η ύπαρξη γουανίνης στην αντίστοιχη θέση 1408 του 18S RNA των ευκαρυωτικών κυττάρων εξηγεί την ενδογενή αντοχή αυτών στις 4,6-2-DOS αμινογλυκοσίδες (Lambert, 2012).

Όσον αφορά τις άτυπες αμινογλυκοσίδες, έχει μελετηθεί η αλληλεπίδραση τριών από αυτές (στρεπτομυκίνη, σπεκτινομυκίνη και

υγρομυκίνη Β) με την 30S ριβοσωμική υπομονάδα. Η στρεπτομυκίνη προσδένεται, όπως και οι 4,6- 2-DOS, στην θέση Α, αλληλεπιδρά όμως με περισσότερες περιοχές της θέσης αυτής. Η πρόσδεση της σπεκτινομυκίνης και της υγρομυκίνης Β στην υπομονάδα 30S αναστέλλει τη μετατόπιση του πεπτιδυλο-tRNA από την θέση Α στην θέση Ρ (θέση υποδοχής του πεπτιδυλο-tRNA) (Carter *et al.*, 2000), εμποδίζοντας έτσι τη σωστή ολοκλήρωση της πρωτεϊνοσύνθεσης.

Εκτός από τη ριβοσωμική υπομονάδα 30S ως κύριο στόχο των αμινογλυκοσιδών, έχει πρόσφατα αποδειχθεί ότι ορισμένες αμινογλυκοσίδες, όπως η γενταμικίνη και η νεομυκίνη, προσδένονται και στο 23S rRNA της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας (50S). Η πρόσδεση στο σημείο αυτό εμποδίζει τη διαδικασία ανακύκλωσης των ριβοσωμάτων (ribosomal recycling process), ένα απαραίτητο βήμα, στο οποίο οι δύο υπομονάδες χωρίζονται η μία από την άλλη μετά τη φάση του τερματισμού της πρωτεϊνοσύνθεσης και είναι ελεύθερες να προσδεθούν σε άλλα mRNA (Wang *et al.*, 2012).

Εικόνα 2. Μηχανισμός δράσης των αμινογλυκοσιδών (Serio *et al.*, 2018).



A: Ένα θετικά φορτισμένο μόριο αμινογλυκοσίδης συνδέεται με την αρνητικά φορτισμένη εξωτερική μεμβράνη του βακτηριακού κυττάρου και έπειτα διέρχεται στον περιπλασμικό χώρο.

B: Η αμινογλυκοσίδη διέρχεται μέσω της εσωτερικής μεμβράνης στο κυτταρόπλασμα με τη βοήθεια του διαμεμβρανικού δυναμικού στην ενεργοεξαρτώμενη φάση I.

C: Μετά την είσοδο στο κυτταρόπλασμα, η αμινογλυκοσίδη συνδέεται με το αρνητικά φορτισμένο 16S rRNA που βρίσκεται στην υπομονάδα 30S του βακτηριακού ριβοσώματος, όπου διακόπτει τη μετάφραση και οδηγεί στη δημιουργία ελαττωματικών πρωτεϊνών στην ενεργοεξαρτώμενη φάση II. Αυτές οι ελαττωματικές πρωτεΐνες ενσωματώνονται στην κυτταρική μεμβράνη, γεγονός που οδηγεί στο σχηματισμό πόρων και την είσοδο περισσότερων αμινογλυκοσιδών, με αποτέλεσμα τελικά τον κυτταρικό θάνατο.

1.4 Χρήση των αμινογλυκοσιδών

1.4.1 Κλινική χρήση (Jackson *et al.*, 2013; Block & Blanchard, 2021)

Αν και δεν είναι νέα κατηγορία αντιμικροβιακών, οι αμινογλυκοσίδες συνεχίζουν να αποδεικνύουν την κλινική τους αξία στην καταπολέμηση των λοιμώξεων. Οι αμινογλυκοσίδες έχουν ταχεία βακτηριοκτόνο δράση και μπορούν να θεωρηθούν ευρέως φάσματος αντιμικροβιακά φάρμακα, καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατά αρκετών Gram-αρνητικών, αλλά και Gram-θετικών μικροβίων, όπως επίσης και κατά των μυκοβακτηρίων (Durante-Mangoni *et al.*, 2009). Οι 4,5- και οι 4,6- 2-DOS είναι οι πιο κλινικά σημαντικές αμινογλυκοσίδες για θεραπευτική χρήση. Στα πλεονεκτήματά τους συγκαταλέγονται η χημική τους σταθερότητα, η ταχεία και ευρέως φάσματος βακτηριοκτόνος δράση τους, η σπάνια εμφάνιση αλλεργικών αντιδράσεων καθώς και το χαμηλό κόστος τους συγκριτικά με άλλα φάρμακα. Οι αμινογλυκοσίδες λειτουργούν επίσης συνεργικά με άλλες κατηγορίες αντιβιοτικών όπως οι β-λακτάμες (Vakulenko & Mobashery, 2003). Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά αναστέλλουν τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, προάγοντας έτσι την πρόσληψη της αμινογλυκοσίδης λόγω της αυξημένης κυτταρικής διαπερατότητας. Βέβαια, οι αμινογλυκοσίδες έχουν και ορισμένα μειονεκτήματα, όπως η μειωμένη απορρόφηση από το γαστρεντερικό σωλήνα, η αδυναμία δράσης κατά αναερόβιων μικροβίων και πιο σημαντικά, η τοξικότητα που παρουσιάζουν.

Καθώς υπάρχουν πολλά φάρμακα στην κατηγορία των αμινογλυκοσιδών, όπως η γενταμικίνη, η τομπραμυκίνη, η αμικασίνη, η νεομυκίνη, η πλαζομικίνη, η παρομομυκίνη και η στρεπτομυκίνη, οι εγκεκριμένες ενδείξεις από τον FDA ποικίλλουν μεταξύ των διαφορετικών αμινογλυκοσιδών. Γενικά, οι ενδείξεις για αμινογλυκοσίδες περιλαμβάνουν τόσο την εμπειρική όσο και την στοχευμένη θεραπεία. Δεδομένου ότι αυτή η κατηγορία φαρμάκων έχει επιδείξει αποτελεσματικότητα σε πολυανθεκτικά Gram-αρνητικά παθογόνα, οι αμινογλυκοσίδες ενδείκνυνται για εμπειρική θεραπεία σε ασθενείς με σοβαρή ασθένεια. Αυτό περιλαμβάνει εμπειρική θεραπεία για ασθενείς με λοιμώδη ενδοκαρδίτιδα, σηψαιμία, επιπλεγμένες ενδοκοιλιακές λοιμώξεις και επιπλεγμένες λοιμώξεις του ουροποιογεννητικού συστήματος. Συνήθως, σε αυτές τις περιπτώσεις, οι αμινογλυκοσίδες δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται για περισσότερο από δύο ημέρες, λόγω τοξικότητας για τον ασθενή. Για στοχευμένη θεραπεία, η χρήση αμινογλυκοσιδών για περισσότερο από 48 ώρες είναι αποδεκτή. Αποτελούν μέρος της στοχευμένης συνδυαστικής θεραπείας για τη βρουκέλλωση και τη μπαρτονέλλωση, τη λιστερίωση, τη νοκαρδίωση του ΚΝΣ και τη λοίμωξη από *Pseudomonas aeruginosa*. Η μονοθεραπεία με αμινογλυκοσίδες ενδείκνυται για την αντιμετώπιση ανθεκτικών μυκοβακτηρίων και ανθεκτικών Gram-αρνητικών παθογόνων, της τουλαραιμίας και της βακτηριαιμίας που

προκαλείται από *Campylobacter* spp. και *Yersinia* spp.. (Avent *et al.*, 2011; Pagkalis *et al.*, 2011)

Ανάλογα με την επιλεγμένη αμινογλυκοσίδη, η χορήγηση μπορεί να είναι από του στόματος, παρεντερική, εισπνεόμενη, ενδοπεριτοναϊκή, ή ενδοκοιλιακή. Η χορήγηση αυτών των παραγόντων είναι συνήθως παρεντερική. Η γενταμικίνη, η αμικασίνη και η τομπραμυκίνη είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες αμινογλυκοσίδες που χορηγούνται μέσω της παρεντερικής οδού (Avent *et al.*, 2011). Η τομπραμυκίνη μπορεί να εισπνευθεί μέσω νεφελοποίησης για ασθενείς με κυστική ίνωση που παρουσιάζουν έξαρση της πνευμονικής νόσου λόγω λοίμωξης (Smith *et al.*, 2018). Οι αμινογλυκοσίδες που λαμβάνονται από το στόμα είναι η παρομομυκίνη και η νεομυκίνη επειδή δεν μπορούν να απορροφηθούν συστηματικά· αυτές οι δύο αμινογλυκοσίδες επιδεικνύουν ενδοαυλική δραστηριότητα στο έντερο σε περιπτώσεις αμοιβάδωσης και λαμβλίας, ενώ χρησιμοποιούνται και τοπικά σε έλκη, πληγές ή εγκαύματα. Επιπλέον, η γενταμικίνη είναι αμινογλυκοσίδη που μπορεί να χορηγηθεί ενδοπεριτοναϊκά και ενδοκοιλιακά. Η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση γενταμικίνης είναι χρήσιμη σε ασθενείς υπό περιτοναϊκή κάθαρση που αναπτύσσουν περιτονίτιδα (Ranganathan *et al.*, 2009). Η χορήγηση γενταμικίνης ενδοκοιλιακά έχει αποδειχθεί χρήσιμη σε λοιμώξεις του κεντρικού νευρικού συστήματος (LeBras *et al.*, 2016).

1.4.2 Άλλες χρήσεις των αμινογλυκοσιδών

Παρά τον υψηλό αριθμό αμινογλυκοσιδών που έχουν ανακαλυφθεί τα τελευταία 70 χρόνια, μόνο μερικές από αυτές έχουν αποδειχθεί χρήσιμες και αποτελεσματικές για εφαρμογή στον άνθρωπο στην κλινική πράξη ως βακτηριοκτόνοι παράγοντες, κυρίως εκείνες που ανήκουν στις ομάδες των 4,5- και 4,6 2-DOS, καθώς και η στρεπτομυκίνη. Ωστόσο, ορισμένες αμινογλυκοσίδες μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για άλλους σκοπούς.

Όσον αφορά στον κλάδο της κτηνιατρικής, η χρήση των αμινογλυκοσιδών περιορίζεται στη θεραπεία λοιμώξεων σε διαφορετικά είδη ζώων, συμπεριλαμβανομένων τόσο των ζώων της κτηνοτροφίας όσο και των οικόσιτων. Επιπλέον, δύο αμινογλυκοσίδες, η destomycin A και η υγρομυκίνη B (2-DOS αμινογλυκοσίδες με ένα αμινοσάκχαρο στη θέση 5), χρησιμοποιούνται ως ανθελμινθικά φάρμακα για ζώα.

Ορισμένες αμινογλυκοσίδες, όπως η παρομομυκίνη, η ριβοσταμυκίνη και η στρεπτομυκίνη έχουν δείξει σημαντική αντιμυκητιασική δράση, καθώς επίσης και δράση κατά των ωομυκήτων (Lee *et al.*, 2005) και επομένως αποτελούν ένα σημαντικό όπλο καταπολέμησης ασθενειών φυτών, που καταστρέφουν πολλές φυτοκαλλιέργειες.

Η γνώση του μηχανισμού δράσης και του μοριακού στόχου των αμινογλυκοσιδών έχει οδηγήσει από τα μέσα της δεκαετίας του '90 σε μία

συναρπαστική νέα εφαρμογή αυτών των φαρμάκων ως πειραματική θεραπεία συγκεκριμένων γενετικών διαταραχών. Μόρια αμινογλυκοσιδών που φέρουν αντί αμινομάδας, ομάδα υδροξυλίου στη θέση 6, φαίνεται πως είναι πιο αποτελεσματικοί αναστολείς της ευκαρυωτικής πρωτεϊνοσύνθεσης (Shalev *et al.*, 2013). Αυτήν ακριβώς την ιδιότητα έχουν εκμεταλλευτεί διάφορες κλινικές μελέτες, που έχουν διεξαχθεί τις τελευταίες δεκαετίες για να εξακριβώσουν τον πιθανό ρόλο των αμινογλυκοσιδών στη θεραπεία γενετικών διαταραχών, όπως οι αιμορροφιλίες, η κυστική ίνωση ή η μυϊκή δυστροφία Duchenne (James *et al.*, 2005; Rich *et al.*, 1990; Kellermayer, 2006). Αυτές οι γενετικές διαταραχές προκαλούνται από nonsense μεταλλάξεις, που εισάγουν πρόωρα κωδικόνια τερματισμού και οδηγούν σε παραγωγή μη λειτουργικών μικρών πρωτεϊνών. Μερικές αμινογλυκοσίδες, όπως η γενταμικίνη, η παρομομυκίνη και η γενετισίνη (G-418), έχει φανεί πως καταστέλλουν τον πρόωρο τερματισμό της πεπτιδικής αλυσίδας και επαναφέρουν εν μέρει την παραγωγή λειτουργικών πρωτεϊνών σε περισσότερες από 20 γενετικές διαταραχές (Keeling & Bedwell, 2011). Έχει αναφερθεί προσωρινή ύφεση των συμπτωμάτων τέτοιων διαταραχών μετά τη χορήγηση αυτών των αμινογλυκοσιδών. Πάρα ταύτα, τα θέματα τοξικότητας αυτών των αντιβιοτικών εξακολουθούν να περιορίζουν την κλινική εφαρμογή τους για αυτό το σκοπό και σίγουρα απαιτείται περαιτέρω έρευνα.

Άλλες χρήσεις των αμινογλυκοσιδών περιλαμβάνουν τη θεραπεία του AIDS πειραματικά ως αναστολείς της αναπαραγωγής του ιού HIV (Houghton *et al.*, 2010), τη θεραπεία του συνδρόμου Ménière με τη μέθοδο της ενδοτυμπανικής έγχυσης (κυρίως γενταμικίνης) (Nakashima *et al.*, 2000), ενώ λίγες αμινογλυκοσίδες, όπως η γενετισίνη (G-418), διατίθενται ως βιοχημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στην έρευνα της μοριακής βιολογίας (Nudelman *et al.*, 2010).

Πίνακας 2. Ενδείξεις για παρεντερική χορήγηση αμινογλυκοσιδών (Avent *et al.*, 2011)

Προφύλαξη χειρουργικών λοιμώξεων	Εμπειρική Θεραπεία σοβαρής λοίμωξης (άγνωστο παθογόνο)	Στοχευμένη Θεραπεία (γνωστό παθογόνο)
<p>Διάρκεια θεραπείας: μία εφάπαξ δόση</p> <p><u>Γενταμικίνη</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Ουρολογικές επεμβάσεις - Ορισμένες χειρουργικές επεμβάσεις κοιλίας (εξαιρείται αποκατάσταση κήλης) - Αγγειοχειρουργικές επεμβάσεις - Καρδιοχειρουργικές επεμβάσεις 	<p>Διάρκεια θεραπείας: < 48 ώρες</p> <p><u>Γενταμικίνη</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Ενδοκοιλιακές και Χειρουργικές Λοιμώξεις - Χολαγγειίτιδα - Οξεία Χολοκυστίτιδα - Διάτρηση σπλάγγνου - Λοίμωξη χειρουργικού πεδίου - Λοιμώξεις Ουροποιογεννητικού Πυελονεφρίτιδα - Επιδιδυμορχίτιδα - Φλεγμονώδης Νόσος Πυέλου (μη σεξουαλικά μεταδιδόμενη) - Πνευμονία κοινότητας σε τροπικές περιοχές - Νοσοκομειακή Πνευμονία - Λοιμώδης Ενδοκαρδίτιδα - Λοιμώξεις ΚΝΣ - Επισκληρίδιο απόστημα - Ενδοφθαλμίτιδα - Σήψη - Σήψη που σχετίζεται με ενδαγγειακή γραμμή - Ενήλικας με άγνωστη εστία ή με υποψία Gram-αρνητικής βακτηριαιμίας - Παιδιά ηλικίας <4 μηνών και νεογνά με άγνωστη εστία - Εμπύρετος ουδετεροπενία 	<p>Διάρκεια θεραπείας: Παρατεταμένη, συχνά εβδομάδες</p> <p><u>Γενταμικίνη</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Βρουκέλλωση - Λοιμώδης Ενδοκαρδίτιδα (από <i>Enterococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp. και <i>Bartonella</i> spp. ή που σχετίζεται με προσθετική βαλβίδα ή ενδοκαρδιακή συσκευή) - Βακτηριαιμία από <i>Campylobacter</i> spp. και <i>Yersinia</i> spp. - Λοίμωξη από <i>P. aeruginosa</i> - Σοβαρή Λιστερίωση - Πνευμονική πανώλη - Τουλαραιμία <p><u>Τομπραμυκίνη</u></p> <p>Λοίμωξη από <i>P. aeruginosa</i> σε ασθενείς με κυστική ίνωση</p> <p><u>Αμικασίνη</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Gram-αρνητικά βακτήρια με υψηλού επιπέδου αντοχή (π.χ. μικρόβια που παράγουν MBL) - Λοίμωξη του ΚΝΣ από <i>Nocardia</i> spp. - (Ανθεκτική) μυκοβακτηριακή λοίμωξη (<i>M. tuberculosis</i>, <i>M. abscessus</i>, <i>M. avium</i> - complex)

1.5 Τοξικότητα των αμινογλυκοσιδών (Πετρίκκος, 2009; Lambert, 2012; Jackson *et al.*, 2013)

Οι κύριες τοξικές επιδράσεις των αμινογλυκοσιδών είναι η ωτοτοξικότητα, η νεφροτοξικότητα ενώ λιγότερο συχνή είναι η νευροτοξικότητα μέσω αποκλεισμού των νευρομυϊκών συνάψεων (Jackson *et al.*, 2013).

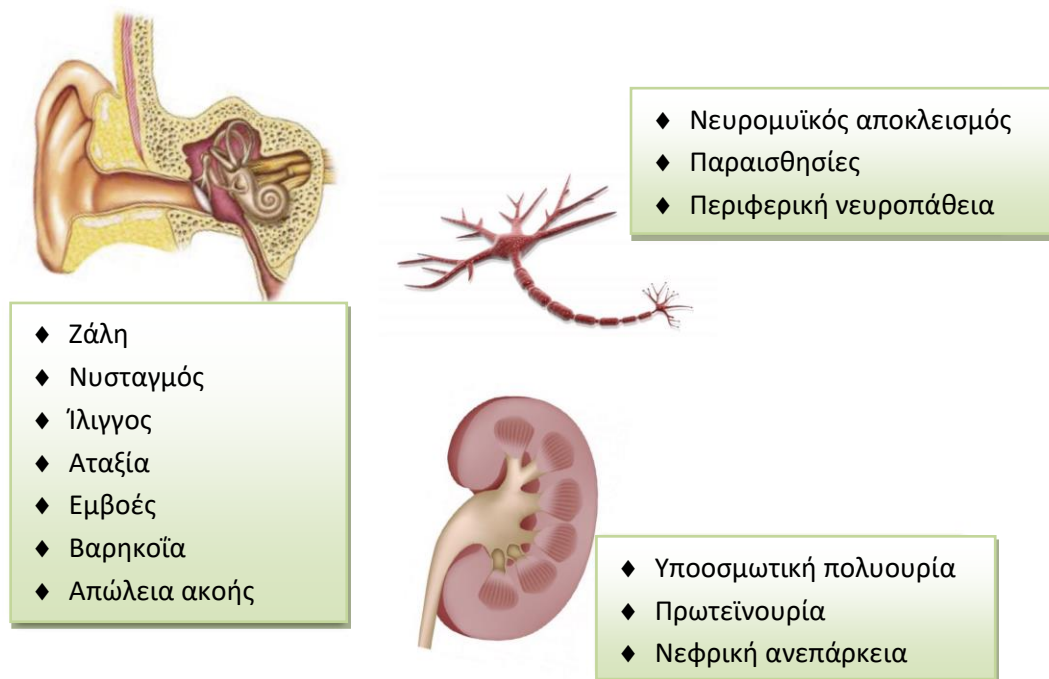
Διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν την εμφάνιση ή μη τοξικών επιδράσεων, όπως η επιλογή του φαρμάκου, η διάρκεια της θεραπείας ή η νεφρική λειτουργία. Άλλοι παράγοντες, όπως η ηλικία του ασθενούς ή η συγχορήγηση με άλλα φάρμακα, είναι επίσης πιθανόν να παίζουν ρόλο στα επίπεδα τοξικότητας των αμινογλυκοσιδών (Πετρίκκος, 2009).

Η τοξικότητα των αμινογλυκοσιδών αποτελεί ένα πολύ βασικό πρόβλημα στη χρήση τους, αν και η δυνατότητα που παρέχεται σήμερα στα περισσότερα νοσοκομεία για μέτρηση των επιπέδων τους στο αίμα και την προσαρμογή ανάλογα στη δοσολογία τους δίνει τη δυνατότητα αποφυγής της (Destache, 2014). Συνίσταται η αποφυγή χορήγησης αμινογλυκοσιδών σε ηλικιωμένους, σε ασθενείς με σοβαρά επηρεασμένη νεφρική λειτουργία και σε ασθενείς με αιθουσαία βλάβη ή προβλήματα ακοής. Θα έπρεπε να αποφεύγεται η συγχορήγηση με άλλα νεφρο- ή/και ωτοτοξικά φάρμακα, όπως επίσης και μυοχαλαρωτικά, καθώς και να ελέγχονται τακτικά η κρεατινίνη πλάσματος και η κάθαρση κρεατινίνης και να τροποποιούνται τα δοσολογικά σχήματα αναλόγως (Jackson *et al.*, 2013).

Έχει αποδειχθεί ότι η χορήγηση των αμινογλυκοσιδών σε μια εφάπαξ ημερήσια δόση είναι μια επιτυχημένη στρατηγική για την αποφυγή της νεφροτοξικότητας, καθώς συνοδεύεται από μικρότερη τοξικότητα σε σύγκριση με τη συνεχή ενδοφλέβια ή σε διαιρεμένες δόσεις χορήγησή τους, χωρίς να υπολείπεται σε κλινική αποτελεσματικότητα (Πετρίκκος, 2009; Freeman *et al.*, 1997; Wargo & Edwards, 2014). Πολλοί ερευνητές συστήνουν τον περιορισμό της θεραπείας με αμινογλυκοσιδές σε 3-5 ημέρες για αποφυγή τοξικών επιδράσεων (Craig, 2011).

Τα συμπτώματα που παρατηρούνται στις τοξικές επιδράσεις των αμινογλυκοσιδών συνοψίζονται στην Εικόνα 3.

Εικόνα 3. Τοξικές επιδράσεις των αμινογλυκοσιδών



1.5.1 Νεφροτοξικότητα (Jackson *et al.*, 2013; Wargo & Edwards, 2014)

Νεφροτοξικότητα εμφανίζεται σε περίπου 10-25% των περιπτώσεων που χορηγούνται αμινογλυκοσίδες και δεν περιορίζεται μόνο σε περιπτώσεις ενδοφλέβιας χορήγησης (Jackson *et al.*, 2013). Παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη νεφροτοξικότητας που αφορούν στον ασθενή αποτελούν η προχωρημένη ηλικία, τυχόν προϋπάρχουσα νεφρική δυσλειτουργία, αφυδάτωση, υποθυρεοειδισμός, εγκυμοσύνη, ηπατική δυσλειτουργία, ενώ παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με τη θεραπευτική αγωγή περιλαμβάνουν τη μακρά διάρκεια θεραπείας με αμινογλυκοσίδες, τη χορήγηση υψηλών δόσεων, τη χορήγηση σε διαιρεμένες δόσεις, καθώς επίσης και τη συγχορήγηση με άλλες νεφροτοξικές ουσίες, όπως μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (ΜΣΑΦ), διουρητικά, αμφοτερικίνη Β, σισπλατίνη, κυκλοσπορίνη, ιωδιούχες σκιαγραφικές ουσίες, βανκομυκίνη και κεφαλοσπορίνες (Wargo & Edwards, 2014).

Οι αμινογλυκοσίδες φαίνεται να ασκούν τις νεφροτοξικές τους επιδράσεις μέσω τριών γενικών μηχανισμών: τη νεφρική σωληναριακή τοξικότητα, τη μείωση της σπειραματικής διήθησης και την ελάττωση της νεφρικής αιματικής ροής (Wargo & Edwards, 2014).

Από πειραματικές και κλινικές μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η επαναρρόφηση της δια σπειραματικής διηθήσεως αποβαλλομένης αμινογλυκοσίδης από το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο δημιουργεί υψηλές συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών αυτών στο νεφρικό φλοιό, που είναι 20-30 φορές ανώτερες των αντιστοίχων του ορού, ενώ στο μυελό του νεφρού είναι πολύ χαμηλότερες. Από ραδιοϊσοτοπικές μελέτες αποδείχθηκε ότι οι αμινογλυκοσίδες αρχικά υφίστανται ενδοκυττάρωση και στη συνέχεια συσσωρεύονται στο σωμάτιο Golgi, στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στα λυσοσώματα, προκαλώντας φωσφολιπίδωση. Αργότερα απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα, όπου αναστέλλουν την οξειδωτική φωσφορυλίωση των μιτοχονδρίων και τελικώς οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο από οξεία σωληναριακή νέκρωση η οποία είναι δυνατόν να ακολουθείται από αναγέννηση ακόμα και όταν συνεχίζεται η χορήγηση των αμινογλυκοσιδών (Lopez-Novoa *et al.*, 2011).

Στο σπείραμα, οι αμινογλυκοσίδες επάγουν τη συστολή του μεσαγγείου, η οποία οδηγεί σε μειωμένο ρυθμό σπειραματικής διήθησης (GFR). Οι μηχανισμοί που οδηγούν στη σύσπαση του μεσαγγείου περιλαμβάνουν την επαγωγή της έκκρισης του Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF), την ενεργοποίηση του συστήματος Ρενίνης – Αγγειοτενσίνης - Αλδοστερόνης, την παραγωγή αγγειοσυσπαστικών ουσιών, όπως η Ενδοθηλίνη 1 και η Θρομβοξάνη A2, και το οξειδωτικό στρες. Αυξάνοντας τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ασβεστίου μέσω αυτών των μηχανισμών, τα μεσαγγειακά κύτταρα συσπώνται, οδηγώντας σε μείωση της GFR. Δευτερογενώς, λόγω της αυξημένης αγγειακής αντίστασης, μειώνεται και η νεφρική αιματική ροή, με αποτέλεσμα την περαιτέρω μείωση της GFR (Wargo & Edwards, 2014).

Κλινικώς, η νεφροτοξικότητα των αμινογλυκοσιδών στον άνθρωπο χαρακτηρίζεται από την πρόκληση κατά κανόνα πολυουρικής οξείας νεφρικής ανεπάρκειας που εμφανίζεται 7-10 ημέρες από την έναρξη της χορηγήσεως τους και υποχωρεί σε διάστημα 30 ημερών μετά τη διακοπή τους η οποία μπορεί, λόγω της πολυουρίας να μη γίνει αντιληπτή (Πετρίκκος, 2009). Τα πρώιμα σημεία της νεφρικής βλάβης είναι η αύξηση της απέκκρισης ασβεστίου, μαγνησίου, πρωτεϊνών και άλλων οργανικών ανιόντων στα ούρα, που μερικές φορές καταλήγουν σε υπασβεστιαϊμία, υπομαγνησισαιμία και πρωτεϊνουρία. Καθώς η βλάβη συνεχίζεται, μπορεί να παρατηρηθεί αυξημένη απέκκριση καλίου και νατρίου μαζί με αυξήσεις της κρεατινίνης ορού (Wargo & Edwards, 2014). Τα πρώιμα σημεία είναι αναστρέψιμα (αν και σπάνια έχει παρατηρηθεί εξέλιξη σε νεφρική βλάβη με ανουρία) και δεν επιβάλλουν τη διακοπή χορήγησης των αμινογλυκοσιδών (Jackson *et al.*, 2013).

1.5.2 Ωτοτοξικότητα (Jackson, 2013; Jiang, 2017; Rutka, 2019)

Η ωτοτοξικότητα εμφανίζεται σε ποσοστό έως και 25% των ασθενών που έλαβαν θεραπεία με αμινογλυκοσίδη και θεωρείται το μείζον μειονέκτημα των αμινογλυκοσιδών, καθώς, σε αντίθεση με τη νεφροτοξικότητα, οι τοξικές επιδράσεις εδώ συνήθως είναι μη αναστρέψιμες, οδηγώντας σε μόνιμη απώλεια της ακοής και της ισορροπίας (Jackson *et al.*, 2013; Huth *et al.*, 2011).

Οι αμινογλυκοσίδες διέρχονται εύκολα το φραγμό αίματος-περιλεμφικού χώρου. Στο χώρο αυτό, που βρίσκεται μεταξύ οστέινου και υμενώδη λαβυρίνθου, παραμένουν για αρκετό χρόνο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα υψηλές συγκεντρώσεις των αμινογλυκοσιδών στην έσω λέμφο με αποτέλεσμα την ωτοτοξικότητα. Ο μηχανισμός της προκαλούμενης βλάβης αφορά την εκλεκτική διαδοχική καταστροφή των τριχωτών κυττάρων του οργάνου του Corti και του αγγειώδους πετάλου του έξω τοιχώματος του κοχλιακού πόρου, που έχει ως αποτέλεσμα αρχικά την απώλεια της ακοής των υψηλών συχνοτήτων και δευτερευόντως τη σκλήρυνση του ακουστικού νεύρου και την πλήρη κώφωση (Jiang *et al.*, 2017). Παρόμοιες ιστολογικές βλάβες παρατηρούνται στους τροφοφόρους ιστούς της αιθούσης και στα τριχωτά αισθητήρια κύτταρα στα οποία καταλήγουν οι απολήξεις του αιθουσαίου νεύρου (Rutka, 2019).

Κλινικά εμφανής απώλεια της ακοής είναι ασυνήθης, από ακοομετρικές, όμως, μελέτες μπορεί να βρεθεί ότι ο ασθενής παρουσιάζει μείωση της ακοής. Η βλάβη του αιθουσαίου εκδηλώνεται με ναυτία, εμέτους, ίλιγγο, εμβοές, νυσταγμό και αστάθεια βαδίσεως, ωστόσο είναι δύσκολο να μελετηθεί, λόγω της δυσκολίας εφαρμογής του διαγνωστικού τεχνικού ελέγχου της ισορροπίας σε κλινικό επίπεδο.

Η ωτοτοξικότητα έχει συσχετιστεί με φυσικές αλλά και με ημισυνθετικές αμινογλυκοσίδες και οι διάφορες αμινογλυκοσίδες εμφανίζουν σημαντικές διαφορές όσον αφορά το βαθμό ωτοτοξικότητας και το είδος της, δηλαδή αιθουσαία ή κοχλιακή (Jackson *et al.*, 2013; Leis *et al.*, 2015). Η καναμυκίνη και η αμικασίνη προκαλούν κυρίως βλάβη του κοχλιακού νεύρου, ενώ η γενταμικίνη και η τομπραμυκίνη κυρίως του αιθουσαίου. Η στρεπτομυκίνη μπορεί να προκαλέσει βλάβη και στα δύο.

Η κοχλιακή τοξικότητα έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς όλων των ηλικιών, αλλά η προχωρημένη ηλικία φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της (Jackson *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2007). Οι μεγαλύτερες σε διάρκεια θεραπείες φαίνεται να προκαλούν συχνότερα απώλεια ακοής, αν και έχουν αναφερθεί μεμονωμένα κλινικά περιστατικά απώλειας ακοής μετά από μία μόνο ενδοφλέβια χορήγηση (Forge & Schacht, 2000).

Είναι ενδιαφέρον ότι η ωτοτοξικότητα της γενταμικίνης μπορεί να αξιοποιηθεί για τη θεραπεία ορισμένων ατόμων με τη νόσο του Ménière μέσω

καταστροφής του εσωτερικού αυτιού, η οποία σταματά τις επιθέσεις ιλίγγου, αλλά προκαλεί μόνιμη κώφωση (Nakashima *et al.*, 2000).

1.5.3 Αποκλεισμός νευρομυϊκών συνάψεων

Αν και σπάνια, τοξική επίδραση στις νευρομυϊκές συνάψεις έχει παρατηρηθεί μετά από χορήγηση αμινογλυκοσίδης, οδηγώντας σε νευρομυϊκή παράλυση (Jiang *et al.*, 2006). Η επίδραση αυτή έχει παρατηρηθεί κυρίως σε ασθενείς με μυασθένεια, υπασβεστιαμία ή δηλητηρίαση με *Clostridium botulinum*, αλλά και σε ασθενείς που ελάμβαναν συγχρόνως και άλλα φάρμακα που προκαλούν αποκλεισμό των νευρομυϊκών συνάψεων όπως η σουκινυλοχολίνη και το κουράριο (Jackson *et al.*, 2013; Del Pozo & Baeyens, 1986; Barrons, 1997). Ο κίνδυνος αυτός πρέπει να λαμβάνεται υπόψη και κατά τη διάρκεια χειρουργικών επεμβάσεων, όπως και σε ασθενείς που πάσχουν από εξωπυραμιδική συνδρομή ή λαμβάνουν ειδική κατασταλτική αγωγή. Η νευροτοξικότητα είναι όμως συνήθως αναστρέψιμη μετά τη διακοπή της αμινογλυκοσίδης (Πετρίκκος, 2009).

1.6 Ανακάλυψη νέων αμινογλυκοσιδών

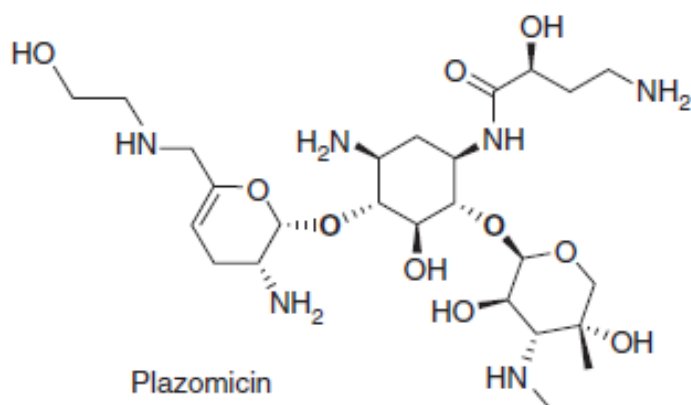
Η πρόσφατη εμφάνιση των 16S rRNA-μεθυλοτρανσφερασών ως μηχανισμός υψηλής αντοχής, η πιθανή αξία ορισμένων αμινογλυκοσιδών στη θεραπεία γενετικών ασθενειών, καθώς και το πρόβλημα τοξικότητας των ήδη γνωστών αμινογλυκοσιδών έχουν οδηγήσει στην επείγουσα ανάγκη ανακάλυψης ή δημιουργίας νέων αμινογλυκοσιδών.

1.6.1 Πλαζομικίνη

Σχετική έρευνα της βιοφαρμακευτικής εταιρείας Achaogen απέδωσε μια συλλογή περισσότερων από 400 αναλόγων σισομικίνης, εκ των οποίων επιλέχθηκε το ACHN-490, που αργότερα ονομάστηκε πλαζομικίνη (Aggen *et al.*, 2010) (Εικόνα 4). Η πλαζομικίνη επιδεικνύει *in vitro* αντιβακτηριακή δράση κατά πολλών πολυανθεκτικών Gram-αρνητικών βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων Εντεροβακτηριακών ανθεκτικών στις καρβαπενέμες, *Staphylococcus aureus* (και MRSA) και *Acinetobacter* species. Η πλαζομικίνη δεν επηρεάζεται από κανένα από τα γνωστά τροποποιητικά ένζυμα των αμινογλυκοσιδών, εκτός από τα AAC(2')-Ia, -Ib και -Ic (που έχουν βρεθεί μόνο σε *Providencia* species), αλλά δυστυχώς δεν είναι δραστική κατά των Gram-αρνητικών βακτηρίων που φέρουν 16S rRNA-μεθυλοτρανσφεράσες (Galani *et al.*, 2019). Είναι ένα πολλά υποσχόμενο νέο αντιμικροβιακό φάρμακο, που έχει

ήδη εγκριθεί από τον FDA και κυκλοφορεί στις ΗΠΑ με την ονομασία Zemdri, ενώ δεν κυκλοφορεί ακόμα στην Ευρώπη.

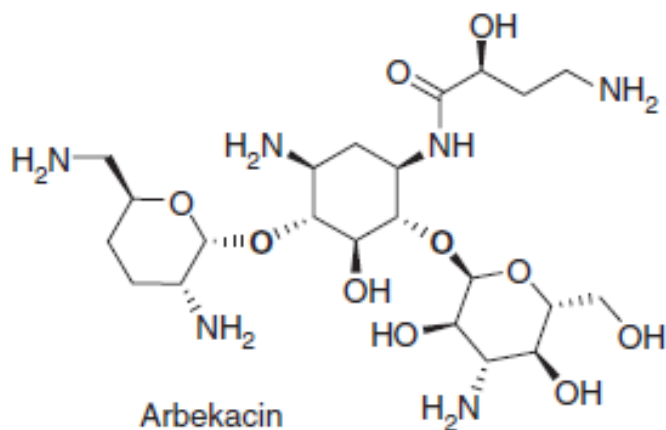
Εικόνα 4. Μοριακή δομή της πλαζομικίνης (Krause *et al.*, 2016).



1.6.2 Αρμπεκασίνη

Η τελευταία αμινογλυκοσίδη που πήρε έγκριση για κλινική χρήση πριν από την πλαζομικίνη ήταν η αρμπεκασίνη (Εικόνα 5) το 1990, αλλά η κλινική χρήση της σε ανθρώπους έχει εγκριθεί μόνο σε ορισμένες χώρες και μέχρι τώρα όχι σε χώρες της Ευρώπης. Είναι ένα παράγωγο της διβεκακίνης και έχει καλή δράση κατά των *Pseudomonas*, *Acinetobacter* και παραδόξως MRSA (Sato *et al.*, 2006). Η δράση της αρμπεκασίνης αναστέλλεται όμως από τις 16S rRNA-μεθυλοτρανσφεράσες.

Εικόνα 5. Μοριακή δομή της αρμπεκασίνης (Krause *et al.*, 2016).



1.6.3 Απραμικίνη

Η απραμυκίνη έχει αποδειχθεί πως είναι η μοναδική αμινογλυκοσίδη με δραστικότητα κατά οργανισμών που φέρουν γονίδια 16S rRNA-μεθυλοτρανσφεράσης, ενώ πιθανότατα έχει και καλύτερη δράση κατά των *Mycobacteria* (Jackson *et al.*, 2013). Παρά το γεγονός ότι φαίνεται να προκαλεί τοξικότητα σε μικρότερο βαθμό σε σύγκριση με τις αμινογλυκοσίδες που βρίσκονται τώρα σε κλινική χρήση (Matt *et al.*, 2012), εξακολουθεί να χρησιμοποιείται μόνο στην κτηνιατρική, ενώ αναμένονται τα αποτελέσματα της πρώτης κλινικής έρευνας για ανθρώπινη χρήση, που ξεκίνησε το 2019 και ολοκληρώθηκε το 2021 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04105205).

2. Μικροβιακή αντοχή στις αμινογλυκοσίδες

Παρά την αλματώδη πρόοδο στη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων με την εμφάνιση των αντιβιοτικών, η κατάσταση άλλαξε δραστικά από τη στιγμή που τα μικρόβια παρουσίασαν αντοχή σε αυτά, με αποτέλεσμα σήμερα η μικροβιακή αντοχή στα αντιβιοτικά να αποτελεί πλέον μία από τις μεγαλύτερες απειλές για τη Δημόσια Υγεία. Οι αριθμοί των βακτηρίων που αναπτύσσουν αντοχή στα αντιβιοτικά έχουν αυξηθεί δραματικά και αυτή η καταγραφόμενη συνεχής αύξηση οφείλεται στην κατάχρηση των αντιμικροβιακών παραγόντων, ειδικότερα των ευρέως φάσματος. Η συνεχής και ταχεία εμφάνιση και εξάπλωση μηχανισμών αντοχής σε όλα τα κλινικά χρησιμοποιούμενα αντιμικροβιακά φάρμακα σε συνδυασμό με την έλλειψη νέων βακτηριοκτόνων ουσιών τις τελευταίες δεκαετίες προκαλούν μεγάλη ανησυχία, καθώς έχουν ως αποτέλεσμα την έξαρση των νοσοκομειακών λοιμώξεων από πολυανθεκτικούς μικροοργανισμούς, με αύξηση της νοσηρότητας, της διάρκειας νοσηλείας και της θνησιμότητας των νοσηλευόμενων ασθενών και τελικό αντίκτυπο την οικονομική επιβάρυνση των Συστημάτων Υγείας (Tenover, 2006; McGowan, 2001).

Αναλυτικά, σύμφωνα με καταγραφές από το ESAC (European Surveillance of Antimicrobial Consumption) (ECDC, 2021), η Ελλάδα είναι η πρώτη χώρα της Ευρώπης σε συνολική – και ειδικότερα εξωνοσοκομειακή – κατανάλωση αντιβιοτικών, ενώ δυστυχώς συγκαταλέγεται και στις ευρωπαϊκές χώρες με τα υψηλότερα επίπεδα μικροβιακής αντοχής. Κατά την τελευταία δεκαπενταετία μάλιστα, έχουν αυξηθεί σημαντικά τα στελέχη *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* και *A. baumannii*, τα οποία εμφανίζουν αντοχή στα περισσότερα ή όλα τα διαθέσιμα αντιβιοτικά και αποτελούν απειλή για την παγκόσμια κοινότητα.

Συνήθως, τα ευαίσθητα βακτήρια μπορούν να αναπτύξουν αντοχή σε αντιβιοτικά μέσω μετάλλαξης ή μέσω επίκτητης γενετικής πληροφορίας (γενετικός ανασυνδυασμός). Οι μηχανισμοί γενετικού ανασυνδυασμού στα βακτήρια περιλαμβάνουν τη σύζευξη, το μετασχηματισμό και τη μεταγωγή, και επιταχύνουν την εξάπλωση της αντοχής με οριζόντια γονιδιακή μεταφορά μεταξύ στελεχών του ίδιου ή και διαφορετικού γένους (McManus, 1997). Αυτό το είδος επίκτητης αντοχής συμβάλλει σημαντικά στην εμφάνιση και εξάπλωση πολυανθεκτικών μικροβίων, ανθεκτικών δηλαδή σε περισσότερες κατηγορίες αντιμικροβιακών φαρμάκων, προκαλώντας ανησυχία στα νοσηλευτικά ιδρύματα. Κατά την τελευταία δεκαπενταετία μάλιστα, έχουν αυξηθεί σημαντικά τα πολυανθεκτικά στελέχη (Multi Drug Resistant - MDR) που παρουσιάζουν αντοχή σε τρεις ή και περισσότερες κατηγορίες αντιβιοτικών, τα εκτεταμένως ανθεκτικά στελέχη (Extensively Drug Resistant - XDR) που παραμένουν ευαίσθητα σε μία έως δύο κατηγορίες αντιβιοτικών, αλλά και τα πανανθεκτικά στελέχη (Pan Drug Resistant - PDR) αυτά δηλαδή που παραμένουν ανθεκτικά σε όλα τα διαθέσιμα αντιβιοτικά.

Οι αμινογλυκοσίδες ήταν μία από τις πρώτες κατηγορίες αντιβιοτικών που αναπτύχθηκαν κατά τη «Χρυσή Εποχή» ανακάλυψης των αντιβιοτικών (1940 έως 1960) και θεωρήθηκαν επανάσταση λόγω του ευρέος φάσματός τους και της ισχυρής βακτηριοκτόνου δράσης τους έναντι Gram-αρνητικών μικροβίων και μυκοβακτηρίων (Falagas *et al.*, 2011). Όπως και με άλλα αντιβιοτικά, η αντοχή στις αμινογλυκοσίδες έχει τρομερή επίπτωση στη χρησιμότητα αυτών των φαρμάκων.

Η μικροβιακή αντοχή στις αμινογλυκοσίδες προσδίδεται από διάφορους μηχανισμούς, που μπορούν να συνυπάρχουν ταυτόχρονα στο ίδιο κύτταρο (Houghton *et al.*, 2010; Magnet & Blanchard, 2005; Taber *et al.*, 1987; Tolmasky, 2007). Οι μηχανισμοί, που έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα, περιλαμβάνουν την ελαττωμένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση του αντιβιοτικού, την ενζυμική τροποποίηση του φαρμάκου και την τροποποίηση του μοριακού στόχου. Αυτοί οι μηχανισμοί θα αναλυθούν εκτενέστερα σε αυτό το κεφάλαιο.

2.1 Ελαττωμένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση

Η ελαττωμένη συγκέντρωση των αμινογλυκοσιδών μέσα στο βακτηριακό κύτταρο οφείλεται στη διαταραχή των μηχανισμών εισόδου ή εξόδου τους προς και από αυτό. Δηλαδή η χαμηλότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού επιτυγχάνεται είτε μέσω ελαττωμένης πρόσληψης είτε μέσω αυξημένης απέκκρισης του αντιβιοτικού από αντλίες ενεργητικής εκροής.

2.1.1 Ελαττωμένη πρόσληψη αμινογλυκοσιδών

Η είσοδος των αμινογλυκοσιδών στο κύτταρο απαιτεί την ύπαρξη κυτταρικής αναπνοής με παραγωγή ενέργειας και άρα επιτυγχάνεται μόνο σε αερόβιους μικροοργανισμούς. Επομένως, αναερόβια βακτήρια είναι ενδογενώς ανθεκτικά στις αμινογλυκοσίδες λόγω της αδυναμίας πρόσληψης του αντιβιοτικού. Κατά τον ίδιο τρόπο, βακτήρια με χρωμοσωμικές μεταλλάξεις που επηρεάζουν το σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων, όπως είναι π.χ. η έλλειψη της ATP-συνθετάσης, παρουσιάζουν ελαττωμένο ηλεκτρικό δυναμικό και άρα επηρεασμένη μεταφορά αμινογλυκοσιδών, με αποτέλεσμα να είναι ανθεκτικά σε αυτές. Τέτοιου είδους μεταλλαγμένα στελέχη του γένους *E. coli*, *P. aeruginosa* και *S. aureus* έχουν απομονωθεί σε λοιμώξεις του ενδοκαρδίου (Balwit *et al.*, 1994).

Σε στελέχη *P. aeruginosa* παρατηρείται συχνότερα συγκριτικά με άλλα στελέχη μειωμένη ευαισθησία στις αμινογλυκοσίδες λόγω ελαττωμένης πρόσληψης. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί αντοχή στη γενταμικίνη, η οποία προσδίδεται από την απενεργοποίηση της OprH, μιας πορίνης της εξωτερικής μεμβράνης. Για την αντοχή στις αμινογλυκοσίδες λόγω μειωμένης διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης έχει ενοχοποιηθεί επίσης το

ρυθμιστικό σύστημα *phoP/phoQ*, που αποτελείται από δύο ρυθμιστές διάφορων γονιδίων υπεύθυνων για την τροποποίηση λιποπολυσακχαριτών. Ο τροποποιημένος πολυσακχαρίτης είναι λιγότερο αρνητικά φορτισμένος και έλκει ασθενέστερα το θετικά φορτισμένο μόριο της αμινογλυκοσίδης, με αποτέλεσμα αυτό να μην μπορεί να εισέλθει στο κύτταρο (Bryan *et al.*, 1984; Poole, 2005a). Επιπρόσθετα, η επιφανειακή βλέννα (αλγινικό έλυτρο) ορισμένων στελεχών *P. aeruginosa* φαίνεται να παίζει ρόλο στη μειωμένη πρόσληψη αμινογλυκοσιδών, πιθανότατα σαν παγίδα ιόντων για το μόριο του αντιβιοτικού (Hatch & Schiller, 1998).

2.1.2 Ενεργή εξώθηση (Efflux)

Η απέκκριση αντιβιοτικών είναι μια ενεργοεξαρτώμενη διαδικασία, που συμβάλλει σημαντικά στην πολυαντοχή διάφορων μικροβίων. Τα τελευταία χρόνια, έχουν περιγραφεί σε διάφορα βακτήρια ποικίλοι πλασμιδιακοί και χρωμοσωμικοί μηχανισμοί ενεργής εξώθησης. Συνήθως, βακτήρια που φέρουν συστήματα ενεργητικής εκροής είναι ενδογενώς ανθεκτικά σε χαμηλά επίπεδα διάφορων αντιβιοτικών. Όταν, όμως, υπάρχουν μεταλλάξεις στα ρυθμιστικά γονίδια των συστημάτων αυτών και παρουσιάζεται αυξημένη επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων και άρα αυξημένη παρουσία αντλιών εκροής, υπάρχει και αυξημένη απέκκριση του αντιβιοτικού και έτσι υψηλότερη αντοχή του βακτηρίου σε αυτό.

Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν πέντε οικογένειες διαμεμβρανικών αντλιών ενεργητικής εκροής που σχετίζονται με μικροβιακή αντοχή (Πίνακας 3) και είναι οι εξής: η MF (major facilitator superfamily), η ABC (ATP-binding cassette family), η RND (resistance-nodulation division family), η SMR (small multidrug resistance family) και η MATE (multidrug and toxic compound extrusion family). Έχουν καταγραφεί συστήματα ενεργής εξώθησης και των πέντε οικογενειών που φαίνεται να προσδίδουν αντοχή στις αμινογλυκοσίδες, αλλά η πλειοψηφία των αντλιών ενεργητικής εκροής αμινογλυκοσιδών σε Gram-αρνητικά μικρόβια φαίνεται να ανήκουν στην οικογένεια RND (Poole, 2005b) (Εικόνα 6).

Η ενεργής εξώθηση των αμινογλυκοσιδών είναι ένας σημαντικός μηχανισμός αντοχής σε βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, *Burkholderia* και *Stenotrophomonas*, αν και έχει περιγραφεί και σε άλλα βακτήρια. Το πρώτο σύστημα ενεργητικής εκροής αμινογλυκοσιδών, το AmrAB-OprA, ανιχνεύτηκε σε στέλεχος *Burkholderia pseudomallei*. Έκτοτε έχουν αναφερθεί και άλλα συστήματα ενεργής εξώθησης σε στελέχη *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Lactococcus lactis*, *Acinetobacter baumannii* και *Stenotrophomonas* spp. (Πίνακας 3). Ο πρώτος αντίστοιχος μηχανισμός που βρέθηκε σε στέλεχος *P. aeruginosa* ήταν το σύστημα MexAB-OprM, το οποίο όμως δεν φαίνεται να προσδίδει ιδιαίτερα ισχυρή αντοχή στις αμινογλυκοσίδες (Masuda *et al.*, 2000). Η πιο δραστική αντλία ενεργητικής εκροής στα στελέχη *P. aeruginosa* είναι το σύστημα MexXY-OprM (Aires *et al.*, 1999). Τα γονίδια *mexXY* είναι τοποθετημένα μαζί σε ένα

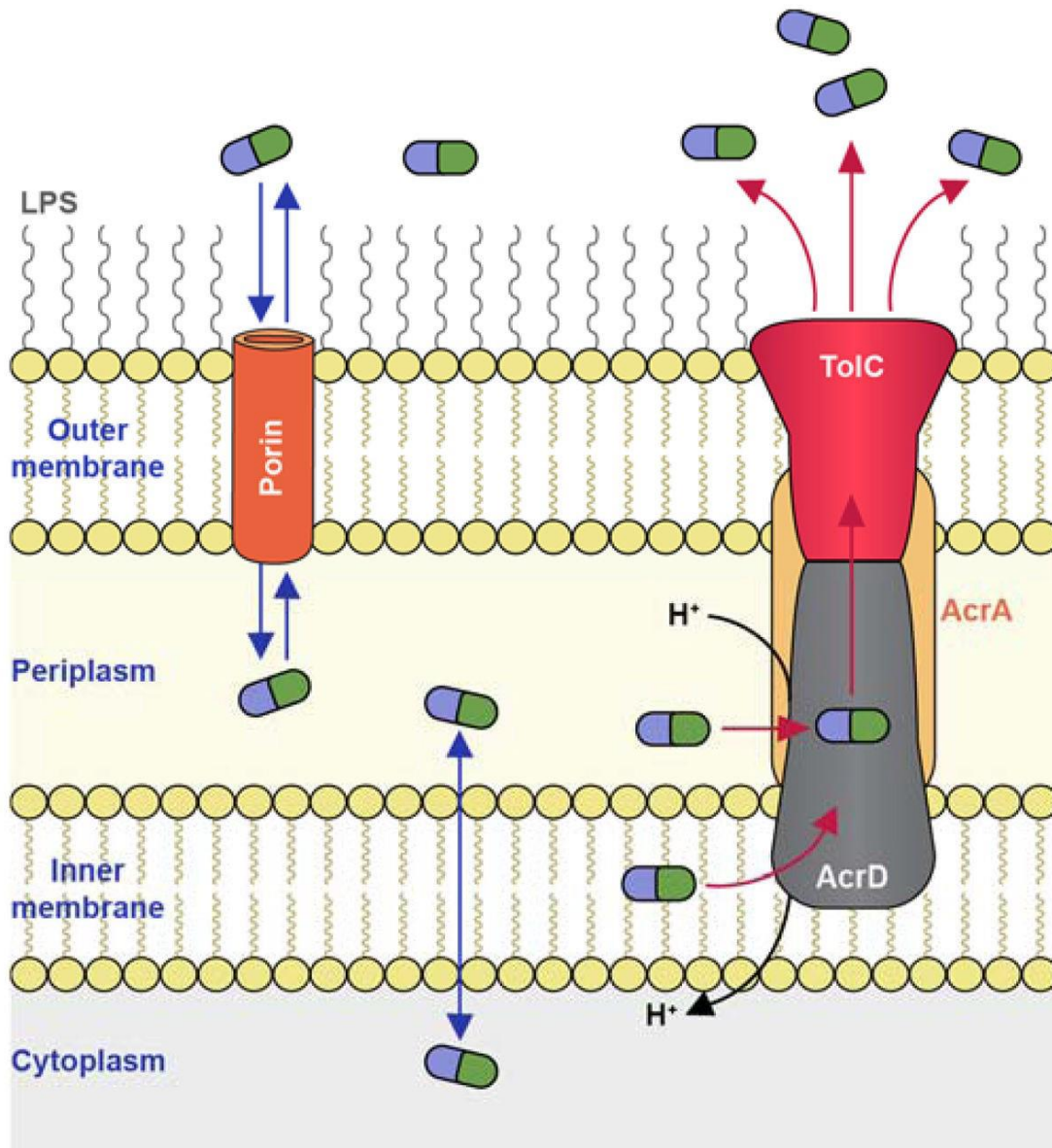
οπερόνιο με το *mexZ*, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη-καταστολέα της έκφρασης των *mexXY*. Η έκφραση των *mexXY* επάγεται από την παρουσία αμινογλυκοσιδών, οπότε η έκθεση του βακτηρίου σε οποιαδήποτε αμινογλυκοσίδη έχει ως αποτέλεσμα την υψηλή αντοχή σε όλες τις αμινογλυκοσίδες, η οποία όμως χάνεται γρήγορα απουσία του φαρμάκου. Αντίστοιχο σύστημα ενεργητικής εκροής αμινογλυκοσιδών του *MexXY-OprM*, είναι το *AcrAD-TolC* στο *E. coli* (Rosenberg *et al.*, 2000). Υπάρχουν και διάφοροι άλλοι, ομόλογοι του *AcrD*, μηχανισμοί σε άλλα γένη της οικογένειας των Εντεροβακτηριακών, γεγονός που υποδεικνύει την πιθανή ύπαρξη αυτού του μηχανισμού αντοχής σε όλες τις αμινογλυκοσίδες και σε άλλα Gram-αρνητικά μικρόβια.

Αν και τα γονίδια των μηχανισμών ενεργής εξώθησης αμινογλυκοσιδών βρίσκονται κυρίως στο βακτηριακό χρωμόσωμα, συστήματα ενεργητικής εκροής της οικογένειας MF φαίνεται να μειώνουν την ευαισθησία στις αμινογλυκοσίδες σε στελέχη που φέρουν το δομικό γονίδιο σε πλασμίδιο.

Πίνακας 3. Οικογένειες συστημάτων ενεργούς εξώθησης που σχετίζονται με αντοχή σε αντιμικροβιακά και οι κύριες αντλίες που προσδίδουν αντοχή στις αμινογλυκοσίδες

Οικογένεια	Σύστημα efflux	Είδος	Θέση
MF	MdfA	<i>E. coli</i>	Πλασμίδιο
ABC	LmrA	<i>L. lactis</i>	Χρωμόσωμα
RND	AmrAB-OprB	<i>B. pseudomallei</i>	Χρωμόσωμα
	BpeAB-OprB	<i>B. pseudomallei</i>	Χρωμόσωμα
	MexAB-OprM	<i>P. aeruginosa</i>	Χρωμόσωμα
	MexXY-OprM	<i>P. aeruginosa</i>	Χρωμόσωμα
	AcrAD-TolC	<i>E. coli</i>	Χρωμόσωμα
	AdeAB-AdeC	<i>A. baumannii</i>	Χρωμόσωμα
	SmeAB-SmeC	<i>S. maltophilia</i>	Χρωμόσωμα
SMR	EmrE	<i>P. aeruginosa</i>	Χρωμόσωμα
MATE	AbeM	<i>A. baumannii</i>	Χρωμόσωμα

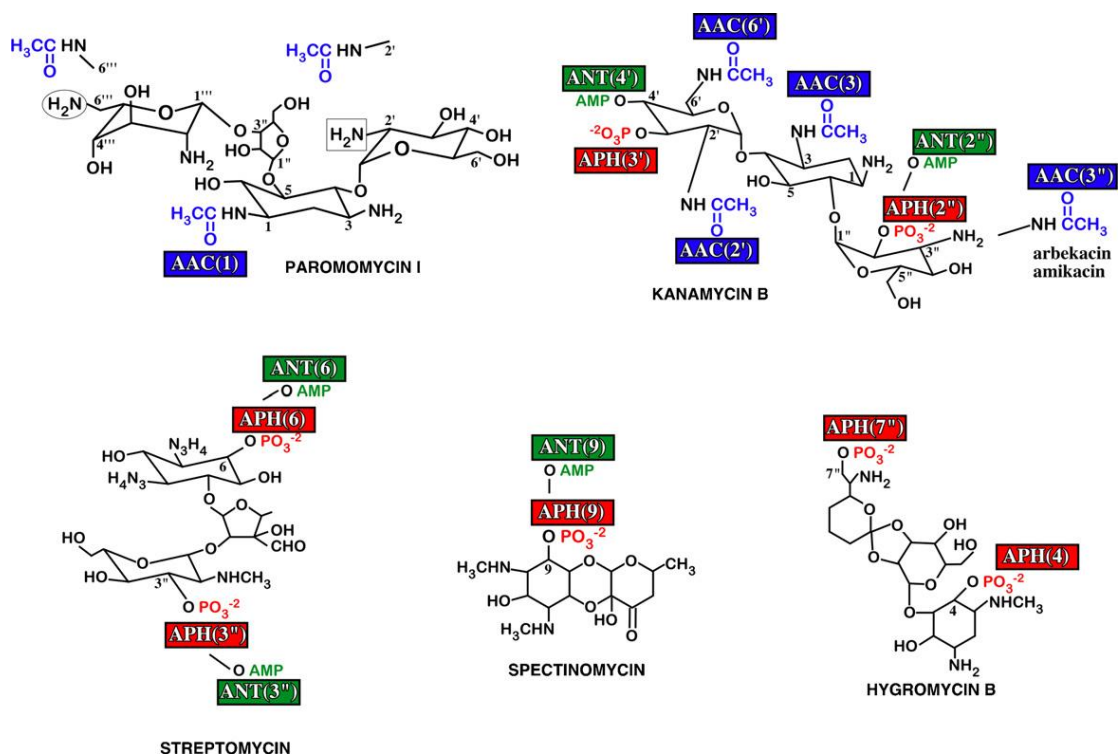
Εικόνα 6. Μεταφορά μορίων αμινογλυκοσίδης μέσω μίας βακτηριακής πορίνης (αριστερά) και μέσω μίας αντλίας εκροής τύπου RND AcrAD-TolC (δεξιά) στην βακτηριακή μεμβράνη. Οι αμινογλυκοσίδες αντιπροσωπεύονται από τις πράσινες και μπλε παστίλιες και τα βέλη απεικονίζουν την εκροή και την εισροή. Οι αντλίες εκροής απαιτούν τη χρήση πρωτονίων (H^+) ως πηγή ενέργειας. (Garneau-Tsodikova & Labby, 2016)



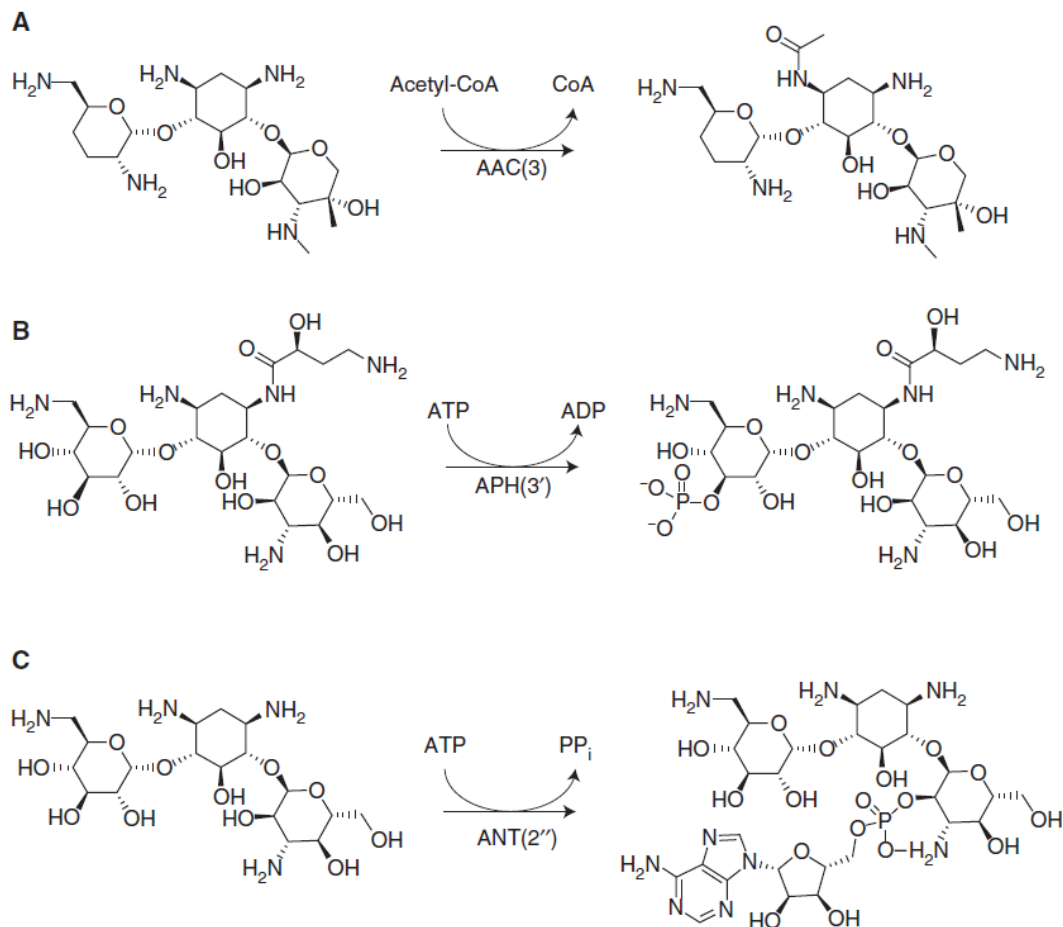
2.2 Ενζυμική τροποποίηση των αμινογλυκοσιδών (Ramirez & Tolmasky, 2010)

Η ενζυμική τροποποίηση των αμινογλυκοσιδών είναι ο πιο διαδεδομένος μηχανισμός αντοχής στις αμινογλυκοσίδες (Tolmasky, 2007), τόσο σε Gram-θετικά όσο και σε Gram-αρνητικά μικρόβια. Τα αμινογλυκοσιδο-τροποποιητικά ένζυμα (AMEs) κατηγοριοποιούνται σε τρεις οικογένειες: τις αμινογλυκοσιδο-ακετυλοτρανσφεράσες (AACs), τις αμινογλυκοσιδο-φωσφοτρανσφεράσες (APHs) και τις αμινογλυκοσιδο-νουκλεοτρανσφεράσες (ANTs). Αυτά τα ένζυμα τροποποιούν τις αμινογλυκοσίδες-στόχους τους σε υδροξυλομάδες ή αμινομάδες της αμινοκυκλιτόλης ή των αμινοσακχάρων του μορίου χρησιμοποιώντας σαν συνένζυμα είτε ATP είτε ακετυλο-CoA (Εικόνα 7, Εικόνα 8). Οι ομάδες αυτές στο μόριο του αντιβιοτικού είναι συνήθως απαραίτητες για τη σύνδεση της αμινογλυκοσίδης με το ριβόσωμα.

Εικόνα 7. Αντιπροσωπευτικές αμινογλυκοσίδες και οι θέσεις τροποποίησης τους από διαφορετικές AACs, ANTs και APHs (Ramirez & Tolmasky, 2010).



Εικόνα 8. Χημική τροποποίηση αμινογλυκοσιδών από AMEs (Krause *et al.*, 2016).



A: τροποποίηση της γενταμικίνης που καταλύεται από την ακετυλοτρανσφεράση AAC(3).

B: τροποποίηση της αμικασίνης που καταλύεται από τη φωσφοτρανσφεράση APH(3').

C: τροποποίηση της καναμικίνης που καταλύεται από τη νουκλεοτιδοτρανσφεράση ANT(2'').

Ο μεγάλος αριθμός αμινογλυκοσιδο-τροποποιητικών ενζύμων και των γονιδίων τους απαιτεί ένα τυποποιημένο σύστημα ονοματολογίας. Ωστόσο, υπάρχουν δύο συστήματα που χρησιμοποιούνται ευρέως επί του παρόντος για την ταυτοποίηση αυτών των ενζύμων. Το παλαιότερο σύστημα ονοματολογίας ορίζει τα γονίδια ως *aac* (για AACs), *aad* (για ANTs) και *aph* (για APHs), ακολουθούμενο από κεφαλαίο γράμμα που προσδιορίζει τη θέση τροποποίησης στην αμινογλυκοσίδη (π.χ. το *aacA* σημαίνει αμινογλυκοσιδο-6'-N-ακετυλοτρανσφεράση). Στη συνέχεια προστίθεται ένας αριθμός που προσδιορίζει ένα συγκεκριμένο γονίδιο (π.χ. *aacA3*) (Shaw *et al.*, 1993). Το άλλο σύστημα ονοματολογίας αποτελείται από τα ακρωνύμια AAC, ANT ή APH, που αναφέρονται στην οικογένεια ενζύμων και σχετίζονται με τον τύπο της ενζυμικής δραστηριότητας, ακολουθούμενο από τη θέση τροποποίησης στην

παρένθεση, έναν ρωμαϊκό αριθμό που αναφέρεται στον φαινότυπο αντοχής και ένα πεζό γράμμα για το συγκεκριμένο γονίδιο (π.χ. AAC(6')-Ia) (Novick *et al.*, 1976). Δηλαδή το AAC(6')-Ia αντιπροσωπεύει μια N-ακετυλοτρανσφεράση που καταλύει την ακετυλίωση στη θέση 6' προσδίδοντας ένα προφίλ αντοχής πανομοιότυπο με τα άλλα ένζυμα AAC(6')-I (δηλαδή τα AAC(6')-Ib έως AAC(6')-Iaf). Κάθε μία από τις ονοματολογίες έχει τα δικά της πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα και διαφορετικοί συγγραφείς προτιμούν τη μία από την άλλη. Για να αποφευχθεί η σύγχυση όμως, προτάθηκε από ερευνητές η χρήση ενός ενιαίου συστήματος ονοματολογίας, το οποίο θα διευκολύνει την ταξινόμηση και τη μελέτη αυτών των ενζύμων (Vanhoof *et al.*, 1998; Tomalsky, 2007).

Πολλά από τα γονίδια που κωδικοποιούν αυτά τα ένζυμα έχουν την ικανότητα να μεταφέρονται σε μοριακό επίπεδο ως μέρος ιντεγκρονίων, γονιδιακών κασετών, τρανσποζονίων ή άλλων μεταθετών στοιχείων, αλλά και σε κυτταρικό επίπεδο κυρίως μέσω σύζευξης με κινητά ή συζευκτικά πλασμίδια, οδηγώντας έτσι σε σημαντική εξάπλωση αυτού του τύπου μηχανισμού αντοχής (Shaw *et al.*, 1993). Η οριζόντια μεταφορά των γονιδίων σε συνδυασμό με τη μεταλλαξιγένεση, η οποία οδηγεί σε συνεχή παραγωγή νέων τροποποιητικών ενζύμων που μπορούν να αλληλεπιδρούν με έναν συνεχώς αυξανόμενο αριθμό αντιβιοτικών, έχουν ως αποτέλεσμα την ικανότητα αυτού του μηχανισμού αντοχής να αγγίζει σχεδόν όλους τους τύπους βακτηρίων. Ο αριθμός των τροποποιητικών ενζύμων των αμινογλυκοσιδών που έχουν εντοπιστεί μέχρι σήμερα, καθώς και το γενετικό περιβάλλον των υπεύθυνων γονιδίων είναι εντυπωσιακά, επομένως οι παραπομπές και τα παραδείγματα που περιγράφονται εδώ θα πρέπει να θεωρούνται αντιπροσωπευτικά και όχι περιεκτικά.

2.2.1 N-Ακετυλοτρανσφεράσες (Ramirez & Tolmasky, 2010)

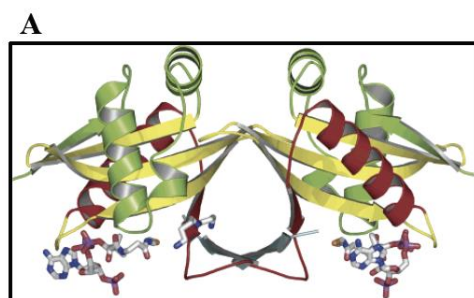
Οι AACs καταλύουν την εξαρτώμενη από ακετυλο-CoA N-ακετυλίωση μιας από τις τέσσερις αμινομάδες των τυπικών αμινογλυκοσιδών. Οι AACs καταλύουν την ακετυλίωση στις θέσεις 1 [AAC(1)], 3 [AAC(3)], 2' [AAC(2')] ή 6' [AAC(6')] του μορίου της αμινογλυκοσιδής. Αυτή η ακετυλίωση μειώνει την ικανότητα πρόσδεσης των αμινογλυκοσιδών στο στόχο τους στη ριβοσωμική υπομονάδα 30S. Τα ένζυμα που ανήκουν σε αυτήν την οικογένεια υπάρχουν τόσο σε Gram-θετικά όσο και σε Gram-αρνητικά βακτήρια και γενικά προσδίδουν έναν πολύ ευρύ φαινότυπο αντοχής στις αμινογλυκοσιδές. Οι τρισδιάστατες δομές αρκετών AACs έχουν προσδιορισθεί (Εικόνα 9), ενώ και οι μηχανικές και δομικές πτυχές πολλών εκπροσώπων αυτής της οικογένειας ενζύμων έχουν μελετηθεί και αναθεωρηθεί διεξοδικά.

Οι AACs ανήκουν στην οικογένεια πρωτεϊνών GNAT (GCN5-related N-acetyltransferases), η οποία περιλαμβάνει περίπου 10.000 πρωτεΐνες (Azucena & Mobashery, 2001; Vetting *et al.*, 2005; Tolmasky, 2007). Τα ένζυμα GNAT είναι σε θέση να ακετυλιώνουν και διάφορα άλλα μόρια, επομένως και οι AACs μπορούν να τροποποιήσουν και άλλα μόρια εκτός από τις

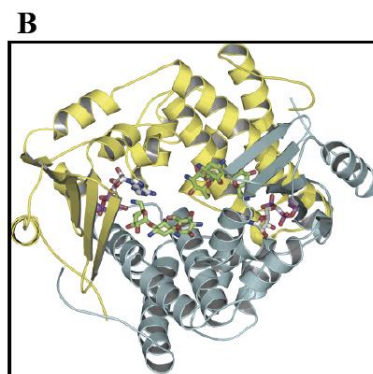
αμινογλυκοσίδες (για παράδειγμα, η AAC(6')-Ii μπορεί να ακετυλιώνει και ριβονουκλεάση A ή ιστόνες). Το γεγονός αυτό οδήγησε στην υπόθεση ότι οι AACs μπορεί να έχουν άλλες λειτουργίες στο κύτταρο και η ικανότητα τροποποίησης των αμινογλυκοσιδών θα μπορούσε να έχει προκύψει μέσω εξέλιξης (Houghton *et al.*, 2010). Αυτή η οικογένεια ενζύμων εξελίσσεται συνεχώς, γεγονός που αποδεικνύεται από την ανακάλυψη της δι-λειτουργικής AAC(6')-Ib-cr πριν από μερικά χρόνια, παραλλαγή της AAC(6')-Ib, που μπορεί επίσης να τροποποιήσει και τις φθοριοκινολόνες (Vetting *et al.*, 2008).

Η οικογένεια των AACs ταξινομείται σε τέσσερις κύριες κατηγορίες με βάση τη θέση ακετυλίωσης στη δομή των αμινογλυκοσιδών: AAC(6'), AAC(2'), AAC(1) και AAC(3). Οι αμινογλυκοσίδο-N-ακετυλοτρανσφεράσες παρατίθενται στον Πίνακα 4.

Εικόνα 9. Η 3D δομή ορισμένων αμινογλυκοσίδο-τροποποιητικών ενζύμων. (Magnet & Blanchard, 2005)



A: Σύμπλεγμα AAC(3)-CoA



B: Σύμπλεγμα ANT(4')-καναμικίνης A

Πίνακας 4. Κατηγοριοποίηση των AACs (Ramirez & Tolmasky, 2010)

AACs	Gene names	Genetic location	Accession number	Host	References
AAC(1)				<i>E. coli</i> , Actinomycete, <i>Campylobacter</i> spp.	Gomez-Luis et al. (1999), Lovering et al. (1987), Sunada et al. (1999)
AAC(3)-Ia C	<i>aac(3)-Ia</i> , <i>aacC1</i>	Plasmid, transposon, integron	X15852, AF550679	<i>S. marcescens</i> , <i>E. coli</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Proteus mirabilis</i>	Javier Teran et al. (1991), Wohlleben et al. (1989)
AAC(3)-Ib	<i>aac(3)-Ib</i>	Integron	L06157	<i>P. aeruginosa</i>	Schwocho et al. (1995)
AAC(3)-Ic	<i>aac(3)-Ic</i>	Integron	AJ511268	<i>P. aeruginosa</i>	Riccio et al. (2003)
AAC(3)-Id	<i>aac(3)-Id</i>	Genomic island, integron	AY458224	<i>S. enterica</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Vibrio fluvialis</i>	Doublet et al. (2004)
AAC(3)-Ie	<i>aac(3)-Ie</i> , <i>aacCA5</i>	Integron	AY463797, DQ520937, AY463797	<i>S. enterica</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Gionchetti et al. (2008), Levings et al. (2005)
AAC(3)-IIa	<i>aac(3)-IIa</i> , <i>aacC3</i> , <i>aacC5</i> , <i>aacC2</i> , <i>aac(3)-Va</i>	Plasmid	X13543	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>Citrobacter freundii</i>	Allmansberger et al. (1985)
AAC(3)-IIb	<i>aac(3)-IIb</i> , <i>aac(3)-Ib</i> , <i>aac(3)-Ic</i> , <i>aac(3)-Ie</i>	Plasmid	M97172	<i>E. coli</i> , <i>A. faecalis</i> , <i>S. marcescens</i>	Rather et al. (1992), Dahmen et al. (2010)
AAC(3)-IIc	<i>aac(3)-IIc</i> , <i>aacC2</i>	Plasmid	X54723	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Dubois et al. (2008)
AAC(3)-IIla	<i>aac(3)-IIla</i> , <i>aacC3</i>	Chromosome	X55652	<i>P. aeruginosa</i>	Vliegthart et al. (1991a)
AAC(3)-IIlb	<i>aac(3)-IIlb</i>	Chromosome	L06160	<i>P. aeruginosa</i>	
AAC(3)-IIlc	<i>aac(3)-IIlc</i> , <i>ant(2'')-Ib</i>	Chromosome	L06161	<i>P. aeruginosa</i>	
AAC(3)-IVa	<i>aac(3)-IVa</i>	Plasmid	X01385, AY216678, AJ493432	<i>E. coli</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>P. stutzeri</i>	Brau et al. (1984), Heuer et al. (2002)
AAC(3)-VIa	<i>aac(3)-VIa</i>	Plasmid	M88012, NC_009140, NC_009838	<i>E. cloacae</i> , <i>S. enterica</i> , <i>E. coli</i>	Rather et al. (1993a), Call et al. (2010)
AAC(3)-VIIa	<i>aac(3)-VIIa</i> , <i>aacC7</i>	Chromosome	M22999	<i>Streptomyces rimosus</i>	Lopez-Cabrera et al. (1989)
AAC(3)-VIIIa	<i>aac(3)-VIIIa</i> , <i>aacC8</i>	Chromosome	M55426	<i>Streptomyces fradiae</i>	Salauze et al. (1991)
AAC(3)-IXa	<i>aac(3)-IXa</i> , <i>aacC9</i>	Chromosome	M55427	<i>Micromonospora chalicea</i>	Salauze et al. (1991)
AAC(3)-X	<i>aac(3)-Xa</i>	Chromosome	AB028210	<i>Streptomyces griseus</i>	Ishikawa et al. (2000)
AAC(2')-Ia	<i>aac(2')-Ia</i>	Chromosome	L06156	<i>P. stuartii</i>	Rather et al. (1993b)
AAC(2')-Ib	<i>aac(2')-Ib</i>	Chromosome	CP001172	<i>M. fortuitum</i> , <i>A. baumannii</i>	Adams et al. (2008), Ainsa et al. (1997)
AAC(2')-Ic C	<i>aac(2')-Ic</i>	Chromosome	CP001658, NC_002945	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i>	Ainsa et al. (1997)
AAC(2')-Id	<i>aac(2')-Id</i>	Chromosome	NC_008596	<i>M. smegmatis</i>	Ainsa et al. (1997)
AAC(2')-Ie	<i>aac(2')-Ie</i>	Chromosome		<i>M. leprae</i>	Ainsa et al. (1997)
Putative AAC(2')		Chromosome	AM743169	<i>S. maltophilia</i>	Crossman et al. (2008)
AAC(6')-Ia	<i>aac(6')-Ia</i> , <i>aacA1</i>	Plasmid, transposon, integron	M18967, AF047479, M86913	<i>Citrobacter diversus</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Shigella sonnei</i>	Tenover et al. (1988), Parent and Roy (1992)
AAC(6')-Ib C	<i>aac(6')-Ib</i> , <i>aac(6')-4</i> , <i>aacA4</i>	Plasmid, transposon, integron	M21682, M23634, AF479774	<i>K. pneumoniae</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. enterica</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>S. maltophilia</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>V. cholerae</i>	Nobuta et al. (1988), Tran van Nhieu and Collatz (1987), Soler Bistu� et al. (2006)
AAC(6')-Ib'	<i>aac(6')-Ib'</i> , <i>aac(6')-Ib6</i>	Integron	L25617, AJ584652, L25666	<i>P. fluorescens</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Lambert et al. (1994b), Mendes et al. (2004), Casin et al. (1998)
AAC(6')-Ic	<i>aac(6')-Ic</i>	Chromosome	M94066	<i>S. marcescens</i>	Shaw et al. (1992)
AAC(6')-Ie	<i>aac(6')-Ie</i> , <i>aac(6')-bifunctional</i>	Transposon	M18086	<i>S. aureus</i> , <i>Macrocooccus caseolyticus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	Rouch et al. (1987)
AAC(6')-If	<i>aac(6')-If</i>	Plasmid	X55353	<i>E. cloacae</i>	Teran et al. (1991)
AAC(6')-Ig	<i>aac(6')-Ig</i>	Chromosome	L09246	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	Lambert et al. (1993)
AAC(6')-Ih	<i>aac(6')-Ih</i>	Plasmid	L29044	<i>A. baumannii</i>	Lambert et al. (1994a)
AAC(6')-Ii C	<i>aac(6')-Ii</i>	Chromosome	L12710	<i>Enterococcus</i> spp.	Costa et al. (1993), Draker et al. (2003), Wybenga-Groot et al. (1999)
AAC(6')-Ij	<i>aac(6')-Ij</i>	Chromosome	L29045	<i>Acinetobacter genomosp. 13</i>	Lambert et al. (1994a)
AAC(6')-Ik	<i>aac(6')-Ik</i>	Chromosome	L29510	<i>Acinetobacter</i> sp.	Rudant et al. (1994)
AAC(6')-Ip	<i>aac(6')-Il</i> , <i>aac(6')-Im</i> , <i>aac(6')-Ip</i>	Integron	Z54241	<i>C. freundii</i>	Hannecart-Pokorni et al. (1997)
AAC(6')-Iq	<i>aac(6')-Iq</i>	Plasmid, integron	AF047556	<i>K. pneumoniae</i>	Centron and Roy (1998)
AAC(6')-Im	<i>aac(6')-Im</i>	Plasmid	AF337947	<i>E. coli</i> , <i>E. faecium</i>	Chow et al. (2001)
AAC(6')-Ii	<i>aac(6')-Ii</i> , <i>aacA7</i>	Plasmid, integron	U13880	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Bunny et al. (1995)
AAC(6')-Ir	<i>aac(6')-Ir</i>	Chromosome	AF031326	<i>Acinetobacter genomosp. 14</i>	Rudant et al. (1999)
AAC(6')-Is	<i>aac(6')-Is</i>	Chromosome	AF031327	<i>Acinetobacter genomosp. 15</i>	Rudant et al. (1999)

Συνέχεια του Πίνακα 4

AACs	Gene names	Genetic location	Accession number	Host	References
AAC(6')-I _{sa}	<i>aac(6')-I_{sa}</i>	Plasmid	AB116646	<i>Streptomyces albulus</i>	Hamano et al. (2004)
AAC(6')-I _t	<i>aac(6')-I_t</i>	Chromosome	AF031328	<i>A. genomsp. 16</i>	Rudant et al. (1999)
AAC(6')-I _u	<i>aac(6')-I_u</i>	Chromosome	AF031329	<i>A. genomsp. 17</i>	Rudant et al. (1999)
AAC(6')-I _v	<i>aac(6')-I_v</i>	Chromosome	AF031330	<i>Acinetobacter</i> sp.	Rudant et al. (1999)
AAC(6')-I _w	<i>aac(6')-I_w</i>	Chromosome	AF031331	<i>Acinetobacter</i> sp.	Rudant et al. (1999)
AAC(6')-I _x	<i>aac(6')-I_x</i>	Chromosome	AF031332	<i>Acinetobacter</i> sp.	Rudant et al. (1999)
AAC(6')-I _y C	<i>aac(6')-I_y</i>	Chromosome	AF144881	<i>S. enteritidis, S. enterica</i>	Magnet et al. (1999)
AAC(6')-I _z	<i>aac(6')-I_z</i>	Chromosome	AF140221	<i>S. maltophilia</i>	Lambert et al. (1999)
AAC(6')-I _{aa}	<i>aac(6')-I_{aa}</i>	Chromosome	NC_003197	<i>S. typhimurium</i>	Salipante and Hall (2003)
AAC(6')-I _{ad}	<i>aac(6')-I_{ad}</i>	Plasmid	AB119105	<i>Acinetobacter genomsp. 3</i>	Doi et al. (2004)
AAC(6')-I _{ae}	<i>aac(6')-I_{ae}</i>	Integron	AB104852	<i>P. aeruginosa, S. enterica</i>	Sekiguchi et al. (2005)
AAC(6')-I _{af}	<i>aac(6')-I_{af}</i>	Plasmid, integron	AB462903	<i>P. aeruginosa</i>	Kitao et al. (2009)
AAC(6')-I _{ai}	<i>aac(6')-I_{ai}</i>	Plasmid, integron	EU886977	<i>P. aeruginosa</i>	
AAC(6')-I _{b₃}	<i>aac(6')-I_{b₃}</i> , <i>aac(6')-I_{b₅}</i>	integron	X60321	<i>P. aeruginosa</i>	Mabilat et al. (1992), Casin et al. (1998)
AAC(6')-I _{b₄}	<i>aac(6')-I_{b₄}</i>		S49888	<i>Serratia</i> spp.	Toriya et al. (1992)
AAC(6')-I _{b₇}	<i>aac(6')-I_{b₇}</i>	Plasmid	Y11946	<i>E. cloacae, C. freundii</i>	Casin et al. (1998)
AAC(6')-I _{b₈}	<i>aac(6')-I_{b₈}</i>	Plasmid	Y11947	<i>E. cloacae</i>	Casin et al. (1998)
AAC(6')-I _{b₉}	<i>aac(6')-I_{b₉}</i>	Integron	AF043381	<i>P. aeruginosa</i>	Mugnier et al. (1998a)
AAC(6')-I _{b₁₀}	<i>aac(6')-I_{b₁₀}</i>	Integron		<i>P. aeruginosa</i>	Mugnier et al. (1998b)
AAC(6')-I _{b₁₁} C	<i>aac(6')-I_{b₁₁}</i>	Integron	AY136758	<i>S. enterica</i>	Casin et al. (2003)
AAC(6')-I _{29a}	<i>aac(6')-I_{29a}</i>	Integron	AF263519	<i>P. aeruginosa</i>	Poirel et al. (2001)
AAC(6')-I _{29b}	<i>aac(6')-I_{29b}</i>	Integron	AF263520	<i>P. aeruginosa</i>	Poirel et al. (2001)
AAC(6')-I ₃₁	<i>aac(6')-I₃₁</i>	Integron	AM283489, AM283490	<i>Pseudomonas putida, A. baumannii, K. pneumoniae</i>	Mendes et al. (2007)
AAC(6')-I ₃₂	<i>aac(6')-I₃₂</i>	Plasmid, integron	EF614235	<i>P. aeruginosa</i>	Gutierrez et al. (2007)
AAC(6')-I ₃₃	<i>aac(6')-I₃₃</i>	Integron	GQ337064	<i>P. aeruginosa</i>	Viedma et al. (2009)
AAC(6')-I ₃₀	<i>aac(6')-I₃₀</i>	Integron	AY289608	<i>S. enterica</i>	Mulvey et al. (2004)
AAC(6')-I _{id}	<i>aac(6')-I_{id}</i>	Chromosome	AJ584700	<i>Enterococcus durans</i>	Del Campo et al. (2005)
AAC(6')-I _{ih}	<i>aac(6')-I_{ih}</i>	Chromosome	AJ584701	<i>Enterococcus hirae</i>	Del Campo et al. (2005)
AAC(6')-I _b -Suzhou	<i>aac(6')-I_b-Suzhou</i>		EF37562, EU085533	<i>E. cloacae, K. pneumoniae</i>	Huang et al. (2008)
AAC(6')-I _b -Hangzhou	<i>aac(6')-I_b-Hangzhou</i>		FJ503047	<i>A. baumannii</i>	
AAC(6')-I _{sk}	<i>aac(6')-I_{sk}</i>	Chromosome	AB164230	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Matsushashi et al. (1985)
AAC(6')-I _{la}	<i>aac(6')-I_{la}</i>	Plasmid, integron	M29695	<i>P. aeruginosa, S. enterica</i>	Shaw et al. (1989)
AAC(6')-I _{lb}	<i>aac(6')-I_{lb}</i>	Integron	L06163	<i>P. fluorescens</i>	
AAC(6')-I _{lc}	<i>aac(6')-I_{lc}</i>	Plasmid, integron	NC_012555	<i>E. cloacae</i>	Chen et al. (2009)
AAC(6')-I _b -cr	<i>aac(6')-I_b-cr</i>	Plasmid, transposon, integron	DQ303918	<i>Enterobacteriaceae</i>	Robicsek et al. (2006)
AAC(6')-I _e -APH(2'')-I _a	<i>aac(6')-aph(2'')</i>	Plasmid, transposon	M18086, M13771	<i>S. aureus, E. faecalis, E. faecium, Staphylococcus. warneri</i>	Rouch et al. (1987)
ANT(3'')-I _i -AAC(6')-I _{id}	<i>ant(3'')-I_i-aac(6')-I_{id}</i> , <i>ant(3'')-I_h-aac(6')-I_{id}</i>	Integron	AF453998	<i>S. marcescens</i>	Centron and Roy (2002)
AAC(6')-I ₃₀ /AAC(6')-I _{b'}	<i>aac(6')-I₃₀/aac(6')-I_{b'}</i>	Integron	AJ584652	<i>P. aeruginosa</i>	Mendes et al. (2004)
AAC(3)-I _b /AAC(6')-I _{b''}	<i>aac(3)-I_b/aac(6')-I_{b''}</i>	Integron	AF355189	<i>P. aeruginosa</i>	Dubois et al. (2002)

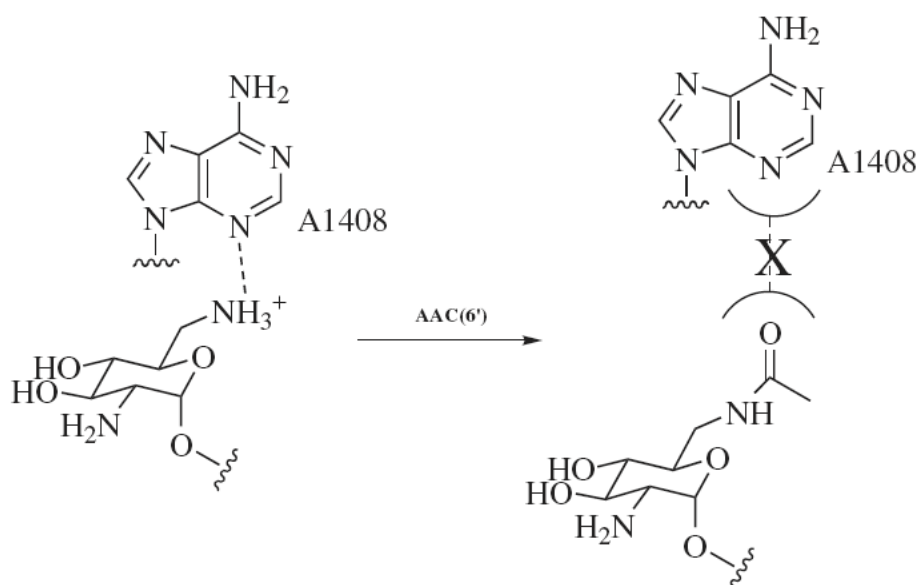
Only representative hosts, references and accession numbers are shown. C, three dimensional structure has been resolved. AAC(3)-I_a pdb id: 1B04 (Wolf et al., 1998). AAC(2')-I_c pdb id: 1M44, 1M4D (in complex with CoA and tobramycin), 1M4G (in complex with CoA and ribostamycin), 1M4I (in complex with CoA and kanamycin A) (Vetting et al., 2002). AAC(6')-I_b pdb id: 1V0C (in complex with kanamycin C and AcetylCoA), 2BUE (in complex with ribostamycin and CoA), 2VQY (in complex with paromomycin and AcetylCoA (Vetting et al., 2008)); 2PRB (in complex with CoA), 2QJR (in complex with CoA and kanamycin) (Maurice et al., 2008). AAC(6')-I_{b11} pdb id: 2PR8 (Maurice et al., 2008). AAC(6')-I_i pdb id: 2A4N (in complex with CoA) (Burk et al., 2005), 1N71 (in complex with CoA) (Burk et al., 2003), 1B87 (in complex with AcetylCoA) (Wybenga-Groot et al., 1999). AAC(6')-I_y pdb id: 2V8Q (in complex with bisubstrate analog CoA-S-monomethyl-acetylneamine) (Magalhaes et al., 2008), 1S3Z (in complex with CoA and ribostamycin), 1S5K (in complex with CoA and N-terminal His(6)-tag, crystal form 1), 1S60 (in complex with CoA and N-terminal His(6)-tag, crystal form 2) (Vetting et al., 2004).

2.2.1.1 AAC(6') (Ramirez & Tolmasky, 2010)

Όπως είναι ευρέως γνωστό, η αμινομάδα στη θέση 6' των αμινογλυκοσιδών παίζει σημαντικό ρόλο στη σύνδεσή τους με την ριβοσωμική υπομονάδα 30S για την ανάπτυξη της αντιμικροβιακής δράσης τους. Επομένως, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι αυτή η θέση στοχεύεται από μια μεγάλη κατηγορία αμινογλυκοσιδο-τροποποιητικών ενζύμων, την κατηγορία AAC(6') (Εικόνα 10). Αυτά τα ένζυμα είναι τα πιο κοινά και μπορούν να βρεθούν τόσο σε Gram-θετικά όσο και σε Gram-αρνητικά, ενώ τα γονίδια τους βρίσκονται συχνά σε κινητά γενετικά στοιχεία, είτε σε πλασμίδια είτε σε χρωμοσώματα. Υπάρχουν δύο κύριες υποκατηγορίες ενζύμων AAC(6') ανάλογα με το φαινότυπο αντοχής που προσδίδουν, οι AAC(6')-I και AAC(6')-

II. Η υποκατηγορία AAC(6')-I προσδίδει αντοχή στην αμικασίνη και στη γενταμικίνη C1a και C2, αλλά όχι στη γενταμικίνη C1, ενώ τα ένζυμα AAC(6')-II προσδίδουν αντοχή και στις τρεις γενταμικίνες, αλλά όχι στην αμικασίνη. Ένα παράγωγο του ενζύμου AAC(6')-Ib, το AAC(6')-Ib-cr, ευθύνεται επιπλέον για αντοχή στις φθοριοκινολόνες και θα μπορούσε να θεωρηθεί τρίτη υποκατηγορία ενζύμων AAC(6') (Salipante & Hall, 2003). Δυστυχώς, λόγω του μεγάλου αριθμού ενζύμων και των γονιδίων τους σε αυτή την κατηγορία, καθώς και της απουσίας ενός ενιαίου συστήματος ονοματολογίας, υπήρξαν αρκετά λάθη και σύγχυση κατά την ονομασία και την ταξινόμηση των AAC(6').

Εικόνα 10. Τροποποίηση της αμινομάδας στη θέση 6' της 2-DOS, η οποία προσδένεται στην A1408 του βακτηριακού ριβοσώματος.



Έχει αναφερθεί επίσης η ύπαρξη σύνθετων πρωτεϊνών (fusion proteins) που έχουν δράση AAC(6'), καθώς η πρωτεΐνη AAC(6') βρίσκεται στην τελική περιοχή N ή C της σύνθετης πρωτεΐνης. Είναι ενδιαφέρον το ότι έχουν βρεθεί δι-λειτουργικά ένζυμα με δράση AAC(6') συνδυασμένη με δράση APH ή ANT ή άλλου AAC(6') ή ακόμα και άλλου AAC ενζύμου (Zhang *et al.*, 2009). Για παράδειγμα, το AAC(6')-APH(2'') είναι ένα δι-λειτουργικό ένζυμο που βρίσκεται σε στελέχη *Enterococcus faecalis* και *S. aureus* και το γονίδιο του βρίσκεται συνήθως σε τρανσποζόνια (Culebras & Martinez, 1999). Τέτοιες σύνθετες πρωτεΐνες, όπως δύο AAC της κατηγορίας AAC(6')-I (για παράδειγμα AAC(6')-30/AAC(6')-Ib'), ή δύο AAC που ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες (για παράδειγμα AAC(3)-Ib/AAC(6')-Ib') βρέθηκαν σε ιντεγκρόνια σε στελέχη *P. aeruginosa*.

Η AAC(6')-Ib είναι ίσως η πιο σημαντική κλινικά ακετυλοτρανσφεράση και είναι υπεύθυνη για την αντοχή στην αμικασίνη και σε άλλες

αμινογλυκοσίδες, που παρουσιάζουν αρκετά Gram-αρνητικά του γένους των *Acinetobacter*, *Enterobacteriales*, *Pseudomonadaceae* και *Vibrionaceae*. Υπάρχει σε πάνω από το 70% των Gram-αρνητικών στελεχών που απομονώνονται και παράγουν AAC(6')-I και, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, μερικές από τις παραλλαγές της παρουσιάζουν εκτεταμένο φαινότυπο που περιλαμβάνει αντοχή στη γενταμικίνη [AAC(6')-Ib₁₁] ή μειωμένη ευαισθησία σε κινολόνες [AAC(6')-Ib-cr]. Από τότε που πρωτοανιχνεύθηκε, έχει καταγραφεί σε πολλές γεωγραφικές περιοχές και σε πολυάριθμα γενετικά περιβάλλοντα.

2.2.1.2 AAC(2') (Ramirez & Tolmasky, 2010)

Υπάρχουν πέντε AACs που καταλύουν την ακετυλίωση της 2'-αμινομάδας και υπάρχει μόνο μία υποκατηγορία, η οποία περιλαμβάνει τις AAC(2')-Ia (σε *Providencia stuartii*), AAC(2')-Ib (σε *Mycobacterium fortuitum* και *Acinetobacter baumannii*), AAC(2')-Ic (σε *Mycobacterium tuberculosis* και *Mycobacterium bovis*), AAC(2')-Id (σε *Mycobacterium smegmatis*) και AAC(2')-Ie (σε *Mycobacterium leprae*) (Ainsa *et al.*, 1997; Hedge *et al.*, 2001; Rather *et al.*, 1993). Αυτά τα πέντε ένζυμα κωδικοποιούνται από χρωμοσωμικά γονίδια, είναι ειδικά για κάθε είδος, αλλά είναι παρόντα σε όλα τα μυκοβακτηρίδια. Οι AAC(2') τροποποιούν διάφορες αμινογλυκοσίδες συμπεριλαμβανομένης της νεότερης πλαζομικίνης, της γενταμικίνης, της καναμυκίνης, της τομπραμυκίνης, της νετιλμικίνης και της διβεκακίνης.

2.2.1.3 AAC(1) (Ramirez & Tolmasky, 2010)

Αυτή η κατηγορία ακετυλοτρανσφερασών δεν είναι πολύ συχνή σε σύγκριση με την AAC(6') και η σημασία της είναι μικρή επειδή δεν τροποποιούν τις κλινικά πιο σχετικές αμινογλυκοσίδες. Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί σε ακτινομύκητες, *E. coli* και *Campylobacter* spp. (Lovering *et al.*, 1987; Sunada *et al.*, 1999). Τα ένζυμα AAC(1) προσδίδουν αντοχή σε νεομυκίνη, ριβοσταμυκίνη, απραμυκίνη, βουτυροσίνη, παρομομυκίνη και λιβιδομυκίνη. Ενώ ο φαινότυπος αντοχής που προσδίδουν οι AAC(1) που έχουν απομονωθεί από *E. coli* και *Campylobacter* spp. είναι παρόμοιος μεταξύ των δύο, η AAC(1) που απομονώνεται από ακτινομύκητες δεν είναι σε θέση να ακετυλιώσει την απραμυκίνη. Αν και τα τρία ένζυμα έχουν ονομαστεί AAC(1), η διαφορά στο προφίλ αντοχής στο τουλάχιστον ένα από αυτά θα δικαιολογούσε την ομαδοποίησή τους σε υποκατηγορίες.

2.2.1.4- AAC(3) (Ramirez & Tolmasky, 2010)

Αυτή η οικογένεια είναι μία από τις μεγαλύτερες και περιλαμβάνει εννέα υποκατηγορίες που έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα με βάση το φαινότυπο αντοχής που προσδίδουν (Shaw *et al.*, 1993). Οι υποκατηγορίες ονομάζονται AAC(3)-I έως AAC(3)-X εκτός από την υποκατηγορία AAC(3)-V, η οποία εξαλείφθηκε όταν αποδείχθηκε ότι το μόνο ένζυμο που ανήκε σε αυτήν την ομάδα ήταν η AAC(3)-II που είχε ήδη περιγραφεί προηγουμένως.

Πέντε ένζυμα έχουν ταυτοποιηθεί στην υποκατηγορία AAC(3)-I(a-e), ευρέως διαδεδομένα μεταξύ των Gram-αρνητικών βακτηρίων και χαρακτηρίζονται από αντοχή στη φορτιμικίνη, τη σισομικίνη και τη γενταμικίνη. Η AAC(3)-Ia που εντοπίστηκε αρχικά το 1991 σε στέλεχος *Serratia marcescens* ήταν η πρώτη αμινογλυκοσιδο-ακετυλοτρανσφεράση της οποίας προσδιορίστηκε η τρισδιάστατη δομή συμπλεγμένη με CoA, κατατάσσοντάς την στην οικογένεια GNAT. Τα γονίδια που κωδικοποιούν αυτά τα πέντε ένζυμα έχουν βρεθεί ως μέρος γονιδιακών κασετών μέσα σε ιντεγκρόνια.

Η υποκατηγορία AAC(3)-II περιλαμβάνει τρία ένζυμα, τα οποία προσδίδουν αντοχή στη γενταμικίνη, την τομπραμυκίνη, τη σισομικίνη, τη νετιλμικίνη και τη διβεκακίνη. Η AAC(3)-IIa έχει βρεθεί ευρέως σε διαφορετικά γένη, ενώ η AAC(3)-IIb έχει ταυτοποιηθεί μόνο σε στελέχη *E. coli*, *Alcaligenes faecalis* και *S. marcescens*, και η AAC(3)-IIc σε στελέχη *P. aeruginosa* και *E. coli*. Η υποκατηγορία AAC(3)-III αποτελείται επίσης από τρία ένζυμα και όλα έχουν απομονωθεί από στελέχη *P. aeruginosa*. Η υποκατηγορία IV έχει ένα μοναδικό ένζυμο, την AAC(3)-IVa, η οποία προσδίδει υψηλού επιπέδου αντοχή στην απραμυκίνη και έχει μέχρι στιγμής ταυτοποιηθεί σε κλινικά Εντεροβακτηριακά στελέχη, καθώς και σε περιβαλλοντικά στελέχη *Pseudomonas stutzeri* (Bordeleau *et al.*, 2021). Για την υποκατηγορία VI έχει επίσης περιγραφεί ένα μόνο ένζυμο, η AAC(3)-VIa. Όταν η αρχική αλληλουχία αμινοξέων της AAC(3)-VIa του στελέχους *Enterobacter cloacae* συγκρίθηκε με αυτές που αναγνωρίστηκαν αργότερα σε στελέχη *E. coli* και *S. enterica*, σημειώθηκε μία αλλαγή ενός αμινοξέος.

Τέλος, οι υποκατηγορίες VII, VIII, IX και X έχουν ταυτοποιηθεί μεταξύ διαφορετικών στελεχών ακτινομυκήτων. Είναι ενδιαφέρον ότι η AAC(3)-X είναι η μόνη περιγραφόμενη AAC με δράση AAC(3"), καθώς είναι σε θέση να ακετυλιώσει όχι μόνο την 3-αμινομάδα της καναμυκίνης και της διβεκακίνης αλλά και την 3"-αμινομάδα της αμικασίνης και της αρμπεκασίνης. Ωστόσο, η αρμπεκασίνη παραμένει ενεργή ακόμα και μετά από αυτήν την τροποποίηση (Hotta *et al.*, 1998).

2.2.2 Ο-Φωσφοτρανσφεράσες (Ramirez & Tolmasky, 2010)

Αυτά τα ένζυμα καταλύουν την, εξαρτώμενη από ATP, φωσφορυλίωση βασικών ομάδων υδροξυλίου που υπάρχουν στα μόρια των αμινογλυκοσιδών. Υπάρχουν ευρέως μεταξύ βακτηριακών παθογόνων και κωδικοποιούνται από γονίδια που βρίσκονται συνήθως σε πλασμίδια και τρανσποζόνια που φέρουν γενετική πληροφορία και για πολλούς μηχανισμούς αντοχής και σε άλλα αντιμικροβιακά. Αυτή η οικογένεια περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό ενζύμων, αν και κλινικά σημαντικά είναι περισσότερο στα Gram-θετικά βακτήρια (Vakulenko & Mobashery, 2003). Οι υποκατηγορίες των APHs παρατίθενται στον Πίνακα 5, αλλά μόνο τα ένζυμα APH(3') περιγράφονται αναλυτικότερα καθώς ανήκουν στην πιο εκτεταμένη και καλύτερα μελετημένη κατηγορία APHs.

Πίνακας 5. Κατηγοριοποίηση των APHs (Ramirez & Tolmasky, 2010)

APHs	gene names	Genetic location	Accession number	Host	References
APH(4)-Ia	<i>aph(4)-Ia, hph</i>	Plasmid	V01499	<i>E. coli</i>	Kaster et al. (1983)
APH(4)-Ib	<i>aph(4)-Ib, hyg</i>	Chromosome	X03615	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Zalacain et al. (1986)
APH(6)-Ia	<i>aph(6)-Ia, aphD, strA</i>	Chromosome	Y00459	<i>S. griseus</i>	Distler et al. (1987)
APH(6)-Ib	<i>aph(6)-Ib, sph</i>	Chromosome	X05648	<i>S. glaucescens</i>	Vogtli and Hutter (1987)
APH(6)-Ic	<i>aph(6)-Ic, str</i>	Transposon	X01702	<i>S. enterica, P. aeruginosa, E. coli</i>	Mazodier et al. (1985), Steiniger-White et al. (2004)
APH(6)-Id	<i>aph(6)-Id, strB, orfI</i>	Plasmid, integrative conjugative element, chromosomal genomic islands	M28829	<i>K. pneumoniae, Salmonella spp., E. coli, Shigella flexneri, Providencia alcalifaciens, Pseudomonas spp., V. cholerae, Edwardsiella tarda, Pasteurella multocida, Aeromonas bestiarum</i>	Daly et al. (2005), Gordon et al. (2008), Meyer (2009), Scholz et al. (1989)
APH(9)-Ia C	<i>aph(9)-Ia</i>	Chromosome	U94857, CR628337	<i>L. pneumophila</i>	Suter et al. (1997)
APH(9)-Ib	<i>aph(9)-Ib, spcN</i>	Chromosome	U70376	<i>S. flavopersicus</i>	Lyutskanova et al. (1997)
APH(3')-Ia	<i>aph(3')-Ia, aphA-1</i>	Transposon	V00359	<i>E. coli, S. enterica</i>	Oka et al. (1981)
APH(3')-Ib	<i>aph(3')-Ib, aphA-like</i>	Plasmid	M20305	<i>E. coli</i>	Pansegrau et al. (1987)
APH(3')-Ic	<i>aph(3')-Ic, aphA1-1AB, aphA7</i>	Plasmid, transposon, genomic island	M37910	<i>K. pneumoniae, A. baumannii, S. marcescens, Corynebacterium spp., Photobacterium spp., Citrobacter spp.</i>	Lee et al. (1990), Tauch et al. (2000)
APH(3')-IIa C	<i>aph(3')-IIa, aphA-2</i>	Transposon	V00618	<i>E. coli</i>	Beck et al. (1982)
APH(3')-IIb	<i>aph(3')-IIb</i>	Chromosome	NC.002516	<i>P. aeruginosa</i>	Stover et al. (2000)
APH(3')-IIc	<i>aph(3')-IIc</i>	Chromosome		<i>S. maltophilia</i>	Okazaki and Avison (2007)
APH(3')-IIIa C	<i>aph(3')-IIIa</i>	Plasmid	V01547	<i>S. aureus, Enterococcus spp.</i>	Trieu-Cuot and Courvalin (1983)
APH(3')-IVa	<i>aph(3')-IVa, aphA4</i>	Chromosome	X01986	<i>B. circulans</i>	Herbert et al. (1983)
APH(3')-Va	<i>aph(3')-Va, aphA-5a</i>	Chromosome	K00432	<i>Streptomyces fradiae</i>	Thompson and Gray (1983)
APH(3')-Vb	<i>aph(3')-Vb, aphA-5b, rph</i>	Chromosome	M22126	<i>Streptomyces ribosidificus</i>	Hoshiko et al. (1988)
APH(3')-Vc	<i>aph(3')-Vc, aphA-5c</i>	Chromosome	S81599	<i>M. chalcea</i>	Salauze et al. (1991)
APH(3')-VIa	<i>aph(3')-VIa, aphA-6</i>	Plasmid	X07753	<i>A. baumannii</i>	Martin et al. (1988)
APH(3')-VIb	<i>aph(3')-VIb</i>	Plasmid		<i>K. pneumoniae, S. marcescens</i>	Gaynes et al. (1988)
APH(3')-VIIa	<i>aph(3')-VIIa, aphA-7</i>	Plasmid	M29953	<i>C. jejuni</i>	Tenover et al. (1989)
APH(2'')-Ia	<i>aph(2'')-Ia, aph(2'')-bifunctional</i>	Plasmid	AP003367	<i>S. aureus, Clostridium difficile, Streptococcus mitis, E. faecium</i>	Ferretti et al. (1986)
APH(2'')-IIa C	<i>aph(2'')-IIa, aph(2'')-Ib</i>	Chromosome	AF207840, AF337947	<i>E. faecium, E. coli</i>	Kao et al. (2000)
APH(2'')-IIIa C	<i>aph(2'')-IIIa, aph(2'')-Ic</i>	Plasmid	U51479	<i>Enterococcus gallinarum</i>	Chow et al. (1997)
APH(2'')-IVa C	<i>aph(2'')-IVa, aph(2'')-Ic</i>	Chromosome	AF016483	<i>E. casseliflavus</i>	Tsai et al. (1998)
APH(2'')-Ie	<i>aph(2'')-Ie</i>	Plasmid, transposon	AY939911	<i>E. faecium, E. casseliflavus</i>	Chen et al. (2006)
APH(3'')-Ia	<i>aph(3'')-Ia, aphE, aphD2</i>	Chromosome	X53527	<i>S. griseus</i>	Trower and Clark (1990)
APH(3'')-Ib	<i>aph(3'')-Ib, strA, orfH</i>	Plasmid, transposon, integrative conjugative elements, chromosome	M28829	<i>Enterobacteriaceae, Pseudomonas spp.</i>	Scholz et al. (1989)
APH(3'')-Ic	<i>aph(3'')-Ic</i>	Chromosome	DQ336355	<i>M. fortuitum</i>	Ramon-Garcia et al. (2006)
APH(7'')-Ia	<i>aph(7'')-Ia, aph7''</i>	Chromosome		<i>S. hygroscopicus</i>	Berthold et al. (2002)

Only representative hosts, references and accession numbers are shown.
 C, three dimensional structure has been resolved. APH(9)-Ia pdb id: 3I00 (in complex with ADP and Spectinomycin), 3I0Q (in complex with AMP), 3I1A (Fong et al., 2010).
 APH(3')-IIa pdb id: 1ND4 (Nurizzo et al., 2003). APH(3')-IIIa pdb id: 1J7I, 1J7L (in complex with ADP), 1J7U (in complex with APPNP) (Burk et al., 2001), 1L8T (in complex with ADP and Kanamycin A) (Fong and Berghuis, 2002) 3H8P (in complex with AMPPNP and butirosin A) (Fong and Berghuis, 2009), 2BKK (in complex with the inhibitor AR-3A) (Kohl et al., 2005). APH(2'')-IIa pdb id: 3HAV (in complex with ATP and streptomycin), 3HAM (in complex with gentamicin) (Young et al., 2009).

2.2.2.1- APH(3') (Ramirez & Tolmasky, 2010)

Αυτή η οικογένεια είναι ιδιαίτερα κοινή και ορισμένα γονίδια της χρησιμοποιούνται ευρέως ως γονιδιακοί δείκτες στην έρευνα της μοριακής βιολογίας (π.χ. σε φορείς κλωνοποίησης, δείκτες αντοχής σε συζευτικά πλασμίδια κλπ).

Τα υπεύθυνα γονίδια της υποκατηγορίας APH(3')-I βρίσκονται σε πλασμίδια και τρανσποζόνια πολλών Gram-αρνητικών μικροβίων (Tenover *et al.*, 1989). Τρία ένζυμα της υποκατηγορίας APH(3')-I προσδίδουν αντοχή στη νεομυκίνη, την παρομομυκίνη, τη λιβιδομυκίνη, τη ριβοσταμυκίνη και την καναμυκίνη.

Το καλύτερα μελετημένο μέλος των APHs είναι η APH(3')-IIIa, που βρίσκεται γενικά σε Gram-θετικά παθογόνα. Προσδίδει αντοχή σε ένα ευρύ φάσμα αμινογλυκοσιδών, συμπεριλαμβανομένης της νεομυκίνης, της λιβιδομυκίνης, της παρομομυκίνης, της βουτυροσίνης, της λιβοσταμυκίνης, της ισεπαμισίνης, της καναμυκίνης και της αμικασίνης. Δεν τροποποιεί την τομπραμυκίνη ή τη γενταμικίνη καθώς και οι δύο στερούνται ελεύθερης ομάδας 3'-υδροξυλίου. Παρ' όλα αυτά, μπορεί να φωσφορυλιώσει άλλες αμινογλυκοσίδες που στερούνται 3'-υδροξυλομάδας, όπως για παράδειγμα τη λιβιδομυκίνη στη θέση 5". Επιπλέον, η APH(3')-IIIa είναι σε θέση να διφωσφορυλιώσει τη βουτυροσίνη και τη νεομυκίνη Β στις θέσεις 3' και 5" (McKay *et al.*, 1994).

Όσον αφορά τα υπόλοιπα ένζυμα APH(3'), το γονίδιο της APH(3')-IVa υπάρχει στο χρωμόσωμα του *Bacillus circulans*, ενώ τα γονίδια των APH(3')-Va, APH(3')-Vb και APH(3')-Vc βρίσκονται στο χρωμόσωμα ακτινομυκήτων. Οι φαινότυποι αντοχής που προσδίδουν οι APHs της υποκατηγορίας V περιλαμβάνουν τις νεομυκίνη, ριβοσταμυκίνη και παρομομυκίνη, ενώ τα ένζυμα που ανήκουν στην υποκατηγορία VI προσδίδουν αντοχή στη νεομυκίνη, την παρομομυκίνη, τη ριβοσταμυκίνη, τη βουτυροσίνη, την καναμυκίνη, την αμικασίνη και την ισεπαμισίνη. Το μόνο μέλος της υποκατηγορίας VII, η APH(3')-VIIa, προσδίδει αντοχή στην καναμυκίνη και τη νεομυκίνη και εντοπίστηκε σε στέλεχος *Campylobacter jejuni*.

2.2.3 O-Νουκλεοτρανσφεράσες (Ramirez & Tolmasky, 2010)

Οι ANTs αντιπροσωπεύουν τη μικρότερη κατηγορία ενζύμων που αδρανοποιούν τις αμινογλυκοσίδες. Αυτά τα ένζυμα μεταφέρουν ένα AMP από ATP σε υδροξυλομάδες της αμινογλυκοσίδης-στόχου σχηματίζοντας ένα μόριο O-αδενυλιωμένου αντιβιοτικού. Μέχρι σήμερα, υπάρχουν πέντε κατηγορίες ANT που ταξινομούνται ανάλογα με τη θέση της αδενυλίωσης στο μόριο της αμινογλυκοσίδης: ANT(6), ANT(9), ANT(3"), ANT(2") και ANT(4') (Πίνακας 6). Υπάρχει μόνο μία υποκατηγορία σε όλες εκτός από την ANT(4'), η οποία περιλαμβάνει δύο υποκατηγορίες. Τα ένζυμα ANT(2") και ANT(3") είναι πιο κοινά μεταξύ των Gram-αρνητικών βακτηρίων, ενώ οι ANT(4'), ANT(6) και ANT(9) βρίσκονται συχνότερα σε Gram-θετικά παθογόνα (Shaw *et al.*, 1993). Τα γονίδια που κωδικοποιούν όλα αυτά τα ένζυμα αναγνωρίζονται συχνά σε κινητά γενετικά στοιχεία.

Οι πιο συχνά ανιχνευόμενες ANTs είναι οι ANT(3"), ωστόσο, δεν θεωρούνται τόσο κλινικά σημαντικές, καθώς χαρακτηρίζονται από αντοχή μόνο στη στρεπτομυκίνη και τη σπεκτινομυκίνη (Hollingshead & Varneck, 1985).

Ένα από τα πιο κλινικά σημαντικά μέλη αυτής της οικογένειας ενζύμων είναι η ANT(2")-Ia, καθώς είναι ένας πολύ κοινός μηχανισμός αντοχής στη γενταμικίνη στη Βόρεια Αμερική, ευρέως διαδεδομένος μεταξύ των Gram-αρνητικών παθογόνων. Το γονίδιο της (*aadB*) έχει βρεθεί ανάμεσα σε ποικίλα γενετικά υπόβαθρα, όπως μικρά μη συζευκτικά πλασμίδια, συζευκτικά πλασμίδια, ιντεγκρόνια ή τρανσποζόνια (Ramirez *et al.*, 2005). Προσδίδει αντοχή στη γενταμικίνη, την καναμυκίνη, την τομπραμυκίνη, τη σισομικίνη και τη διβεκακίνη.

Η ANT(4')-Ia, το γονίδιο της οποίας τυπικά βρίσκεται στα πλασμίδια των Σταφυλοκόκκων και των Εντεροκόκκων και ονομάζεται επίσης *aadD*, *aadD2* και *ant(4',4")-I*, προσδίδει αντοχή στην αμικασίνη, την τομπραμυκίνη και την ισεπαμισίνη, αλλά και στη διβεκακίνη, η οποία δεν έχει στόχο στη θέση 4', αλλά στη θέση 4".

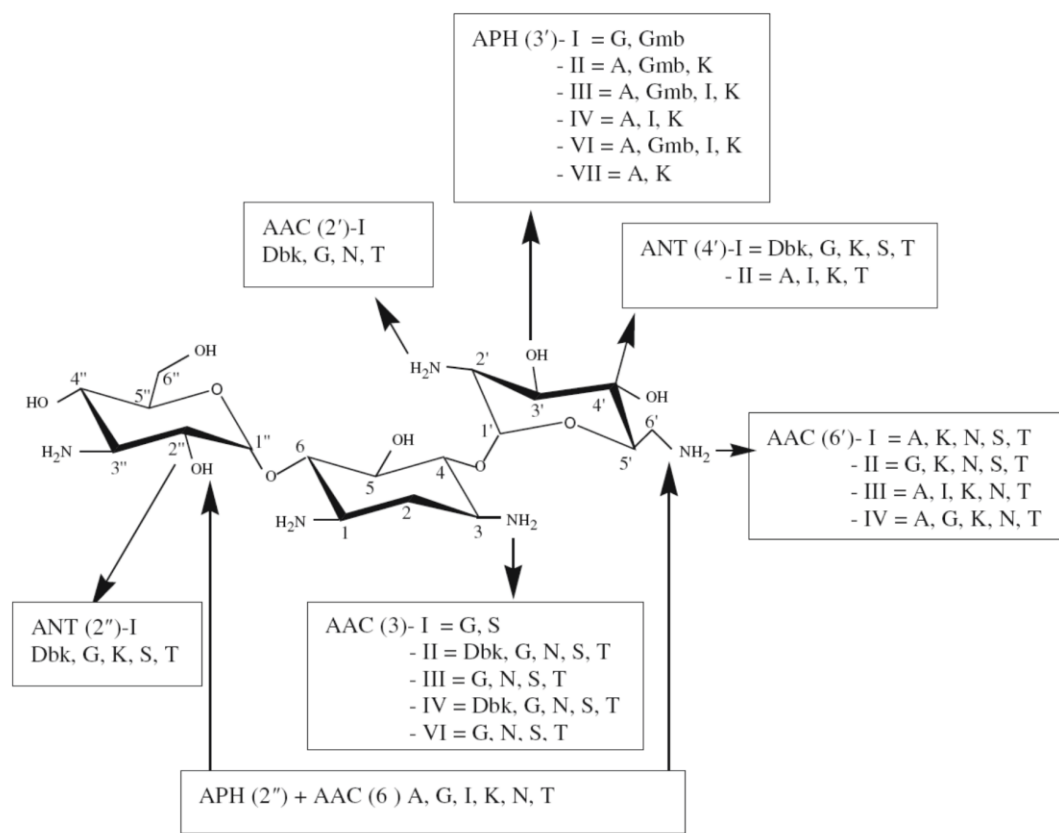
Πίνακας 6. Κατηγοριοποίηση των ANTs (Ramirez & Tolmasky, 2010)

ANTs	gene names	Genetic location	Accession number	Host	References
ANT(6)-Ia	<i>ant(6)-Ia, ant6, aadE</i>	Plasmid, chromosome	NC.006663, NC.012924, GQ900487	<i>Staphylococcus epidermidis, E. faecium, Streptococcus suis, S. aureus</i>	Gill et al. (2005), Holden et al. (2009)
	<i>ant6</i>	Plasmid	AB247327	<i>E. faecalis</i>	
	<i>aadE</i>	Chromosome	NC.013853	<i>Streptococcus mitis</i>	
	<i>aadK</i>	Chromosome	M26879	<i>B. subtilis, Bacillus</i> spp.	Noguchi et al. (1993), Ohmiya et al. (1989)
	<i>aadE</i>	Plasmid	AJ489618	<i>C. jejuni</i>	
	<i>aad(6)</i>	Plasmid	NC.008445, AY712687	<i>E. faecalis, Streptococcus oralis</i>	Cerda et al. (2007), Schwarz et al. (2001)
ANT(6)-Ib	<i>ant(6)-Ib</i>	Transferable pathogenicity island	FN594949, NZ.ABDU01000081	<i>C. fetus subsp. fetus, B. subtilis</i>	Abril et al. (2010)
ANT(9)-Ia	<i>ant(9)-Ia, aad(9), spc</i>	Plasmid, transposon	X02588, GU235985	<i>S. aureus, Enterococcus</i> spp., <i>Staphylococcus sciuri</i>	Murphy (1985)
ANT(9)-Ib	<i>ant(9)-Ib, aad(9), spc</i>	Plasmid	M69221	<i>E. faecalis</i>	LeBlanc et al. (1991)
ANT(4')-Ia C	<i>ant(4')-Ia, aadD2, aadD, ant(4', 4'')-I</i>	Plasmid	U35229, M19465	<i>S. epidermidis, S. aureus, Enterococcus</i> spp., <i>Bacillus</i> spp.	McKenzie et al. (1986), Santanam and Kayser (1978)
ANT(4')-IIa	<i>ant(4')-IIa</i>	Plasmid	M98270	<i>P. aeruginosa, Enterobacteriaceae</i>	Jacoby et al. (1990)
ANT(4')-IIb	<i>ant(4')-IIb</i>	Transposon	AY114142	<i>P. aeruginosa</i>	Sabtcheva et al. (2003)
ANT(2'')-Ia	<i>ant(2'')-Ia, aadB</i>	Plasmid, integron	X04555	<i>P. aeruginosa, K. pneumoniae, Morganella morganii, E. coli, S. typhimurium, C. freundii, A. baumannii</i>	Cameron et al. (1986)
ANT(3'')-Ia	<i>ant(3'')-Ia, aadA, aadA1, aad(3'')(9)</i>	Plasmid, transposon, integron	X02340	<i>Enterobacteriaceae, A. baumannii, P. aeruginosa, Vibrio cholerae</i>	Hollingshead and Vapnek (1985), Tolmasky (1990)
	<i>aadA2</i>	Plasmid, integron	NC.010870	<i>K. pneumoniae, Salmonella</i> spp., <i>Corynebacterium glutamicum, C. freundii, Aeromonas</i> spp., <i>E. coli</i>	Chen et al. (2007)
	<i>aadA3</i>	Plasmid, transposon, integron	AF047479	<i>E. coli</i>	Parent and Roy (1992)
	<i>aadA4</i>	Plasmid, chromosome	NC.002928, NC.010558	<i>Bordetella parapertussis, E. coli</i>	Parkhill et al. (2003), Perichon et al. (2008)
	<i>aadA5</i>	Plasmid, transposon, integron	AF137361	<i>E. coli, K. pneumoniae, Kluyvera georgiana, P. aeruginosa, E. cloacae</i>	Sandvang (1999)
	<i>aadA6</i>	Integron	AM087411	<i>P. aeruginosa</i>	Fiett et al. (2006)
	<i>aadA7</i>	Integron	AB114632	<i>V. fluvialis, P. aeruginosa, E. coli, V. cholerae, S. enterica</i>	Ahmed et al. (2004)
	<i>aadA8</i>	Plasmid, integron	AY139603	<i>V. cholerae, K. pneumoniae, Bacillus endophyticus</i>	Tennstedt et al. (2003)
	<i>aadA9</i>	Plasmid	NC.003227	<i>C. glutamicum</i>	Tauch et al. (2002)
	<i>aadA10</i>	Plasmid, integron	AM087405	<i>P. aeruginosa, E. coli</i>	Fiett et al. (2006), Partridge et al. (2002)
	<i>aadA11</i>	Integron	AJ567827, AY758206	<i>E. coli, P. aeruginosa</i>	Llanes et al. (2006)
	<i>aadA12</i>	Integron	FJ381668	<i>E. coli, Yersinia enterocolitica, S. enterica</i>	Ajiboye et al. (2009)
	<i>aadA13</i>	Plasmid, integron	NC.010643	<i>Pseudomonas rettgeri, P. aeruginosa, Y. enterocolitica, E. coli</i>	Revilla et al. (2008)
	<i>aadA14</i>	Plasmid	AJ884726	<i>Pasteurella multocida</i>	Kehrenberg et al. (2005)
	<i>aadA15</i>	Integron	DQ393783	<i>P. aeruginosa</i>	Yan et al. (2006)
	<i>aadA16</i>	Plasmid, integron	EU675686	<i>E. coli, V. cholerae, K. pneumoniae</i>	Wei et al. (2009)
	<i>aadA17</i>	Integron	FJ460181	<i>Aeromonas media</i>	
	<i>aadA21</i>	Integron	AY171244	<i>Salmonella</i> spp.	Faldynova et al. (2003)
	<i>aadA22</i>	Plasmid, integron	AM261837	<i>S. enterica, E. coli</i>	Herrero et al. (2008)
	<i>aadA23</i>	Integron	AJ809407	<i>S. enterica</i>	Michael et al. (2005)
	<i>aadA24</i>	Integron	DQ677333	<i>Salmonella</i> spp.	Egorova et al. (2007)
	<i>aadA6/aadA10</i>	Integron	AM087405	<i>P. aeruginosa</i>	Fiett et al. (2006)

Only representative hosts, references and accession numbers are shown.
C, three dimensional structure has been resolved. ANT(4')-Ia pdb id: 1KNY (Pedersen et al., 1995).

Η συσχέτιση μεταξύ της θέσης τροποποίησης ορισμένων ενζύμων και των φαινοτύπων αντοχής στις αμινογλυκοσίδες παρουσιάζονται στην Εικόνα 11.

Εικόνα 11. Μόριο αμινογλυκοσίδης με τις θέσεις τροποποίησής της από επιλεγμένα ένζυμα και οι φαινότυποι αντοχής που προσδίδουν. (Jana & Deb, 2006)



A: αμικασίνη; Dbk: διβεκακίνη; G: γενταμικίνη; Gmb: γενταμικίνη Β; I: ισεπαμισίνη; K: καναμικίνη; N: νετιλμικίνη; S: σισομικίνη; T: τομπραμυκίνη.

2.2.4 Επιδημιολογία στην Ελλάδα

Στα Ελληνικά νοσοκομεία ήδη από τη δεκαετία του 1990 η συνύπαρξη των AAC(6')-I (αντοχή σε τομπραμυκίνη, νετιλμικίνη, αμικασίνη, διβεκακίνη και καναμυκίνη) με AAC(3)-I (αντοχή σε γενταμικίνη) ήταν πολύ κοινή στα Εντεροβακτηριακά (59.5%), και μάλιστα φαινόταν να οφείλεται σε επιδημία πλασμιδίου (Miller *et al.*, 1997). Η Ελλάδα, το Βέλγιο και η Γαλλία είχαν την υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης του AAC(6')-I στην Ευρώπη, τόσο μεμονωμένα όσο και σε συνδυασμούς και αυτή η επίπτωση συσχετίστηκε με πολύ υψηλότερη (>25%) χρήση αμικασίνης συγκριτικά με άλλες ευρωπαϊκές χώρες (Miller *et al.*, 1997).

Την ίδια περίοδο οι τρεις πιο κοινοί μηχανισμοί αντοχής στο είδος *Pseudomonas* ήταν το ANT(2'')-I (αντοχή σε γενταμικίνη, τομπραμυκίνη, διβεκακίνη και καναμυκίνη), το AAC(6')-II (αντοχή σε γενταμικίνη, τομπραμυκίνη και νετιλμικίνη) και η έλλειψη διαπερατότητας (αντοχή σε όλες τις αμινογλυκοσίδες) και σε αντίθεση με εκείνους στα Εντεροβακτηριακά, δεν φαίνεται να σχετίζονται με τη χρήση αμινογλυκοσιδών (Miller *et al.*, 1997).

Οι μηχανισμοί αντοχής στις αμινογλυκοσίδες στο είδος *Acinetobacter* ήταν οι πλέον πολύπλοκοι (έως και πέντε διαφορετικά ένζυμα) με την εμφάνιση δύο μηχανισμών, του APH(3')-VI (αντοχή σε αμικασίνη, ισεπαμυκίνη, καναμυκίνη και νεομυκίνη) και του AAC(3)-? (αντοχή σε γενταμικίνη και νετιλμικίνη), να παρουσιάζονται σε πολύ υψηλές συχνότητες (47,6% και 51,4%, αντίστοιχα) (Miller *et al.*, 1997).

Σε πιο πρόσφατες μελέτες που έγιναν στην Ελλάδα παρατηρήθηκαν 23 διαφορετικοί συνδυασμοί AMEs (μέγιστο πέντε γονίδια/στελέχος) που συσχετίζονται με διαφορετικά επίπεδα αντοχής στις αμινογλυκοσίδες. Το *aac(6')-Ib* ήταν το πιο κοινό γονίδιο που ανιχνεύθηκε και βρέθηκε σε ≥71,4% των στελεχών *Klebsiella* που παράγουν καρβαπενεμάση, ανεξάρτητα από τον τύπο της καρβαπενεμάσης, ενώ το γονίδιο *aac(3')-IIa* συσχετίστηκε κυρίως με στελέχη που παρήγαγαν NDM ή OXA-48. Το γονίδιο *ant(3')-I* συσχετίστηκε με την παραγωγή VIM, ενώ το *aph(3')-Ia* βρισκόταν πάντα στα στελέχη που παρήγαγαν KPC και VIM (Galani *et al.*, 2019). Το *aac(6')-Ib* βρέθηκε να είναι το πιο κοινό γονίδιο αντοχής στις αμινογλυκοσίδες, σε πρόσφατη συλλογή (2019-2020) ελληνικών στελεχών ανθεκτικών στις καρβαπενέμες (35 στελέχη *K. pneumoniae*, 6 στελέχη *A. baumannii* και 3 στελέχη *P. aeruginosa*) αφού βρέθηκε στα 29 από τα 44 στελέχη (65.9%) (Tsilipounidaki *et al.*, 2022).

2.3 Τροποποίηση ριβοσώματος-στόχου

2.3.1 Ριβοσωμικές μεταλλάξεις

Η αντοχή σε αμινογλυκοσίδες λόγω ριβοσωμικών μεταλλάξεων μπορεί να προκύψει είτε λόγω μεταλλάξεων στο ριβοσωμικό στόχο (16S rRNA), είτε λόγω μετάλλαξης ριβοσωμικών πρωτεϊνών (Magnet & Blanchard, 2005).

Η αντοχή στη στρεπτομυκίνη μέσω μετάλλαξης του ριβοσωμικού στόχου σε στελέχη *M. tuberculosis* είναι η μόνη περίπτωση όπου αυτός ο μηχανισμός αντοχής είναι κλινικά σημαντικός. Το *rrs* είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί το 16S rRNA, αλλά το γεγονός ότι το οπερόνιο rRNA (*rrn*) που το φιλοξενεί υπάρχει σε πολλά αντίγραφα στα περισσότερα βακτήρια (για παράδειγμα έξι στο *E. coli*) περιορίζει την επίδραση αυτού του μηχανισμού στα βακτήρια με ένα μόνο αντίγραφο του οπερονίου rRNA (Dobner *et al.*, 1997). Το *Mycobacterium* είναι το μόνο γένος βακτηρίων με είδη που περιέχουν ένα μόνο αντίγραφο του ριβοσωμικού οπερονίου, επομένως, μια μεμονωμένη μετάλλαξη οδηγεί στην παραγωγή ενός πληθυσμού μεταλλαγμένων ριβοσωμάτων με αποτέλεσμα την ανάπτυξη αντοχής (Prammananan *et al.*, 1998; Nessar *et al.*, 2011). Έχουν γίνει πολλές μελέτες που χρησιμοποιούν την εισαγωγή ενός μόνο γονιδίου *rrs* σε ένα πλασμίδιο πολλαπλών αντιγράφων για τον έλεγχο της επίδρασης των μεταλλαγμένων 16S rRNA στη δραστικότητα των αμινογλυκοσιδών. Αυτές οι μελέτες έχουν δείξει ότι τουλάχιστον το 50% των ριβοσωμάτων πρέπει να είναι σε μεταλλαγμένη μορφή για να αναπτυχθεί ουσιαστική αντοχή στις αμινογλυκοσίδες (Meier *et al.*, 1994).

Μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν ριβοσωμικές πρωτεΐνες μπορούν επίσης να επηρεάσουν τη δράση των αμινογλυκοσιδών. Οι μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη S12 της υπομονάδας 30S του ριβοσώματος προσδίδουν αντοχή στη στρεπτομυκίνη τόσο σε Gram-θετικά όσο και σε Gram-αρνητικά μικρόβια (Meier *et al.*, 1994). Αν και η S12 έρχεται σε άμεση επαφή με τη στρεπτομυκίνη, έχει αποδειχθεί ότι η επίδραση τέτοιων μεταλλάξεων σχετίζεται περισσότερο με τις αλλαγές στη διαμόρφωση του rRNA που εμποδίζουν τη σύνδεση του αντιβιοτικού σε αυτό (O'Connor *et al.*, 1991). Εκτός από τις μεταλλάξεις στη ριβοσωμική υπομονάδα 30S, ορισμένες μεταλλάξεις σε πρωτεΐνες της υπομονάδας 50S έχουν επίσης συσχετιστεί με αντοχή σε διάφορες αμινογλυκοσίδες. Για παράδειγμα, οι μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη S5 μπορούν να προσδώσουν αντοχή στη σπεκτινομυκίνη σε στελέχη *Pasteurella multocida*, καθώς αποσταθεροποιούν το δίκτυο αλληλεπιδράσεων με την υπομονάδα 30S (Lambert, 2012).

2.3.2 Μεθυλίωση του 16S rRNA

Η μεθυλίωση του 16S rRNA αποτελεί τον πιο ανησυχητικό μηχανισμό αντοχής στις αμινογλυκοσίδες. Για το λόγο αυτό, και καθότι αποτελεί το κύριο θέμα της διατριβής αυτής, θα αναλυθεί εκτενέστερα στο επόμενο κεφάλαιο.

3. Οι 16S rRNA-Μεθυλοτρανσφεράσες (RMTs): ένας μηχανισμός υψηλής αντοχής στις αμινογλυκοσίδες (Doi & Arakawa, 2007a; Wachino & Arakawa, 2012)

Οι αμινογλυκοσίδες παράγονται από ακτινομύκητες, όπως τα *Streptomyces* spp. και τα *Micromonospora* spp.. Αυτοί οι ακτινομύκητες είναι ενδογενώς ανθεκτικοί στις αμινογλυκοσίδες που παράγουν, επειδή φιλοξενούν εγγενή γονίδια 16S rRNA - μεθυλοτρανσφεράσης (RMTs). Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν ένζυμα, τα οποία προσθέτουν μια ομάδα μεθυλίου σε συγκεκριμένα νουκλεοτίδια του 16S rRNA που είναι απαραίτητα για τη σύνδεση των αμινογλυκοσιδών στην υπομονάδα 30S του ριβοσώματος, αναστέλλοντας έτσι την αντιμικροβιακή τους δράση και χωρίς να παρεμβαίνουν σε άλλες ριβοσωμικές λειτουργίες (Cundliffe, 1989).

Μέχρι πρότινος θεωρείτο ότι αυτός ο μηχανισμός αντοχής μέσω προστασίας του 16S rRNA είναι εγγενής στους φυσικούς παραγωγούς αμινογλυκοσιδών, αλλά απουσίαζε από βακτηριακά είδη που προκαλούν λοιμώξεις σε ανθρώπους ή ζώα. Ωστόσο, το 2003 απομονώθηκαν για πρώτη φορά στη Γαλλία και την Ιαπωνία κλινικά στελέχη *Klebsiella pneumoniae* και *Pseudomonas aeruginosa* με υψηλού επιπέδου αντοχή σε αμινογλυκοσίδες, η οποία αποδόθηκε στην παραγωγή RMTs που είχαν αποκτήσει (Galimand *et al.*, 2003; Yokoyama *et al.*, 2003). Αυτά τα ένζυμα βρέθηκαν ότι προσφέρουν εξαιρετικά υψηλά επίπεδα αντοχής σε όλες τις κλινικά χρήσιμες αμινογλυκοσίδες, όπως αμικασίνη, τομπραμυκίνη και γενταμικίνη, ενώ τα γονίδια των RMTs εντοπίστηκαν κυρίως σε πλασμίδια. Από την πρώτη αναφορά το 2003, η βιβλιογραφία για αυτόν τον μηχανισμό αντοχής έχει αναπτυχθεί ραγδαία, τεκμηριώνοντας την ταυτοποίηση νέων ενζύμων και την εξάπλωσή τους σε διαφορετικά είδη σε διάφορα μέρη του κόσμου (Doi & Arakawa, 2007a).

Αυτός ο μηχανισμός προκαλεί σημαντική ανησυχία σχετικά με την αντοχή στις αμινογλυκοσίδες, όχι μόνο επειδή μπορούν να επιτευχθούν υψηλά επίπεδα αντοχής στις περισσότερες κλινικά σημαντικές αμινογλυκοσίδες, αλλά και λόγω της δυνατότητας τόσο για κάθετη όσο και για οριζόντια μεταφορά των γονιδίων που κωδικοποιούν τις RMTs. Η παγκόσμια εξάπλωση των παθογόνων μικροοργανισμών που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε πολλά φάρμακα με την ταυτόχρονη παραγωγή RMTs και καρβαπενεμασών γίνεται σοβαρή απειλή για την ανθρώπινη υγεία και έχει μετατρέψει την αντοχή κατά των αμινογλυκοσιδών σε κεντρικό θέμα πολυάριθμων ερευνητικών εργασιών.

Σε αυτό το κεφάλαιο θα περιγραφούν αναλυτικότερα τα γενετικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των RMTs που είναι υπεύθυνες για την αντοχή στις αμινογλυκοσίδες, με έμφαση σε αυτές που βρίσκονται στα παθογόνα Gram-αρνητικά βακτήρια, η επιδημιολογία τους, καθώς και η συσχέτισή τους με μηχανισμούς αντοχής σε άλλα αντιβιοτικά.

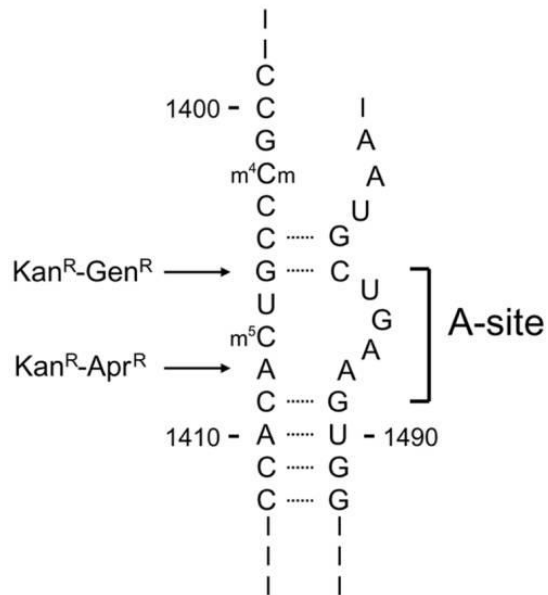
3.1 Εγγενείς RMTs σε παραγωγούς αμινογλυκοσιδών (Wakino & Arakawa, 2012)

Τα περισσότερα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη είναι δευτερογενείς μεταβολίτες διάφορων προκαρυωτικών οργανισμών, με τους πιο παραγωγικούς να είναι οι ακτινομύκητες. Ως εκ τούτου, οι οργανισμοί που παράγουν αντιβιοτικά πρέπει να είναι σε θέση να προστατευθούν από τις τοξικές επιδράσεις των δικών τους προϊόντων. Αυτή η αυτοάμυνα μπορεί να επιτευχθεί με διαφορετικούς τρόπους, από την προστασία του στόχου του αντιβιοτικού έως την αυξημένη απέκκριση μέσω συστημάτων εκροής ή οποιαδήποτε άλλη στρατηγική που εμποδίζει την αλληλεπίδραση φαρμάκου-στόχου (Cundliffe & Demain, 2010).

Τη δεκαετία του 1980 ανακαλύφθηκε ότι ορισμένοι ακτινομύκητες που παράγουν αμινογλυκοσίδες, όπως τα είδη *Streptomyces* και *Micromonospora*, φιλοξενούν συγκεκριμένα γονίδια που κωδικοποιούν RMTs για να προστατεύονται από τις δικές τους εγγενείς αμινογλυκοσίδες (Cundliffe, 1989). Κατά συνέπεια, αυτοί οι ακτινομύκητες εμφανίζουν ενδογενώς υψηλό επίπεδο αντοχής στις αμινογλυκοσίδες, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που παράγουν οι ίδιοι, προστατεύοντας ταυτόχρονα τη δική τους πρωτεϊνοσύνθεση. Τη δεκαετία του 2000 με τις σημαντικές προόδους στον τομέα των τεχνικών γενετικής ανάλυσης, τα γονίδια που εμπλέκονται στη σύνθεση αμινογλυκοσιδών στους ακτινομύκητες αναλύθηκαν εκτενέστερα.

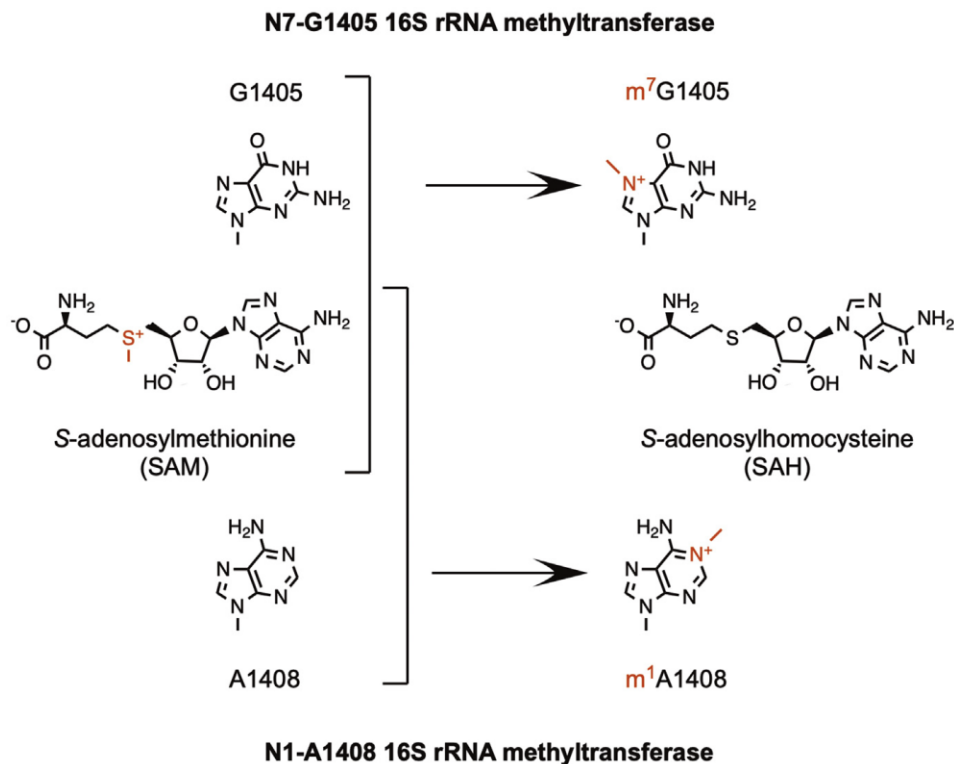
Οι υπεύθυνες για την αντοχή σε αμινογλυκοσίδες RMTs που βρίσκονται στους ακτινομύκητες που παράγουν αμινογλυκοσίδες ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες, ανάλογα με το νουκλεοτίδιο που πρόκειται να τροποποιήσουν στο 16S rRNA (Εικόνα 12, Πίνακας 7) (Beauclerk & Cundliffe, 1987; Conn *et al.*, 2009; Savic *et al.*, 2009). Οι N7-G1405 RMTs της οικογένειας Kgm (kanamycin-gentamicin MTs) μεθυλιώνουν το νουκλεοτίδιο G1405 στη θέση N-7 εντός του 16S rRNA και προσδίδουν αντοχή αποκλειστικά σε 4,6- 2-DOS αμινογλυκοσίδες όπως καναμυκίνη, αμικασίνη και γενταμικίνη, ενώ δεν μειώνουν την ευαισθησία σε 4,5- 2-DOS αμινογλυκοσίδες (νεομυκίνη, παρομομυκίνη), ούτε σε άλλες αμινογλυκοσίδες όπως η απραμυκίνη και η στρεπτομυκίνη (Husain *et al.*, 2010) (Εικόνα 13). Από την άλλη πλευρά, οι N1-A1408 RMTs της οικογένειας Kam (kanamycin-apramycin MTs) μεθυλιώνουν το νουκλεοτίδιο A1408 στη θέση N-1 εντός του 16S rRNA και προσδίδουν υψηλή αντοχή στην καναμυκίνη και την απραμυκίνη, αυξάνουν την αντοχή στη νεομυκίνη, αλλά δεν μειώνουν την ευαισθησία στη γενταμικίνη (Macmaster *et al.*, 2010) (Εικόνα 13).

Εικόνα 12. Νουκλεοτίδια τροποποίησης στη θέση πρόσδεσης των αμινογλυκοσιδών στο 16S rRNA (Doi & Arakawa, 2007a).



Kan: καναμικίνη, Gen: γενταμικίνη, Apr: απραμικίνη

Εικόνα 13. Μηχανισμοί μεθυλίωσης των G1405 και A1408 του 16S rRNA από τις RMTs (Wachino *et al.*, 2020).



Πίνακας 7. Οικογένειες εγγενών RMTs και τα σημαντικότερα γονίδιά τους

Οικογένεια MT	Γονίδιο MT	Παραγωγός	Αμινογλυκοσίδη
Kgm (N7-G1405)	<i>gmrA</i>	<i>Micromonospora purpurea</i>	Γενταμικίνη
	<i>kmr</i>	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Καναμικίνη
	<i>kgmB</i>	<i>Streptomyces tenebrarius</i>	Σύμπλεγμα νεμπραμικίνης
	<i>fmrO</i>	<i>Micromonospora olivasterospora</i>	Φορτιμικίνη Α
Kam (N1-A1408)	<i>kamA</i>	<i>Streptomyces tenjimariensis</i>	Ισταμικίνη
	<i>kamB</i>	<i>Streptomyces tenebrarius</i>	Σύμπλεγμα νεμπραμικίνης
	<i>kamC</i>	<i>Saccharopolyspora hirsuta</i>	Σποραρισίνη

3.2 Επίκτητες RMTs σε Gram-αρνητικά βακτήρια

Παρά το γεγονός ότι η προστασία του ριβοσώματος-στόχου μέσω μεθυλίωσης περιγράφεται ευρέως ως στρατηγική αυτοάμυνας στους παραγωγούς αμινογλυκοσιδών από τη δεκαετία του '80, μέχρι πρόσφατα θεωρείτο ότι αυτός ο μηχανισμός αντοχής απουσίαζε από παθογόνα στελέχη. Σήμερα, η μεθυλίωση του 16S rRNA είναι ένας αναδυόμενος μηχανισμός στα κλινικά σημαντικά Gram-αρνητικά βακτήρια, που είναι υπεύθυνη για υψηλού επιπέδου αντοχή στις αμινογλυκοσίδες και προκαλεί μεγάλη ανησυχία.

3.2.1 Πρώτες αναφορές και νεότερες RMTs (Wachino & Arakawa, 2012)

Το 2003 αναφέρθηκε για πρώτη φορά μία επίκτητη RMT (Galimand *et al.*, 2003). Ένα στέλεχος *K. pneumoniae* που απομονώθηκε το 2000 από ασθενή με ουρολοίμωξη στη Γαλλία βρέθηκε να είναι εξαιρετικά ανθεκτικό σε όλες τις 4,6- 2-DOS αμινογλυκοσίδες και στη φορτιμικίνη. Η υπεύθυνη γονιδιακή περιοχή για αυτόν τον φαινότυπο κλωνοποιήθηκε σε εργαστηριακό στέλεχος *E. coli* και συγκρίθηκε με νουκλεοτιδικές αλληλουχίες της βάσης δεδομένων GenBank, αποκαλύπτοντας μεγάλη ομοιότητα με ένα τμήμα ενός πλασμιδίου (pCTX-M3) από στέλεχος *Citrobacter freundii* που είχε απομονωθεί στην Πολωνία και είχε κατατεθεί στη GenBank το 2002. Τμήμα της αμινοξικής αλληλουχίας παρουσίαζε 27% ομοιότητα με μια εγγενή RMT του *Streptoalloteichus hindustanus*. Ωστόσο, παρά το γεγονός ότι ολόκληρη η νουκλεοτιδική αλληλουχία του pCTX-M3 είχε αναλυθεί και πρωτύτερα, αυτή η πιθανή RMT δεν χαρακτηρίστηκε και δεν δημοσιεύτηκε μέχρι που ο Galimand και οι συνεργάτες του ονόμασαν αυτή τη νέα πρωτεΐνη ArmA σαν ακρωνύμιο για την aminoglycoside resistance methyltransferase A. Η ομολογία που παρουσίαζε η ArmA με τις RMTs των ακτινομυκήτων κυμαίνονταν από 21% έως 30% (Εικόνα 14.A) (Galimand *et al.*, 2003).

Μόλις 4 μήνες μετά την πρώτη αναφορά της ArmA, δημοσιεύτηκε ένα άλλο άρθρο που περιέγραφε μία άλλη RMT σε Gram-αρνητικό βακτήριο (Yokoyama *et al.*, 2003). Το υπεύθυνο γονίδιο, μεγέθους 756 bp, ταυτοποιήθηκε σε στέλεχος *P. aeruginosa* που είχε απομονωθεί από κλινικό

δείγμα το 1997 στην Ιαπωνία και ονομάστηκε *rmtA* (ribosomal RNA methyltransferase A). Αυτό το γονίδιο, όταν κλωνοποιήθηκε και εκφράστηκε σε εργαστηριακά στελέχη *E. coli* και *P. aeruginosa*, βρέθηκε ότι προσδίδει υψηλού επιπέδου αντοχή στην αρμπεκασίνη, την αμικασίνη, τη γενταμικίνη, την καναμυκίνη και την τομπραμυκίνη.

Οι επίκτητες RMTs, RmtB και RmtC, ανακαλύφθηκαν στη συνέχεια για πρώτη φορά επίσης σε ιαπωνικά νοσοκομεία (Εικόνα 14.A). Η πρώτη απομονώθηκε από ένα στέλεχος *Serratia marcescens* το 2002 και δημοσιεύτηκε το 2004 (Doi *et al.*, 2004). Η αμινοξική αλληλουχία της RmtB παρουσίαζε ομοιότητα 82% με την RmtA και περαιτέρω έρευνα επιβεβαίωσε ότι η RmtB ήταν μία λειτουργική RMT. Η πρώτη ταυτοποίηση της RmtC δημοσιεύτηκε το 2006 (Wachino *et al.*, 2006b). Βρέθηκε σε ένα στέλεχος *Proteus mirabilis* που απομονώθηκε το 2003 και επιβεβαιώθηκε εργαστηριακά σαν RMT που προσδίδει τον ίδιο φαινότυπο αντοχής με τις ArmA, RmtA και RmtB.

Οι ArmA και RmtA ήταν λοιπόν τα πρώτα ένζυμα, τα οποία αποκάλυψαν την εμφάνιση επίκτητων RMTs που προσφέρουν ένα ευρύ φάσμα και υψηλό επίπεδο αντοχής στις αμινογλυκοσίδες σε παθογόνα Gram-αρνητικά βακτήρια. Τρία χρόνια αργότερα, η ενζυμική λειτουργία της ArmA προσδιορίστηκε λεπτομερώς από τους Liou *et al.* και η ArmA κατηγοριοποιήθηκε στις N7-G1405 RMTs (Liou *et al.*, 2006). Η RmtA αναμενόταν να ανήκει στην ίδια κατηγορία με βάση την ομοιότητα στην αμινοξική αλληλουχία.

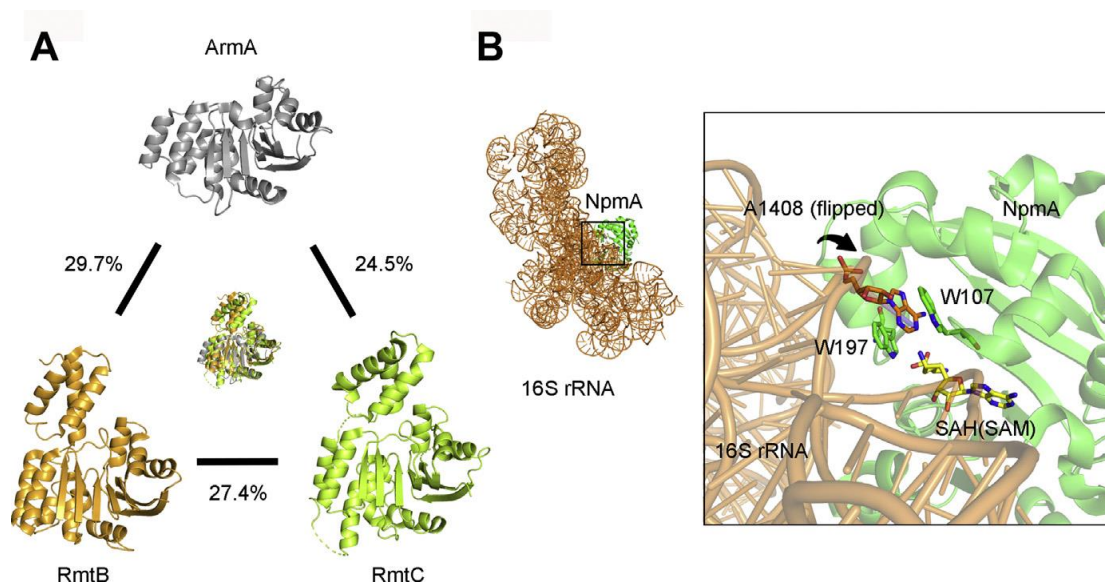
Έκτοτε έχουν ανακαλυφθεί και άλλες N7-G1405 RMTs σε Gram-αρνητικά βακτήρια. Η RmtD αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 2007 σε ένα κλινικό στέλεχος *P. aeruginosa* στη Βραζιλία (Doi *et al.*, 2007c) και η παραλλαγή της, η RmtD2, η οποία δείχνει 9 αμινοξικές αλλαγές σε σύγκριση με την RmtD, βρέθηκε σε στέλεχος *Enterobacter aerogenes* στην Αργεντινή το 2011 (Tijet *et al.*, 2011). Η πρώτη αναφορά της RmtE δημοσιεύτηκε το 2010. Βρέθηκε σε στελέχη *E. coli* που απομονώθηκαν από βοοειδή στις Ηνωμένες Πολιτείες (Davis *et al.*, 2010). Η RmtF ανιχνεύθηκε σε ένα κλινικό στέλεχος *K. pneumoniae* στο νησί Ρεϋνιόν το 2012 (Galimand *et al.*, 2012) και οι RmtG και RmtH ανακαλύφθηκαν το 2013 σε στελέχη *K. pneumoniae* που απομονώθηκαν στη Βραζιλία και στο Ιράκ, αντίστοιχα (Bueno *et al.*, 2013, O'Hara *et al.*, 2013).

Μία N1-A1408 έχει βρεθεί, συγκεκριμένα η NrmA, η οποία ανακαλύφθηκε το 2007 σε κλινικό στέλεχος *E. coli* στην Ιαπωνία, και επιβεβαιώθηκε ότι μεθυλίωσε το νουκλεοτίδιο A1408 του 16S rRNA (Εικόνα 14.B). Επιπλέον, εμφανίζει έναν κατάλληλο φαινότυπο αντοχής σύμφωνα με τη λειτουργία του (Wachino *et al.*, 2007). Πέρα από την NrmA, μία μόνο παραλλαγή της έχει αναφερθεί έως σήμερα, η NrmA2, και συγκεκριμένα σε *C. difficile* (Marsh *et al.*, 2019).

Εικόνα 14. (Wachino *et al.*, 2020)

A: 3D-αναπαράσταση δομής των ArmA, RmtB και RmtC. Τα ποσοστά αφορούν αμινοξική ομολογία.

B: Δεσμός μεταξύ του 16S rRNA και της NpmA.



Το συνένζυμο S-adenosyl-L-homocysteine (SAH) εμφανίζεται με κίτρινες ράβδους και το τελικό τμήμα του A1408 με πορτοκαλί ράβδους, οι τρυπτοφάνες στις θέσεις W107 και W197 της NpmA με πράσινες ράβδους.

3.2.2 Ονοματολογία

Λόγω της εμφάνισης και ταχείας εξάπλωσης των επίκτητων RMTs σε Gram-αρνητικά βακτήρια, το 2008, ο Doi και οι συνεργάτες του πρότειναν ορισμένους κανόνες προκειμένου να αποφευχθεί η σύγχυση σχετικά με την ονοματολογία των 16S rRNA μεθυλοτρανσφερασών (Doi *et al.*, 2008b) και για την αποφυγή περιπτώσεων όπως τα δύο υπάρχοντα συστήματα ονοματολογίας για τις αμινογλυκοσιδο-ακετυλοτρανσφεράσες. Ως εκ τούτου, προτάθηκαν οι ακόλουθες κατευθυντήριες γραμμές: ένα νέο γονίδιο με βαθμό ομοιότητας στην αμινοξική αλληλουχία μεγαλύτερο από 95% με την πλησιέστερη γνωστή RMT θα αποδίδεται ως παραλλαγή της γνωστής RMT με έναν επιπλέον αριθμό ξεκινώντας από τον αριθμό δύο (π.χ. *rmtD2*). Ένα νέο γονίδιο που έχει βαθμό ομοιότητας στην αμινοξική αλληλουχία μεταξύ 50 και 95% με την πλησιέστερη γνωστή RMT θα λαμβάνει ένα νέο αλφαβητικό γράμμα σύμφωνα με το πλησιέστερο υπάρχον γονιδιακό όνομα (π.χ. *rmtF*). Ένα γονίδιο που είτε εμφανίζει βαθμό ομοιότητας στην αμινοξική αλληλουχία μικρότερο από 50% με την πλησιέστερη γνωστή RMT είτε έχει αποδειχθεί ότι μεθυλιώνει μία νέα θέση στο 16S rRNA, μπορεί να αποκτήσει ένα εντελώς νέο όνομα γονιδίου (π.χ. *npmA*).

Πίνακας 8. Πρώτη απομόνωση των RMT γονιδίων *armA*, *rmtA-rmtH*, *npmA*.

Γονίδιο	Έτος απομόνωσης	Στέλεχος	Τύπος δείγματος/Πηγή απομόνωσης	Χώρα	Αναφορά
armA	1996	<i>C.freundii</i>	Άγνωστο	Πολωνία	Gniadkowski <i>et al.</i> , 1998
armA2	Άγνωστο	<i>A.baumannii</i>	Αίμα	Μιανμάρ	Tada <i>et al.</i> , 2020
rmtA	1997	<i>P.aeruginosa</i>	Πτύελα	Ιαπωνία	Yokoyama <i>et al.</i> , 2003
rmtB	2002	<i>S.marcescens</i>	Πτύελα	Ιαπωνία	Doi <i>et al.</i> , 2004
rmtB2	2006	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	Αίμα	Μεξικό	GenBank: AFC75738.1
rmtB3	2005	<i>E.coli</i>	Αίμα	ΗΠΑ	GenBank: AFC75739.1
rmtB4	2013	<i>P.mirabilis</i>	Ούρα	Άγνωστο	Costello <i>et al.</i> , 2019
rmtC	2003	<i>P.mirabilis</i>	Φαρυγγικό επίχρισμα	Ιαπωνία	Wachino <i>et al.</i> , 2006b
rmtD	2005	<i>P.aeruginosa</i>	Ούρα	Βραζιλία	Doi <i>et al.</i> , 2007c
rmtD2	2007	<i>K.aerogenes</i>	Άγνωστο	Αργεντινή	Tijet <i>et al.</i> , 2011
rmtD3	2014	<i>P.aeruginosa</i>	Πτύελα	Μιανμάρ	Tada <i>et al.</i> , 2018
rmtE	Άγνωστο	<i>E.coli</i>	Ζώα: Βοοειδή	ΗΠΑ	Davis <i>et al.</i> , 2010
rmtE2	Άγνωστο	<i>E.coli</i>	Ζώα: Χοίρος	Κίνα	Xia <i>et al.</i> , 2015
rmtF	2011	<i>K.pneumoniae</i>	Άγνωστο	Ρεϋνιόν	Galimand <i>et al.</i> , 2012
rmtF2	Άγνωστο	<i>P.aeruginosa</i>	Άγνωστο	Νεπάλ	Tada <i>et al.</i> , 2017a
rmtG	2010	<i>K.pneumoniae</i>	Οστό	Βραζιλία	Bueno <i>et al.</i> , 2013
rmtH	2009	<i>K.pneumoniae</i>	Τραύμα	Ιράκ	O'Hara <i>et al.</i> , 2013
npmA	2003	<i>E.coli</i>	Ούρα	Ιαπωνία	Wachino <i>et al.</i> , 2007
npmA2	Άγνωστο	<i>C.difficile</i>	Άγνωστο	ΗΠΑ	Marsh <i>et al.</i> , 2019

3.2.3 Φαινότυποι αντοχής

Οι RMTs συνήθως ανιχνεύονται σε Gram-αρνητικά παθογόνα απομονωμένα από νοσοκομειακές λοιμώξεις και λοιμώξεις της κοινότητας (Wachino & Arakawa, 2012) και φαίνεται να είναι πολύ διαδεδομένες σε πολυανθεκτικά βακτηριακά είδη, όπως τα παθογόνα ESKAPE (*E. faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella* spp., *A. baumannii*, *P. aeruginosa* και *Enterobacter* spp.).

Οι N7-G1405 RMTs (ArmA, RmtA-H) προσδίδουν υψηλή αντοχή σε 4,6-2-DOS αμινογλυκοσίδες, όπως γενταμικίνη, αμικασίνη, τομπραμυκίνη, καναμυκίνη ή ακόμα και αρμπτεκασίνη. Ωστόσο, δεν μειώνουν την ευαισθησία στις 4,5-2-DOS αμινογλυκοσίδες (όπως νεομυκίνη), στην απραμυκίνη ή στη στρεπτομυκίνη (Πίνακας 9, Εικόνα 15). Κατά κανόνα, όταν αυτά τα γονίδια κλωνοποιούνται και εκφράζονται σε εργαστηριακά στελέχη *E. coli*, οι τιμές MIC είναι ≥ 128 mg/L για όλες τις 4,6-2-DOS, πολύ υψηλότερες δηλαδή τιμές από τα κλινικά όρια ευαισθησίας που έχει θεσπίσει η EUCAST (MIC > 8mg/L = αντοχή στην αμικασίνη, MIC > 2mg/L = αντοχή στη γενταμικίνη και την τομπραμυκίνη). Δεν είναι σπάνιο να βρεθούν ακόμα και MICs > 1024 mg/L σε ορισμένες 4,6-2-DOS.

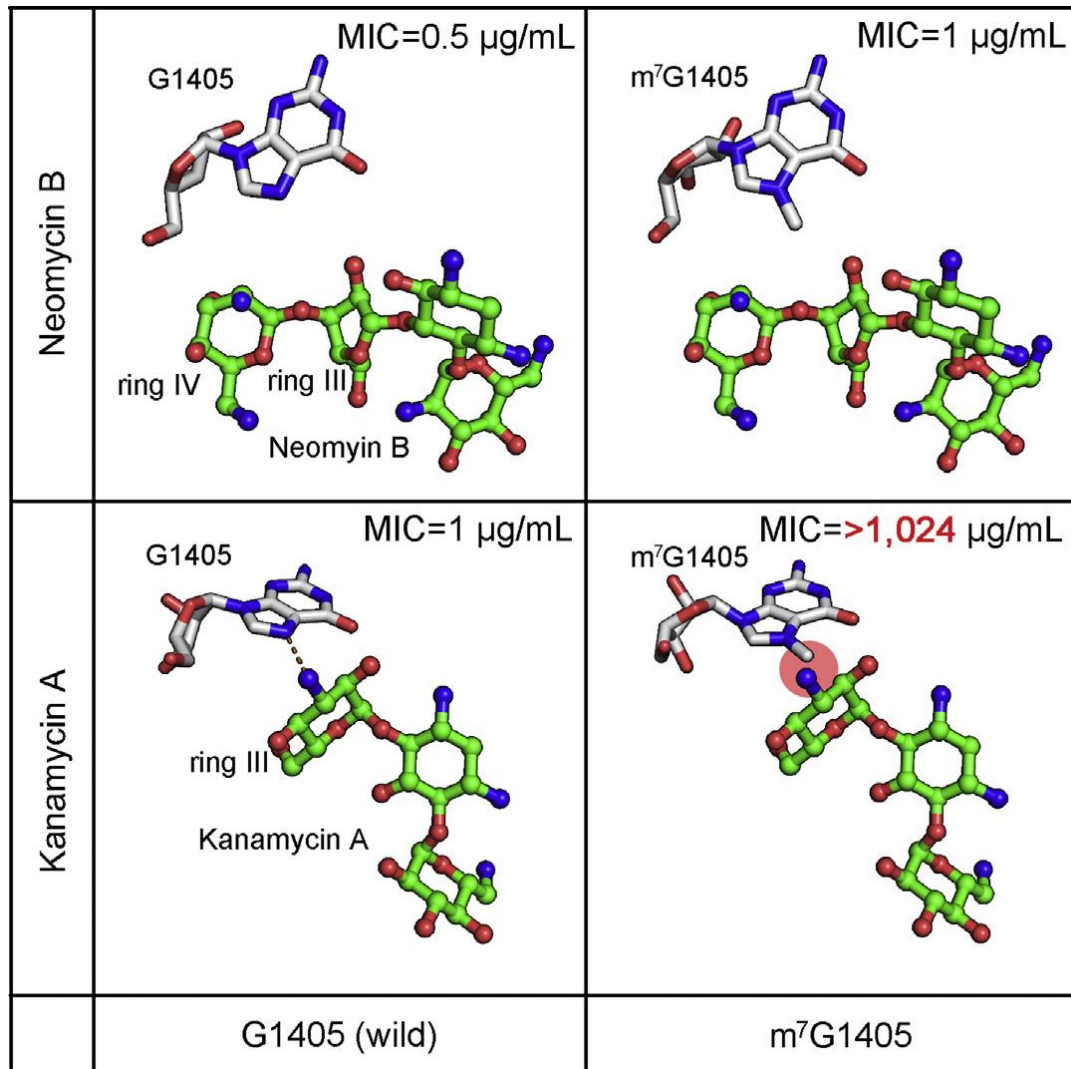
Αντίθετα, η μόνη N1-A1408 RMT που έχει εντοπιστεί μέχρι σήμερα σε Gram-αρνητικά βακτήρια, η NpmA, προσδίδει υψηλή αντοχή στις 4,5-2-DOS (όπως νεομυκίνη), στην απραμυκίνη, αλλά μειώνει σημαντικά την ευαισθησία και στις 4,6-2-DOS (Wachino *et al.*, 2007) (Πίνακας 9, Εικόνα 16). Αυτός ο τύπος RMT προκαλεί ακόμη μεγαλύτερη ανησυχία, καθώς παρέχει ένα ευρύτερο φάσμα αντοχής στις αμινογλυκοσίδες.

Πίνακας 9. Φαινότυπος αντοχής των N7-G1405 και N1-A1408 RMTs.

Αμινογλυκοσίδη	N7-G1405 RmtA, RmtB, RmtC, RmtD/D2, RmtE	N1-A1408 NpmA
4,6-2-DOS		
Γενταμικίνη	R+	R
Αμικασίνη	R+	R
4,5-2-DOS		
Νεομυκίνη	S	R+
Ριβοσταμυκίνη	S	R+
Απραμυκίνη	S	R+
Στρεπτομυκίνη	S	S

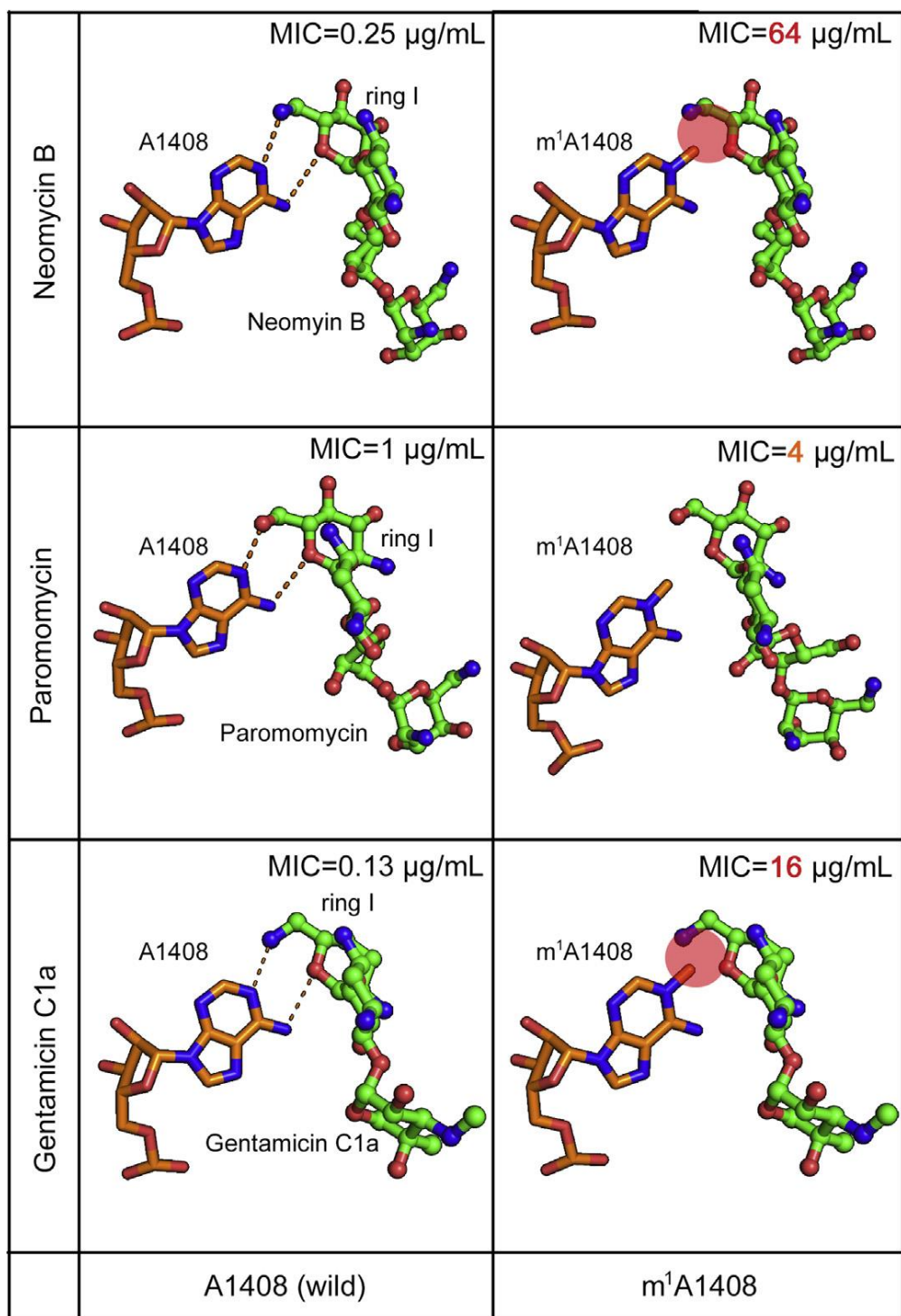
R+: υψηλή αντοχή, R: αντοχή, S: ευαισθησία, 2-DOS: 2-δεοξυ-στρεπταμίνη.

Εικόνα 15. Μοριακή απεικόνιση των δεσμών μεταξύ νεομικίνης Β/ καναμικίνης Α και του G1405 του 16S rRNA προ και μετά μεθυλίωσής του. (Wachino *et al.*, 2020)



Το τελικό τμήμα του G1405 και τα μόρια των αμινογλυκοσιδών απεικονίζονται με γκρι και πράσινο, αντίστοιχα, ενώ η διακεκομμένη γραμμή σηματοδοτεί δεσμούς υδρογόνου. Ο κόκκινος κύκλος υποδεικνύει τη θέση σύγκρουσης ανάμεσα στο μεθυλιωμένο G1405 και το μόριο της αμινογλυκοσίδης.

Εικόνα 16. Μοριακή απεικόνιση των δεσμών μεταξύ νεομικίνης Β/ παρομομικίνης/γενταμικίνης C1a και του A1408 του 16S rRNA προ και μετά μεθυλίωσής του. (Wachino *et al.*, 2020)



Το τελικό τμήμα του A1408 και τα μόρια των αμινογλυκοσιδών απεικονίζονται με πορτοκαλί και πράσινες ράβδους, αντίστοιχα, ενώ η διακεκομμένη γραμμή σηματοδοτεί δεσμούς υδρογόνου. Ο κόκκινος κύκλος υποδεικνύει τη θέση σύγκρουσης ανάμεσα στο μεθυλιωμένο A1408 και το μόριο της αμινογλυκοσίδης.

3.2.4 Προέλευση επίκτητων RMTs

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η ταξινόμηση των RMTs γίνεται σε τέσσερις διαφορετικές οικογένειες ανάλογα με την προέλευση (εγγενής ή επίκτητη) και τον στόχο τους (Conn *et al.*, 2009): την οικογένεια "Kgm" (kanamycin-gentamicin MTs) με εγγενείς RMTs του G1405, την οικογένεια "Arm" (aminoglycoside resistance MTs) με επίκτητες RMTs του G1405, την οικογένεια "Kam" (kanamycin-apramycin MTs) με εγγενείς RMTs που στοχεύουν στο A1408 και την οικογένεια "Pam" (pan-aminoglycoside resistance MTs) με επίκτητες RMTs του A1408.

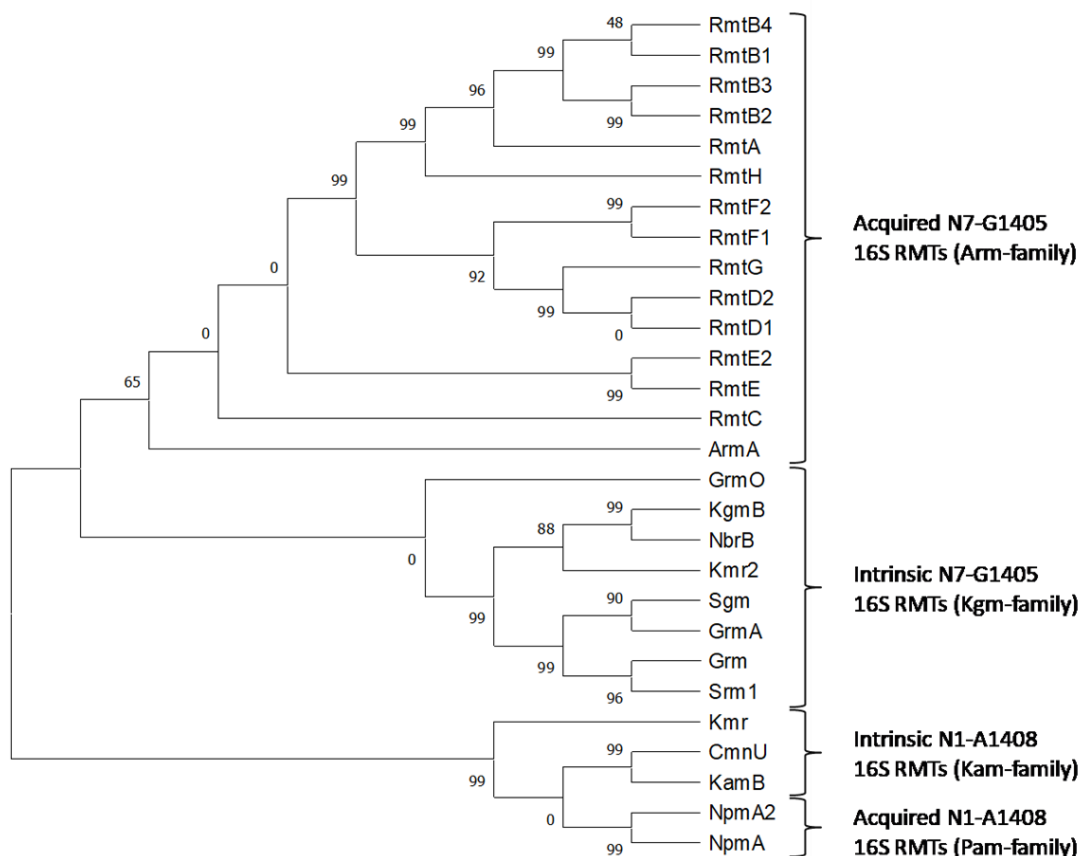
Όσον αφορά τη φυλογενετική συγγένεια των επίκτητων RMTs, το ποσοστό της ομοιότητας στην αμινοξική αλληλουχία μεταξύ των μελών της οικογένειας Arm (ArmA, RmtA-H) κυμαίνεται από 20% έως 81%, ενώ η NpmA έχει μικρή ομοιότητα με τις RMTs της οικογένειας Arm (Πίνακας 10). Συγκρίνοντας τις αμινοξικές αλληλουχίες όλων των RMTs, οι G1405-RMTs ομαδοποιούνται μαζί, και το ίδιο κάνουν και εκείνες που μεθυλιώνουν τη θέση A1408 (Εικόνα 17). Ωστόσο, οι αμινοξικές αλληλουχίες των επίκτητων RMTs έχουν ποσοστό ομοιότητας μικρότερο από 33% με αυτές των εγγενών RMTs.

Αναλύοντας τα ποσοστά βάσεων γουανίνης - κυτοσίνης (περιεχόμενο GC) των γονιδίων RMTs βρέθηκε ότι το περιεχόμενο GC των επίκτητων γονιδίων RMTs είναι μεταξύ 30% και 55%, υποδηλώνοντας ότι η προέλευσή τους είναι λιγότερο πιθανό να είναι από εγγενή γονίδια RMTs των ακτινομουκήτων που παράγουν αμινογλυκοσίδες, επειδή το περιεχόμενό τους σε GC είναι γενικά υψηλότερο του 60% (Liou *et al.*, 2006). Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένοι Gram-θετικοί βάκιλλοι ικανοί να παράγουν αμινογλυκοσίδες, όπως ο *Bacillus circulans*, και η ταυτοποίηση ενός εγγενούς γονιδίου RMT με χαμηλό περιεχόμενο GC σε τέτοια μικρόβια, μπορεί να δώσει μια ένδειξη για την αναζήτηση της προέλευσης των επίκτητων γονιδίων RMTs που βρίσκονται σε Gram-αρνητικά παθογόνα (Liou *et al.*, 2006). Παρ'όλα αυτά, η προέλευση αυτών των επίκτητων RMTs παραμένει ακόμα άγνωστη.

Πίνακας 10. Σύγκριση αμινοξικών αλληλουχιών επίκτητων RMTs.

RMTs	Ομοιότητα αλληλουχίας αμινοξέων (%)									
	ArmA	RmtA	RmtB1-B4	RmtC	RmtD1-D2	RmtE/E2	RmtF1/F2	RmtG	RmtH	NpmA
ArmA	100	33	32	29	26	33	25	26	27	10
RmtA		100	81-82	29	41	33	42-43	37	64	12
RmtB1-B4			97-100	30	42-43	34	43-44	38-39	64	11
RmtC				100	27-28	29	27	26	28	5
RmtD1-D2					96-100	30-31	45-46	57-59	40	9
RmtE/E2						100	33	31	31	5
RmtF1/F2							100	41	42	2
RmtG								100	37	5
RmtH									100	5
NpmA										100

Εικόνα 17. Δενδρόγραμμα που απεικονίζει τη φυλογενετική συγγένεια επίκτητων και εγγενών RMTs.



Δημιουργήθηκε με το CLUSTALW και το MEGA με τη χρήση του Neighbour-joining algorithm.

Χρησιμοποιήθηκαν αμινοξικές αλληλουχίες αναφοράς από την NCBI με τα ακόλουθα accession numbers: ArmA (WP_000359986.1); CmnU (ABR67761.1); Grm (AAA25338.1); GrmA (AAR98546.1); GrmO (AAR98541.1); KgmB (AAB20100.1); KamB (WP_063964000.1); Kmr από *S. cellulosum* (ACB88605.1); Kmr από *S. kanamyceticus* (BAD20767.1); NbrB (AAB95477.1); Sgm (3LCU_A); Srm1 (AAV28394.1); RmtA (WP_063854824.1); RmtB1 (WP_012372818.1); RmtB2 (WP_063854854.1); RmtB3: (WP_048266647.1); RmtB4: (WP_032634099.1); RmtC (WP_000855769.1); RmtD1 (WP_019726361.1); RmtD2 (WP_063866469.1); RmtE (WP_063866478.1); RmtE2 (WP_063866490.1); RmtF1 (WP_015632396.1); RmtF2 (WP_023434793.1); RmtG: (WP_070180863.1); RmtH: (WP_046664169.1); NpmA (WP_032492089.1) and NpmA2 (WP_070112004.1).

3.3 Επίκτητες RMTs σε Gram-θετικά βακτήρια

Η έκφραση των RMT γονιδίων *armA*, *rmtA-rmtH* και *hpmA* φαινόταν να περιορίζεται σε Gram-αρνητικά βακτήρια, καθώς μέχρι πρόσφατα δεν υπήρχαν αναφορές RMT γονιδίων σε Gram-θετικά μικρόβια (Wachino & Arakawa, 2012; Wachino *et al.*, 2010). Ωστόσο, το 2018 βρέθηκαν τα *hpmA* και *hpmA2* σε στελέχη *Clostridioides difficile* που απομονώθηκαν στις ΗΠΑ (Marsh *et al.*, 2019). Πριν από αυτήν την ανακάλυψη, ο Wachino και οι συνεργάτες του είχαν αποδείξει ότι η έκφραση του γονιδίου *rmtC* είναι εφικτή σε Gram-θετικά μικρόβια, αλλά εξαρτάται από την ύπαρξη των κατάλληλων (και συμβατών με Gram-θετικά) υποκινητών (Wachino *et al.*, 2010). Η έκφραση των RMT γονιδίων σε Gram-θετικά μικρόβια, ιδιαίτερα σε *C. difficile*, που είναι γνωστό για τις νοσοκομειακές εξάρσεις που προκαλεί, καθώς είναι εξαιρετικά μεταδοτικό και δύναται να σχηματίσει σπόρια που μπορούν να επιβιώσουν για παρατεταμένες περιόδους στο περιβάλλον, υποδηλώνει την ικανότητα των RMT γονιδίων να εξαπλωθούν και σε άλλα βακτηριακά γένη σε ασθενείς (Martinez *et al.*, 2012).

3.4 Επιδημιολογία των επίκτητων RMTs

3.4.1 Επιπολασμός και παγκόσμια κατανομή

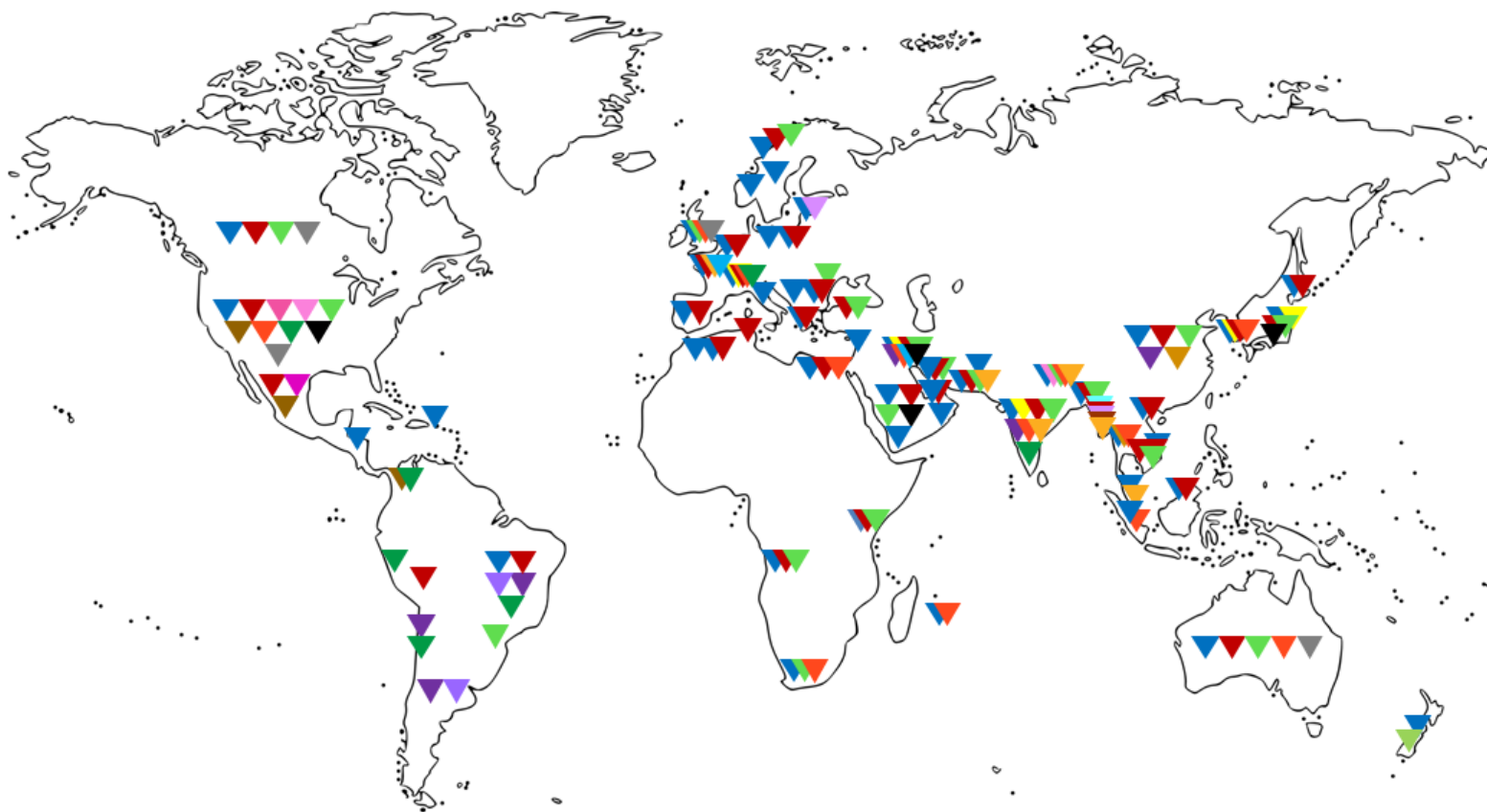
Έχουν διεξαχθεί αρκετές μελέτες σε όλο τον κόσμο για τον υπολογισμό του επιπολασμού των RMTs στις αντίστοιχες χώρες. Οι RMTs γενικά φαίνεται να βρίσκονται σε υψηλότερα ποσοστά στην Άπω Ανατολή και τη Μέση Ανατολή σε σύγκριση με την Ευρώπη. RMTs βρέθηκαν σε ποσοστό 2.6% (2/78) των Εντεροβακτηριακών που παράγουν ESBL στην Ιαπωνία (Maeyama *et al.*, 2018) σε σύγκριση με 1.3% (5/373) των Εντεροβακτηριακών που παράγουν ESBL στη Γαλλία (Berçot *et al.*, 2008). Κλινικά στελέχη Εντεροβακτηριακών (ένα στέλεχος ανά ασθενή) έφεραν γονίδια RMTs σε ποσοστά 46.3% (57/123), 6.8% (21/307), 1.5% (20/1.310) και 1.1% (20/1.770) στην Ινδία (Zaman *et al.*, 2017), στο Ιράν (Ghotaslou *et al.*, 2017), στη Βουλγαρία (Sabtcheva *et al.*, 2008) και στην Πολωνία (Piekarska *et al.*, 2016), αντίστοιχα. Τέλος, τα ποσοστά RMTs σε MDR στελέχη *A. baumannii* βρέθηκαν να είναι 88.9% (48/54) στην Ινδία (Saranathan *et al.*, 2017), 76.2% (32/42) στη Νότια Κορέα (Kim *et al.*, 2008) και 32.9% (23/70) στη Βουλγαρία (Strateva *et al.*, 2012).

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα AMEs είναι ο πιο κοινός μηχανισμός αντοχής στις αμινογλυκοσίδες και οι μελέτες έχουν αποδείξει ότι εμφανίζονται πιο συχνά από τις RMTs. Οι Castanheira *et al.* (Castanheira *et al.*, 2018) εντόπισαν ότι το 18.5% (782/4.217) των Εντεροβακτηριακών, που συλλέχθηκαν από τις ευρωπαϊκές και τις γύρω χώρες, παρήγαγαν AMEs, ενώ μόνο 1.4% (60/4.217) των στελεχών παρήγαγαν RMTs. Οι Costello *et al.*

(Costello *et al.*, 2019) εντόπισαν ότι το 72.0% (144/200) των Gram-αρνητικών στελεχών από νοσοκομεία της Βόρειας Αμερικής, της Λατινικής Αμερικής και της Ευρώπης, που συμμετείχαν στο Πρόγραμμα Αντιμικροβιακής Επιτήρησης SENTRY, παρήγαγαν AMEs, ενώ το 10.5% (21/200) των στελεχών παρήγαγαν RMTs. Τέλος, έρευνα που διεξήχθη από την ομάδα μας κατά τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της διατριβής (Galani *et al.*, 2019) έδειξε ότι το 85.3% (256/300) των στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάση στα ελληνικά νοσοκομεία, παρήγαγαν AMEs και το 7.7% (23/300) των στελεχών παρήγαγαν RMTs. Αυτό δείχνει ότι ο επιπολασμός των γονιδίων RMTs είναι σχετικά χαμηλός σε σύγκριση με τα AMEs και ότι επί του παρόντος δεν αποτελούν σημαντική απειλή για τη χρήση αμινογλυκοσιδών, αλλά υπάρχουν αρκετοί παράγοντες που κάνουν την τρέχουσα εμφάνισή τους ανησυχητική.

armA: Το *armA* είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα γονίδια RMTs σε όλο τον κόσμο (Εικόνα 18) καθώς έχει βρεθεί στην Ευρώπη, την Αφρική, την Ασία, τη Βόρεια Αμερική, τη Νότια Αμερική, τη Μέση Ανατολή και την Ωκεανία (Wachino & Arakawa, 2012; Doi *et al.*, 2016). Το *armA* έχει εντοπιστεί σε ένα ευρύ φάσμα Gram-αρνητικών βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων των Εντεροβακτηριακών (Lee *et al.*, 2006; Galimand *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2008; Bogaerts *et al.*, 2007; Fritsche *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2007), των *A. baumannii* (Lee *et al.*, 2006) (ιδιαίτερα των στελεχών που ανήκουν στον διεθνή κλώνο ICII) (Tada *et al.*, 2015; Hasani *et al.*, 2016) και των *P. aeruginosa* (Zhou *et al.*, 2010). Έχει επίσης εντοπιστεί σε είδη όπως τα *Salmonella* spp. (Bouzidi *et al.*, 2011; Granier *et al.*, 2011; Moissenet *et al.*, 2011; Naas *et al.*, 2011; Du *et al.*, 2012; Folster *et al.*, 2009; Hidalgo *et al.*, 2012) και *Shigella flexneri* (Galimand *et al.*, 2015), τα οποία εμπλέκονται σε τροφιμογενείς λοιμώξεις. Επιπλέον, το *armA* έχει εντοπιστεί σε βακτήρια που απομονώθηκαν από ζώα, ιδιαίτερα στην Κίνα όπου βρέθηκε σε στελέχη *E. coli* που συλλέχθηκαν από πουλερικά (Du *et al.*, 2009; Du *et al.*, 2010; Yang Y *et al.*, 2015) και χοίρους (Deng, 2011b; Liu *et al.*, 2008). Επιπρόσθετα, το *armA* έχει εντοπιστεί σε στελέχη *E. coli* από ζώα εκτροφής στη Νότια Κορέα (Choi *et al.*, 2011), σε στελέχη *K. pneumoniae* από οικόσιπα ζώα από την Κίνα (Xia *et al.*, 2017) καθώς και σε στελέχη *Salmonella enterica* serovar California και *S. enterica* serovar Indiana από πουλερικά στην Κίνα (Wang *et al.*, 2017). Η παραλλαγή *armA2* αναγνωρίστηκε σε ένα στέλεχος *A. baumannii* από τη Μιανμάρ από τους Tada *et al.* (Tada *et al.*, 2020).

Symbol	16S RMTase
▼	ArmA
▼	ArmA2
▼	RmtA
▼	RmtB
▼	RmtB2
▼	RmtB3
▼	RmtB4
▼	RmtC
▼	RmtD
▼	RmtD2
▼	RmtD3
▼	RmtE
▼	RmtE2
▼	RmtF
▼	RmtF2
▼	RmtG
▼	RmtH
▼	NpmA
▼	NpmA2



Εικόνα 18. Η παγκόσμια κατανομή των RMTs.

(Χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από την πλατφόρμα The National Center for Biotechnology Information [NCBI]: Aghazadeh *et al.*, 2013; Gniadkowski *et al.*, 1998; Galimand *et al.*, 2003; Yokoyama *et al.*, 2003; Marsh *et al.*, 2019; Doi *et al.*, 2004; Wachino *et al.*, 2006b; Doi *et al.*, 2007c; Tijet *et al.*, 2011; Tada *et al.*, 2018; Davis *et al.*, 2010; Xia *et al.*, 2015; Galimand *et al.*, 2012; Tada *et al.*, 2017; Bueno *et al.*, 2013; O'Hara *et al.*, 2013; Wachino *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2008; Bogaerts *et al.*, 2007; Fritsche *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008; Granier *et al.*, 2011; Folster *et al.*, 2009; Hidalgo *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2017; Nagasawa *et al.*, 2014; Shin *et al.*, 2009; Upadhyay *et al.*, 2016; Dakhl *et al.*, 2015; Poirel *et al.*, 2011c; Chen *et al.*, 2018; Islam *et al.*, 2012; Sidjabat *et al.*, 2015; Heang *et al.*, 2014; Al-Gallas *et al.*, 2013; Castanheira *et al.*, 2012; Al Sheikh *et al.*, 2014; Sartor *et al.*, 2014; Haldorsen *et al.*, 2014; Kapmaz *et al.*, 2016; Carattoli *et al.*, 2012; Tijet *et al.*, 2015; Kiaei *et al.*, 2018; Al-Kadmy *et al.*, 2015; Tada *et al.*, 2013; Williamson *et al.*, 2012; Tada *et al.*, 2017b; Hopkins *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2017; Saranathan *et al.*, 2017; Bado *et al.*, 2018; Mohanam & Menon *et al.*, 2017; Gamal *et al.*, 2016; Hidalgo *et al.*, 2013; Filgona *et al.*, 2015; Khong *et al.*, 2016; Yoon *et al.*, 2018; Mancini *et al.*, 2018a; Lee CS *et al.*, 2014b; Rubin *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2014; Beyrouthy *et al.*, 2017; Berçot *et al.*, 2008; Strateva *et al.*, 2012; El-Sayed-Ahmed *et al.*, 2015; Poirel *et al.*, 2014a/b; Ayad *et al.*, 2016; Berçot *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2011; Samuelsen *et al.*, 2011; Pitart *et al.*, 2015; Zurfluh *et al.*, 2017; McGann *et al.*, 2012; Poirel *et al.*, 2018; Quiles *et al.*, 2015; Tojo *et al.*, 2015; Denisuik *et al.*, 2015; Cao, 2017; Pulss *et al.*, 2017; Galani *et al.*, 2016; Waterman *et al.*, 2013; Ho *et al.*, 2016; Chatterjee *et al.*, 2016; Brigante *et al.*, 2012; Revathi *et al.*, 2013; Saule *et al.*, 2013; Salloum *et al.*, 2017; Lean *et al.*, 2016; Shrestha *et al.*, 2016; Karah *et al.*, 2011b; Dortet *et al.*, 2012; Martinez *et al.*, 2016; Dortet *et al.*, 2016; Blackwell *et al.*, 2017; González-Zorn *et al.*, 2005a; Karah *et al.*, 2016; Sonnevend *et al.*, 2013; Doi *et al.*, 2014; Tada *et al.*, 2013b; Bakour *et al.*, 2014; Yeganeh Sefidan *et al.*, 2019, Kieffer *et al.*, 2016; Bartoloni *et al.*, 2016; Walkty *et al.*, 2019; Helaly *et al.*, 2010; Galani L *et al.*, 2013; Shakil *et al.*, 2010; Nematzadeh *et al.*, 2015; Taitt *et al.*, 2017; Yan *et al.*, 2004; Sonnevend *et al.*, 2017; Mancini *et al.*, 2018b; Yao *et al.*, 2011; Poirel *et al.*, 2011a; Ma *et al.*, 2015; Meradji *et al.*, 2016; Deng *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013; Mushtaq *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2014; Urbanowicz *et al.*, 2019. Gokemn *et al.*, 2016; Rahman *et al.*, 2015; Dortet *et al.*, 2015; Bueno *et al.*, 2016; Yamane *et al.*, 2008; Castanheira *et al.*, 2008; Fontes *et al.*, 2011; Cavalcanti *et al.*, 2015; Doi *et al.*, 2007d; Lincopan *et al.*, 2010; Silveira *et al.*, 2016; Moura *et al.*, 2017; Leigue *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2014a; Li *et al.*, 2017; Rahman *et al.*, 2014; Cerdeira *et al.*, 2016; Ramos *et al.*, 2014; Bueno *et al.*, 2017; Francisco *et al.*, 2015; Tada *et al.*, 2019)

rmtA: Το *rmtA* αρχικά θεωρήθηκε ότι περιοριζόταν στην Ασία (Wachino & Arakawa, 2012; Doi *et al.*, 2016), καθώς εντοπίστηκε κυρίως σε *P. aeruginosa* στην Ιαπωνία (Yokoyama *et al.*, 2003; Nagasawa *et al.*, 2014; Yamane *et al.*, 2015; Yamane *et al.*, 2007) όπως και σε *E. coli* (Shin *et al.*, 2009), *K. pneumoniae* (Shin *et al.*, 2009) και *P. aeruginosa* (Jin *et al.*, 2009) στη Νότια Κορέα. Ωστόσο, αργότερα εντοπίστηκε στην Ινδία σε στελέχη *A. baumannii* (Uradhyay *et al.*, 2016) και *E. coli* (Wangkheimayum *et al.*, 2017), καθώς και σε *P. aeruginosa* στο Ιράκ (Dakhl & Alwan, 2015) και σε *K. pneumoniae* στην Ελβετία (Poirel *et al.*, 2011c).

rmtB: Όπως το *armA*, το *rmtB* είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα γονίδια RMTs παγκοσμίως, καθώς έχει βρεθεί στην Ευρώπη, την Αφρική, την Ασία, τη Βόρεια Αμερική, τη Νότια Αμερική, τη Μέση Ανατολή και την Ωκεανία (Wachino & Arakawa, 2012; Doi *et al.*, 2016). Το *rmtB* έχει επίσης εντοπιστεί σε μια σειρά από Gram-αρνητικά βακτήρια, συμπεριλαμβανομένων των *A. baumannii* (Chen *et al.*, 2018), των Εντεροβακτηριακών (Fritsche *et al.*, 2008; Islam *et al.*, 2012; Sidjabat *et al.*, 2015; Heang *et al.*, 2014; Al-Gallas *et al.*, 2013; Yao *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2015) καθώς και σε στελέχη *P. aeruginosa* (Meradji *et al.*, 2016), αλλά φαίνεται να σχετίζεται πιο στενά με το *E. coli* σε σύγκριση με άλλα είδη, ιδιαίτερα όταν απομονώνονται από ζώα (Doi *et al.*, 2016; Deng *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013). Οι Castanheira *et al.* (Castanheira *et al.*, 2012) ανέφεραν τις παραλλαγές *rmtB2* και *rmtB3*, καθώς δύο *rmtB2*-θετικά στελέχη *E. cloacae* απομονώθηκαν στο Μεξικό, ενώ το *rmtB3* βρέθηκε σε ένα στέλεχος *E. coli* στις ΗΠΑ καθώς και σε ένα στέλεχος *E. cloacae* και ένα στέλεχος *K. pneumoniae* στο Μεξικό. Η παραλλαγή *rmtB4* έχει βρεθεί σε δύο στελέχη *P. aeruginosa* από το Νεπάλ (Tada *et al.*, 2017a) καθώς και σε μεμονωμένα στελέχη *Enterobacter hormaechei* και *P. mirabilis* από τις ΗΠΑ.

rmtC: Όπως το *armA* και το *rmtB*, το *rmtC* έχει εντοπιστεί στην Ευρώπη, την Αφρική, την Ασία, τη Βόρεια Αμερική, τη Νότια Αμερική, τη Μέση Ανατολή και την Ωκεανία (Sidjabat *et al.*, 2015; Al Sheikh *et al.*, 2014; Sartor *et al.*, 2014; Haldorsen *et al.*, 2014; Karpmaz *et al.*, 2016; Carattoli *et al.*, 2012; Tijet *et al.*, 2015; Mushtaq *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2016). Το *rmtC* έχει εντοπιστεί κυρίως σε Εντεροβακτηριακά, ιδιαίτερα σε κλινικά στελέχη *K. pneumoniae* (Wangkheimayum *et al.*, 2017; Islam *et al.*, 2012; Sidjabat *et al.*, 2015; Al Sheikh *et al.*, 2014; Sartor *et al.*, 2014; Kiaei *et al.*, 2018; Al-Kadmy *et al.*, 2015; Tada *et al.*, 2013a; Li *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2014; Urbanowicz *et al.*, 2019; Gokemn *et al.*, 2016), αλλά έχει επίσης εντοπιστεί σε τροφιμογενή παθογόνα όπως τα *Salmonella* spp. (Folster *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2017; Hopkins *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2017). Επιπλέον, το *rmtC* έχει εντοπιστεί σε στελέχη *A. baumannii* από την Ινδία (Saranathan *et al.*, 2017) και την Ουρουγουάη (Bado *et al.*, 2018) καθώς και σε στελέχη *P. aeruginosa* από την Ινδία (Mohanam & Menon, 2017; Rahman *et al.*, 2015) και τη Ρουμανία (Dortet *et al.*, 2015).

rmtD: Το *rmtD* έχει εντοπιστεί κυρίως σε βακτηριακά στελέχη από τη Νότια Αμερική, κυρίως σε στελέχη *K. pneumoniae* (Tijet *et al.*, 2011; Bueno *et al.*, 2013; Fritsche *et al.*, 2008; Bueno *et al.*, 2016; Yamane *et al.*, 2008) και *P. aeruginosa* (Doi *et al.*, 2007c; Castanheira *et al.*, 2008; Fontes *et al.*, 2011; Cavalcatti *et al.*, 2015; Doi *et al.*, 2007d; Lincopan *et al.*, 2010), αλλά και σε *Aeromonas hydrophila* (Doi *et al.*, 2007d), *C. freundii* (Fritsche *et al.*, 2008), *E. cloacae* (Fritsche *et al.*, 2008) και *E. coli* (Leigue *et al.*, 2015). Επιπλέον, το *rmtD* έχει εντοπιστεί σε *A. baumannii* (Upadhyay *et al.*, 2016) και σε *E. coli* (Wangkheimayum *et al.*, 2017) στην Ινδία καθώς και σε *P. aeruginosa* στο Ιράκ (Dakhl & Alwan, 2015). Η παραλλαγή *rmtD2* έχει αναφερθεί λιγότερο συχνά και έχει εντοπιστεί σε διάφορα στελέχη Εντεροβακτηριακών στην Αργεντινή (Tijet *et al.*, 2011), καθώς και σε *K. pneumoniae* στη Βραζιλία (Bueno *et al.*, 2016), ενώ το *rmtD3* εντοπίστηκε αρχικά σε *P. aeruginosa* στη Μιανμάρ (Tada *et al.*, 2018), αλλά έχει επίσης ταυτοποιηθεί σε ένα μεμονωμένο στέλεχος *P. aeruginosa* στην Πολωνία (Urbanowicz *et al.*, 2019).

rmtE: Σε αντίθεση με άλλα γονίδια RMTs, το *rmtE* έχει αναφερθεί σποραδικά. Εντοπίστηκε για πρώτη φορά σε πολλαπλά στελέχη *E. coli* στις ΗΠΑ (Davis *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2014a; Li *et al.*, 2017) και αργότερα εντοπίστηκε σε *A. baumannii* από το Μεξικό, σε *E. hormaechei* από την Ταϊλάνδη και *K. pneumoniae* από την Κολομβία. Έχει επίσης βρεθεί σε συνδυασμό με *rmtB* σε πολλαπλά στελέχη *P. aeruginosa* από τη Μιανμάρ (Tada *et al.*, 2019). Η παραλλαγή *rmtE2* έχει αναφερθεί μόνο σε δύο στελέχη *E. coli* στην Κίνα (Xia *et al.*, 2015).

rmtF: Το *rmtF* έχει εντοπιστεί κυρίως σε *K. pneumoniae* από χώρες όπως η Αυστραλία (Sidjabat *et al.*, 2015), η Αίγυπτος (Gamal *et al.*, 2016), η Ινδία (Sidjabat *et al.*, 2015; Hidalgo *et al.*, 2013; Filgona *et al.*, 2015), το Ιράκ (Al-Kadmy *et al.*, 2015), το νησί Ρεϋνιόν (Galimand *et al.*, 2012), το Νεπάλ (Tada *et al.*, 2013a), η Σιγκαπούρη (Khong *et al.*, 2016), η Νότια Κορέα (Yoon *et al.*, 2018), η Ελβετία (Mancini *et al.*, 2018b), το Ηνωμένο Βασίλειο (Hidalgo *et al.*, 2013) και οι ΗΠΑ (Lee *et al.*, 2014b). Το *rmtF* έχει επίσης εντοπιστεί σε άλλα Εντεροβακτηριακά, συμπεριλαμβανομένων των *E. cloacae* από την Αυστραλία (Sidjabat *et al.*, 2015), *C. freundii* (Hidalgo *et al.*, 2013; Filgona *et al.*, 2015), *Citrobacter koseri* (Filgona *et al.*, 2015), *E. cloacae* (Hidalgo *et al.*, 2013), *E. coli* (Hidalgo *et al.*, 2013; Rahman *et al.*, 2014) και *P. mirabilis* (Filgona *et al.*, 2015) από την Ινδία καθώς και *E. cloacae* από τη Νότια Αφρική (Rubin *et al.*, 2014). Επιπλέον, *rmtF* βρέθηκε σε *P. aeruginosa* από την Ινδία (Mohanam & Menon, 2017; Rahman *et al.*, 2015), ενώ η παραλλαγή *rmtF2* εντοπίστηκε σε στελέχη *P. aeruginosa* από τη Γαλλία, την Ινδία, το Νεπάλ (Tada *et al.*, 2017a) και το Πακιστάν. Το *rmtF2* έχει επίσης ταυτοποιηθεί σε ένα στέλεχος *K. pneumoniae* από τη Σιγκαπούρη (Khong *et al.*, 2016).

rmtG: Όπως το *rmtD*, το *rmtG* έχει αναφερθεί κυρίως στη Νότια Αμερική, ιδιαίτερα σε *K. pneumoniae* (Bueno *et al.*, 2013; Cerdeira *et al.*, 2016; Ramos *et al.*, 2014), αλλά έχει επίσης εντοπιστεί σε στελέχη *E. hormaechei* και *P. aeruginosa* (Bueno *et al.*, 2017; Francisco *et al.*, 2015). Επιπλέον, το *rmtG* έχει βρεθεί σε στελέχη *E. coli* και *K. pneumoniae* από την Ινδία (Filgona *et al.*, 2015), καθώς και μεμονωμένα στελέχη *K. pneumoniae* από την Ελβετία (Mancini *et al.*, 2018a) και τις ΗΠΑ (Hu *et al.*, 2014).

rmtH: Το *rmtH* είναι προφανώς το σπανιότερο από τα γονίδια RMTs, καθώς έχει εντοπιστεί μόνο σε μεμονωμένα στελέχη *K. pneumoniae* από το Ιράκ (O'Hara *et al.*, 2013) και τον Λίβανο (Beyrouthy *et al.*, 2017).

npmA: Το *npmA* εντοπίστηκε για πρώτη φορά σε ένα μεμονωμένο στέλεχος *E. coli* από την Ιαπωνία το 2003 (Wachino *et al.*, 2007), αλλά αναφέρθηκε ξανά μετά το 2014, όταν βρέθηκε σε πολλαπλά *Enterobacter* spp. και στελέχη *K. pneumoniae* από τη Σαουδική Αραβία (Al Sheikh *et al.*, 2014), σε πολλαπλά στελέχη *P. aeruginosa* από το Ιράκ (Dakhl & Alwan, 2015), σε ένα μεμονωμένο στέλεχος *C. difficile* από τις ΗΠΑ (Marsh *et al.*, 2019) και σε πολλαπλά στελέχη *E. coli* από το Ιράν, όπου το *npmA* βρέθηκε μόνο του ή σε συνδυασμό με το *armA* (Yeganeh *et al.*, 2019). Το *npmA2* ανακαλύφθηκε σε κλινικά και κτηνιατρικά στελέχη *C. difficile* από την Αυστραλία, τον Καναδά, το Ηνωμένο Βασίλειο και τις ΗΠΑ (Marsh *et al.*, 2019).

3.4.2 Πηγές και τρόποι μετάδοσης

Οι επίκτητες RMTs έχουν ως επί το πλείστον ταυτοποιηθεί σε ανθρώπινα κλινικά στελέχη που απομονώθηκαν είτε από νοσοκομειακές είτε από λοιμώξεις της κοινότητας. Ωστόσο, η έγκαιρη ανίχνευση της *ArmA* σε ένα μόνο στέλεχος *E. coli* που απομονώθηκε από χοίρο φάρμας (Gonzalez-Zorn *et al.*, 2005b) έθεσε το ερώτημα εάν άλλες πηγές, όπως ζώα ή προϊόντα διατροφής, μπορούν να εμπλέκονται στην προέλευση ή την εξάπλωση των RMTs.

Οι *ArmA*, *RmtB* και *RmtE* είναι οι μόνες RMTs που έχουν εντοπιστεί σε ζώα μέχρι σήμερα. Η *ArmA* έχει αναφερθεί σε στελέχη που απομονώθηκαν από χοίρους στην Ισπανία και τη Νότια Κορέα (Gonzalez-Zorn *et al.*, 2005b; Choi *et al.*, 2011), από βοοειδή στη Νότια Κορέα (Choi *et al.*, 2011) και από κοτόπουλα στην Κίνα και στη Νότια Κορέα (Choi *et al.*, 2011; Du *et al.*, 2012). Στην Κίνα, η *RmtB* έχει συσχετιστεί ευρέως με χοίρους (Deng *et al.*, 2011b, Yao *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2007), κοτόπουλα (Du *et al.*, 2012; Du *et al.*, 2009; Du *et al.*, 2010; Yang Y *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017, Yang *et al.*, 2014; Yang L *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2017; Fu *et al.*, 2016, Liao *et al.*, 2013; Pan *et al.*, 2014) και βοοειδή (He *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2015), αλλά και με περιβάλλοντα κτηνοτροφίας και οικόσιτα ζώα (Deng *et al.*, 2011a; Deng *et al.*, 2011b; Li *et al.*,

2012; Du *et al.*, 2012). Η μόνη περιγραφή της RmtE ήταν σε στέλεχος *E. coli* που απομονώθηκε από βοοειδή (Davis *et al.*, 2010).

Η παρουσία γονιδίων RMTs σε βακτήρια από ζώα αποτελεί απειλή, όχι μόνο για την τροφική αλυσίδα, αλλά και για όσους βρίσκονται κοντά σε ζώα φάρμας. Για παράδειγμα, ένα παιδί 11 μηνών μολύνθηκε από ένα στέλεχος *Salmonella enterica* που παρήγαγε ArmA μετά από επαφή με ζώα φάρμας στην Ινδία (Folster *et al.*, 2009), ενώ σε μία φάρμα στην Κίνα πλασμίδια που φέρουν το *rmtB* βρέθηκαν να έχουν διαδοθεί μεταξύ των χοίρων και των εργατών της φάρμας (Deng *et al.*, 2011b).

Έχουν εντοπιστεί αρκετές περιπτώσεις γονιδίων RMTs σε βακτήρια που απομονώθηκαν από κρέας σε super-market (Hopkins *et al.*, 2010; Granier *et al.*, 2011; Al-Gallas *et al.*, 2013), ιδιαίτερα πουλερικά (Granier *et al.*, 2011; Al-Gallas *et al.*, 2013), υποδεικνύοντας ότι το κρέας μπορεί να είναι μια πιθανή πηγή RMT-θετικών βακτηρίων στην κοινότητα. Επιπλέον, η αναγνώριση των γονιδίων RMTs σε οικόσιτα ζώα (Xia *et al.*, 2017; Hou *et al.*, 2012; Liao *et al.*, 2013) σημαίνει ότι μπορεί να λειτουργήσουν ως δεξαμενή και στο περιβάλλον της κοινότητας. Ωστόσο, δεν είναι σαφές εάν το κρέας, τα ζώα της κτηνοτροφίας ή τα οικόσιτα ζώα απέκτησαν γονίδια RMTs ανεξάρτητα ή από ανθρώπους. Ως εκ τούτου, πρέπει να διεξάγεται συνεχής επιτήρηση σε ζώα (τόσο στα οικόσιτα ζώα όσο και στην κτηνοτροφία) για να περιοριστεί η εξάπλωση των γονιδίων RMTs στον ανθρώπινο πληθυσμό και να υποστηριχθεί η επίτευξη καλύτερων αποτελεσμάτων δημόσιας υγείας.

Εκτός από κλινικά δείγματα και ζώα, γονίδια RMTs έχουν επίσης βρεθεί στο περιβάλλον. Η μεταγονιδιωτική ανάλυση των λυμάτων τουαλέτας από αεροπλάνα που φτάνουν σε ένα διεθνές αεροδρόμιο στην Κοπεγχάγη, στη Δανία, εντόπισε την παρουσία *hpmA* (Petersen *et al.*, 2015). Επιπλέον, η ανάλυση των λυμάτων από νοσοκομεία καθώς και εισροών και λυμάτων από εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων στη Βασιλεία της Ελβετίας, εντόπισε τα γονίδια *armA* και *rmtB* σε στελέχη *E. coli* (Zurfluh *et al.*, 2017). Η παρουσία γονιδίων RMTs στα λύματα, ιδιαίτερα στο νερό που έχει υποστεί επεξεργασία, είναι ανησυχητική καθώς υποδηλώνει ότι τα λύματα αποτελούν πιθανή δεξαμενή για βακτήρια που φιλοξενούν γονίδια RMTs (καθώς και άλλα γονίδια αντοχής σε αντιβιοτικά) και ότι απαιτείται πρόσθετη επεξεργασία των λυμάτων να εξασφαλιστεί η εξάλειψη των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων και να αποτραπεί η απελευθέρωση ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων σε υδάτινα περιβάλλοντα. Το *rmtD* εντοπίστηκε σε ένα στέλεχος *P. aeruginosa* που συλλέχθηκε από τον ποταμό Tietê στη Βραζιλία (Fontes *et al.*, 2011) υποδεικνύοντας ότι τα υδάτινα περιβάλλοντα χρησιμεύουν ήδη ως δεξαμενές για γονίδια RMTs και άλλα γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά και έχουν τη δυνατότητα να διαδίδουν αυτά τα γονίδια σε όλο το περιβάλλον της κοινότητας.

3.5 Γενετικό περιβάλλον των επίκτητων RMTs

3.5.1 Θέση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις RMTs

Ανησυχία προκαλεί το γεγονός ότι τα δομικά γονίδια των επίκτητων RMTs βρίσκονται κυρίως σε μεταφερόμενα πλασμίδια και όχι στο χρωμόσωμα, συνθήκη που ευνοεί τη δυνατότητα κάθετης αλλά και οριζόντιας μεταφοράς, επιταχύνοντας έτσι την εξάπλωσή τους. Το ευρέως διαδεδομένο γονίδιο *armA* βρίσκεται πάντα χρωμοσωμικά στα στελέχη *A. baumannii* (Blackwell *et al.*, 2015; Blackwell *et al.*, 2017), ενώ στα Εντεροβακτηριακά στελέχη πλασμιδιακά (Kang *et al.*, 2008). Το γονίδιο *rmtB*, αν και έχει βρεθεί σε πολύ μεγάλο αριθμό στελεχών, δεν έχει εντοπιστεί μέχρι σήμερα στο χρωμόσωμα (Kang *et al.*, 2008). Το γονίδιο *rmtC* βρέθηκε αρχικά σε πλασμίδιο στελεχούς *P. mirabilis*, και αργότερα στο χρωμόσωμα ενός κλώνου *S. enterica* που εξαπλώθηκε στο Ηνωμένο Βασίλειο (Doi *et al.*, 2016). Είναι ενδιαφέρον ότι το γονίδιο *rmtD*, το οποίο είναι ιδιαίτερα διαδεδομένο στη Νότια Αμερική, φαίνεται να βρίσκεται πάντα στο χρωμόσωμα κλωνικά συγγενών στελεχών *P. aeruginosa*, ενώ το γονίδιο *rmtD2* παρατηρήθηκε να εξαπλώνεται στην Αργεντινή μεταξύ μη κλωνικών στελεχών και μπορούσε να μεταφερθεί με σύζευξη (Doi *et al.*, 2008a; Bueno *et al.*, 2016). Οι λίγες δημοσιεύσεις με αναφορά στα γονίδια *rmtA* και *hpmA* δείχνουν ότι αυτά τα γονίδια βρίσκονται σε συζευκτικά πλασμίδια (Yokoyama *et al.*, 2003; Yamane *et al.*, 2007; Wachino *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2009), ενώ τα γονίδια *rmtE*, *rmtF* και *rmtG* έχουν βρεθεί σε μη-συζευκτικά πλασμίδια (Davis *et al.*, 2010; Galimand *et al.*, 2012; Bueno *et al.*, 2013). Οι λίγες δημοσιεύσεις που περιγράφουν το γονίδιο *rmtH* δηλώνουν ότι έχει εντοπιστεί και στο χρωμόσωμα, αλλά και σε πλασμίδιο (O'Hara *et al.*, 2013; Beyrouthy *et al.*, 2017).

3.5.1.1 Πλασμίδια που φέρουν γονίδια επίκτητων RMTs

Η ταξινόμηση των πλασμιδίων σε ομάδες με βάση τη φυλογενετική τους συγγένεια είναι χρήσιμη για την ανάλυση της κατανομής τους αλλά και για την αξιολόγηση της σχέσης τους με τα κύτταρα-ξενιστές (Carattoli, 2009). Το 1971, οι Datta και Hedges πρότειναν ένα σύστημα κατηγοριοποίησης των πλασμιδίων με βάση τη σταθερότητα του πλασμιδίου κατά τη σύζευξη (Datta & Hedges, 1971). Καθόρισαν τον όρο «γενετική ασυμβατότητα» ως την αδυναμία συνύπαρξης δύο διαφορετικών πλασμιδίων στο ίδιο βακτηριακό κύτταρο. Τα μη συμβατά πλασμίδια ακολουθούν συνήθως το ίδιο σύστημα αντιγραφής και επομένως ανταγωνίζονται κατά την αντιγραφή τους, οπότε το ένα από τα δύο χάνεται καθώς δεν μπορεί να αντιγραφεί. Η ιδιότητα αυτή χρησιμοποιείται για την ταξινόμηση των πλασμιδίων σε «ομάδες ασυμβατότητας». Οι κύριες ομάδες ασυμβατότητας στα Εντεροβακτηριακά είναι οι HI1, HI2, I1, X, L/M, N, FIA, FIB, FIC, W, Y, P, A/C, T, K και B/O (Carattoli, 2009). Μεταξύ αυτών, αυτά

που σχετίζονται κυρίως με γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά είναι τα F, A/C, L/M, I1, HI2 και N.

Το γονίδιο *armA* ανιχνεύθηκε σε πλασμίδια IncA/C και IncHI2 σε Εντεροβακτηριακά στελέχη Ασιατικής προέλευσης που απομονώθηκαν πριν από το 2001, και αργότερα εντοπίστηκε κυρίως σε IncF, IncL/M και μη τυποποιημένα πλασμίδια (Kang *et al.*, 2008; Galimand *et al.*, 2003/2005; Bogaerts *et al.*, 2007; Naas *et al.*, 2011; Ho *et al.*, 2011; Du *et al.*, 2010/2012) (Πίνακας 11). Προτάθηκε ότι αυτή η πλασμιδιακή μετάβαση ήταν υπεύθυνη για την εμφάνιση πολυανθεκτικών *K. pneumoniae* σε αυτές τις χώρες (Carattoli, 2009). Εκείνη την εποχή, τα πλασμίδια IncL/M συσχετίστηκαν με τη διάδοση του γονιδίου *armA* σε κλινικά στελέχη Ευρωπαϊκών χωρών, ενώ συγκεκριμένα το πλασμίδιο pCTX-M-3 θεωρήθηκε υπεύθυνο για την εξάπλωση αυτής της επίκτητης RMT στην Πολωνία (Zacharczuk *et al.*, 2011). Ωστόσο, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι το *armA* εντοπίστηκε και σε ένα IncN πλασμίδιο ζωικής προέλευσης στην Ισπανία (Gonzalez-Zorn *et al.*, 2005a), ενώ πιο πρόσφατα, έχουν περιγραφεί και IncA/C τύπου πλασμίδια που κωδικοποιούν την καρβαπενεμάση NDM-1 και φέρουν το *armA* (Πίνακας 11).

Το γονίδιο *rmtB*, αν και βρίσκεται σε πολύ μεγάλο αριθμό στελεχών, δεν έχει βρεθεί μέχρι σήμερα σε χρωμόσωμα. Αρχικά, είχε εντοπιστεί σε πλασμίδια τύπου IncI1 και IncA/C και αργότερα σε πλασμίδια τύπου IncF (Kang *et al.*, 2008; Bogaerts *et al.*, 2007; Carattoli *et al.*, 2012). Το *rmtB* έχει εξαπλωθεί κυρίως στην Κίνα, μέσω πλασμιδίων τύπου IncF ή της παραλλαγής IncFII (Périchon *et al.*, 2008; Villa *et al.*, 2010; Deng *et al.*, 2011b; Hou *et al.*, 2012). (Πίνακας 11).

Όσον αφορά τα υπόλοιπα επίκτητα γονίδια που κωδικοποιούν RMTs, το IncA/C φαίνεται να είναι η κύρια ομάδα ασυμβατότητας που βρέθηκε να φέρει αυτά τα γονίδια (Πίνακας 11).

Τα πλασμίδια ταξινομούνται επίσης ανάλογα με την ικανότητά τους να εξαπλώνονται σε διαφορετικά βακτηριακά είδη, δηλαδή ως έχοντα είτε μεγάλο εύρος είτε στενό εύρος ξενιστών (Jain *et al.*, 2013). Τα πλασμίδια που ανήκουν σε ομάδες Inc, όπως τα IncP και IncQ, έχουν ταξινομηθεί ως έχοντα μεγάλο εύρος ξενιστών, ενώ τα πλασμίδια τύπου IncF και IncX (τα οποία εμφανίζονται στα Εντεροβακτηριακά στελέχη) έχουν ταξινομηθεί ως έχοντα στενό εύρος ξενιστών (Carattoli, 2009; Jain *et al.*, 2013). Τα γονίδια RMTs έχουν επομένως ταυτοποιηθεί σε πλασμίδια με μεγάλο εύρος ξενιστών, όπως τα πλασμίδια IncA/C, IncL/M και IncN, καθώς και πλασμίδια με στενό εύρος ξενιστών, όπως τα πλασμίδια IncF.

Πίνακας 11. Κύριες ομάδες ασυμβατότητας πλασμιδίων που φέρουν γονίδια RMTs.

Γονίδιο RMT	Ομάδα ασυμβατότητας πλασμιδίων	Πρώτη αναφορά
<i>armA</i>	IncL/M (pIP1204, pNDM-HK) IncN (pMUR050) IncA/C (pNDM-1, pMR0211) IncF (pKP048) IncFII	Galimand <i>et al.</i> , 2005; Ho <i>et al.</i> , 2011 Gonzalez-Zorn <i>et al.</i> , 2005a Sekizuka <i>et al.</i> , 2011; McGann <i>et al.</i> , 2012 Jiang <i>et al.</i> , 2010 Naas <i>et al.</i> , 2011; Du <i>et al.</i> , 2012
<i>rmtA</i>	IncA/C	Poirel <i>et al.</i> , 2011c
<i>rmtB</i>	IncI1 IncA/C (pNDM-KN) IncFI (pIP1206) IncFII	Kang <i>et al.</i> , 2008 Carattoli <i>et al.</i> , 2012 Périchon <i>et al.</i> , 2008; Park <i>et al.</i> , 2009 Hou <i>et al.</i> , 2012; Deng <i>et al.</i> , 2011b
<i>rmtC</i>	IncA/C (pNDM-KN)	Carattoli <i>et al.</i> , 2012
<i>rmtD</i>	IncL/M, IncA/C	Bueno <i>et al.</i> , 2016; Bueno <i>et al.</i> , 2013
<i>rmtE</i>	IncA/C IncI1	Lee <i>et al.</i> , 2015; Li <i>et al.</i> , 2017 Xia <i>et al.</i> , 2015
<i>rmtF</i>	IncN, IncR, Non-typable	Hidalgo <i>et al.</i> , 2013
<i>rmtG</i>	IncN, IncA/C, IncB/O	Bueno <i>et al.</i> , 2013, Mancini <i>et al.</i> , 2018a
<i>rmtH</i>	IncFIIk	Beyrouthy <i>et al.</i> , 2017
<i>npmA</i>	Not determined	-

3.5.2 Δομές στο γενετικό περιβάλλον επίκτητων RMTs που παρακινούν τη μεταφορά τους (Wachino & Arakawa, 2012)

Τα μεταθετά στοιχεία είναι γενετικές δομές DNA, οι οποίες μπορούν να μετακινηθούν από μία θέση σε άλλη ή από ένα μόριο DNA σε ένα άλλο μέσω μιας διαδικασίας γνωστής ως μετάθεσης (Mazei, 2006; Bennett, 2004). Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, μια τρανσποζάση (μεταθετάση) που κωδικοποιείται από το ίδιο το μεταθετό στοιχείο διασπά τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μέσα στο DNA, απελευθερώνοντας έτσι το μεταθετό στοιχείο ώστε να μπορεί να εισαχθεί σε άλλο σημείο του DNA ή σε άλλο DNA (Bennett, 2004; Bennett, 2008; Mahillon & Chandler, 1998). Υπάρχουν διάφοροι τύποι μεταθετών στοιχείων, όπως τα στοιχεία IS (Insertion Sequence: αλληλουχία ένθεσης), τα τρανσποζόνια, τα ιντεγκρόνια και τα στοιχεία ISCR. Όλα έχουν βρεθεί ότι σχετίζονται με γονίδια RMTs, επιτρέποντας τη διάδοσή τους μεταξύ πλασμιδίων και χρωμοσωμάτων καθώς και μεταξύ βακτηρίων.

Τα στοιχεία IS είναι τα μικρότερα και απλούστερα μεταθετά στοιχεία. Κυμαίνονται από 0,5-2 Kb σε μέγεθος και είναι ευρέως διαδεδομένα, τόσο σε βακτηριακά χρωμοσώματα όσο και σε πλασμίδια. Τα στοιχεία IS περιέχουν μόνο πληροφορίες που εμπλέκονται στη μετακίνησή τους, συγκεκριμένα ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μια τρανσποζάση καθώς και ανάστροφες επαναλήψεις

στα άκρά του (~15-40 bp), οι οποίες δρουν ως θέσεις δέσμευσης για την τρανσποζάση αυτή (Bennett, 2004; Mahillon & Chandler, 1998; Thomas & Nielsen, 2005; Wagner, 2006).

Τα τρανσποζόνια (ή μεταθετόνια) διαφέρουν από τα στοιχεία IS καθώς κωδικοποιούν μεν γονίδια υπεύθυνα για τη μετάθεση, αλλά και για άλλες λειτουργίες, όπως π.χ. η αντοχή στα αντιβιοτικά (Bennett, 2004; Siguier *et al.*, 2014). Υπάρχουν δύο τύποι τρανσποζονίων: τα απλά τρανσποζόνια και τα σύνθετα τρανσποζόνια. Τα σύνθετα τρανσποζόνια έχουν μια αρθρωτή δομή, όπου πανομοιότυπα στοιχεία IS πλαισιώνουν μια περιοχή που περιέχει γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά, αλλά στερούνται γονιδίων που εμπλέκονται στη μετάθεση (Bennett, 2004; Bennett, 2008; Tolemann & Walsh, 2011). Τα γονίδια που εμπλέκονται στη μετάθεση παρέχονται από τα στοιχεία IS, τα οποία λειτουργούν επίσης ως θέσεις αναγνώρισης για την τρανσποζάση (Bennett, 2004). Τα απλά τρανσποζόνια περιέχουν επίσης λειτουργικά γονίδια, όπως π.χ. γονίδια αντοχής σε αντιβιοτικά, αλλά και γονίδια που εμπλέκονται στη μετακίνησή τους (γονίδιο τρανσποζάσης και ρεσολβάσης), αλλά πλαισιώνονται από μικρού μήκους ανάστροφες επαναλήψεις (~15-40 bp) (Bennett, 2004; Bennett, 2008) και όχι από στοιχεία IS.

Τα ιντεγκρόνια (ή ενσωματόνια) είναι μεταθετά γενετικά στοιχεία ικανά να αναγνωρίζουν και να ενσωματώνουν μικρές αλληλουχίες DNA (~1 Kb), γνωστές ως γονιδιακές κασέτες, χρησιμοποιώντας μια ιντεγκράση, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *int*. Οι γονιδιακές κασέτες εισάγονται στη θέση εισαγωγής attI από την ιντεγκράση για να σχηματίσουν μια συνεχή συστοιχία γονιδίων, όπου η πιο πρόσφατη κασέτα γονιδίων είναι και η πιο κοντινή στο γονίδιο *int* (Bennett, 2004; Toleman & Walsh, 2011; Toleman *et al.*, 2006). Έχουν περιγραφεί τουλάχιστον πέντε τάξεις ιντεγκρονίων, που χαρακτηρίζονται κυρίως από την αλληλουχία της αντίστοιχης ιντεγκράσης. Τα ιντεγκρόνια που ανιχνεύονται πιο συχνά στα κλινικά στελέχη των Gram-αρνητικών βακτηρίων, και ιδιαίτερα των Εντεροβακτηριακών, είναι ιντεγκρόνια τάξης 1. Τα ιντεγκρόνια τάξης 1 είναι ιντεγκρόνια με συγκεκριμένη δομή και συνδέονται συνήθως με γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά. Αποτελούνται από δύο συντηρημένα τμήματα (Conserved Segment), γνωστά ως 3'-CS και 5'-CS, τα οποία πλαισιώνουν τη μεταβλητή περιοχή που περιέχει τις γονιδιακές κασέτες (Bennett, 2004; Partridge *et al.*, 2009; Domingues *et al.*, 2012). Το 5'-CS αποτελείται από το γονίδιο *int* καθώς και από τη θέση εισαγωγής attI και παρέχει έναν κοινό υποκινητή για την έκφραση των ενσωματωμένων γονιδιακών κασετών (Bennett, 2004; Domingues *et al.*, 2012). Το 3'-CS αποτελείται από το περικομμένο γονίδιο *gacED1*, το οποίο προσδίδει αντοχή στις ενώσεις τεταρτοταγούς αμμωνίου, και το *sul1*, το οποίο προσδίδει αντοχή στις σουλφοναμίδες, μαζί με δύο άλλα γονίδια γνωστά ως *orf5* και *orf6* (Bennett, 2004; Domingues *et al.*, 2012). Τα σύνθετα ιντεγκρόνια τάξης 1 περιλαμβάνουν ένα στοιχείο ISCR στο 3'-CS, όπως το ISCR1, το οποίο σχετίζεται με μια άλλη μεταβλητή περιοχή που κωδικοποιεί γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά που είναι

ξεχωριστά από την περιοχή που περιέχει τις γονιδιακές κασέτες (Bennett, 2004).

Σε αντίθεση με άλλα μεταθετά στοιχεία, τα στοιχεία ISCR μεταθέτονται με μια διαδικασία αντιγραφής. Έχουν διακριτές τερματικές επαναλήψεις, γνωστές ως *oriS* και *terIS*, όπου η αντιγραφή ξεκινά στο *oriS* και τερματίζεται στο *terIS* (Bennett, 2004; Toleman & Walsh, 2011; Domingues *et al.*, 2012). Κατά τη διάρκεια της αντιγραφής, ένας μόνο κλώνος του στοιχείου ISCR ανοίγει στο 5'-άκρο κοντά στο *oriS* και συνδέεται με την τρανσποζάση (Tavakoli *et al.*, 2000). Ένα νέο αντίγραφο του στοιχείου ISCR δημιουργείται χρησιμοποιώντας τον άθικτο κλώνο DNA ως πρότυπο από ένα σύμπλεγμα αντιγραφής, το οποίο εκτοπίζεται μόλις η αντιγραφή τερματιστεί στο *terIS*. Με την τρανσποζάση να είναι ακόμα δεσμευμένη στο άκρο 5', η μονή αλυσίδα μπορεί να εισαχθεί σε μια νέα θέση DNA-στόχο, οδηγώντας έτσι στην εισαγωγή του στοιχείου ISCR (Tavakoli *et al.*, 2000). Ωστόσο, περίπου σε 1-10% των περιπτώσεων, το *terIS* δεν αναγνωρίζεται, επομένως η αναπαραγωγή συνεχίζεται κατάντη (downstream) του *terIS* μέχρι να τερματιστεί σε άλλο *terIS* (Bennett, 2004; Toleman & Walsh, 2011; Toleman *et al.*, 2006). Αυτό σημαίνει ότι γονίδια, όπως π.χ. γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά, που γειτνιάζουν με το *terIS* μπορούν να κινητοποιηθούν ως μέρος του στοιχείου ISCR λόγω της εσφαλμένης ανάγνωσης του *terIS* και πιστεύεται ότι είναι ο λόγος πίσω από τη δημιουργία σύνθετων ιντεγκρονίων τάξης 1 (Bennett, 2004; Toleman *et al.*, 2006).

Οι γενετικές περιοχές που περιβάλλουν τα γονίδια των RMTs έχουν αναλυθεί σε ορισμένες περιπτώσεις. Η μελέτη αυτών των περιοχών είναι ζωτικής σημασίας γιατί θα συμβάλει στην κατανόηση του τρόπου με τον οποίο τα γενετικά στοιχεία που εμπλέκονται στην κινητοποίηση αυτών των γονιδίων επιταχύνουν την εξάπλωσή τους. Επιπλέον, θα βοηθήσει στην πρόβλεψη της εξέλιξης αυτού του μηχανισμού αντοχής. Παρακάτω, περιγράφονται οι γενετικές περιοχές που έχουν αναλυθεί μέχρι τώρα και τα μεταθετά στοιχεία που σχετίζονται με κάθε γονίδιο RMT (Πίνακας 12).

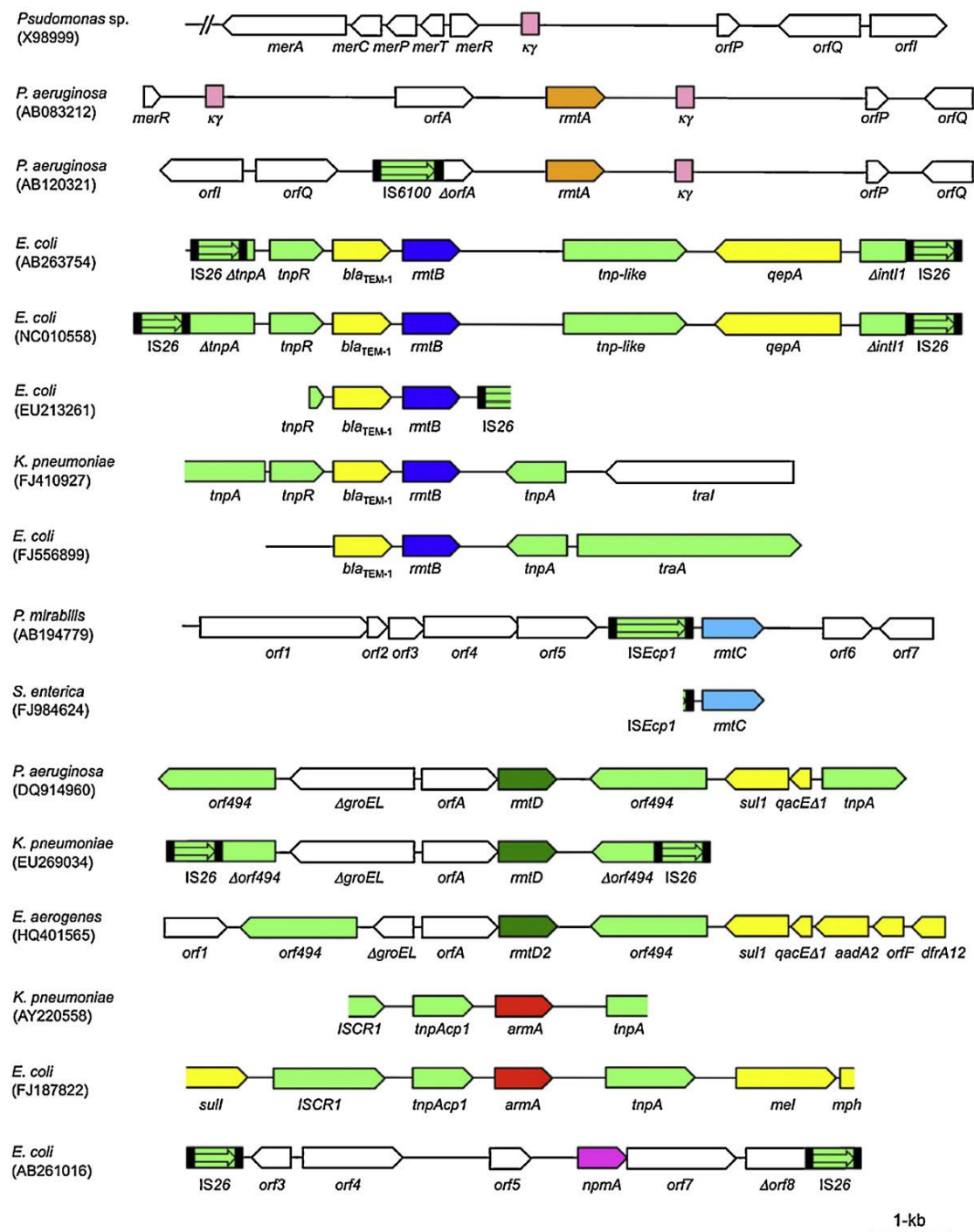
armA: Παρά το γεγονός ότι η *ArmA* είναι η πιο ευρέως διαδεδομένη RMT, οι γενετικές περιοχές που περιβάλλουν το γονίδιο *armA* έχουν αναλυθεί μόνο σε ορισμένα στελέχη, ενώ όσες έχουν κατατεθεί στη GenBank είναι σχεδόν πανομοιότυπες (Bercot *et al.*, 2008; Doi & Arakawa, 2007a; Galimand *et al.*, 2005). Συνήθως το *armA* βρίσκεται εντός του σύνθετου τρανσποζόνιου Tn1548, το οποίο περιλαμβάνει μεταξύ άλλων, ένα ιντεγκρόνιο τάξης I με ένα στοιχείο ISCR1, ένα γονίδιο εκροής μακρολίδων (*mel*) και ένα γονίδιο φωσφοτρανσφοράσης μακρολίδων (*mph*) (Bogaerts *et al.*, 2007; Du *et al.*, 2012; Folster *et al.*, 2009) (Εικόνα 19). Ο Galimand και οι συνεργάτες του αναφέρουν ότι το *armA* πλαισιώνεται εκατέρωθεν από λειτουργικά γονίδια που κωδικοποιούν τρανσποζάσες σε στοιχεία IS6 και θα μπορούσε εύκολα να μετατεθεί σε άλλη θέση-στόχο του DNA (Galimand *et al.*, 2005). Μετά την πρώτη ταυτοποίηση της *ArmA*, το γονίδιό της αποδείχθηκε ότι διαδόθηκε

μεταξύ διαφορετικών ειδών μικροβίων στην Ευρώπη στην ίδια δομή Tn1548 μέσω του πλασμιδίου pCTX-M-3 (Galimand *et al.*, 2005; Golebiewski *et al.*, 2007). Ωστόσο, η πλήρης αλληλουχία του πλασμιδίου pMUR050, που απομονώθηκε από ζώο στην Ισπανία (Gonzalez-Zorn *et al.*, 2005a), αποκάλυψε ότι το *armA* βρισκόταν σε ένα Tn1548, το οποίο δεν είχε γονιδιακή κασέτα αντοχής στην τριμεθοπρίμη *dhfrXII* και διαφοροποιείτο έτσι από το Tn1548 του πλασμιδίου pCTX-M-3. Έκτοτε έχουν δημοσιευθεί μερικές ακόμη περιοχές που περιέχουν *armA* (Du *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2011) και όλες σχετίζονται με το Tn1548. Όσον αφορά στη χρωμοσωμική θέση του *armA* στα στελέχη *A. baumannii*, η δομή του τρανσποζονίου Tn6180 μοιάζει αρκετά αυτή του Tn1548 (Blackwell *et al.*, 2017).

rmtA: Οι γενετικές περιοχές που περιβάλλουν το *rmtA* έχουν αναλυθεί σε διαφορετικά στελέχη *P. aeruginosa* (Yamane *et al.*, 2004), και παρότι δεν είναι πανομοιότυπες μεταξύ τους, το *rmtA* φαίνεται να είναι ενσωματωμένο σε μια περιοχή που μοιάζει με το σύνθετο τρανσποζόνιο Tn5041, που είναι γνωστό ότι φέρει τα υπεύθυνα γονίδια για την αντοχή στον υδράργυρο σε *Pseudomonas* spp. Επιπλέον, το *rmtA* πλαισιώνεται από δύο αντίγραφα του μεταθετού στοιχείου *kg* που ανήκει στην οικογένεια των τρανσποζονίων Tn3 (Εικόνα 19). Επομένως, υποτέθηκε ότι μετά την πρώτη ένθεση του *rmtA* σε ένα Tn5041, το τρανσποζόνιο ήταν υπεύθυνο για την εξάπλωσή του μεταξύ των διαφορετικών στελεχών *Pseudomonas* spp. (Yamane *et al.*, 2004).

rmtB: Το γονίδιο αυτό έχει γενικά βρεθεί σε τμήματα DNA που πλαισιώνονται από δύο αλληλουχίες ένθεσης IS26, που σχετίζονται με τρανσποζόνια Tn3, αλλά και στοιχεία ISCR3. Συχνά, του *rmtB* προηγείται ένα γονίδιο *bla*_{TEM-1}, ενώ ακολουθεί ένα γονίδιο *qepA* (εκροή φθοριοκινολονών), σε μία δομή που μοιάζει με το Tn3 (Doi *et al.*, 2004; Perichon *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2012; Yamane *et al.*, 2007; Deng *et al.*, 2011b; Chen *et al.*, 2014) (Εικόνα 19). Ωστόσο, το Tn3 που σχετίζεται με το *rmtB* είχε προηγουμένως εσφαλμένα ταξινομηθεί και τώρα έχει επαναταξινομηθεί σε Tn2 (Martins & Gales, 2017).

Εικόνα 19. Γενετικό πλαίσιο γονιδίων RMTs. (Wachino & Arakawa, 2012)



Τα γονίδια που φαίνεται να συμμετέχουν στον ανασυνδυασμό του DNA απεικονίζονται με ανοιχτό πράσινο. Τα γονίδια αντιμικροβιακής αντοχής, εκτός των RMTs, απεικονίζονται με κίτρινο.

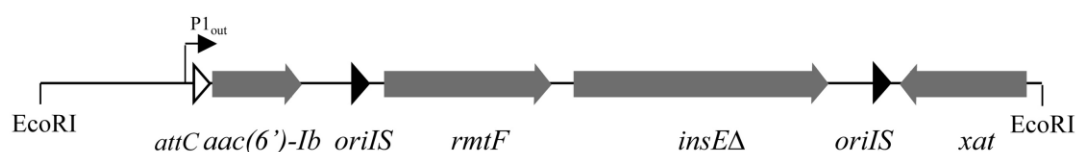
rmtC: Στο 5' άκρο του *rmtC* που βρέθηκε σε στέλεχος *P. mirabilis* εντοπίστηκε η παρουσία ενός στοιχείου *ISEcp1*, που φάνηκε να περιέχει ένα γονίδιο τρανσποζάσης υπεύθυνο για τη μετάθεση και την προαγωγή της έκφρασης του *rmtC* (Wachino *et al.*, 2006a) (Εικόνα 19). Όταν αυτή η RMT ανιχνεύθηκε σε στελέχη *S. enterica* που απομονώθηκαν στο Ηνωμένο Βασίλειο, βρέθηκε η παρουσία ενός τμήματος μόνο του στοιχείου *ISEcp1* ακριβώς πριν το *rmtC* (Εικόνα 19). Ωστόσο, παραμένει ασαφές αν το στοιχείο υπέστη μερική διαγραφή ή αν πρόκειται για διαφορετικό στοιχείο που μοιάζει με το *ISEcp1* (Zong *et al.*, 2008; Hopkins *et al.*, 2010). Ταυτόχρονα, όταν το *rmtC* βρέθηκε σε στελέχη *Salmonella* που απομονώθηκαν στις ΗΠΑ, εντοπίστηκε το 3' άκρο του *ISEcp1* μαζί με μια ανεστραμμένη επαναλαμβανόμενη περιοχή προ του *rmtC*, αλλά ολόκληρη η ακολουθία του παραμένει άγνωστη (Folster *et al.*, 2009). Το *ISEcp1* έχει συχνά συσχετισθεί με την ύπαρξη γονιδίων που κωδικοποιούν β-λακταμάσες, όπως τα *bla_{CTX-M}* και *bla_{CMY}* που είναι ικανά να υδρολύσουν ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες και/ή αρκετές κεφαμυκίνες, αντίστοιχα.

rmtD/D2: Το γενετικό περιβάλλον του *rmtD* διερευνήθηκε σε στελέχη *P. aeruginosa* και *K. pneumoniae* (Doi *et al.*, 2008a). Και στις δύο περιπτώσεις το γονίδιο *rmtD* πλαισιώνεται από δύο αντίγραφα του στοιχείου *ISCR14* (που αρχικά είχαν ονομαστεί *orf494* και κωδικοποιούν γονίδιο τρανσποζάσης), ενώ ένα ιντεγκρόνιο τάξης I ακολουθεί το *rmtD* (Εικόνα 19). Σε στελέχη *K. pneumoniae*, και τα δύο αντίγραφα του *ISCR14* περικλύονται από ένα στοιχείο *IS26*, εγείροντας την υπόθεση ότι το *rmtD* πιθανόν να κινητοποιήθηκε από στέλεχος *P. aeruginosa* με τη μεσολάβηση του *IS26*. Το γενετικό περιβάλλον του *rmtD2* που βρέθηκε σε στέλεχος *P. aeruginosa* από την Αργεντινή ήταν παρόμοιο με αυτό του *rmtD* σε στέλεχος *P. aeruginosa* από τη Βραζιλία (Tijet *et al.*, 2011). Ωστόσο, το 5'-άκρο του γονιδίου *groEL*, που προηγείτο του *rmtD2*, έχει διαγραφεί σε μεγάλο βαθμό σε σύγκριση με αυτό του *rmtD*. Ο Tijet και οι συνεργάτες του περιέγραψαν την πιθανότητα η περιοχή γύρω από το *rmtD* που πλαισιώνεται από το *orf494* και αυτή του *rmtD2* να προέκυψαν χωριστά από διαφορετικούς μηχανισμούς γενετικού ανασυνδυασμού που περιλαμβάνουν το *orf494*, αντί να προέρχονται από μια κοινή προγονική δομή.

rmtE: Οι Lee *et al.* ανέλυσαν το γενετικό περιβάλλον του γονιδίου *rmtE*, που βρέθηκε στο πλασμίδιο pYDC637 στελέχους *E. coli*. Το γονίδιο *rmtE* βρίσκεται ενσωματωμένο σε ένα ιντεγκρόνιο τάξης I και πλαισιώνεται από ένα στοιχείο όμοιο με *ISCR20* και μία αλληλουχία ένθεσης όμοια με *IS1294*, δομές που πιθανότατα παρακίνησαν την ένθεσή του στο πλασμίδιο αυτό από άγνωστη μέχρι στιγμής προέλευση (Lee *et al.*, 2015). Τμήμα της αλληλουχίας αυτής του πλασμιδίου με το γονίδιο *rmtE1* ανιχνεύθηκε από τους Li *et al.* ενσωματωμένη και στο βακτηριακό χρωμόσωμα στελέχους *E. coli*, πλαισιωμένη από τα ίδια στοιχεία *ISCR20* και *IS1294* της οικογένειας *IS91* (Li *et al.*, 2017).

rmtF: Το γονίδιο *rmtF* ακολουθείται από ένα γονίδιο τρανσποζάσης *insE* και περιβάλλεται από δύο αντίγραφα του στοιχείου ISCR5 (*oriIS*). Στην περιοχή που κλωνοποιήθηκε και αναλύθηκε υπήρχαν επίσης το γονίδιο αντοχής στις αμινογλυκοσίδες *aac(6')-Ib* και το γονίδιο αντοχής στη χλωραμφαινικόλη *cat* (Galimand *et al.*, 2012) (Εικόνα 20).

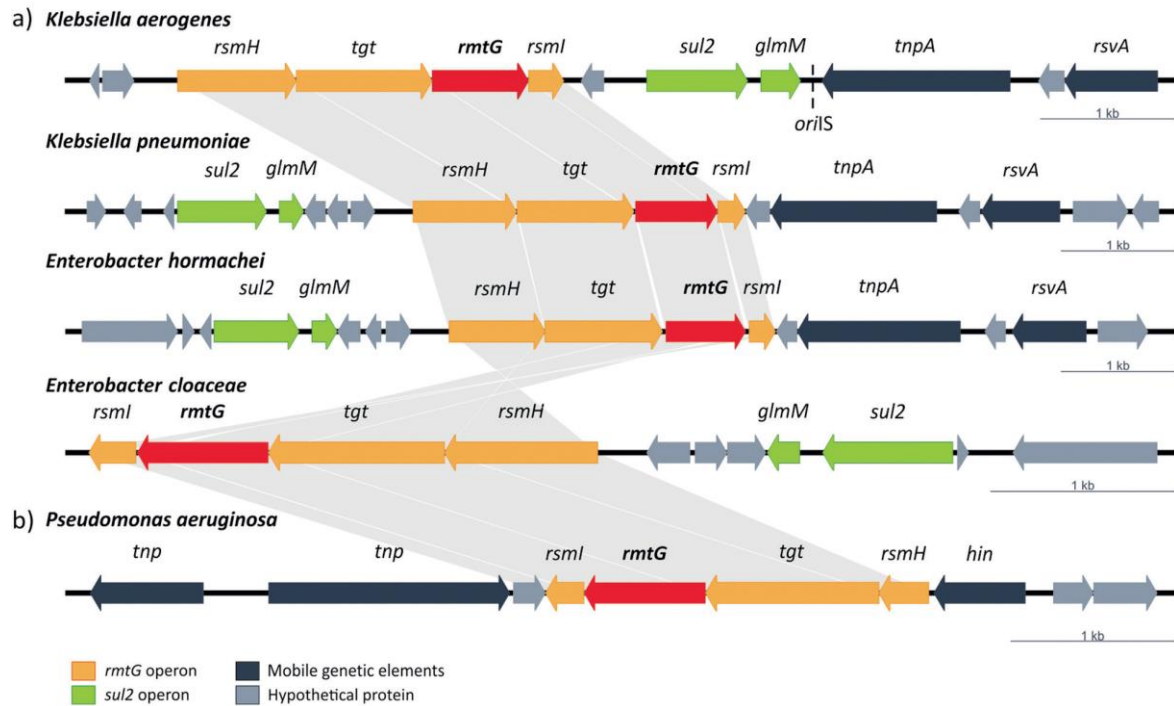
Εικόνα 20. Σχηματική αναπαράσταση του γενετικού πλαισίου του γονιδίου *rmtF*. (Galimand *et al.*, 2012)



rmtG: Σε στέλεχος *K. aerogenes* D3 το γονίδιο *rmtG* βρέθηκε σε οπερόνιο που περιέχει γονίδια που σχετίζονται με τροποποίηση rRNA και tRNA, όπως τα *rsmH*, *tgt* and *rsmL*. Το γονίδιο *sul2* βρέθηκε ανάντη (upstream) του *rmtG*, μαζί με το *glmM*. Η γενομική αυτή περιοχή βρέθηκε να περικλείεται από τρανσποζάσες, που σχετίζονται με IS91, γεγονός που υποδηλώνει ότι η IS91 μπορεί να έπαιξε ρόλο στη μετάθεση του *rmtG*. Το γενετικό περιβάλλον του *rmtG* στο στέλεχος *K. aerogenes* D3 παρουσιάζει υψηλή ομοιότητα με αυτό άλλων Εντεροβακτηριακών στελεχών και στελεχών *P. aeruginosa* (Εικόνα 21). Ωστόσο, στα Εντεροβακτηριακά στελέχη (*E. cloacae*, *E. hormaechei* και *K. pneumoniae*), η ομοιότητα αυτή επεκτείνεται και πέραν του οπερόνιου που περιέχει το *rmtG*, γεγονός που υποδηλώνει ότι το *rmtG* αποκτήθηκε ως μέρος ενός μεγαλύτερου τμήματος DNA που υπάρχει σε διάφορα Εντεροβακτηριακά. Αντίθετα, στην *P. aeruginosa*, αναγνωρίστηκε μόνο το οπερόνιο με το *rmtG*, ενώ απουσίαζε και το γονίδιο *sul2*. (Passarelli-Araujo *et al.*, 2019)

rmtH: Στην πρώτη περιγραφή του, το *rmtH* αναφέρθηκε ότι βρίσκεται στο βακτηριακό χρωμόσωμα και πλαισιώνεται από δύο αντίγραφα του ISCR2 (O'Hara *et al.*, 2013; Beyrouthy *et al.*, 2017), ενός μεταθετού στοιχείου που μοιάζει με το IS91 και έχει βρεθεί σε συνδυασμό με πολλά γονίδια που κωδικοποιούν αντοχή (Toleman *et al.*, 2006). Σύμφωνα με τους Beyrouthy *et al.*, το *rmtH* βρέθηκε και σε πλασμίδιο τύπου IncFIIk και συσχετίστηκε πάλι με μεταθετά στοιχεία ISCR2 (Εικόνα 22).

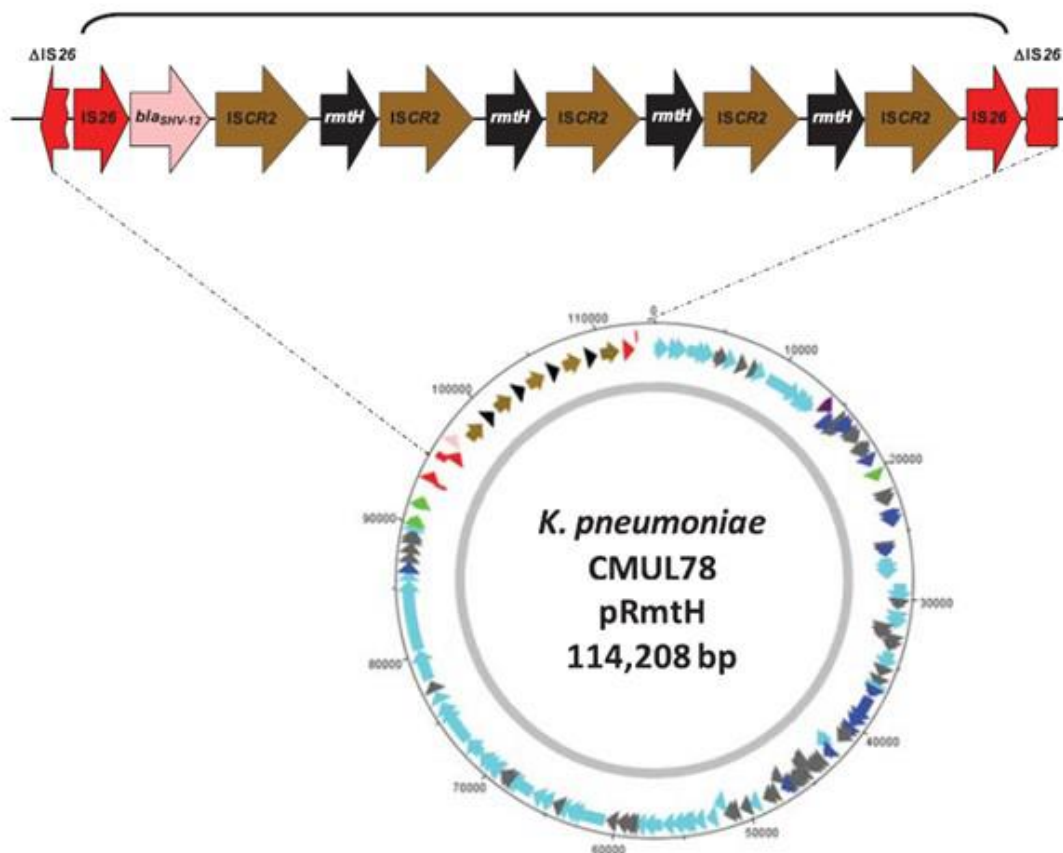
Εικόνα 21. Γενετικό πλαίσιο του γονιδίου *rmtG* σε: (a) Εντεροβακτηριακά είδη (*K. aerogenes*, *K. pneumoniae*, *E. hormachei* και *E. cloaceae*) και (b) *Pseudomonas aeruginosa* (Passarelli-Araujo *et al.*, 2019)



Οι συντηρημένες περιοχές ενώνονται από τις γκρι σκιές. Conserved regions are connected by grey shadows.

npmA: Στην πρώτη και μοναδική του ταυτοποίηση, αυτό το γονίδιο εντοπίστηκε σε μία περιοχή 9,1 Kb που περικλείεται από δύο στοιχεία IS26 (Εικόνα 19). Αυτή η περιοχή δεν μοιάζει με οποιαδήποτε άλλη αλληλουχία που έχει κατατεθεί στη βάση δεδομένων GenBank μέχρι σήμερα, αλλά οι γειτονικές αλληλουχίες αυτού του μεγάλου μεταθετού στοιχείου δείχνουν σημαντική ομοιότητα με μέρος διαφορετικών πλασμιδίων πολλαπλής αντοχής που βρίσκονται στη GenBank (Wachino *et al.*, 2007).

Εικόνα 22. Συσχέτιση του *rmtH* με στοιχεία ISCR2 του Tn6329 στο πλασμίδιο pRmtH. (Beyrouthy *et al.*, 2017)



Πίνακας 12. Γενετικές δομές που παρακινούν τη μεταφορά των γονιδίων RMTs

Επίκτητο γονίδιο RMT	Μεταθετό γενετικό στοιχείο	Αναφορά
<i>armA</i>	Tn1548, IS26, Tn6180	Du <i>et al.</i> , 2012; Blackwell <i>et al.</i> , 2017
<i>rmtA</i>	Tn5041	Yamane <i>et al.</i> , 2004
<i>rmtB</i>	Tn3, ISCR3, IS26	Li <i>et al.</i> , 2012
<i>rmtC</i>	ISEcp1	Wachino <i>et al.</i> , 2006a
<i>rmtD/D2</i>	ISCR14, IS26	Doi <i>et al.</i> , 2008a
<i>rmtE</i>	ISCR20, IS1294	Lee <i>et al.</i> , 2015; Li <i>et al.</i> , 2017
<i>rmtF</i>	ISCR5, <i>insE</i>	Galimand <i>et al.</i> , 2012
<i>rmtG</i>	IS91	Passarelli-Araujo <i>et al.</i> , 2019
<i>rmtH</i>	ISCR2	Beyrouthy <i>et al.</i> , 2017
<i>npmA</i>	IS26	Wachino <i>et al.</i> , 2007

3.6 Συσχέτιση των επίκτητων RMTs με άλλους μηχανισμούς αντοχής σε άλλα αντιβιοτικά

Η εμφάνιση των επίκτητων RMTs σε Gram-αρνητικά βακτήρια προκαλεί μεγάλη ανησυχία, καθώς οι αμινογλυκοσίδες εξακολουθούν να είναι χρήσιμα αντιβιοτικά για τη θεραπεία αρκετών λοιμώξεων που οφείλονται τόσο σε Gram-αρνητικά όσο και σε Gram-θετικά βακτήρια, ιδιαίτερα και ως εναλλακτική λύση για τις λοιμώξεις που προκαλούνται από βακτήρια ανθεκτικά σε άλλα αντιμικροβιακά (Livermore *et al.*, 2011a). Όπως περιγράφηκε προηγουμένως, τα επίκτητα γονίδια των RMTs συνήθως βρίσκονται ενσωματωμένα εντός μεγάλων συζευκτικών πλασμιδίων, τα οποία διαθέτουν την ικανότητα συσσώρευσης διαφόρων γονιδίων αντοχής στα αντιβιοτικά. Η ταχεία διάδοση πολλαπλών γονιδίων αντοχής στα αντιμικροβιακά, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων RMTs μέσω πλασμιδίων με μεγάλο εύρος ξενιστών, όπως οι ομάδες IncN και IncA/C, προκαλεί μεγάλη ανησυχία για την ανθρώπινη υγεία, καθώς προφανώς επιταχύνει την απόκτηση πολυαντοχής σε παθογόνους μικροοργανισμούς.

3.6.1 Συσχέτιση με μηχανισμούς αντοχής στις κινολόνες

Οι κινολόνες είναι βακτηριοκτόνα φάρμακα που χρησιμοποιούνται ευρέως στην κλινική ιατρική και στην κτηνιατρική. Χωρίζονται σε κινολόνες πρώτης γενιάς (όπως ναλιδιξικό οξύ) και κινολόνες δεύτερης γενιάς που ονομάζονται και φθοριοκινολόνες (όπως νορφλοξασίνη ή σιπροφλοξασίνη). Και οι δύο ομάδες δείχνουν υψηλή δραστηριότητα κατά Gram-αρνητικών και Gram-θετικών βακτηρίων (Jacoby, 2005). Εκτός από τον ευρέως γνωστό μηχανισμό αντοχής στις κινολόνες, ο οποίος βρίσκεται στο χρωμόσωμα και ευθύνεται για τη μετάλλαξη της θέσης στόχου των φαρμάκων αυτών (DNA-γυράση και τοποϊσομεράση IV), την τελευταία δεκαετία αυξάνεται η εμφάνιση ανθεκτικότητας στις κινολόνες που προκαλείται από πλασμίδια (PMQR: Plasmid-Mediated Quinolone Resistance) (Poirel *et al.*, 2012). Οι μηχανισμοί PMQR που έχουν ανακαλυφθεί μέχρι τώρα είναι οι πρωτεΐνες Qnr, οι οποίες προστατεύουν τη DNA-γυράση και την τοποϊσομεράση IV από τη δέσμευση της κινολόνης, η AAC(6′)-Ib-cr, μια παραλλαγή αμινογλυκοσιδο-τροποποιητικού ενζύμου, ικανή να ακετυλιώσει τη σιπροφλοξασίνη, και η αντλία εκροής QepA, που προκαλεί σημαντική μείωση της ευαισθησίας στις υδρόφιλες κινολόνες (σιπροφλοξασίνη, ενροφλοξασίνη).

Η PMQR έχει συσχετιστεί με επίκτητες RMTs σε στελέχη που παράγουν ArmA, RmtB ή RmtC. Παρά την υψηλή επικράτησή της, η ArmA έχει αναφερθεί σε συνδυασμό με PMQR μόνο μερικές φορές, κυρίως στην Κίνα (Jiang *et al.*, 2010; Du *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2012; McGann *et al.*, 2012). Έχει βρεθεί ότι παράγεται από κοινού με QnrS1, QnrB4, QnrA, QnrB2 και το ένζυμο AAC(6′)-Ib-cr (Lee *et al.*, 2007; Du *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2009;

Tamang *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2012; Zenati *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2010; Seiffert *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2016), τα δύο τελευταία από τα οποία ανιχνεύθηκαν σε στελέχη απομονωμένα από κοτόπουλα. Από την άλλη πλευρά, οι περισσότερες αναφορές της RmtB σχετίζονται με την αντλία εκροής QepA, η οποία ανιχνεύθηκε αρχικά κατά τη διάρκεια ενός ελέγχου για αντοχή στις αμινογλυκοσίδες μέσω RMTs (Perichon *et al.*, 2007; Deng *et al.*, 2011b; Kang *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2014). Επιπλέον, το γονίδιο *rmtB* έχει βρεθεί με την παραλλαγή *aac(6')-Ib-cr* καθώς και με αρκετά γονίδια *qnr* των παραλλαγών A, B και C. Επιπλέον, σε ορισμένες περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί η ταυτόχρονη παραγωγή περισσότερων μηχανισμών PMQR σε συνδυασμό με την RmtB (Liu *et al.*, 2008). Οι περισσότερες δημοσιεύσεις που αφορούν τη σύνδεση της RmtB με PMQR προέρχονται από βακτήρια που απομονώθηκαν από ζώα (Liu *et al.*, 2008; Deng *et al.*, 2011a; Deng *et al.*, 2011b). Η RmtC έχει βρεθεί σε συνδυασμό με PMQR μόνο σε δύο στελέχη *K. pneumoniae* που απομονώθηκαν πρόσφατα στο Μπαγκλαντές, τα οποία παράγαν και QnrB (Islam *et al.*, 2012).

3.6.2 Συσχέτιση με μηχανισμούς αντοχής στις β-λακτάμες

Δεδομένου ότι οι β-λακτάμες είναι μία από τις κύριες οικογένειες αντιβιοτικών που ταξινομούνται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας ως κρίσιμης σημασίας για την ιατρική, η απόκτηση μηχανισμών αντοχής στις β-λακτάμες από Gram-αρνητικά βακτήρια που παράγουν και RMTs είναι ένας λόγος σοβαρής ανησυχίας. Εκτός από τις β-λακταμάσες που προσδίδουν αντοχή στις πениκιλίνες και τις κεφαλοσπορίνες πρώτης και δεύτερης γενιάς, η εμφάνιση και η αύξηση των ESBLs (β-λακταμάσες ευρέος φάσματος), των επίκτητων ενζύμων AmpC και των καρβαπενεμασών τα τελευταία χρόνια προκαλούν μεγάλη ανησυχία όσον αφορά την αντοχή στα αντιβιοτικά. Στην πραγματικότητα, έχει προταθεί ότι η συνύπαρξη με μηχανισμούς αντοχής σε άλλα αντιμικροβιακά (δηλ. φθοριοκινολόνες ή αμινογλυκοσίδες) μπορεί να συνέβαλε σε αυτό το ζήτημα (Coque *et al.*, 2008).

Από την πρώτη τους ταυτοποίηση οι επίκτητες RMTs βρέθηκαν κυρίως σε παραγωγούς ESBL τύπου CTX-M (Bueno *et al.*, 2013; Gamal *et al.*, 2016; Poirel *et al.*, 2014a; Ayad *et al.*, 2016; Rahman *et al.*, 2015; Wachino *et al.*, 2006a). Μεταξύ αυτών, η συσχέτιση ArmA/RmtB με την παγκοσμίως διαδεδομένη παραλλαγή CTX-M-15 στα Εντεροβακτηριακά αναφέρεται όλο και πιο συχνά τα τελευταία χρόνια (Poirel *et al.*, 2011a; Arpin *et al.*, 2009; Bouzidi *et al.*, 2011). Έχει αναφερθεί επίσης συνύπαρξη RmtB και μιας άλλης ομάδας CTX-M, της ομάδας CTX-M-9 (συμπεριλαμβανομένων των CTX-M-9 και CTX-M-14) (Deng *et al.*, 2011a; Yan *et al.*, 2004).

Οι επίκτητες RMTs έχουν βρεθεί σποραδικά σε βακτήρια που παράγουν SPM-1, IMP, VIM και NDM μεταλλο-β-λακταμάσες (MBL) (Doi *et al.*, 2007c; Lee *et al.*, 2007; Gurung *et al.*, 2010; Livermore *et al.*, 2011a/b; Dortet *et al.*, 2012).

Η SPM-1 είναι μια MBL που έχει συσχετιστεί με την RmtD (Doi *et al.*, 2007b), καθώς η ταυτόχρονη παραγωγή τους έχει ταυτοποιηθεί κυρίως σε κλινικά στελέχη *P. aeruginosa* μέχρι στιγμής (Doi *et al.*, 2007c; Fontes *et al.*, 2011; Hopkins *et al.*, 2016). Η ταυτόχρονη παραγωγή RMT και MBL τύπου IMP ή VIM δεν είναι συνηθισμένη, μέχρι σήμερα έχει αναφερθεί μόνο στην Κορέα, στην Ελλάδα και στη Σουηδία (Galani *et al.*, 2012; Gurung *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2007, Samuelsen *et al.*, 2011). Η NDM-1 (New Delhi Metallo β-lactamase-1), που αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 2009, έχει γίνει ένα σημαντικό παγκόσμιο ζήτημα υγείας λόγω της ταχείας εξάπλωσης και του φάσματος αντοχής που προσδίδει (Kumarasamy *et al.*, 2010) και η σύνδεση με διαφορετικές RMTs (El-Sayed-Ahmed *et al.*, 2015; Dolejska *et al.*, 2013b; Solé *et al.*, 2011; Poirel *et al.*, 2011c; Tada *et al.*, 2017a/b; Poirel *et al.*, 2014b; Fiett *et al.*, 2014; Tijet *et al.*, 2015; Hidalgo *et al.*, 2013; Rahman *et al.*, 2015) συνήθως σχετίζεται με μεγάλα πολυανθεκτικά συζευκτικά πλασμίδια και φαίνεται να είναι ένα αυξανόμενο πρόβλημα παγκοσμίως (Livermore *et al.*, 2011b; Dortet *et al.*, 2012).

Συνεχώς αυξανόμενος είναι τα τελευταία χρόνια ο αριθμός αναφορών παραγωγής RMTs μεταξύ παραγωγών καρβαπενεμασών τύπου OXA και τύπου KPC. Τόσο η ArmA όσο και η RmtB έχουν ταυτοποιηθεί επανειλημμένα σε συνδυασμό με καρβαπενεμάσες τύπου KPC, σε λοιμώξεις από *K. pneumoniae* (Jiang *et al.*, 2010; Sheng *et al.*, 2012; Galani *et al.*, 2012), ενώ παγκοσμίως εμφανίζεται και η ArmA σε στελέχη *A. baumannii* που παράγουν καρβαπενεμάσες τύπου OXA, με αυξημένη συχνότητα στις ασιατικές χώρες (Doi *et al.*, 2007b; Kumarasamy *et al.*, 2010; Karah *et al.*, 2011b; Livermore *et al.*, 2011a), με μέρος αυτών των *A. baumannii* να παράγουν και MBL τύπου NDM-1 (Karthikeyan *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2011).

3.6.3 Συσχέτιση με άλλους μηχανισμούς αντοχής

Μεταξύ των παραγωγών επίκτητων RMTs, μπορούν να βρεθούν πολλαπλοί μηχανισμοί που προσδίδουν αντοχή σε διαφορετικές κατηγορίες αντιβιοτικών. Εκτός από εκείνους τους μηχανισμούς που κωδικοποιούνται από γονίδια που ανήκουν στο βακτηριακό χρωμόσωμα (π.χ. αντοχή στη ριφαμπικίνη από μετάλλαξη στο στόχο), τα περισσότερα από τα γονίδια αντοχής που συνδέονται με τις RMTs βρίσκονται σε πλασμίδια ή άλλα κινητά στοιχεία. Ως εκ τούτου, γενετικές πλατφόρμες όπως τα ιντεγκρόνια διευκολύνουν τη σύλληψη αρκετών γονιδίων αντοχής σε αλληπάλληλες γονιδιακές κασέτες. Ένα παράδειγμα θα μπορούσε να είναι το Tn1548, στο οποίο είναι ενσωματωμένο το *armA*: εκτός από τα γονίδια αντοχής στις μακρολίδες που βρίσκονται μετά το *armA*, αυτό το τρανσποζόνιο περιέχει ένα ιντεγκρόνιο τάξης I με διάφορα γονίδια αντοχής σε σουλφοναμίδες, τριμεθοπρίμη ή αμινογλυκοσίδες (Gonzalez-Zorn *et al.*, 2005a). Εκτός από τα γονίδια αντοχής στις β-λακτάμες και τις κινολόνες που περιγράφηκαν

προηγούμενως, είναι συνηθισμένο να ανιχνεύεται η παρουσία γονιδίων που προσφέρουν αντοχή στις τετρακυκλίνες (*tet*), τις μακρολίδες (*mel*, *mph2*), τη χλωραμφαινικόλη (*cat*) ή ακόμη πολλαπλά αμινογλυκοσιδο-τροποποιητικά ένζυμα σε βακτήρια που παράγουν RMTs (Jiang *et al.*, 2010; Sekizuka *et al.*, 2011; Wachino & Arakawa, 2012; Dolejska *et al.*, 2013a).

3.7 Ανάπτυξη νέων φαρμάκων κατά των μικροβίων που παράγουν RMT

3.7.1 Ανάπτυξη αμινογλυκοσιδών ανθεκτικών στις RMTs

Καθώς οι περισσότερες RMTs δεν είναι σε θέση να αναστείλουν τις 4,5-2-DOS αμινογλυκοσίδες, οι ερευνητές τροποποιούν αυτές τις αμινογλυκοσίδες προκειμένου να βελτιώσουν την επιλεκτικότητά τους για το βακτηριακό ριβόσωμα έναντι του ευκαρυωτικού ριβοσώματος και να μειώσουν έτσι την τοξικότητα χωρίς να επηρεάσουν την αντιβακτηριακή δράση τους. Παραδείγματα περιλαμβάνουν την τροποποίηση συγκεκριμένων θέσεων στο μόριο της παρομομυκίνης καθώς και της νεομυκίνης (Sati *et al.*, 2017; Matsushita *et al.*, 2019).

Ένα πολλά υποσχόμενο μόριο είναι ένα παράγωγο της απραμυκίνης που ονομάζεται TS3112, το οποίο αναπτύχθηκε από το Ινστιτούτο Μικροβιακής Χημείας και είναι ανθεκτικό σε όλες τις RMTs εκτός από την NpmA (Serio *et al.*, 2018; Takahashi & Igarashi, 2017). Αποδείχθηκε ότι έχει υψηλή αποτελεσματικότητα έναντι στελεχών *A. baumannii*, *K. pneumoniae* και *P. aeruginosa* που παράγουν RMT, γεγονός που υποδεικνύει ότι θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στο μέλλον κατά πολυανθεκτικών Gram-αρνητικών βακτηρίων που παράγουν RMT (Serio *et al.*, 2018; Takahashi & Igarashi, 2017).

Μια εναλλακτική λύση για την καταπολέμηση της αντοχής στις αμινογλυκοσίδες που προσδίδεται από τις RMTs είναι ο σχεδιασμός αναστολέων των RMTs. Οι Vinal και Conn (Vinal & Conn, 2017) ανακάλυψαν τρεις περιοχές εντός της πτυχής του πυρήνα της μεθυλοτρανσφεράσης NpmA, που ήταν σημαντικές για τη δέσμευση στη βακτηριακή ριβοσωμική μονάδα 30S και στο υπόστρωμα SAM, και θα μπορούσαν επομένως να αποτελέσουν πιθανούς στόχους για μελλοντικούς αναστολείς των N1-A1408 RMTs. Ωστόσο, ο ρόλος τους στις N7-G1405 RMTs πρέπει να διερευνηθεί για να διαπιστωθεί εάν αυτές οι περιοχές θα μπορούσαν να στοχευθούν από μελλοντικούς αναστολείς N7-G1405 RMT.

3.7.2 Ανάπτυξη άλλων αντιμικροβιακών φαρμάκων κατά βακτηρίων που φέρουν RMT

Περιορισμένος αριθμός αντιβιοτικών έχουν εγκριθεί τα τελευταία χρόνια (από το 2018 και μετά) από τον FDA και τον EMA για την καταπολέμηση Gram-αρνητικών μικροβίων, και ιδιαίτερα των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες Εντεροβακτηριακών (CRE), *A. baumannii* (CRAB) και *P. aeruginosa* (CRPA), τα οποία αποτελούν και τη μεγαλύτερη απειλή όσον αφορά τη μικροβιακή αντοχή.

Ο συνδυασμός της ρελεβακτάμης (ένας DBO β-λακταμικός αναστολέας) με την ιμιπενέμη/σιλαστατίνη (Ricarbio) πήρε έγκριση από τον FDA τον Ιούλιο του 2019 για επιπλεγμένες λοιμώξεις του ουροποιητικού και επιπλεγμένες ενδοκοιλιακές λοιμώξεις, ενώ τον Φεβρουάριο του 2020 εγκρίθηκε από τον EMA για νοσοκομειακή πνευμονία (συμπεριλαμβανομένης της πνευμονίας του αναπνευστήρα), για βακτηριαιμία που σχετίζεται με νοσοκομειακή πνευμονία ή πνευμονία του αναπνευστήρα και για λοιμώξεις από αερόβια Gram-αρνητικά παθογόνα με περιορισμένες επιλογές θεραπείας. Η ρελεβακτάμη είναι δραστική έναντι των β-λακταμασών τάξης A (ESBL και KPC) και C (AmpC), έχει δράση έναντι των Εντεροβακτηριακών που παράγουν KPC και έναντι στελεχών *P. aeruginosa* που παράγουν ESBL. Δεν έχει δράση έναντι των στελεχών που παράγουν MBL και OXA-48, στελεχών *Acinetobacter baumannii* ή *Stenotrophomonas maltophilia*.

Η εραβακυκλίνη (Xeraba) είναι μια νέα φλουοροκυκλίνη της ομάδας των τετρακυκλινών, με δομή παρόμοια της τιγκεκυκλίνης, που αναστέλλει την βακτηριακή πρωτεϊνοσύνθεση με την πρόσδεση της στην 30S ριβοσωμική υπομονάδα. Η εραβακυκλίνη διαφεύγει από τα συστήματα ενεργητικής εκροής των τετρακυκλινών και από τον μηχανισμό που προστατεύει το ριβόσωμα. Είναι δραστική έναντι των ESBL Εντεροβακτηριακών, του *A. baumannii*, αλλά και των CRE, όμως δεν είναι δραστική έναντι της *P. aeruginosa* και της *Burkholderia cenocepacia*. Πήρε έγκριση από τον FDA τον Αύγουστο του 2018 και από τον EMA τον Σεπτέμβριο του 2018 για επιπλεγμένες ενδοκοιλιακές λοιμώξεις.

Ένα επιπλέον προϊόν, η κεφιντεροκόλη, μια β-λακτάμη που είναι εγγενώς πιο σταθερή σε πολλές β-λακταμάσες και έχει δράση έναντι και των τριών παθογόνων υψηλής προτεραιότητας (CRAB, CRPA και CRE), έλαβε έγκριση από τον FDA τον Νοέμβριο του 2019 για επιπλεγμένες λοιμώξεις του ουροποιητικού και από τον EMA τον Απρίλιο του 2020 για λοιμώξεις από Gram-αρνητικούς μικροοργανισμούς με περιορισμένες θεραπευτικές επιλογές.

Επιπρόσθετα, αναπτύσσονται και άλλα νέα αντιβιοτικά κατά Gram-αρνητικών μικροβίων και βρίσκονται επί του παρόντος σε φάση III κλινικών δοκιμών και θα μπορούσαν ενδεχομένως να χρησιμοποιηθούν έναντι πολυανθεκτικών βακτηρίων που φιλοξενούν RMTs. Επί του παρόντος υπάρχουν τρεις μόνο αντιμικροβιακοί παράγοντες στην φάση 3 της κλινικής ανάπτυξης που στοχεύουν ένα τουλάχιστον από τα CRAB, CRPA και CRE. Η φαρμακευτική εταιρεία Polyphor τον Ιούλιο του 2019 διέκοψε την ανάπτυξή του Murepavadin, γνωστό και σαν POL7080, ενώ βρισκόταν σε κλινικές μελέτες φάσης 3, λόγω νεφροτοξικότητας. Η Murepavadin εκπλήρωνε και τα τέσσερα κριτήρια καινοτομίας, συμπεριλαμβανομένου του κριτηρίου της απουσίας γνωστής διασταυρούμενης αντοχής και παραμένει υπό ανάπτυξη για εισπνεόμενη θεραπεία.

Η Taniborbactam (VNRX-5133) είναι ένας αναστολέας β-λακταμασών με βάση το βορονικό οξύ, έχει δράση έναντι των β-λακταμασών των ομάδων A, C και D καθώς και αρκετών MBLs, ιδιαίτερα των NDM και VIM και πληροί τουλάχιστον ένα από τα τέσσερα κριτήρια καινοτομίας (νέα χημική ομάδα) . Συνδυάζεται με την κεφεπίμη σε κλινικές μελέτες φάσης 3, για τη θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από στελέχη CRE και CRPA που παράγουν β-λακταμάσες.

Η Durlobactam (ETX-2514) είναι ένας β-λακταμικός αναστολέας τύπου DBO, με ανασταλτική δράση έναντι και της PBP2 και επομένως έχει εγγενή δράση έναντι ορισμένων Εντεροβακτηριακών στελεχών. Σε στελέχη *A. baumannii* αποκαθιστά τη δραστηριότητα της σουλβακτάμης με αποτέλεσμα ο συνδυασμός να αναπτύσσεται επί του παρόντος για λοιμώξεις από *A. baumannii*.

Η Zidebactam είναι ένας β-λακταμικός αναστολέας τύπου DBO με σχετική αντιβακτηριακή δράση έναντι ορισμένων Εντεροβακτηριακών στελεχών λόγω αναστολής της PBP2. Σε συνδυασμό με την κεφεπίμη είναι δραστική έναντι Εντεροβακτηριακών στελεχών που παράγουν β-λακταμάσες τάξης A, συμπεριλαμβανομένων των ESBL και της KPC, αλλά παρουσιάζει αυξημένες τιμές MIC σε στελέχη που παράγουν MBL, ενώ επιδεικνύει μειωμένη ευαισθησία έναντι στελεχών *Pseudomonas* λόγω παραγωγής καρβαπενεμασών τάξης B (IMP ή VIM) ή λόγω συνδυασμού μηχανισμών (MexAB-OrfM ή εκροή MexXY, μειωμένη λειτουργία OrfD και παραγωγή AmpC υψηλού επιπέδου).

Δυστυχώς υπογραμμίζεται το γεγονός ότι αναπτύσσονται ελάχιστες αντιβιοτικές ουσίες κατά των μικροοργανισμών υψηλής προτεραιότητας όπως τα CRAB, τα CRPA και τα CRE. Τονίζεται, επομένως, η ανάγκη για περαιτέρω έρευνα και ανάπτυξη νέων αντιμικροβιακών φαρμάκων για την καταπολέμηση αυτών των βακτηρίων, καθώς και η ανάγκη για ελεγχόμενη χρήση των ήδη υπάρχοντων και των νέων αντιβιοτικών για την αποφυγή ανάπτυξης περαιτέρω μηχανισμών αντοχής, που θα τα καταστήσουν αναποτελεσματικά.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

II. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της ύπαρξης γονιδίων που κωδικοποιούν 16S rRNA μεθυλοτρανσφεράσες στα Εντεροβακτηριακά στελέχη αλλά και στα στελέχη *Acinetobacter baumannii* και *Pseudomonas aeruginosa*, που απομονώνονται από καλλιέργειες ασθενών που νοσηλεύονται σε μεγάλα νοσοκομεία των Αθηνών και ο ακριβής επιπολασμός τους τα έτη 2015-2016.

Επιπρόσθετος στόχος είναι η μελέτη του γενετικού υποστρώματός τους και της συνύπαρξής τους με γονίδια αντοχής για άλλες ομάδες αντιμικροβιακών, όπως οι β-λακτάμες (β-λακταμάσες), οι καρβαπενέμες (καρβαπενεμάσες) και οι κινολόνες (*qnr*, *aac(6')-cr*, *oqxAB*), στα ίδια συζευτικά πλασμίδια.

III. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

1. Περίληψη πειραματικής διαδικασίας

Από τα μικροβιολογικά εργαστήρια των συνεργαζόμενων νοσοκομείων συλλέχθηκαν τα στελέχη (Εντεροβακτηριακά, *P. aeruginosa* ή *A. baumannii*) που είχαν απομονωθεί από οποιαδήποτε πηγή απομόνωσης (κλινικά δείγματα και φορίες) ασθενών που νοσηλεύθηκαν το 2015 και το 2016 και που παρουσίαζαν αντοχή σε όλες τις αμινογλυκοσίδες που είχαν ελεγχθεί (αμικασίνη, γενταμικίνη ή και τομπραμυκίνη).

Σε όλα τα στελέχη έγινε προσδιορισμός των ελάχιστων ανασταλτικών συγκεντρώσεων (MIC) στις αμινογλυκοσίδες αμικασίνη, γενταμικίνη, τομπραμυκίνη και απραμυκίνη με τη μέθοδο της μικροαραίωσης σε ζωμό του CLSI (CLSI, M07-A10, 2015). Ακολούθησε μοριακός έλεγχος με PCR για ανίχνευση γονιδίων 16S rRNA μεθυλοτρανσφερασών (*armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*, *rmtF*, *rmtG*, *rmtH*, *hpmA*). Όσον αφορά την ύπαρξη καρβαπενεμασών, αυτή ελέγχθηκε με PCR μόνο στα RMT-θετικά στελέχη. Ταυτόχρονα προσδιορίστηκε η ευαισθησία των RMT-θετικών στελεχών σε όλες τις κλινικά σημαντικές ομάδες αντιμικροβιακών, ενώ ελέγχθηκε και η κλωνικότητα των στελεχών ανά είδος.

Στη συνέχεια ελέγχθηκε η πιθανή πλασμιδιακή θέση του γονιδίου *rmtB* που βρέθηκε στα Εντεροβακτηριακά στελέχη, η δυνατότητα μεταφοράς του, καθώς και η συνύπαρξη στο ίδιο πλασμίδιο άλλων γονιδίων αντοχής. Τέλος, έγινε σύγκριση των πλασμιδίων που έφεραν το *rmtB* και είχαν απομονωθεί από διαφορετικούς γονότυπους Εντεροβακτηριακών στελεχών.

Καθώς παρατηρήθηκε ότι όλα τα RMT-θετικά Εντεροβακτηριακά στελέχη παρήγαγαν καρβαπενεμάση, θελήσαμε να ελέγξουμε τον επιπολασμό των RMTs και σε μία συλλογή 397 κλινικών στελεχών *Klebsiella pneumoniae*, που ήταν ανθεκτικά στις καρβαπενέμες και απομονώθηκαν από 15 νοσοκομεία της Ελλάδας το ίδιο χρονικό διάστημα με την πρώτη συλλογή.

2. Βακτηριακά στελέχη

Για τη μελέτη αυτή ελέγχθηκαν δύο συλλογές βακτηριακών στελεχών, τα οποία απομονώθηκαν από οποιαδήποτε πηγή απομόνωσης (κλινικά δείγματα ή και φορίες) ασθενών που νοσηλεύτηκαν σε μεγάλα νοσοκομεία της Αττικής και της επαρχίας από τον Ιανουάριο του 2015 έως και τον Δεκέμβριο του 2016. Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκε αυστηρά ένα στέλεχος ανά ασθενή.

Η πρώτη συλλογή στελεχών αποτελείται από Εντεροβακτηριακά στελέχη, στελέχη *P. aeruginosa* και *A. baumannii* που παρουσίαζαν αντοχή σε όλες τις αμινογλυκοσίδες που είχαν ελεγχθεί (αμικασίνη, γενταμικίνη ή και τομπραμυκίνη) στο μικροβιολογικό εργαστήριο του εκάστοτε νοσοκομείου. Τα συνεργαζόμενα νοσοκομεία στα οποία συλλέχθηκαν κλινικά στελέχη για την έρευνα μας είναι τα Γ.Ν.Ν.Θ.Α. «Η Σωτηρία», Γ.Ν. Ελευσίνας «Θριάσιο», Γ.Ν.Α. «Κοργιαλένειο-Μπενάκειο Ε.Ε.Σ.», Γ.Ν.Α. «Αλεξάνδρα» και Π.Γ.Ν. «Αττικόν». Η συλλογή και μελέτη των στελεχών έγινε από το Ερευνητικό Εργαστήριο Λοιμώξεων και Αντιμικροβιακής Θεραπείας της Δ' Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Η δεύτερη συλλογή αποτελείται από 397 κλινικά στελέχη *Klebsiella pneumoniae*, που παρήγαγαν καρβαπενεμάση και απομονώθηκαν από 15 νοσοκομεία της Ελλάδας το 2015 και το 2016, συγκεκριμένα τα Π.Γ.Ν. Ηρακλείου (ΠαΓΝΗ), Νοσοκομείο «ΚΑΤ», «Θεαγένειο» Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης, Π.Γ.Ν. «Αττικόν», Γ.Ν.Θ. «Γ. Παπανικολάου», Γ.Ν. Ελευσίνας «Θριάσιο», Γ.Ν.Α. «Ιπποκράτειο», Γ.Ν.Α. «Γ. Γεννηματάς», Ναυτικό Νοσοκομείο Αθηνών, Γ.Ν. Κέρκυρας, Γ.Ν.Θ. «Γ. Γεννηματάς», Γ.Ν. Λαμίας, Π.Γ.Ν. Λάρισας, Γ.Ν. «Υγεία», Γ. Αντικαρκινικό-Ογκολογικό Νοσοκομείο Αθηνών «Άγιος Σάββας». Η συλλογή των στελεχών αυτών έγινε από την 6^η Παθολογική Κλινική του Νοσοκομείου «Υγεία», ενώ η μελέτη τους πραγματοποιήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Λοιμώξεων και Αντιμικροβιακής Θεραπείας της Δ' Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Τα ποσοστά απομόνωσης των ανθεκτικών στην αμικασίνη και στην γενταμικίνη στελεχών ως προς το σύνολο των στελεχών που απομονώθηκαν στο εκάστοτε νοσοκομείο υπολογίστηκαν από τον υπεύθυνο μικροβιολόγο του ίδιου νοσοκομείου για το πρώτο εξάμηνο του 2016.

Η τυποποίηση των βακτηριακών στελεχών και η μελέτη των ευαισθησιών τους στα αντιβιοτικά έγινε με αυτοματοποιημένο σύστημα (Vitec®2, bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France; BD Phoenix, BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA; Microscan, Microscan Systems, Inc., Renton, WA, USA) στο μικροβιολογικό εργαστήριο του εκάστοτε νοσοκομείου.

Τα κλινικά στελέχη διατηρούντο σε διάλυμα αποβουτυρωμένου γάλακτος (skim milk) 10% σε ειδικό κρυοφιαλίδιο στους -80°C.

Στην μελέτη χρησιμοποιήθηκαν επίσης τα εξής εργαστηριακά στελέχη:

- i. Το πρότυπο στέλεχος *E. coli* ATCC25922 χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα ελέγχου ευαισθησιών.
- ii. Το πρότυπο στέλεχος *P. aeruginosa* ATCC27853 χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα ελέγχου ευαισθησιών στελεχών *P. aeruginosa*.
- iii. Το πρότυπο στέλεχος *K. pneumoniae* ATCC700603 χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα ελέγχου ευαισθησιών των συνδυασμών β-λακταμών/αναστολέων β-λακταμασών.
- iv. Το πρότυπο στέλεχος *E. coli* NCTC13846 (*mcr-1*-positive) χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα ελέγχου ευαισθησιών στην κολιστίνη.
- v. Το στέλεχος *E. coli* RC85 R- K12, Rif-R (ανθεκτικό στη ριφαμπικίνη) χρησιμοποιήθηκε σαν στέλεχος δέκτης στα πειράματα σύζευξης.

3. Προσδιορισμός ελάχιστων ανασταλτικών συγκεντρώσεων στις αμινογλυκοσίδες

Σε όλα τα στελέχη και των δύο συλλογών έγινε προσδιορισμός των ελάχιστων ανασταλτικών συγκεντρώσεων (MIC) στις αμινογλυκοσίδες αμικασίνη, γενταμικίνη, τομπραμυκίνη και απραμυκίνη (Πίνακας 14). Ο προσδιορισμός των MIC έγινε με τη μέθοδο της μικροαραίωσης σε ζωμό Cation-Adjusted Mueller-Hinton II (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA) σε πλάκες μικροαραίωσης 96 θέσεων, με ενοφθάλμισμα ίσο με 5×10^5 CFU/mL, σύμφωνα με οδηγίες του CLSI (CLSI, M07-A10, 2015). Οι υποδιπλάσιες συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών είχαν εύρος από 1024mg/L έως 1mg/L. Σε όλα τα πειράματα προσδιορισμού MIC χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη *E. coli* ATCC 25922 και *P. aeruginosa* ATCC 27853 για ποιοτικό έλεγχο, ενώ παράλληλα έγιναν και τεστ στείρωσης για έλεγχο των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων έγινε σύμφωνα με τα όρια ευαισθησίας που προτείνονται από την EUCAST (EUCAST, Version 12.0, 2022), ενώ για την απραμυκίνη στα Εντεροβακτηριακά χρησιμοποιήθηκαν τα όρια (S; ≤ 8 mg/L, R; ≥ 64 mg/L) που είχαν δημοσιευτεί στο National Antibiotic Resistance Monitoring Study (NARMS) report το 2001 (CDC, 2003). Για τα στελέχη *P. aeruginosa* και *A. baumannii*, δεν υπάρχουν δημοσιευμένα όρια ευαισθησίας και χρησιμοποιήθηκε η τιμή του επιδημιολογικού ορίου αντοχής των 64 mg/L που έχει προταθεί από τους Kang *et al.* (Kang *et al.*, 2017).

Πίνακας 14. Αντιμικροβιακές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των MIC στις αμινογλυκοσίδες

Αντιμικροβιακή ουσία	Εταιρεία	Κωδικός εταιρείας
Amikacin disulfate salt	Discovery-Fine Chemicals, Wimborne, UK	-
Gentamicin sulfate	Applichem GmbH, Darmstadt, Germany	A1492
Tobramycin sulfate salt	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany	36562
Apramycin sulfate	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA	A2024

4. Ανίχνευση γονιδίων RMTs

Στα στελέχη που παρουσίαζαν ταυτόχρονα υψηλού επιπέδου αντοχή στην αμικασίνη, την γενταμικίνη και την τομπραμυκίνη (MIC>256mg/L) ακολούθησε ανίχνευση γονιδίων 16S rRNA μεθυλοτρανσφερασών με τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Ο μοριακός έλεγχος έγινε με την τεχνική της πολυπλεκτικής PCR για τα εξής γονίδια μεθυλασών: *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*, *rmtF*, *rmtG*, *rmtH*, *npmA*.

Το DNA που χρησιμοποιήθηκε στις αντιδράσεις PCR απομονώθηκε από μία αποικία του υπό έλεγχο στελέχους, η οποία διαλύθηκε σε 50μL H₂O, τέθηκε σε συνθήκες βρασμού για 10 λεπτά και ακολούθως σε ψύξη -20°C για ακόμα 10 λεπτά. Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 14.000rpm για 1 λεπτό και το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε ως template DNA στις αντιδράσεις PCR.

Στη συνέχεια έγιναν τέσσερις πολυπλεκτικές PCR, δύο σύμφωνα με τους Doi & Arakawa (Doi & Arakawa, 2007a) και δύο σύμφωνα με τους Corrêa *et al.* (Corrêa *et al.*, 2014), που περιλάμβαναν εκκινητές για την ανίχνευση των γονιδίων *rmtB*, *rmtC* και *armA* (η πρώτη), *rmtA* και *rmtD* (η δεύτερη), *rmtA*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtG* και *rmtH* (η τρίτη) και *armA*, *npmA*, *rmtB*, *rmtE* και *rmtF* (η τέταρτη). Για τις αντιδράσεις της PCR προστέθηκαν σε κατάλληλο φιαλίδιο όγκου 0.2mL τα αντιδραστήρια και το DNA, όπως φαίνονται στον Πίνακα 15.

Πίνακας 15. Πολυπλεκτική PCR για την ανίχνευση των γονιδίων RMTs.

Αντιδραστήρια	Ποσότητα ανά αντίδραση
DNA	5μL
Κάθε Primer-F (100μM)	0.25μL
Κάθε Primer-R (100μM)	0.25μL
ThermoPol Buffer 10X (με MgCl ₂)	2.5μL
dNTPs (200μM each) ¹	2.5μL
H ₂ O	Έως τελικό όγκο 25μL
Taq polymerase 5U/μL ²	0.125μL

¹ Χρησιμοποιήθηκε η Taq DNA-polymerase της New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany με το ThermoPol Buffer

² Χρησιμοποιήθηκαν dNTPs της Life Technologies, USA

Σε κάθε αντίδραση PCR ταυτόχρονα με τα υπό εξέταση DNA τοποθετούνταν δύο δείγματα μάρτυρες, ένας θετικός και ένας αρνητικός στον οποίο το DNA είχε αντικατασταθεί με νερό.

Το διάλυμα αναδεύόταν ελαφρά και στη συνέχεια τοποθετείτο στον θερμικό κυκλοποιητή, όπου υποβαλλόταν στις συνθήκες που περιγράφονται στον Πίνακα 16.

Πίνακας 16. Συνθήκες πολυπλεκτικών PCR για την ανίχνευση γονιδίων RMTs.

Φάση	Θερμοκρασία	Διάρκεια	
Multiplex PCR I & II			
Αρχική αποδιάταξη	96°C	5 min	30 κύκλοι
Αποδιάταξη	96°C	30 sec	
Πρόσδεση	55°C	30 sec	
Επιμύκηση	72°C	1 min	
Τελική επιμύκηση	72°C	5 min	
Multiplex PCR III & IV			
Αρχική αποδιάταξη	94°C	10 min	25 κύκλοι
Αποδιάταξη	94°C	45 sec	
Πρόσδεση	57°C	30 sec	
Επιμύκηση	72°C	25 sec	
Τελική επιμύκηση	72°C	3 min	

Οι ακριβείς συνθήκες καθορίζονται από τις εναρκτήριες αλληλουχίες που χρησιμοποιούνται, καθώς και από το μέγεθος του προϊόντος που αναμένεται

να ενισχυθεί. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση εσωτερικού τμήματος των γονιδίων των μεθυλοτρανσφερασών καθώς και το μέγεθος των τμημάτων φαίνονται στον Πίνακα 17.

Πίνακας 17. Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις πολυπλεκτικές PCR για την ανίχνευση γονιδίων μεθυλασών (Corrêa *et al.*, 2014)

PCR	Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία (5' προς 3') ¹	Μέγεθος προϊόντος
Multiplex I	<i>rmtB</i>	rmtB-F	GCTTTCTGCGGGCGATGTAA	173 bp
		rmtB-R	ATGCAATGCCGCGCTCGTAT	
	<i>rmtC</i>	rmtC-F	CGAAGAAGTAACAGCCAAAG	711 bp
rmtC-R		ATCCCAACATCTCTCCCACT		
Multiplex II	<i>armA</i>	armA-F	ATTCTGCCTATCCTAATTGG	315 bp
		armA-R	ACCTATACTTTATCGTCGTC	
Multiplex II	<i>rmtA</i>	rmtA-F	CTAGCGTCCATCCTTTCCCTC	635 bp
		rmtA-R	TTGCTTCCATGCCCTTGCC	
Multiplex II	<i>rmtD</i>	rmtD-F	CGGCACGCGATTGGGAAGC	401 bp
		rmtD-R	CGGAAACGATGCGACGAT	
Multiplex III	<i>rmtA</i>	rmtAF	AAACTATTCCGCATGGTTC	88 bp
		rmtAR	TCATGTACACAAGCTCTTTCC	
	<i>rmtC</i>	rmtCF	CAGGGGTTCCAACAAGT	246 bp
		rmtCR	AGAGTATATAGCTTGAACATAAGTAGA	
	<i>rmtD</i>	rmtDF	TCGTTTCAGCACGTAAAACA	652 bp
rmtDR		CAGCGCGAAATTCAAAAAGG		
Multiplex III	<i>rmtG</i>	rmtGF	ACGGAATGCCGCGCGAAGTA	381 bp
		rmtGR	TCTCCGCAAGCAGATCGCCG	
	<i>rmtH</i>	rmtHF	ATGACCATTGAACAGGCAGC	464 bp
rmtHR	AGGGCAAAGGTAATAATCCCA			
Multiplex IV	<i>armA</i>	armAF	ATTTTAGATTTTGGTTGTGGC	101 bp
		armAR	ATCTCAGCTCTATCAATATCG	
	<i>npmA</i>	npmAF	GGGCTATCTAATGTGGTG	229 bp
		npmAR	TTTTTATTTCCGCTTCTTCGT	
	<i>rmtB</i>	rmtBF	ACTTTTACAATCCCTCAATAC	171 bp
		rmtBR	AAGTATATAAGTTCTGTTCCG	
Multiplex IV	<i>rmtE</i>	rmtEF	GATGCCGTGTCTGTTACGCCG	446 bp
		rmtER	ACGTGAACCCACGAGTCCTGC	
Multiplex IV	<i>rmtF</i>	rmtFF	CGATCCTACTGGGCTCCAT	314 bp
		rmtFR	GGCATAGTGCTTTTCCATGC	

¹ Η σύνθεση των εκκινητών έγινε από την εταιρεία Integrated DNA Technologies, Inc.

Τα ενισχυμένα τμήματα του DNA στην συνέχεια υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, παρουσία βρωμιούχου εθιδίου και το αποτέλεσμα φωτογραφήθηκε με το σύστημα GelDoc™ XR+ (Bio-Rad Laboratories, Inc., Marnes la Coquette, France) και αναλύθηκε με το πρόγραμμα επεξεργασίας Quantity One® 1-D Analysis-Software Version 4.6.9. (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

5. Απομόνωση ολικού γενωμικού DNA

Στα Εντεροβακτηριακά στελέχη που έφεραν γονίδιο μεθυλάσης έγινε απομόνωση ολικού γενωμικού DNA με τη χρήση του συστήματος Nucleospin Tissue της Macherey-Nagel (Macherey-Nagel GmbH, Dueren, Germany) σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας. Το DNA αυτό χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για ανίχνευση άλλων γονιδίων αντοχής.

6. Αντιμικροβιακή ευαισθησία

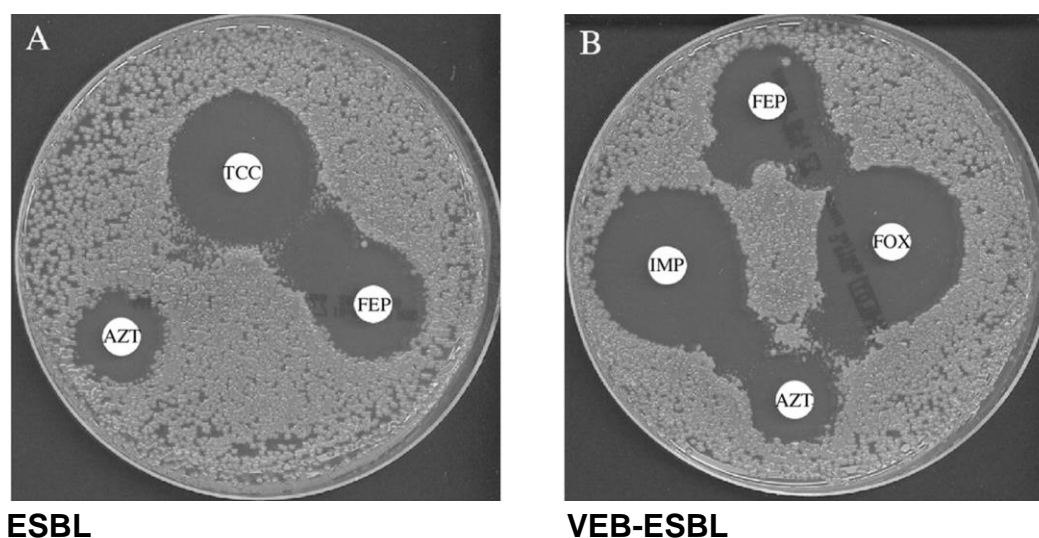
Σε όλα τα στελέχη που βρέθηκε να φέρουν γονίδιο μεθυλάσης έγινε έλεγχος πλήρους αντιμικροβιακής ευαισθησίας.

6.1 Έλεγχος αντιβιογράμματος κατά Kirby-Bauer

Η μελέτη της ευαισθησίας στα αντιμικροβιακά πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο διάχυσης σε δίσκο σε άγαρ Mueller- Hinton II (MH) (Becton Dickinson Microbiology Systems).

Τα Εντεροβακτηριακά στελέχη ελέγχθηκαν περαιτέρω με την μέθοδο συνέργειας διπλού δίσκου (approximation test) για την ύπαρξη ευρέος φάσματος β-λακταμασών (Stürenburg & Mack, 2003) (Εικόνα 23). Επιπρόσθετα έγινε ένα τεστ συνέργειας μεταξύ δίσκων κεφιπίμης-30μg, αζτρεονάμης-30μg και κεφοξιτίνης-30μg ή ιμιπενέμης-10μg (Bio-Rad Laboratories, Inc.) που υποδηλώνει την παραγωγή β-λακταμάσης τύπου VEB (Poirel et al, 2003) (Εικόνα 23).

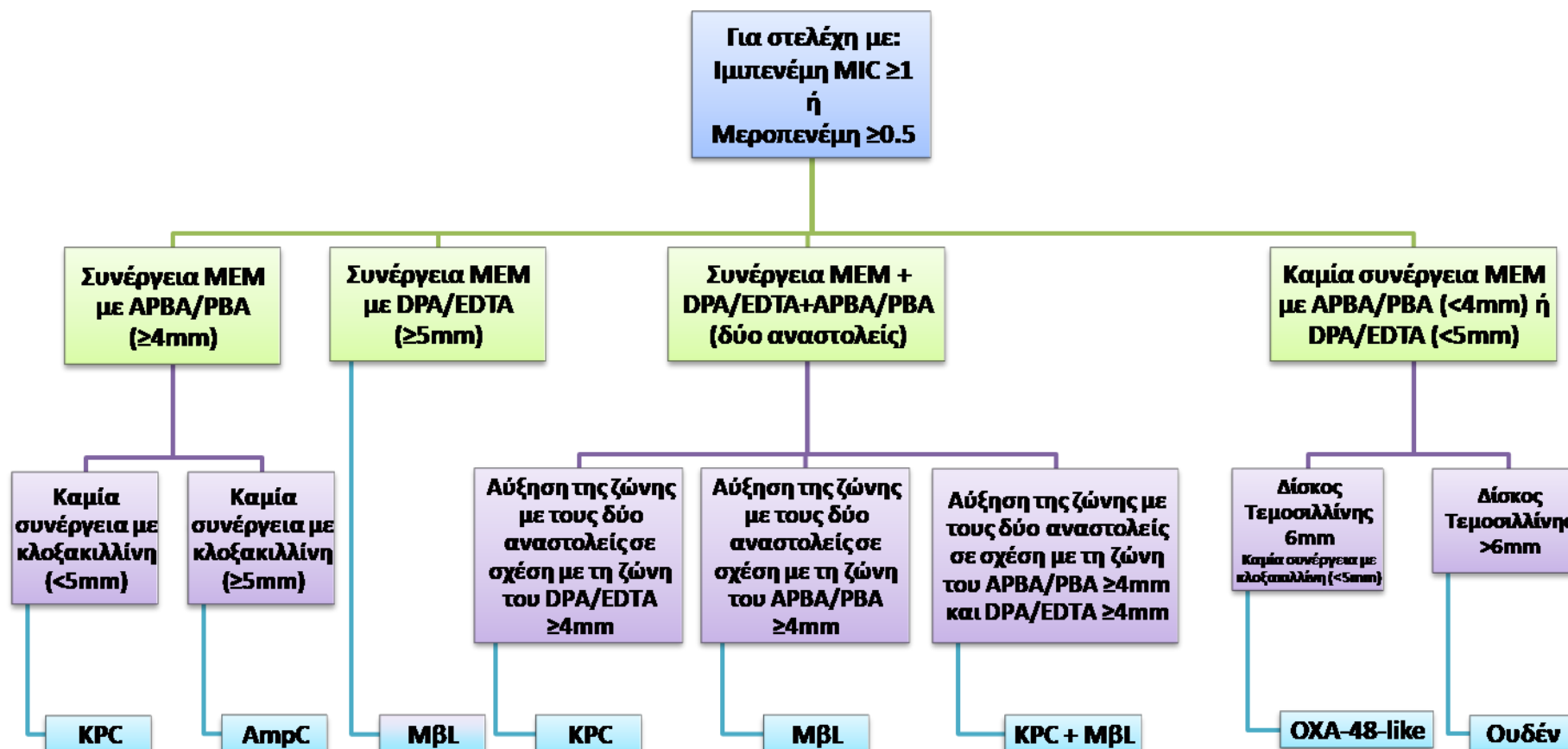
Εικόνα 23. Φαινοτυπικός προσδιορισμός της παραγωγής ESBL και ESBL-VEB με το τεστ των διπλών δίσκων



Για την ανίχνευση παραγωγής καρβαπενεμασών στα Εντεροβακτηριακά στελέχη χρησιμοποιήθηκε η φαινοτυπική μέθοδος συνέργειας δίσκων μεροπενέμης (Bio-Rad Laboratories, Inc.) με ή χωρίς αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA), φαινυλβορονικό οξύ (PBA) και κλοξακιλλίνη (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες της EUCAST (EUCAST, Version 2.01, 2017). Επίσης χρησιμοποιήθηκε ένας δίσκος μεροπενέμης εμποτισμένος με τους δύο αναστολείς PBA και EDTA για την ανίχνευση στελεχών που παράγουν δύο καρβαπενεμάσες (KPC και MBL), που είναι γνωστό ότι απομονώνονται στα ελληνικά νοσοκομεία από το 2009 (Giakkouri *et al.*, 2009). Παράλληλα χρησιμοποιήθηκε και δίσκος τεμοσιλλίνης 30μg (Liofilchem, Italy) για το φαινοτυπικό προσδιορισμό της παραγωγής καρβαπενεμάσης τύπου OXA-48.

Η αξιολόγηση έγινε σύμφωνα με τον αλγόριθμο της Εικόνας 24.

Εικόνα 24. Αλγόριθμος για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων του φαινοτυπικού τεστ ανίχνευσης καρβαπενεμασών (Miriagou *et al.*, 2013, τροποποιημένο)



6.2 Προσδιορισμός MICs σε επιλεγμένα αντιβιοτικά

Ο προσδιορισμός των MICs στις ιμιπενέμη (Merck & Co., Inc, New Jersey, USA), μεροπενέμη (Sigma-Aldrich), κολιστίνη (Sigma-Aldrich), τιγκεκυκλίνη (Sigma-Aldrich), μινοκυκλίνη (Sigma-Aldrich), τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη (Sigma-Aldrich), σιπροφλοξασίνη (Sigma-Aldrich) και χλωραμφαινικόλη (Sigma-Aldrich) έγινε με τη μέθοδο της μικροαραίωσης σε ζυμό όπως περιγράφηκε παραπάνω, σύμφωνα με οδηγίες του CLSI (CLSI, M07-A10, 2015). Οι υποδιπλάσιες συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών είχαν εύρος από 64mg/L έως 0.06mg/L. Σε όλα τα πειράματα προσδιορισμού MIC χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη *E. coli* ATCC25922, *P. aeruginosa* ATCC27853 και *E. coli* NCTC 13846 για ποιοτικό έλεγχο.

Ο προσδιορισμός των MICs στους συνδυασμούς κεφταζιδίμης/αβιμπακτάμης και μεροπενέμης/βαμπορμπακτάμης έγινε με τη χρήση των ταινιών Liofilchem® MIC Test Strips (Liofilchem srl, Roseto degli Abruzzi, Italy), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για ποιοτικό έλεγχο χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο στέλεχος *K. pneumoniae* ATCC 700603. Με ταινίες Liofilchem® MIC Test Strips έγινε και ο προσδιορισμός των MICs στη φωσφομυκίνη, για τις οποίες η μέθοδος αναφοράς είναι η μέθοδος αραίωσης σε άγαρ.

6.3 Ανίχνευση γονιδίων β-λακταμασών

Η ανίχνευση των γονιδίων των β-λακταμασών έγινε με PCR σύμφωνα με τον Πίνακα 18 και τη χρήση κατάλληλων εκκινητών και συνθηκών (Πίνακας 19).

Πίνακας 18. PCR για την ανίχνευση γονιδίων β-λακταμασών

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
DNA	5 µl
Primer-F 10µM	2,5 µl
Primer-R 10µM	2,5 µl
ThermoPol Buffer 10X (µε MgCl ₂)	2,5 µl
dNTPs 200 µM (each)	2,5 µl
H ₂ O	9,875 µl
Taq polymerase 5U/µl	0,125 µl

Πίνακας 19. Εκκινητές και συνθήκες PCR για την ανίχνευση γονιδίων β-λακταμασών

β-λακταμάση	Γονίδιο	Primer	Αλληλουχία (5' → 3') ¹	Θερμοκρασία πρόσδεσης (°C)	PCR προϊόν, bp	Αναφορά
SHV	<i>bla_{SHV}-type</i>	SHVC SHVD	ATGCGTTATATTCGCCTGTG GTTAGCGTTGCCAGTGCTCG	60	862	Yuan <i>et al.</i> , 2000
CTX-M	<i>bla_{CTX-M}-type</i>	CTX-MA CTX-MB	CGCTTTGCGATGTGCAG ACCGCGATATCGTTGGT	54	551	Bonnet <i>et al.</i> , 2001
VEB	<i>bla_{VEB}-type</i>	VEB-F VEB-R	CGACTTCCATTTCCCGATGC GGACTCTGCAACAAATACGC	58	642	Naas <i>et al.</i> , 2006
OXA-10	<i>bla_{OXA-10}-type</i>	OXA10-1 OXA10-2	GTCTTTTCGAGTACGGCATT ATTTTCTTAGCGGCAACTTAC	49	720	Vahaboglu <i>et al.</i> , 1998
OXA-1	<i>bla_{OXA-1}-type</i>	OXA-1 F OXA-1 R	TCAACTTTCAAGATCGCA GTGTGTTTAGAATGGTGA	49	609	Speldooren <i>et al.</i> , 1998
TEM	<i>bla_{TEM}-type</i>	BLA1 BLA2	CATTCAAATATGTATCCGCTCATG CATCCATAGTTGCCTGACTCCCC	56	880	Speldooren <i>et al.</i> , 1998
KPC	<i>bla_{KPC}-type</i>	KPC-F KPC-R	ATGTCACTGTATCGCCGTCT TTTTTCAGAGCCTTACTGCCC	57	893	Bradford <i>et al.</i> , 2004
OXA-48	<i>bla_{OXA-48-like}</i>	OXA-48-F OXA-48-R	TTGGTGGCATCGATTATCGG GAGCACTTCTTTTGTGATGGC	57	743	Poirel <i>et al.</i> , 2004
VIM	<i>bla_{VIM}-type</i> <i>VIM-1, VIM-4, VIM-12, VIM-19, VIM-26, VIM-27, VIM-39</i>	VIM-F VIM-R	ATGGTGTTTGGTCGCATATC TGGGCCATTTCAGCCAGATC	56	509	Poirel <i>et al.</i> , 2000
NDM	<i>bla_{NDM}-type</i>	NDM-F NDM-R	GAAGCTGAGCACCGCATTAG GGCCCGTATGAGTGA	57	758	Sidjabat <i>et al.</i> , 2011
IMP	<i>bla_{IMP}-variants</i> <i>IMP-1, IMP-3-6, IMP-10, IMP-25-26, IMP-28-30, IMP-34</i>	IMP-F IMP-R	CTACCGCAGCAGAGTCTTTG AACCAGTTTTGCCTTACCAT	58	587	Senda <i>et al.</i> , 1996

¹ Η σύνθεση των εκκινητών έγινε από την εταιρεία Integrated DNA Technologies, Inc.

Στα στελέχη *A. baumannii* ο μοριακός έλεγχος για την ανίχνευση των γονιδίων που κωδικοποιούν καρβαπενεμάσες τύπου OXA έγινε με την τεχνική της πολυπλεκτικής PCR με τους εκκινήτες και τις συνθήκες που φαίνονται στον Πίνακα 20.

Πίνακας 20. Αλληλουχίες εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν στην πολυπλεκτική PCR για την ανίχνευση των καρβαπενεμασών τύπου OXA (Woodford *et al.*, 2006)

Γονίδιο	Primer	Αλληλουχία (5' → 3') ¹	PCR προϊόν, bp	Συνθήκες PCR
<i>bla</i> _{OXA-23-like}	OXA-23F	GATCGGATTGGAGAACCAGA	501	1. 94°C/5min 2. 30 κύκλοι 94°C/25s, 52°C/40s, 72°C/50s 3. 72°C/6min
	OXA-23R	ATTTCTGACCGCATTTCAT		
<i>bla</i> _{OXA-24-like}	OXA-24F	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA	246	
	OXA-24R	AGTTGAGCGAAAAGGGGATT		
<i>bla</i> _{OXA-51-like}	OXA-51F	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	353	
	OXA-51R	TGGATTGCACTTCATCTTGG		
<i>bla</i> _{OXA-58-like}	OXA-58F	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	599	
	OXA-58R	CCCCTCTGCGCTCTACATAC		

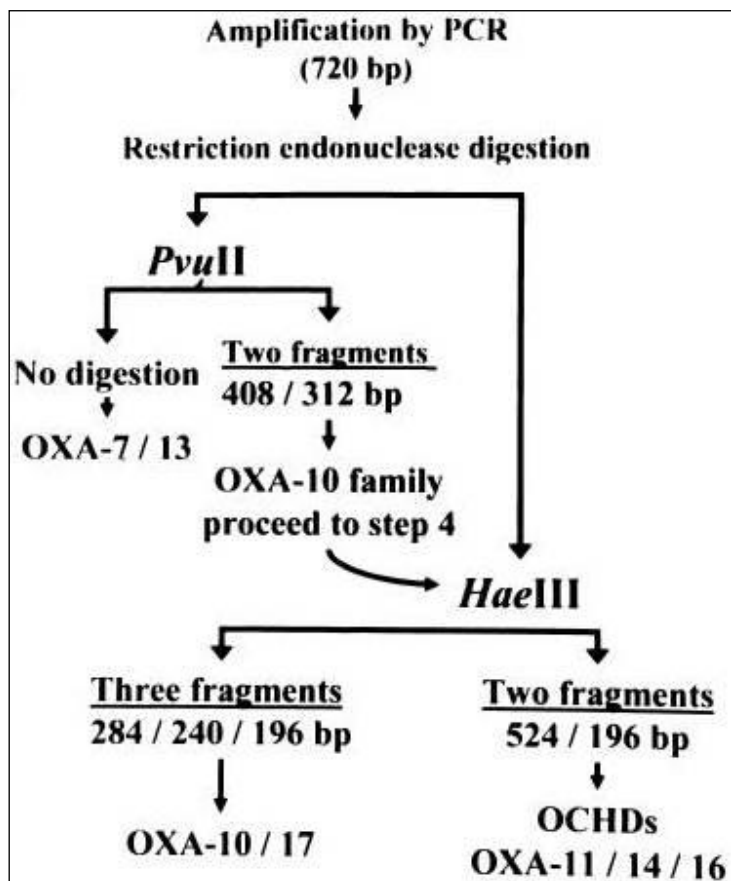
6.3.1 Ανίχνευση της μεταλλαγής G238S που οδηγεί σε ESBL SHV-τύπου (PCR/NheI)

Η ανίχνευση των *bla*_{SHV} γονιδίων που κωδικοποιούν β-λακταμάσες ευρέος φάσματος (ESBL) SHV-τύπου, έγινε μετά από πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση *NheI* των PCR προϊόντων της SHV PCR, σύμφωνα με τους Nuesch-Inderbinen *et al.* (Nüesch-Inderbinen *et al.*, 1996). Λόγω της αντικατάστασης της γλυκίνης στη θέση 238 (SHV-non-ESBL) από σερίνη (SHV-ESBL), με την πέψη δημιουργούνται δυο θραύσματα του PCR προϊόντος, μόνο στα γονίδια που κωδικοποιούν SHV-ESBLs.

6.3.2 Ανίχνευση των ESBL παραγώγων της OXA-10 β-λακταμάσης

Τα PCR προϊόντα των 720 bp που λαμβάνουμε από την ενίσχυση του γονιδίου *bla*_{OXA-10} υποβάλλονται σε πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση *PvuII*. Εάν το PCR προϊόν κοπεί σε δύο θραύσματα (408 και 312 bp) υποβάλλεται σε πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση *HaeIII*. Εάν με την *HaeIII* κοπεί σε τρία θραύσματα (284, 240 και 196 bp) τότε πρόκειται για το *bla*_{OXA-10} ή το *bla*_{OXA-17}, αλλά αν το PCR προϊόν των 720 bp κοπεί σε δύο θραύσματα (524 και 196 bp) με την *HaeIII*, τότε πρόκειται για ένα από τα OXA-10-ESBL (Εικόνα 25).

Εικόνα 25. Διαδικασία προσδιορισμού των OXA-τύπου ESBL σύμφωνα με τους Vahaboglu *et al.* (Vahaboglu *et al.*, 1998).



7. Επιδημιολογική τυποποίηση

Η επιδημιολογική τυποποίηση έγινε με ηλεκτροφόρηση εναλλασσόμενου πεδίου (PFGE) για τα Εντεροβακτηριακά στελέχη, ενώ για τα στελέχη *Acinetobacter* έγινε με ειδικές PCR (δύο tri-locus multiplex PCRs) που κατηγοριοποιούν τα στελέχη σε ομάδες που αντιστοιχίζονται με τους διεθνείς κλώνους.

7.1 Ηλεκτροφόρηση εναλλασσόμενου πεδίου (PFGE)

7.1.1 Παρασκευή ολικού DNA σε πλακίδια αγαρόζης

5ml ζυμού Luria Broth εμβολιάστηκαν με μία αποικία από ολονύκτιο καλλιέργημα του υπό έλεγχο στελέχους και επωάστηκαν στους 37° C για όλη τη νύχτα. Στη συνέχεια 2ml από το καλλιέργημα μεταφέρθηκαν σε φυγοκεντρικό σωλήνα και προστέθηκαν 5ml παγωμένου διαλύματος Pett IV [0.01mM Tris-HCl (pH 8), 1 M NaCl]. Φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 8000rpm στους 4°C και τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 500μl διάλυμα Pett IV. Προστέθηκαν 500μl “incert” αγαρόζης (1.3%) και διαμοιράστηκαν στις ειδικές θήκες δημιουργίας των πλακιδίων αγαρόζης. Τα πλακίδια στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε κρουοφιαλίδιο χωρητικότητας 1.8ml και προστέθηκαν 1.5ml διάλυμα λύσης [6mM Tris-HCl (pH 7.6), 1M NaCl, 100mM EDTA (pH 7.5), 0.5% Brij-58, 0.2% Na-deoxycolate, 0.5% Na lauryl sarcosine) στο οποίο προστέθηκαν 3μl RNase A (10mg/ml) και 30μl λυσοζύμης (50mg/ml) και επωάστηκαν με ανάδευση στους 37°C για 12-16 ώρες. Το διάλυμα λύσης αντικαταστάθηκε από 1.5 ml διαλύματος ESP [0.5 M EDTA (pH 8.0), 1% Na lauryl sarcosine, 2 mg/ml proteinase K) και ακολούθησε επώαση με ανάδευση στους 50°C για 24 ώρες. Τα πλακίδια της αγαρόζης με το καθαρό πλέον DNA, φυλάσσονταν στους 4°C.

7.1.2 Πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση

Ένα πλακίδιο εκπλύθηκε με 5ml διαλύματος TE [10mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 ml EDTA (pH 7.6)] 5 φορές από 30 λεπτά, 30 λεπτά, 1 ώρα, 2 ώρες και ολονύκτια με ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια επωάστηκε σε 250 μl περιοριστικού διαλύματος που περιείχε 30U *SpeI* (για τα στελέχη *K. pneumoniae* και *E. coli*) ή 30U *NotI* (για τα στελέχη *P. mirabilis* και *P. stuartii*) για 16 ώρες στους 37°C. Ακολούθησε διακοπή της πέψης με διάλυμα ESP.

7.1.3 Ηλεκτροφόρηση

Τα θραύσματα του DNA ηλεκτροφορήθηκαν σε εναλλασσόμενο πεδίο, σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5% (για τα στελέχη *K. pneumoniae* και *E. coli*) ή 1.2% (για τα στελέχη *P. mirabilis* και *P. stuartii*) (σε 0.5X Tris-borate-EDTA buffer), στους 14°C και 6 V/cm για 38 ή 24 ώρες αντίστοιχα. Για τα στελέχη *K. pneumoniae* και *E. coli* οι ώσεις κυμαίνονταν από 3 σε 15 δευτερόλεπτα για 15 ώρες και από 1 σε 27 δευτερόλεπτα για 23 ώρες, ενώ για τα στελέχη *P. mirabilis* και *P. stuartii* από 1 σε 30 δευτερόλεπτα για 8 ώρες και από 30 σε 70 δευτερόλεπτα για 16 ώρες αντίστοιχα. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση ήταν η CHEF-DR II system (Bio-Rad, Hercules, California). Η χρώση του πηκτώματος έγινε με εμποτισμό σε διάλυμα βρωμιούχου εθιδίου 1mg/L σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Σε κάθε ηλεκτροφόρηση συμπεριλαμβάνονταν δύο δείγματα με γνωστού μοριακού βάρους ζώνες, τα Lambda και Yeast Chromosome PFG markers (New England Biolabs, Boston, MA, USA).

Τα ηλεκτροφορήματα επεξεργάστηκαν και ερμηνεύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό InfoQuest FP (Bio-Rad, Hercules, California). Υπολογίστηκαν οι συντελεστές ομοιότητας Dice και χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή δένδρογράμματος με την μέθοδο UPGMA (Unweighted pair-group method). Η ανοχή του εύρους των ζωνών (bandwidth tolerance) ορίστηκε στο 1.2%, ενώ θεωρήθηκε ότι δυο στελέχη ανήκουν στην ίδια ομάδα PFGE (παλσότυπος) όταν ο δείκτης ομοιότητας ήταν $\geq 80\%$.

7.2 Επιδημιολογική τυποποίηση στελεχών *Acinetobacter* (tri-locus PCR group typing)

Χρησιμοποιήσαμε δύο tri-locus multiplex PCR, που ενισχύουν επιλεκτικά τα αλληλόμορφα *ompA*, *csuE* και *bla_{OXA-51}*, της Ομάδας 1 και της Ομάδας 2, με στόχο να αντιστοιχηθούν οι ομάδες αλληλουχίας με τους αντίστοιχους κύριους διεθνείς κλώνους (IC) I-III σύμφωνα με τους Turton *et al.* (Turton *et al.*, 2007). Χρησιμοποιώντας αυτό το σχήμα, έχουν πλέον βρεθεί και άλλες ομάδες (G4 έως G14) σύμφωνα με νέους συνδυασμούς των PCR amplicons (Towner *et al.*, 2008; Giannouli *et al.*, 2009/2010; Karah *et al.*, 2011a/b; Grosso *et al.*, 2011; Bonnin *et al.*, 2011). Στον Πίνακα 21 παρουσιάζονται οι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν και τα μεγέθη των PCR προϊόντων που αναμένονταν. Οι συνθήκες των δυο πολυπλεκτικών PCR ήταν μια αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 3 λεπτά, 30 κύκλοι με αποδιάταξη στους 94°C για 45 δευτερόλεπτα, πρόσδεση στους 57°C για 45 δευτερόλεπτα, επιμήκυνση στους 72°C για 1 λεπτό και τελική επιμήκυνση στους 72°C για 5 λεπτά. Τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν σύμφωνα με τον Πίνακα 22.

Πίνακας 21. Εκκινητές που χρησιμοποιούνται στις δύο multiplex PCRs

Group1 - multiplex PCR		
Εκκινητής	Αλληλουχία (5'→3') ¹	PCR προϊόν (bp)
Group1ompAF306	GATGGCGTAAATCGTGGTA	355
Group1and2ompAR660	CAACTTTAGCGATTCTGG	
Group1csuEF	CTTTAGCAAACATGACCTACC	702
Group1csuER	TACACCCGGGTTAATCGT	
Gp1OXA66F89	GCGCTTCAAAATCTGATGTA	559
Gp1OXA66R647	GCGTATATTTTGTTCATTC	
Group2 - multiplex PCR		
Εκκινητής	Αλληλουχία (5'→3') ¹	PCR προϊόν (bp)
Group2ompAF378	GACCTTTCTTATCACAAACGA	343
Group1and2ompAR660	CAACTTTAGCGATTCTGG	
Group2csuEF	GGCGAACATGACCTATTT	580
Group2csuER	CTTCATGGCTCGTTGGTT	
Gp2OXA69F169	CATCAAGGTCAAACCTCAA	162
Gp2OXA69R330	TAGCCTTTTTTCCCATC	

Η τελική συγκέντρωση κάθε εκκινητή πρέπει να είναι 400 nM (10 pmol/25-μL αντίδραση).

¹ Η σύνθεση των εκκινητών έγινε από την εταιρεία Integrated DNA Technologies, Inc.

Πίνακας 22. Αξιολόγηση αποτελεσμάτων PCR και συσχέτιση με διεθνείς κλώνους (IC)

Variant sequence group designation			Group 1 PCR			Group 2 PCR			Αναφορά
			<i>csuE</i> 702 bp	<i>ompA</i> 355 bp	<i>bla_{OXA-51}</i> 559 bp	<i>csuE</i> 580bp	<i>ompA</i> 343 bp	<i>bla_{OXA-51}</i> 162 bp	
G1	ICII	ST2	+	+	+	-	-	-	Turton <i>et al.</i> , 2007
G2	ICI	ST1	-	-	-	+	+	+	Turton <i>et al.</i> , 2007
G3	ICIII	ST3	+	-	+	-	+	-	Turton <i>et al.</i> , 2007
G4			-	+	+	-	-	-	Giannouli <i>et al.</i> , 2009; Towner <i>et al.</i> , 2008
G5			-	+	-	-	-	-	Towner <i>et al.</i> , 2008
G6			+	-	-	-	+	+	Towner <i>et al.</i> , 2008
G7			-	+	-	+	-	-	Towner <i>et al.</i> , 2008
G8 (ST6*)		ST78	-	+	+	+	-	-	Giannouli <i>et al.</i> , 2010
G9			-	+	-	+	-	+	Karah <i>et al.</i> , 2011b
G10			-	-	+	+	+	-	Grosso <i>et al.</i> , 2011
G11			-	-	-	-	+	+	Grosso <i>et al.</i> , 2011
G12			-	-	+	-	-	-	Karah <i>et al.</i> , 2011a
G13			+	+	-	-	-	-	Karah <i>et al.</i> , 2011a
G14			+	-	+	-	-	-	Bonnin <i>et al.</i> , 2011

8. Βακτηριακή σύζευξη

Η μέθοδος της βακτηριακής σύζευξης χρησιμοποιήθηκε για την μεταφορά πλασμιδίων από τα κλινικά στελέχη σε εργαστηριακό στέλεχος δέκτη για την διερεύνηση της ικανότητας τους να αυτομεταβιβάζονται καθώς και για τον έλεγχο των γονιδίων που εδράζονται σε αυτά. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται από τους Christie *et al.* (Christie *et al.*, 1987). Πειράματα σύζευξης πραγματοποιήθηκαν με τουλάχιστον ένα στέλεχος από κάθε γένος Εντεροβακτηριακών με διαφορετικό γονότυπο. Το ανθεκτικό στη ριφαμπικίνη (Rif^R) *E. coli* RC85 R- K12 χρησιμοποιήθηκε σαν στέλεχος δέκτης. Αναλυτικά:

- i. Σε 4.5ml ζωμού BHI εμβολιάστηκαν 500μl ολονύκτιου καλλιεργήματος του στελέχους δέκτη (*E. coli* RC85 R- K12).
- ii. Σε 4.95ml ζωμού BHI εμβολιάστηκαν 50μl ολονύκτιου καλλιεργήματος του στελέχους δότη (κλινικό στέλεχος).
- iii. Σε 4.45ml ζωμού BHI εμβολιάστηκαν 500μl ολονύκτιου καλλιεργήματος του στελέχους δέκτη και 50μl ολονύκτιου καλλιεργήματος του στελέχους δότη.
- iv. Τα κύτταρα από τα παραπάνω διαλύματα (i, ii και iii) στη συνέχεια συλλέχθηκαν σε φίλτρο μεμβράνης με πόρο 0.22 μm (Millipore Corp.) και επωάστηκαν σε τρυβλία με BHI άγαρ για 6 ώρες στους 37°C.
- v. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια με 10ml φυσιολογικό ορό, αναδεύτηκαν και έγιναν διαδοχικές αραιώσεις 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} των εναιωρημάτων σε φυσιολογικό ορό.
- vi. Τέλος με 100μl από κάθε εναιώρημα εμβολιάστηκαν τρυβλία McConkey τα οποία περιείχαν ριφαμπικίνη (400 mg/L) ή/και γενταμικίνη (50 mg/L).
- vii. Τα τρυβλία επωάστηκαν στους 37°C για 18 ώρες.

Οι συχνότητες μεταφοράς εκφράστηκαν ως το κλάσμα του αριθμού των αποικιών στις οποίες έχει επιτευχθεί η σύζευξη προς τον αριθμό των δεκτών.

9. Έλεγχος πλασμιδιακού περιεχομένου

Ο έλεγχος πλασμιδιακού περιεχομένου έγινε στα αρχικά κλινικά στελέχη καθώς και στα μετασυζευγμένα στελέχη. Χρησιμοποιήθηκε η PFGE μετά από πέψη με S1 νουκλεάση, όπως έχει περιγραφεί από τους Barton *et al.* (Barton *et al.*, 1995).

9.1 Πέψη με S1 νουκλεάση

Ένα πλακίδιο αγαρόζης, που παρασκευάστηκε όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, εκπλύθηκε με 5ml διαλύματος TE [10mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 ml EDTA (pH 7.6)] 5 φορές από 30 λεπτά, 30 λεπτά, 1 ώρα, 2 ώρες και ολονύκτια με ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια επώαστηκε σε 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος που περιείχε 1U S1 nuclease (Promega, Southampton, UK) για 45 λεπτά στους 37°C. Ακολούθησε διακοπή της πέψης με διάλυμα ESP και ηλεκτροφόρηση εναλασσόμενου πεδίου.

9.2 Ηλεκτροφόρηση εναλασσόμενου πεδίου (PFGE)

Η ηλεκτροφόρηση εναλασσόμενου πεδίου έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 1.2% (σε 0.5XTBE), στα 200V και στους 10°C. Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης ήταν ώσεις 45 δευτερολέπτων για 14 ώρες και 25 δευτερολέπτων για 6 ώρες. Κάθε ζώνη θεωρήθηκε ένα ευθύγραμμο πλασμίδιο του οποίου το μέγεθος υπολογίστηκε σε σύγκριση με γνωστού μοριακού βάρους ζώνες (Lambda και Yeast Chromosome PFG markers -New England Biolabs, Boston, MA, USA).

10. Ταξινόμηση πλασμιδίων σε ομάδες ασυμβατότητας

Η ταξινόμηση των πλασμιδίων σε ομάδες ασυμβατότητας έγινε με πέντε πολυπλεκτικές και τρεις απλές PCR, σύμφωνα με τη μέθοδο PbRT (PCR-based Replicon Typing) (Carattoli *et al.*, 2005). Τα δεκαοκτώ ζεύγη εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν στις πέντε multiplex και τρεις simplex PCRs για την αναγνώριση των FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1-I7, L/M, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, F και FIIA ρεπλικονίων αναγράφονται στον Πίνακα 23.

Οι συνθήκες όλων των PCRs, εκτός από την F-simplex PCR, ήταν μια αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 5 λεπτά, 30 κύκλοι αποδιάταξης στους 94°C για 1 λεπτό, πρόσδεσης στους 60°C για 30 δευτερόλεπτα και επιμήκυνσης στους 72°C για 1 λεπτό και τελική επιμήκυνση στους 72°C για 5 λεπτά. Η F-simplex PCR έγινε στις ίδιες συνθήκες αλλά με θερμοκρασία πρόσδεσης στους 52°C.

Πίνακας 23. Εκκινητές που χρησιμοποιούνται στις πολυπλεκτικές και απλές PCRs για την ταξινόμηση των πλασμιδίων σε ομάδες ασυμβατότητας (Carattoli *et al.*, 2005).

PCR	Εκκινητές	Αλληλουχία (5'→3') ¹	Στόχος	PCR προϊόν (bp)
Multiplex 1	HI1-FW	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC	parA-parB	471
	HI1-RV	TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA		
	HI2-FW	TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC	iterons	644
	HI2-RV	GGCTCACTACCGTTGTATCCT		
	I1-FW	CGAAAGCCGGACGGCAGAA	RNAI	139
	I1-RV	TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT		
Multiplex 2	X-FW	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT	ori γ	376
	X-RV	TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC		
	L/M-FW	GGATGAAAACATCAGCATCTGAAG	repA,B,C	785
	L/M-RV	CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG		
	N-FW	GTCTAACGAGCTTACCGAAG	repA	559
	N-RV	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC		
Multiplex 3	FIA-F	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG	iterons	462
	FIA-RV	GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG		
	FIB-FW	GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG	repA	702
	FIB-RV	CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT		
	W-FW	CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG	repA	242
	W-RV	GGTGCGCGGCATAGAACCGT		
Multiplex 4	Y-FW	AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG	repA	765
	Y-RV	GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT		
	P-FW	CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA	iterons	534
	P-RV	TCACGCGCCAGGGCGCAGCC		
	FIC-FW	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG	repA2	262
	FIC-RV	TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT		
Multiplex 5	A/C-FW	GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA	repA	465
	A/C-RV	ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT		
	T-FW	TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT	repA	750
	T-RV	CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC		
	FIIs-FW	CTGTCGTAAGCTGATGGC	repA	465
	FIIs-RV	CTCTGCCACAAACTTCAGC		
Simplex PCR	FrepB-FW	TGATCGTTTAAGGAATTTTG	RNAI/repA	270
	FrepB-RV	GAAGATCAGTCACACCATCC		
Simplex PCR	K/B-FW	GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC	RNAI	160
	K/B-RV	TCTTTCACGAGCCCCGCCAAA		
Simplex PCR	B/O-FW		RNAI	159
	B/O-RV	TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA		

¹ Η σύνθεση των εκκινητών έγινε από την εταιρεία Integrated DNA Technologies, Inc.

11. Ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των πλασμιδίων που φέρουν την 16S rRNA μεθυλοτρανσφεράση *rmtB*

Με βάση τα αποτελέσματα των ευαισθησιών των μετασυζευγμένων στελεχών, επιλέχθηκαν πέντε πλασμίδια που έφεραν το *rmtB* από κάθε διαφορετικό προφίλ ευαισθησίας / προέλευση (δότης) για αλληλούχιση.

Το πλασμιδιακό DNA απομονώθηκε χρησιμοποιώντας το PureLink® HiPure Plasmid Midiprep Kit (Life Technologies, Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η αλληλούχιση των πλασμιδίων πραγματοποιήθηκε σε πλατφόρμα Ion Torrent™ (Life Technologies). Τα ανεπεξέργαστα δεδομένα (raw reads) από το IonTorrent φιλτραρίστηκαν (trimming), αφαιρέθηκαν οι adapters των sequence reads καθώς επίσης και ολόκληρα κομμάτια των sequence reads που έχουν πολύ μικρό μήκος, ώστε να εξαχθούν reads καλύτερης ποιότητας. Στη συνέχεια με το πρόγραμμα FastQ έγινε ποιοτικός έλεγχος των sequence reads και συναρμολογήθηκαν σε μεγαλύτερα κομμάτια, δηλαδή σε contigs, με τη χρήση του προγράμματος SPAdes που παρέχεται από το Pathosystems Resource Integration Center (PATRIC) (<https://patricbrc.org/app/Assembly>).

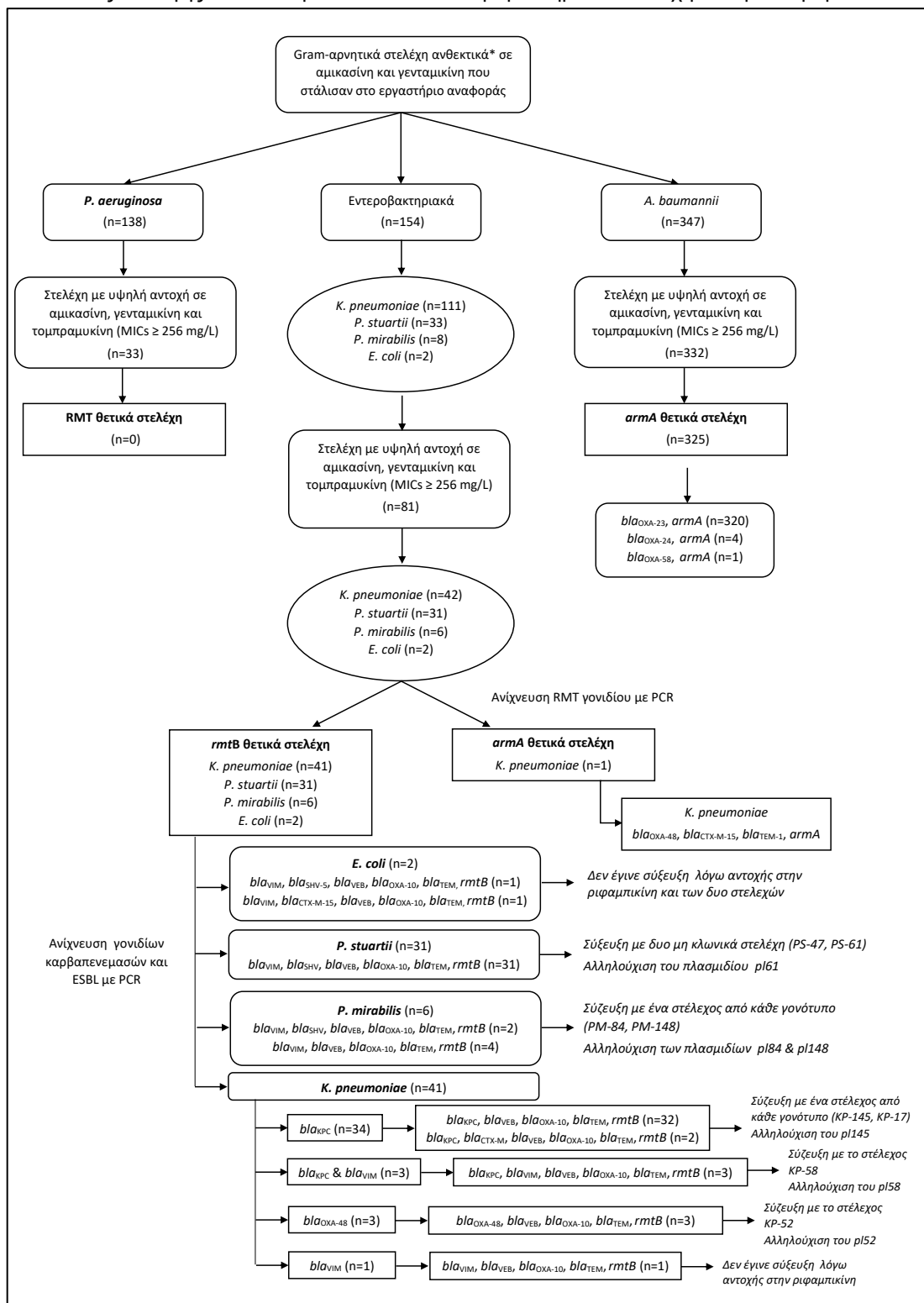
Τα contigs χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των γονιδίων αντιμικροβιακής αντοχής, της ομάδας ασυμβατότητας πλασμιδίου και της pMLST (plasmid Multi-locus Sequence Type), με τα προγράμματα ResFinder 3.0 (Zankari *et al.*, 2012), PlasmidFinder 1.3 και pMLST 1.4 (Carattoli *et al.*, 2014) αντίστοιχα, που είναι διαθέσιμα στο Center for Genomic Epidemiology (www.genomiceridemiology.org). Επιλεγμένα γονίδια συγκρίθηκαν επίσης με γονίδια αναφοράς με τον αλγόριθμο αναζήτησης NCBI BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Για την κατασκευή των χαρτών των πλασμιδιακών τμημάτων που περιείχαν τα γονίδια *rmtB*, *bla_VEB-1* και *bla_VIM-1*, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SnapGene Viewer 2.1 (GSL Biotech LLC).

Οι αλληλουχίες των πλασμιδίων κατατέθηκαν στη βάση δεδομένων SRA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/sra.cgi?view=announcement>) της NCBI, που αποθηκεύει ανεπεξέργαστα δεδομένα (raw reads) από τεχνολογίες NGS ολόκληρων γονιδιωμάτων. Οι αριθμοί κατάθεσης είναι οι: SRR11041018 (για το pl52), SRR11041017 (για το pl58), SRR11041016 (για το pl84), SRR11041015 (για το pl148) και SRR11041019 (για το pl61).

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Σχηματική αναπαράσταση αποτελεσμάτων

Εικόνα 26. Σχηματική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της πειραματικής διαδικασίας και της διαδικασίας επιλογής των πλασμιδίων από τα Εντεροβακτηριακά στελέχη που μελετήθηκαν



* Στελέχη με MICs ψηλότερες από τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν στα Μικροβιολογικά Εργαστήρια των συνεργαζόμενων Νοσοκομείων (συνήθως αμικασίνη >32mg/L, γενταμικίνη >8 mg/L)

2. Πηγές βακτηριακών στελεχών

Στον Πίνακα 24 καταγράφονται οι απόλυτοι αριθμοί στελεχών που αναγνωρίστηκαν ως ανθεκτικά στις αμινογλυκοσίδες που ελέγχθηκαν από τα μικροβιολογικά εργαστήρια των συνεργαζόμενων νοσοκομείων και εστάλησαν στο κεντρικό εργαστήριο, ταξινομημένα ανά είδος και ανά πηγή απομόνωσης. Υπενθυμίζεται ότι χρησιμοποιήθηκε αυστηρά ένα στέλεχος ανά ασθενή. Στον Πίνακα 25 καταγράφονται οι απόλυτοι αριθμοί των στελεχών που διαπιστώθηκε ότι έφεραν γονίδιο μεθυλάσης, ανά είδος και ανά πηγή απομόνωσης.

Πίνακας 24. Στελέχη που εστάλησαν από τα συνεργαζόμενα νοσοκομεία ως ανθεκτικά στις αμινογλυκοσίδες που ελέγχθηκαν στα εργαστήριά τους, ανά είδος και ανά πηγή απομόνωσης

	<i>A.baumannii</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>P.stuartii</i>	<i>P.mirabilis</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>
Αιμοκαλλιέργειες	150	41	18	2	-	27
Πτύελα/Βρογχικές εκκρίσεις/BAL	63	13	10	-	-	37
Πύον	29	5	2	-	-	18
Άκρο καθετήρα	17	7	1	1	-	2
Ούρα	50	39	1	2	1	35
Ορθικό επίχρισμα/ Κόπρανα	28	5	-	1	1	15
Λοιπά	10	1	1	2	-	4
Σύνολο (n)	347	111	33	8	2	138

Πίνακας 25. RMT-θετικά στελέχη ανά είδος και ανά πηγή απομόνωσης

	<i>A.baumannii</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>P.stuartii</i>	<i>P.mirabilis</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>
Αιμοκαλλιέργειες	139	16	17	2	-	-
Πτύελα/Βρογχικές εκκρίσεις/BAL	61	3	10	-	-	-
Πύον	27	3	2	-	-	-
Άκρο καθετήρα	15	3	1	1	-	-
Ούρα	48	14	1	2	1	-
Ορθικό επίχρισμα/ Κόπρανα	27	2	-	1	1	-
Λοιπά	8	1	-	-	-	-
Σύνολο (n)	325	42	31	6	2	0

3. *Pseudomonas aeruginosa*

Τα στελέχη *P. aeruginosa* που ήταν ανθεκτικά στην αμικασίνη και την γενταμικίνη απομονώθηκαν στα συμμετέχοντα νοσοκομεία με μέσο ποσοστό 10.1% (min 1.3%, max 19.2%). Καθένα από τα πέντε νοσοκομεία συνέφερε στη μελέτη από 7 έως 72 στελέχη (σύνολο 138).

Από τα 138 στελέχη που εστάλησαν στο κεντρικό εργαστήριο 122 επιβεβαιώθηκαν ως ανθεκτικά στις αμινογλυκοσίδες αμικασίνη, γενταμικίνη και τομπραμυκίνη. Τριάντα τρία στελέχη (27%) είχαν ταυτόχρονα υψηλή αντοχή και στις τρεις αμινογλυκοσίδες με MICs ≥ 256 mg/L. Ωστόσο, κανένα από τα στελέχη αυτά δεν βρέθηκε να φέρει κάποιο από τα γονίδια των RMTs που ελέγχθηκαν σε αυτή τη μελέτη (Πίνακας 26).

Πίνακας 26. Στελέχη *P. aeruginosa* που συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη, ανά νοσοκομείο

Νοσοκομείο*	ΑΛΞ	ΑΤΤ	ΕΡΘ	ΣΩΤ	ΘΡΣ	ΣΥΝΟΛΟ
Αριθμός στελεχών ανθεκτικών στην αμικασίνη και την γενταμικίνη όπως χαρακτηρίστηκαν από τα τοπικά μικροβιολογικά εργαστήρια **	14	72	22	7	23	138
Αριθμός στελεχών που επιβεβαιώθηκαν ανθεκτικά στην αμικασίνη και την γενταμικίνη	14	66	19	4	19	122
Αριθμός στελεχών με MIC ≥ 256 mg/L στην αμικασίνη, την γενταμικίνη και την τομπραμυκίνη	7	11	8	1	6	33
Αριθμός στελεχών που παρήγαγαν RMTs	0	0	0	0	0	0

*ΑΛΞ, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών “Αλεξάνδρα”; ΑΤΤ, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών “Αττικόν”; ΕΡΘ, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών “Κοργιαλένιο Μπενάκειο ΕΕΣ”; ΣΩΤ, Γενικό Νοσοκομείο Νοσημάτων Θώρακος Αθηνών “Η Σωτηρία”; ΘΡΣ, Γενικό Νοσοκομείο Ελευσίνας “Θριάσιο”

** Στελέχη με MICs υψηλότερες από τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν στα μικροβιολογικά εργαστήρια των νοσοκομείων (συνήθως αμικασίνη >32 mg/L, γενταμικίνη >8 mg/L)

4. *Acinetobacter baumannii*

Τα στελέχη *A. baumannii* που ήταν ανθεκτικά στην αμικασίνη και την γενταμικίνη απομονώθηκαν στα συμμετέχοντα νοσοκομεία με μέσο ποσοστό 67.8% (min 47.5%, max 90.9%). Καθένα από τα πέντε νοσοκομεία συνεισέφερε στη μελέτη από 20 έως 114 στελέχη (σύνολο 347).

Στο κεντρικό εργαστήριο τα 347 στελέχη επιβεβαιώθηκαν ως ανθεκτικά στις αμινογλυκοσίδες αμικασίνη και γενταμικίνη, ενώ ταυτόχρονα παρουσίαζαν αντοχή στα β-λακταμικά αντιβιοτικά και στους συνδυασμούς τους με αναστολείς των β-λακταμασών, στις καρβαπενέμες (CRAB) αλλά και στις φθοριοκινολόνες. 341 από τα 347 στελέχη (98.3%) ήταν επίσης ανθεκτικά στην τομπραμυκίνη, ενώ 332 (95.7%) είχαν υψηλού επιπέδου αντοχή (MICs ≥ 256 mg/L) ταυτόχρονα και στις τρεις αμινογλυκοσίδες. Σε 325 στελέχη (93.7%) επιβεβαιώθηκε η παρουσία γονιδίου που κωδικοποιεί RMT και συγκεκριμένα το γονίδιο *armA* (Πίνακας 27, Εικόνα 27). Ο επιπολασμός των RMT στο σύνολο των στελεχών *A. baumannii* υπολογίστηκε με δεδομένα των συνεργαζόμενων νοσοκομείων για το πρώτο εξάμηνο του 2016 και υπολογίστηκε σε 63.5%.

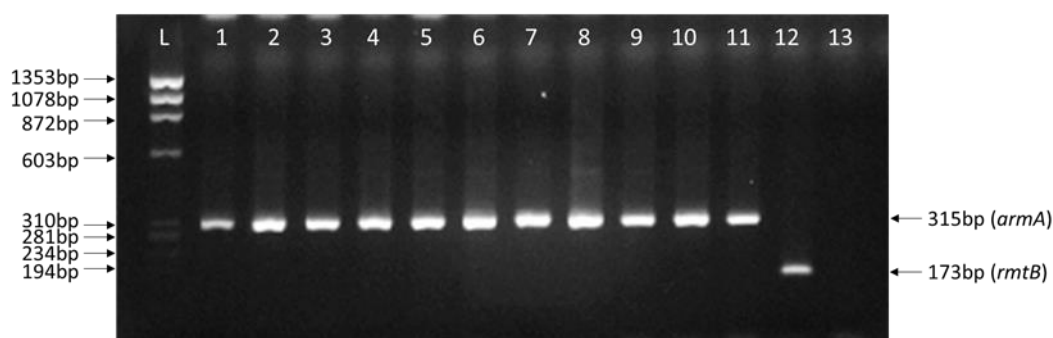
Πίνακας 27. Στελέχη *A. baumannii* που συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη.

Νοσοκομείο*	ΑΛΞ	ΑΤΤ	ΕΡΘ	ΣΩΤ	ΘΡΣ	ΣΥΝΟΛΟ
Αριθμός στελεχών ανθεκτικών στην αμικασίνη και την γενταμικίνη όπως χαρακτηρίστηκαν από τα τοπικά μικροβιολογικά εργαστήρια **	74	18	114	48	93	347
Αριθμός στελεχών που βρέθηκαν ανθεκτικά στην αμικασίνη, την γενταμικίνη και την τομπραμυκίνη στο κεντρικό εργαστήριο	73	17	113	48	90	341
Αριθμός στελεχών με MIC ≥ 256 mg/L στην αμικασίνη, την γενταμικίνη και την τομπραμυκίνη	72	17	109	46	88	332
Αριθμός στελεχών που έφεραν το <i>armA</i>	71	17	105	46	86	325

*ΑΛΞ, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών "Αλεξάνδρα"; ΑΤΤ, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών "Αττικόν"; ΕΡΘ, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών "Κοργιαλένιο Μπενάκειο ΕΕΣ"; ΣΩΤ, Γενικό Νοσοκομείο Νοσημάτων Θώρακος Αθηνών "Η Σωτηρία"; ΘΡΣ, Γενικό Νοσοκομείο Ελευσίνας "Θριάσιο"

** Στελέχη με MICs υψηλότερες από τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν στα μικροβιολογικά εργαστήρια των νοσοκομείων (συνήθως αμικασίνη >32mg/L, γενταμικίνη >8 mg/L)

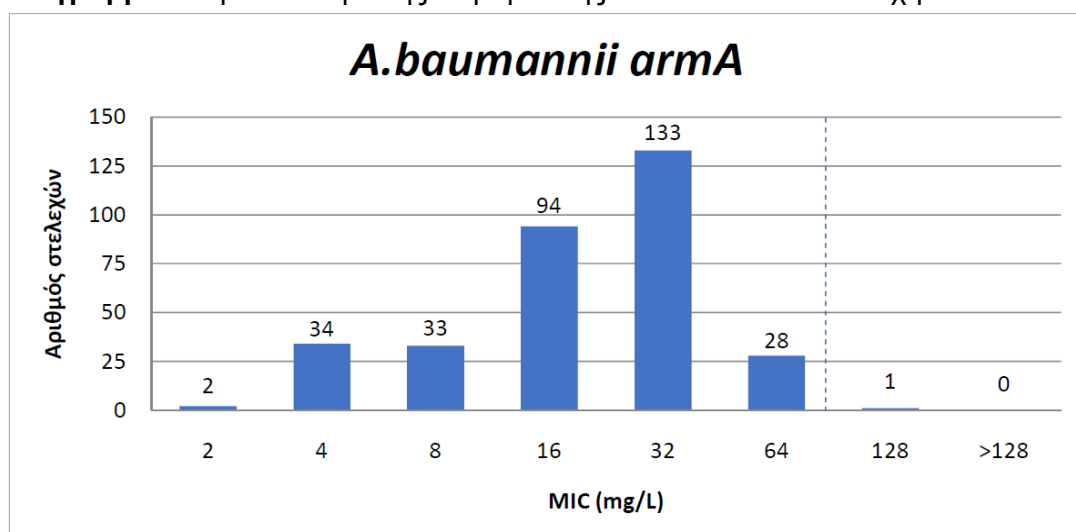
Εικόνα 27. Ανίχνευση γονιδίου που κωδικοποιεί 16S rRNA μεθυλάση



Σειρά L : ΦΧ DNA/HaeIII Ladder
 Σειρές 1-10 : *armA* PCR προϊόντα από DNA στελεχών *A.baumannii*
 Σειρά 11 : *armA* θετικός μάρτυρας
 Σειρά 12 : *rmtB* θετικός μάρτυρας
 Σειρά 13 : αρνητικός μάρτυρας

Η μεγάλη πλειονότητα των στελεχών *A. baumannii* με *armA* ήταν PDR (66.8%), ενώ το υπόλοιπο 33.2% ήταν XDR, με ευαισθησία μόνο στην κολλιστίνη (15.4%) και την τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη (17.8%). Σημαντικά χαμηλότερο ήταν το ποσοστό ευαισθησίας στη μινοκυκλίνη (3.7%), ενώ η τιγκεκυκλίνη και η απραμυκίνη επέδειξαν τιμές MIC_{50/90} 4/8 και 16/32 mg/L αντίστοιχα. 324 των στελεχών (97.7%) ανεστάλησαν από την απραμυκίνη σε συγκέντρωση ≤64 mg/L, που είναι η προτεινόμενη τιμή του επιδημιολογικού ορίου αντοχής (Πίνακας 28, Διάγραμμα 1).

Διάγραμμα 1. Δραστηκότητα της απραμυκίνης σε *armA*-θετικά στελέχη *A.baumannii*.



*Η διακεκομμένη γραμμή σηματοδοτεί την τιμή του επιδημιολογικού ορίου αντοχής για την απραμυκίνη, που έχει προταθεί από τους Kang *et al.*, 2017.

Πίνακας 28. *In vitro* δραστικότητα κολιστίνης, μινοκυκλίνης, τιγκεκυκλίνης, τριμεθοπρίμης / σουλφαμεθοξαζόλης και απραμυκίνης έναντι 325 στελεχών *A. baumannii* που φέρουν το *armA*.

Αντιμικροβιακός παράγοντας	Αριθμός στελεχών /(% στελέχη) που ανεστάλησαν σε MIC (mg/L) ίση με									MIC ₅₀ (mg/L)	MIC ₉₀ (mg/L)	Κλινικό όριο για S; R ^α (mg/L)	S (%)	R (%)
	0.5	1	2	4	8	16	≥32	64	>64					
Κολιστίνη	0 (0)	27 (8.3)	23 (15.4)	5 (16.9)	11 (20.3)	34 (30.8)	225 (100)	ND	ND	>16	>16	≤2; >2	15.4	84.6
Μινοκυκλίνη^β	0 (0)	2 (0.6)	3 (1.5)	7 (3.7)	60 (22.2)	240 (96.0)	13 (100)	ND	ND	16	16	≤4; >8 ^β	3.7	77.8
Τιγκεκυκλίνη	0 (0)	1 (0.3)	47 (14.8)	196 (75.1)	71 (96.9)	9 (99.7)	1 (100)	ND	ND	4	8	IE ^γ	-	-
Τριμεθοπρίμη / σουλφαμεθοξαζόλη^δ	9 (2.8)	37 (14.2)	12 (17.8)	4 (19.1)	3 (20.0)	4 (21.2)	256 (100)			>16	>16	≤2; >4	17.8	80.9
Απραμυκίνη	0 (0)	0 (0)	2 (0.6)	34 (11.1)	33 (21.2)	94 (50.2)	133 (91.1)	28 (99.7)	1 (100)	16	32	NA ^ε	99.7	

^α S, ευαίσθητο; R, ανθεκτικό

^β Κλινικό όριο μινοκυκλίνης του CLSI

^γ "IE" υποδεικνύει ότι δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία ότι ο οργανισμός είναι ένας καλός στόχος για θεραπεία με τον παράγοντα

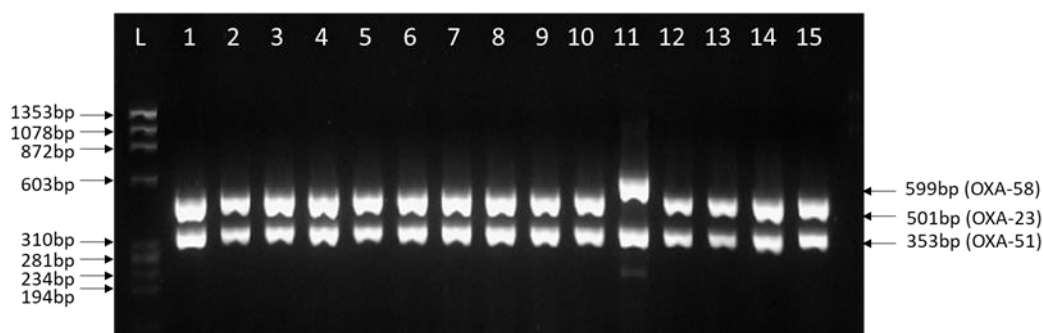
^δ Τριμεθοπρίμη / σουλφαμεθοξαζόλη σε αναλογία 1:19. Οι MICs εκφράζονται ως η συγκέντρωση τριμεθοπρίμης

^ε NA, δεν υπάρχει. Εφαρμόστηκε επιδημιολογικό όριο αντοχής 64 mg / L.

Η παραγωγή καρβαπενεμάσης επιβεβαιώθηκε σε όλα τα στελέχη (100%), με τα 320 (98.5%) να παράγουν OXA-23, 4 (1.2%) OXA-24, και 1 (0.3%) OXA-58 (Πίνακας 29, Εικόνα 28).

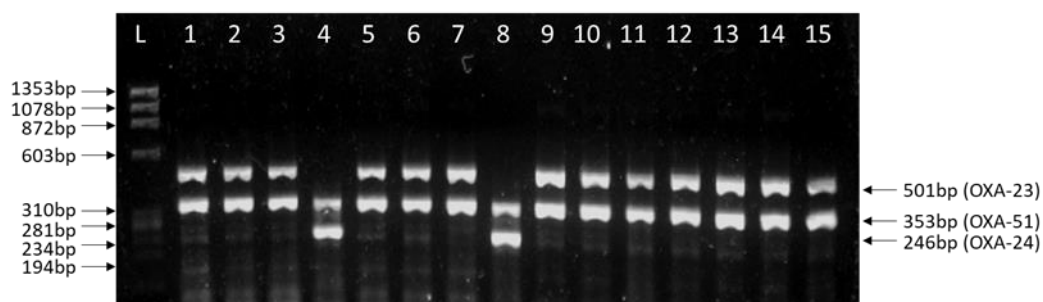
Σχεδόν όλα τα στελέχη *A. baumannii* που παράγουν OXA-23 και φέρουν το *armA* (99.4%) τυποποιήθηκαν ως ομάδα αλληλουχίας G1 που αντιστοιχεί στον IC II, με μόνο δύο στελέχη να τυποποιούνται ως G4 (Πίνακας 29, Εικόνα 29). Τα PCR προϊόντα των G4 διαφέρουν από αυτά του IC II μόνο ως προς την απουσία του *csuE*, το οποίο θα μπορούσε απλώς να οφείλεται σε έναν πολυμορφισμό στις περιοχές πρόσδεσης των εκκινητών. Τα τέσσερα στελέχη που παρήγαγαν την OXA-24, είχαν απομονωθεί στο ίδιο νοσοκομείο, και τυποποιήθηκαν ως G6 με τα PCR προϊόντα να περιλαμβάνουν το *csuE* του IC II και τα *ompA* και *bla_{OXA-51}*-like του IC I. Το μοναδικό στέλεχος που παρήγαγε OXA-58 τυποποιήθηκε ως G2 που αντιστοιχεί στο IC I (Πίνακας 29).

Εικόνα 28. Ανίχνευση γονιδίου που κωδικοποιεί καρβαπενεμάση τύπου OXA



Σειρά L : ΦX DNA/HaeIII Ladder

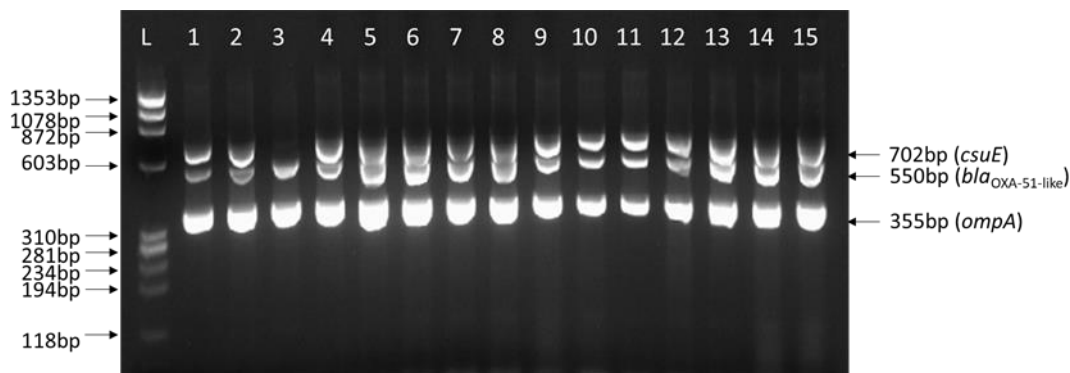
Σειρές 1-15 : *bla_{OXA}* PCR προϊόντα από DNA στελεχών *A.baumannii* μετά από multiplex OXA PCR



Σειρά L : ΦX DNA/HaeIII Ladder

Σειρές 1-11 : *bla_{OXA}* PCR προϊόντα από DNA στελεχών *A.baumannii* μετά από multiplex OXA PCR

Εικόνα 29. Ανίχνευση γονιδίων *ompA*, *csuE*, *bla*_{OXA-51-like} με την Group I multiplex PCR



Σειρά L : ΦΧ DNA/HaeIII Ladder

Σειρές 1-15 : Προϊόντα της Group I multiplex PCR σε DNA στελεχών *A.baumannii*

Πίνακας 29. Επιδημιολογικά και γονοτυπικά χαρακτηριστικά των στελεχών *A. baumannii* που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη

Ομάδες αλληλουχιών ^α	Κλώνος ^β	Γονίδιο <i>bla</i>	<i>armA</i>	Αριθμός στελεχών	Ποσοστό (%)
G1	IC II	OXA-23	+	318	97.8
G4	IC II	OXA-23	+	2	0.6
G6	CC78	OXA-24	+	4	1.2
G2	IC I	OXA-58	+	1	0.3

^α Οι ομάδες αλληλουχιών προσδιορίστηκαν με πολυπλεκτική PCR τριών σημείων

^β Αντίστοιχος κλώνος

IC, διεθνής κλώνος; CC, κλωνικό σύμπλεγμα

5. Εντεροβακτηριακά

Τα ανθεκτικά στην αμικασίνη και την γενταμικίνη Εντεροβακτηριακά στελέχη, απομονώθηκαν στα συμμετέχοντα νοσοκομεία με μέσο ποσοστό 55.1% (min 0%, max 72%) για τα στελέχη *P.stuartii*, 3.4% για τα στελέχη *P.mirabilis*, 10.3% (min 5.8%, max 25.6%) για τα στελέχη *K.pneumoniae* και 0.4% (min 0%, max 2.4%) για τα στελέχη *E.coli*. Καθένα από τα πέντε νοσοκομεία συνέβαλε από 1 έως 18 στελέχη *P. stuartii* (σύνολο 33), από 0 έως

4 στελέχη *P. mirabilis* (σύνολο 8) και από 8 έως 31 στελέχη *K. pneumoniae* (σύνολο 111) (Πίνακες 30-32). Δύο νοσοκομεία έστειλαν από 1 στέλεχος *E. coli* (σύνολο 2) (Πίνακας 33).

Στο εργαστήριο αναφοράς, 31 στελέχη *P. stuartii* (93.9%), 6 στελέχη *P. mirabilis* (75%), 42 στελέχη *K. pneumoniae* (37.8%) και τα 2 *E. coli* (100%) επιβεβαιώθηκαν ως ανθεκτικά στην αμικασίνη, τη γενταμικίνη και τομπραμυκίνη με ταυτόχρονα υψηλές MICs ≥ 256 mg/L, και έφεραν ένα γονίδιο που κωδικοποιούσε RMT (Πίνακες 30-33). Η συντριπτική πλειοψηφία (98.8%) των Εντεροβακτηριακών που παρήγαγαν RMT έφερε το *rmtB* και μόνο ένα στέλεχος *K. pneumoniae* έφερε το γονίδιο *armA* (Πίνακες 30-33, Εικόνα 30). Ο επιπολασμός των RMTs στο σύνολο των στελεχών κάθε είδους υπολογίστηκε με δεδομένα των συνεργαζόμενων νοσοκομείων για το πρώτο εξάμηνο του 2016 και υπολογίστηκε σε 55.1% για *P. stuartii*, 3.9% για *K. pneumoniae* και 0.35% για *E. coli*.

Όλα τα στελέχη παρήγαγαν καρβαπενεμάση και ήταν ανθεκτικά σε πολλαπλά αντιμικροβιακά φάρμακα, παρουσιάζοντας αντοχή σε πενικιλίνες, πενικιλίνες + αναστολείς β-λακταμάσης, κεφαλοσπορίνες, κεφαμυσίνες, μονοβακτάμες, αντιψευδομοναδικές πενικιλίνες + αναστολείς β-λακταμασών, καρβαπενέμες, αναστολείς μονοπατιών φυλλικού οξέος και αμινογλυκοσίδες.

Πίνακας 30. Στελέχη *P. stuartii* που συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη.

Νοσοκομείο*	ΑΛΞ	ΑΤΤ	ΕΡΘ	ΣΩΤ	ΘΡΣ	ΣΥΝΟΛΟ
Αριθμός στελεχών ανθεκτικών στην αμικασίνη και την γενταμικίνη όπως χαρακτηρίστηκαν από τα τοπικά μικροβιολογικά εργαστήρια **	1	1	18	1	12	33
Αριθμός στελεχών με MIC ≥ 256 mg/L στην αμικασίνη, την γενταμικίνη και την τομπραμυκίνη	1	1	18	1	11	32
Αριθμός στελεχών που έφεραν το <i>rmtB</i>	1	1	18	1	10	31
VIM	1	1	18	1	10	31
SHV	1	1	18	1	10	31

*ΑΛΞ, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών "Αλεξάνδρα"; ΑΤΤ, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών "Αττικόν"; ΕΡΘ, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών "Κοργιαλένιο Μπενάκειο ΕΕΣ"; ΣΩΤ, Γενικό Νοσοκομείο Νοσημάτων Θώρακος Αθηνών "Η Σωτηρία"; ΘΡΣ, Γενικό Νοσοκομείο Ελευσίνας "Θριάσιο"

** Στελέχη με MICs υψηλότερες από την μεγαλύτερες συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν στα μικροβιολογικά εργαστήρια των νοσοκομείων (συνήθως αμικασίνη >32 mg/L, γενταμικίνη >8 mg/L)

Πίνακας 31. Στελέχη *P. mirabilis* που συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη.

Νοσοκομείο*	ΑΛΞ	ΑΤΤ	ΕΡΘ	ΣΩΤ	ΘΡΣ	ΣΥΝΟΛΟ
Αριθμός στελεχών ανθεκτικών στην αμικασίνη και την γενταμικίνη όπως χαρακτηρίστηκαν από τα τοπικά μικροβιολογικά εργαστήρια **	4	1	0	2	1	8
Αριθμός στελεχών με MIC ≥ 256 mg/L στην αμικασίνη, την γενταμικίνη και την τομπραμυκίνη	2	1		2	1	6
Αριθμός στελεχών που έφεραν το rmtB	2	1		2	1	6
VIM	2	1		2	1	6
SHV				2		2

*ΑΛΞ, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών “Αλεξάνδρα”; ΑΤΤ, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών “Αττικόν”; ΕΡΘ, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών “Κοργιαλένιο Μπενάκειο ΕΕΣ”; ΣΩΤ, Γενικό Νοσοκομείο Νοσημάτων Θώρακος Αθηνών “Η Σωτηρία”; ΘΡΣ, Γενικό Νοσοκομείο Ελευσίνας “Θριάσιο”

** Στελέχη με MICs υψηλότερες από την μεγαλύτερες συγκέντρωσεις που ελέγχθηκαν στα μικροβιολογικά εργαστήρια των νοσοκομείων (συνήθως αμικασίνη >32 mg/L, γενταμικίνη >8 mg/L)

Πίνακας 32. Στελέχη *K. pneumoniae* που συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη.

Νοσοκομείο*	ΑΛΞ	ΑΤΤ	ΕΡΘ	ΣΩΤ	ΘΡΣ	ΣΥΝΟΛΟ
Αριθμός στελεχών ανθεκτικών στην αμικασίνη και την γενταμικίνη όπως χαρακτηρίστηκαν από τα τοπικά μικροβιολογικά εργαστήρια **	22	8	31	28	22	111
Αριθμός στελεχών με MIC ≥ 256 mg/L στην αμικασίνη, την γενταμικίνη και την τομπραμυκίνη	5	4	16	14	3	42
Αριθμός στελεχών που έφεραν το rmtB	5	3	16	14	3	41
KPC	3	3	15	11	2	34
KPC+VIM	2				1	3
VIM			1			1
OXA-48				3		3
Αριθμός στελεχών που έφεραν το armA		1				1
OXA-48		1				1

*ΑΛΞ, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών “Αλεξάνδρα”; ΑΤΤ, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών “Αττικόν”; ΕΡΘ, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών “Κοργιαλένιο Μπενάκειο ΕΕΣ”; ΣΩΤ, Γενικό Νοσοκομείο Νοσημάτων Θώρακος Αθηνών “Η Σωτηρία”; ΘΡΣ, Γενικό Νοσοκομείο Ελευσίνας “Θριάσιο”

** Στελέχη με MICs υψηλότερες από την μεγαλύτερες συγκέντρωσεις που ελέγχθηκαν στα μικροβιολογικά εργαστήρια των νοσοκομείων (συνήθως αμικασίνη >32 mg/L, γενταμικίνη >8 mg/L)

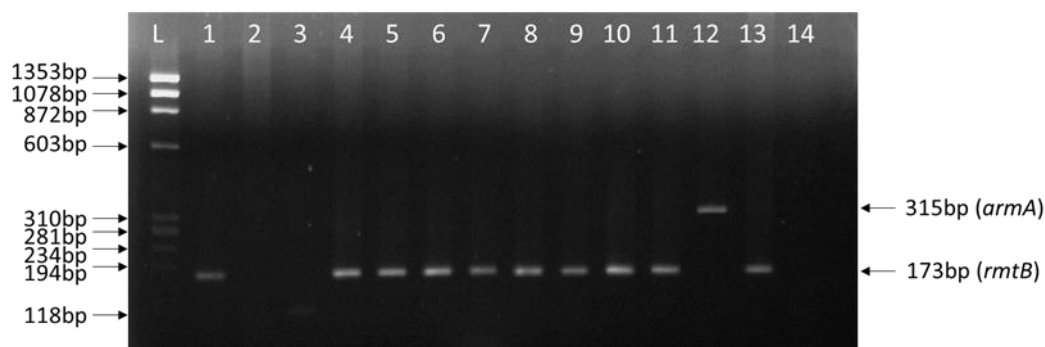
Πίνακας 33. Στελέχη *E. coli* που συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη.

Νοσοκομείο*	ΑΛΞ	ΑΤΤ	ΕΡΘ	ΣΩΤ	ΘΡΣ	ΣΥΝΟΛΟ
Αριθμός στελεχών ανθεκτικών στην αμικασίνη και την γενταμικίνη όπως χαρακτηρίστηκαν από τα τοπικά μικροβιολογικά εργαστήρια **	1	1	0	0	0	2
Αριθμός στελεχών με MIC \geq 256mg/L στην αμικασίνη, την γενταμικίνη και την τομπραμυκίνη	1	1				2
Αριθμός στελεχών που έφεραν το <i>rmtB</i>	1	1				2
VIM	1	1				2
SHV		1				1

*ΑΛΞ, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών “Αλεξάνδρα”; ΑΤΤ, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών “Αττικόν”; ΕΡΘ, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών “Κοργιαλένιο Μπενάκειο ΕΕΣ”; ΣΩΤ, Γενικό Νοσοκομείο Νοσημάτων Θώρακος Αθηνών “Η Σωτηρία”; ΘΡΣ, Γενικό Νοσοκομείο Ελευσίνας “Θριάσιο”

** Στελέχη με MICs υψηλότερες από την μεγαλύτερες συγκέντρωσεις που ελέγχθηκαν στα μικροβιολογικά εργαστήρια των νοσοκομείων (συνήθως αμικασίνη >32mg/L, γενταμικίνη >8 mg/L)

Εικόνα 30. Ανίχνευση γονιδίου που κωδικοποιεί 16S rRNA μεθυλάση σε Εντεροβακτηριακά στελέχη



Σειρά L : ΦΧ DNA/HaeIII Ladder

Σειρές 1-11 : PCR προϊόντα από DNA Εντεροβακτηριακών στελεχών μετά από multiplex RMT PCR.

Σειρά 12 : *armA* θετικός μάρτυρας

Σειρά 13 : *rmtB* θετικός μάρτυρας

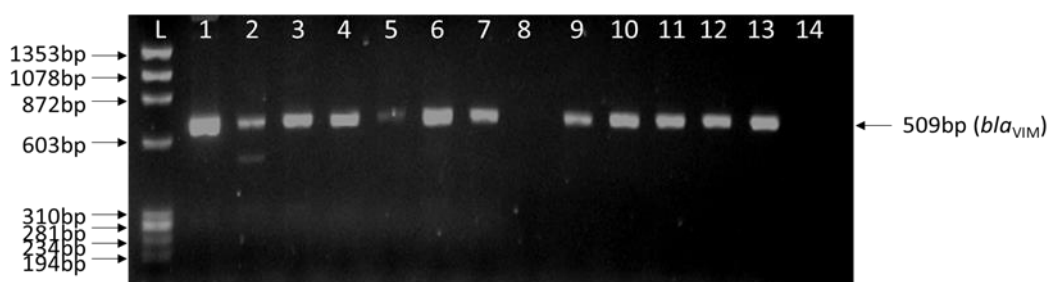
Σειρά 14 : Αρνητικός μάρτυρας

5.1 *Providencia stuartii*

Τα στελέχη *P. stuartii* παρήγαγαν αποκλειστικά καρβαπενεμάση τύπου VIM, μαζί με ESBL τύπου VEB και SHV και β-λακταμάσες τύπου TEM και OXA-10 (Εικόνες 31-35). Όλα τα στελέχη ήταν ανθεκτικά στη σιπροφλοξασίνη, την τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη και τη χλωραμφαινικόλη, με μόνο τη μεροπενέμη να διατηρεί δραστικότητα έναντι του 16.7% των στελεχών (Πίνακας 34).

Τα δεδομένα της PFGE έδειξαν τέσσερις κλώνους στους οποίους ανήκαν τα 31 στελέχη *P. stuartii* (Σχήμα 1). Τα περισσότερα ανήκαν σε ένα προφίλ PFGE (71.0%, 22/31 στελέχη), το οποίο βρέθηκε σε τέσσερα από τα πέντε νοσοκομεία που συμμετείχαν σε αυτή τη μελέτη.

Εικόνα 31. Ανίχνευση *bla_{VIM}* μετά από PCR με ειδικούς εκκινητές



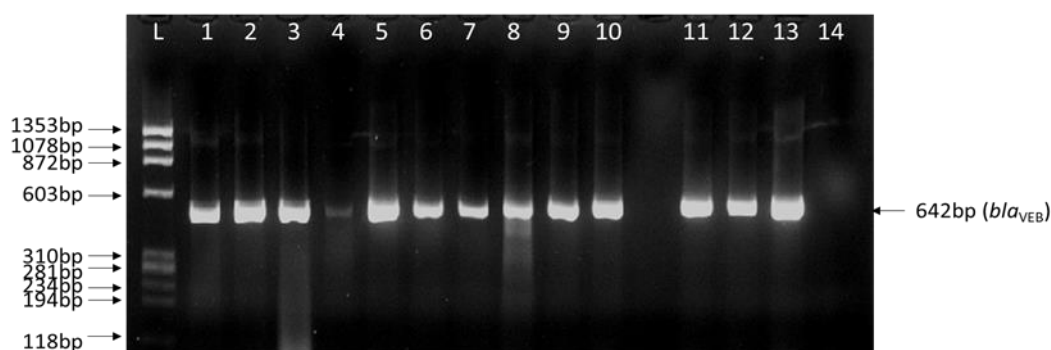
Σειρά L : ΦΧ DNA/HaeIII Ladder

Σειρές 1-12 : PCR προϊόντα από DNA Εντεροβακτηριακών στελεχών

Σειρά 13 : *bla_{VIM}* θετικός μάρτυρας

Σειρά 14 : αρνητικός μάρτυρας

Εικόνα 32. Ανίχνευση *bla_{VEB}* μετά από PCR με ειδικούς εκκινητές



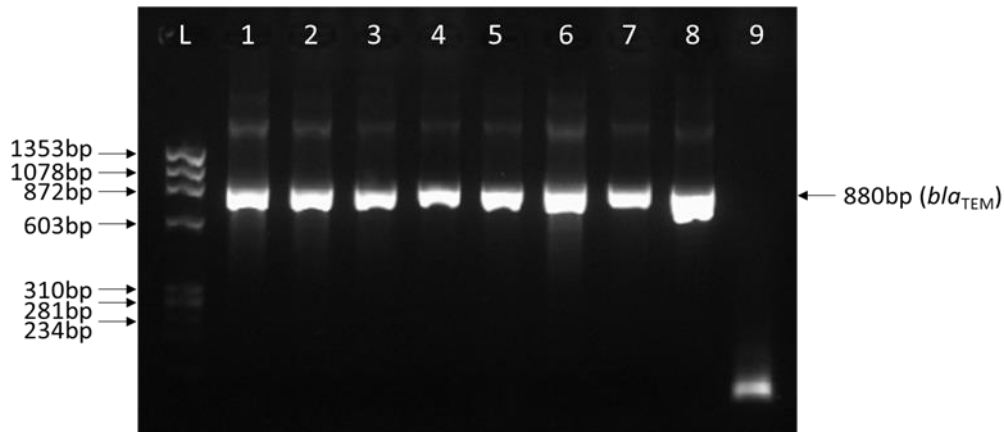
Σειρά L : ΦΧ DNA/HaeIII Ladder

Σειρές 1-12 : PCR προϊόντα από DNA Εντεροβακτηριακών στελεχών

Σειρά 13 : *bla_{VIM}* θετικός μάρτυρας

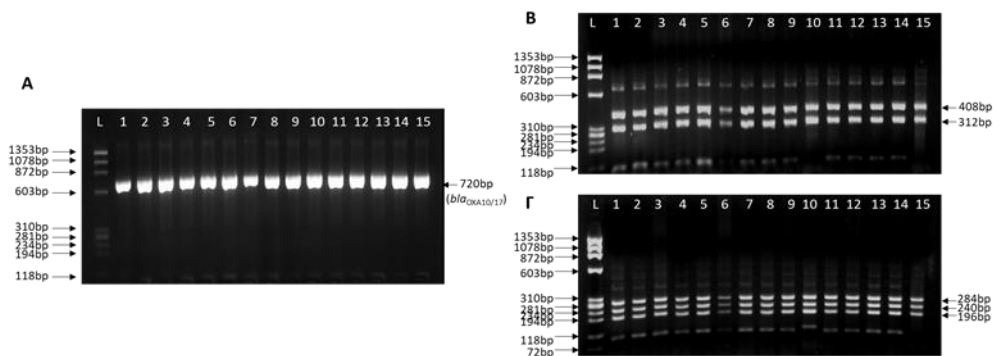
Σειρά 14 : αρνητικός μάρτυρας

Εικόνα 33. Ανίχνευση *bla*_{TEM} μετά από PCR με ειδικούς εκκινητές



Σειρά L : ΦΧ DNA/HaeIII Ladder
 Σειρές 1-7 : PCR προϊόντα από DNA Εντεροβακτηριακών στελεχών
 Σειρά 8 : *bla*_{TEM} θετικός μάρτυρας
 Σειρά 9 : αρνητικός μάρτυρας

Εικόνα 34. Ανίχνευση *bla*_{OXA-10} μετά από PCR με ειδικούς εκκινητές (Α) και πέψη του PCR προϊόντος με περιοριστικές ενδονουκλεάσες PvuII (Β) και HaeIII (Γ)

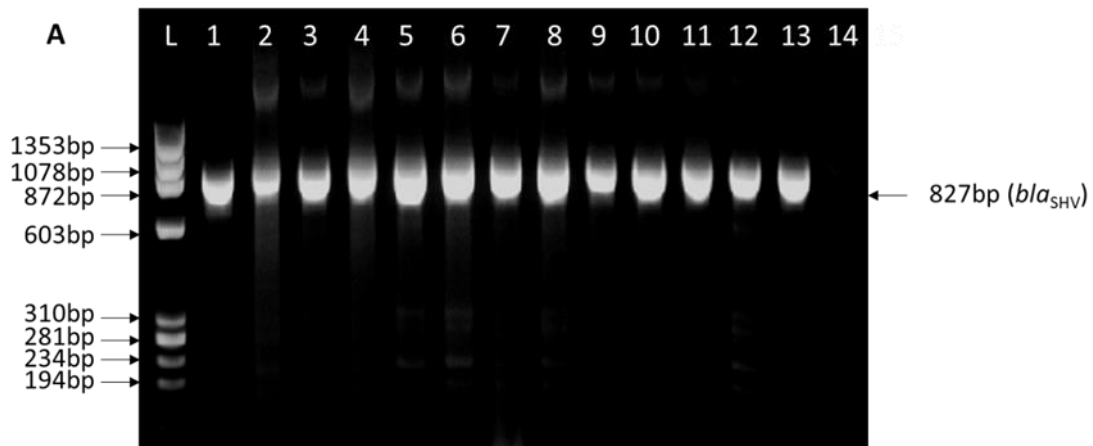


A
 Σειρά L : ΦΧ DNA/HaeIII Ladder
 Σειρές 1-15 : PCR προϊόντα από DNA Εντεροβακτηριακών στελεχών

B
 Σειρά L : ΦΧ DNA/HaeIII Ladder
 Σειρές 1-15 : *bla*_{OXA10} PCR προϊόντα μετά από πέψη με PvuII

Γ
 Σειρά L : ΦΧ DNA/HaeIII Ladder
 Σειρές 1-15 : *bla*_{OXA10} PCR προϊόντα μετά από πέψη με HaeIII

Εικόνα 35. Ανίχνευση *bla_{SHV}* μετά από PCR με ειδικούς εκκινητές (A) και πέψη του PCR προϊόντος με περιοριστική ενδονουκλεάση *NheI* για διαφοροποίηση των SHV τύπου ESBL (B)

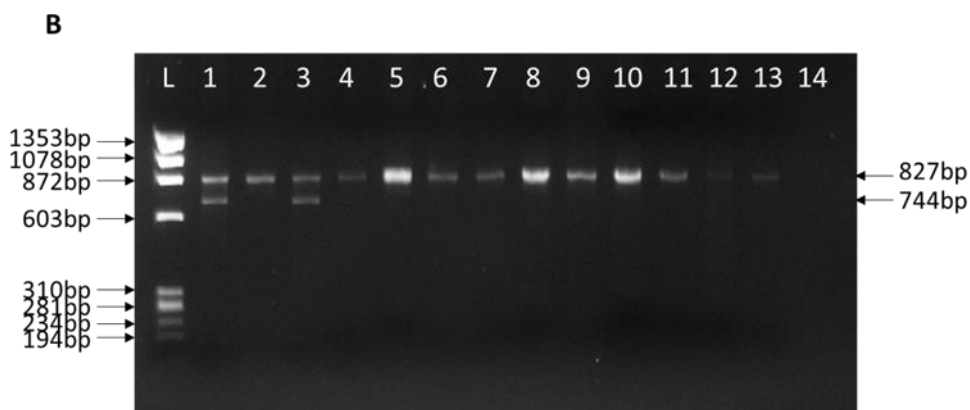


Σειρά L : ΦΧ DNA/*HaeIII* Ladder

Σειρές 1-12 : PCR προϊόντα από DNA Εντεροβακτηριακών στελεχών

Σειρά 13 : *bla_{SHV}* θετικός μάρτυρας

Σειρά 14 : αρνητικός μάρτυρας



Σειρά L : ΦΧ DNA/*HaeIII* Ladder

Σειρές 1-12 : PCR προϊόντα από DNA Εντεροβακτηριακών στελεχών μετά από πέψη με *NheI*

Σειρά 13 : *bla_{SHV-5}* θετικός μάρτυρας

Σειρά 14 : αρνητικός μάρτυρας

Πίνακας 34. Ευαισθησίες των στελεχών *P.stuartii* (n = 31) που έφεραν RMT

Αντιμικροβιακός παράγοντας	MIC (mg/L)			Κλινικό όριο ευαισθησίας (mg/L)	Ευαισθησία (%)
	Εύρος	MIC ₅₀	MIC ₉₀		
Ιμιπενέμη	8->64	16	128	≤0.12	0.0
Μεροπενέμη	0.5->64	4	128	≤2	16.7
Σιπροφλοξασίνη	2->64	8	64	≤0.25	0.0
Χλωραμφαινικόλη	32->64	128	128	≤8	0.0
Τριμεθοπρίμη / σουλφαμεθοξαζόλη ^α	>32	>32	>32	≤2	0.0
Απραμυκίνη	8-128	16	32	≤8 ^β	22.6

^α Τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη σε αναλογία 1:19. Οι MICs εκφράζονται ως η συγκέντρωση της τριμεθοπρίμης.

^β Όρια κατηγοριοποίησης της απραμυκίνης (S; ≤8 mg/L, R; ≥64 mg/L) με βάση την πιο πρόσφατη έκθεση National Antibiotic Resistance Monitoring Study (NARMS).

5.2 *Proteus mirabilis*

Όλα τα στελέχη *P. mirabilis* παρήγαγαν επίσης καρβαπενεμάση τύπου VIM και ESBL τύπου VEB (n = 6). Δύο από τα στελέχη παρήγαγαν επίσης ESBL τύπου SHV, ενώ όλα τα στελέχη παρήγαγαν β-λακταμάσες τύπου OXA10/17 και TEM (Εικόνες 31-35). Η φωσφομυκίνη και η μεροπενέμη ήταν οι μόνοι αντιμικροβιακοί παράγοντες που διατήρησαν δραστηριότητα έναντι πέντε (83.3%) και τεσσάρων από τα έξι (66.7%) στελέχη *P. mirabilis* αντίστοιχα (Πίνακας 35). Τα δεδομένα της PFGE έδειξαν πέντε κλώνους *P. mirabilis* (Σχήμα 2). Μόνο δύο στελέχη από το ίδιο το νοσοκομείο είχαν παρόμοιο προφίλ.

Πίνακας 35. Ευαισθησίες των στελεχών *P.mirabilis* (n = 6) που έφεραν RMT

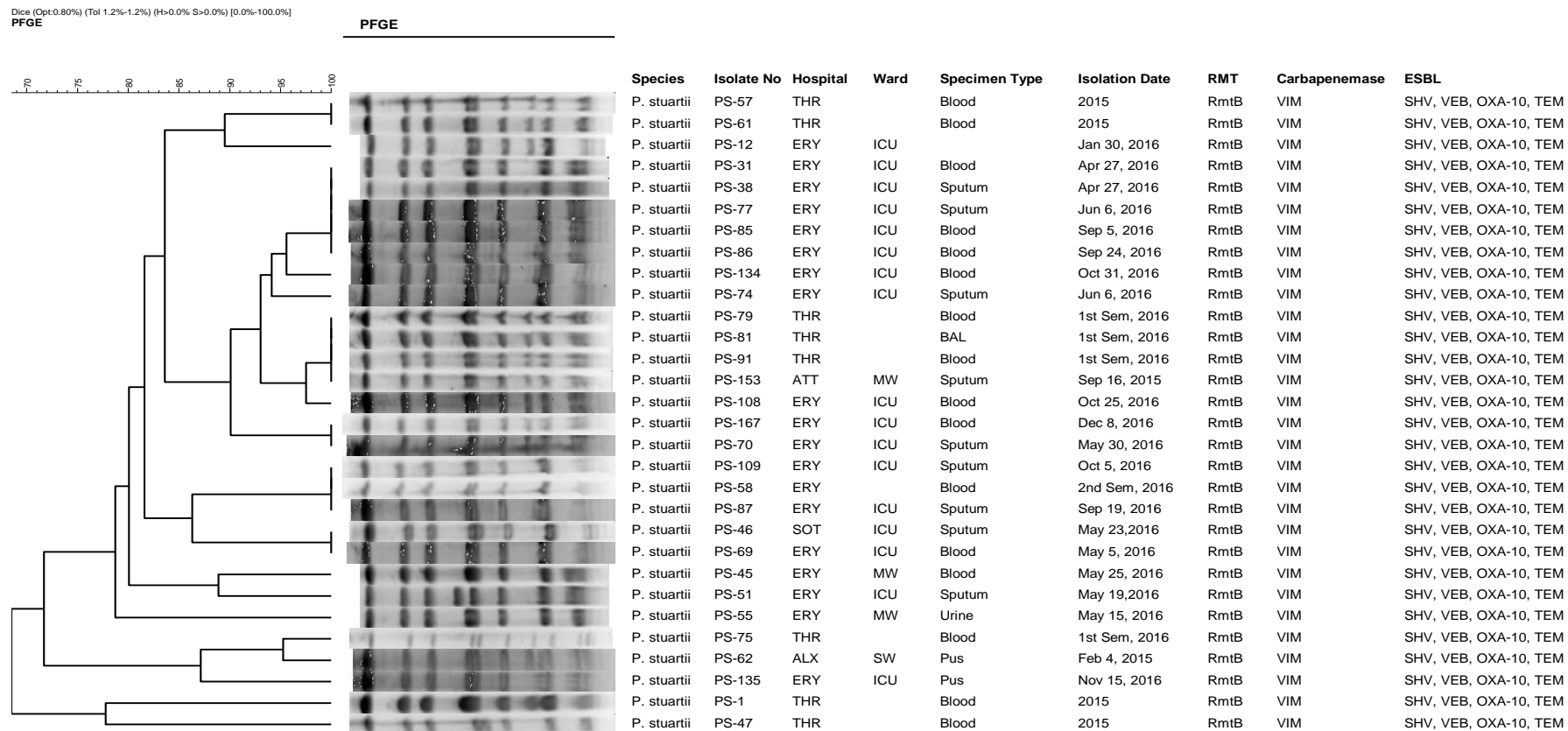
Αντιμικροβιακός παράγοντας	MIC (mg/L)			Κλινικό όριο ευαισθησίας (mg/L)	Ευαισθησία (%)
	Εύρος	MIC ₅₀	MIC ₉₀		
Ιμιπενέμη	4->64	NA ^β	NA	≤0.12	0.0
Μεροπενέμη	0.12-16	NA	NA	≤2	66.7
Σιπροφλοξασίνη	1-64	NA	NA	≤0.25	0.0
Χλωραμφαινικόλη	64->128	NA	NA	≤8	0.0
Φωσφομυκίνη	1->1024	NA	NA	≤32	83.3
Τριμεθοπρίμη / σουλφαμεθοξαζόλη ^α	32	NA	NA	≤2	0.0
Απραμυκίνη	16-64	NA	NA	≤8 ^γ	0.0

^α Τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη σε αναλογία 1:19. Οι MICs εκφράζονται ως η συγκέντρωση της τριμεθοπρίμης.

^β Οι MIC₅₀/MIC₉₀ δεν υπολογίστηκαν λόγω του μικρού αριθμού στελεχών (μικρότερο από 10).

^γ Όρια κατηγοριοποίησης της απραμυκίνης (S; ≤8 mg/L, R; ≥64 mg/L) με βάση την πιο πρόσφατη έκθεση National Antibiotic Resistance Monitoring Study (NARMS).

Σχήμα 1. Γενετική σχέση των στελεχών *Providencia stuartii* που φέρουν το *rmtB* που μελετήθηκαν, όπως αποτυπώνεται από το δένδρογραμμα και τον μοριακό χαρακτηρισμό.



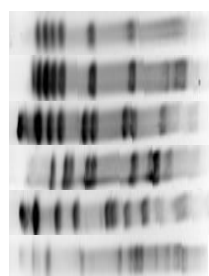
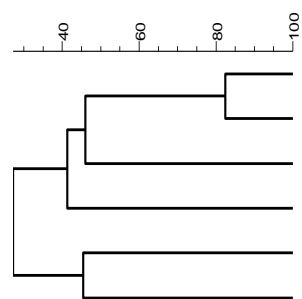
* ALX, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών “Αλεξάνδρα”; ATT, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών “Αττικόν”; ERY, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών “Κοργιαλένιο Μπενάκειο ΕΕΣ”; SOT, Γενικό Νοσοκομείο Νοσημάτων Θώρακος Αθηνών “Η Σωτηρία”; THR, Γενικό Νοσοκομείο Ελευσίνας “Θριάσιο”; MW, παθολογικός τομέας; SW, χειρουργικός τομέας; ICU, μονάδα εντατικής θεραπείας; IVCT, άκρη ενδοφλέβιου καθετήρα; RMT, 16S rRNA μεθυλάση; ESBL, ευρέως φάσματος β-λακταμάσες

Σχήμα 2. Γενετική σχέση των στελεχών *Proteus mirabilis* που φέρουν το *rmtB* που μελετήθηκαν, όπως αποτυπώνεται από το δένδρογραμμα και τον μοριακό χαρακτηρισμό.

Dice (Opt:0.80%) (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

PFGE

PFGE



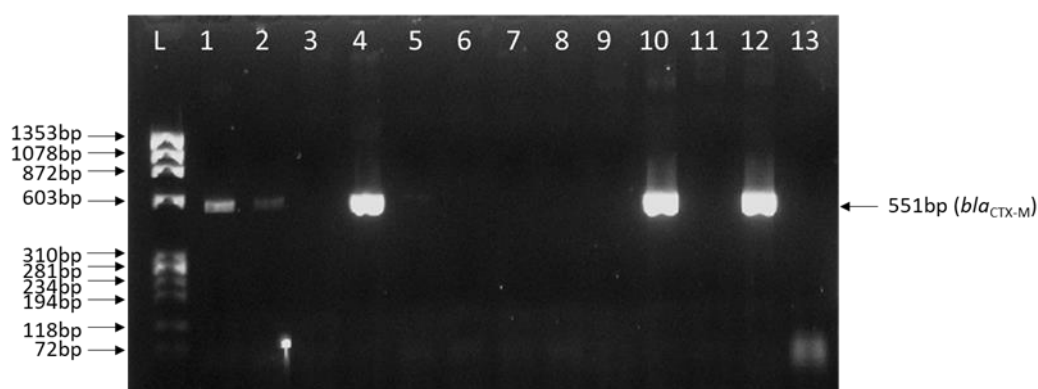
Species	Isolate No	Hospital	Ward	Specimen type	Collection date	RMT	Carbapenemase	ESBL
<i>P. mirabilis</i>	PM-81	SOT	MW	IVCT	Dec 13, 2016	RmtB	VIM	SHV, VEB, OXA-10, TEM
<i>P. mirabilis</i>	PM-84	SOT	ICU	Blood	Dec 21, 2016	RmtB	VIM	SHV, VEB, OXA-10, TEM
<i>P. mirabilis</i>	PM-122	ATT	MW	Urine	Jul 8, 2015	RmtB	VIM	VEB, OXA-10, TEM
<i>P. mirabilis</i>	PM-4	ALX	MW	Stool	Feb 6, 2015	RmtB	VIM	VEB, OXA-10, TEM
<i>P. mirabilis</i>	PM-23	ALX	MW	Urine	Jul 2, 2015	RmtB	VIM	VEB, OXA-10, TEM
<i>P. mirabilis</i>	PM-148	THR	ICU		2nd Sem, 2016	RmtB	VIM	VEB, OXA-10, TEM

* ALX, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών “Αλεξάνδρα”; ATT, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών “Αττικόν”; ERY, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών “Κοργιαλένιο Μπενάκειο ΕΕΣ”; SOT, Γενικό Νοσοκομείο Νοσημάτων Θώρακος Αθηνών “Η Σωτηρία”; THR, Γενικό Νοσοκομείο Ελευσίνας “Θριάσιο”; MW, παθολογικός τομέας; SW, χειρουργικός τομέας; ICU, μονάδα εντατικής θεραπείας; IVCT, άκρη ενδοφλέβιου καθετήρα; RMT, 16S rRNA μεθυλάση; ESBL, ευρέος φάσματος β-λακταμάσες

5.3 *Escherichia coli*

Ένα στέλεχος *E. coli* που έφερε το *rmtB* παρήγαγε καρβαπενεμάση τύπου VIM, ESBLs τύπου VEB και SHV και β-λακταμάσες τύπου TEM- και OXA-10/17 και διατήρησε την ευαισθησία στις καρβαπενέμες, με MIC 1mg/L σε ιμιπενέμη και μεροπενέμη. Το στέλεχος αυτό ήταν επίσης ευαίσθητο στην κολιστίνη, στην τιγκεκυκλίνη και στη φωσφομυκίνη. Το δεύτερο στέλεχος *E. coli* με το *rmtB* παρήγαγε επίσης καρβαπενεμάση τύπου VIM, CTX-M τύπου ESBL και β-λακταμάση τύπου OXA-10/17, ήταν ενδιάμεσα ανθεκτικό στις καρβαπενέμες (MIC 4mg/L) και ήταν ευαίσθητο στη σιπροφλοξασίνη, στη φωσφομυκίνη, στην κολιστίνη και στην τιγκεκυκλίνη (Εικόνες 31-36).

Εικόνα 36. Ανίχνευση *bla*_{CTX-M} μετά από PCR με ειδικούς εκκινητές



Σειρά L : ΦΧ DNA/HaeIII Ladder

Σειρές 1-15 : PCR προϊόντα από DNA Εντεροβακτηριακών στελεχών

5.4 *Klebsiella pneumoniae*

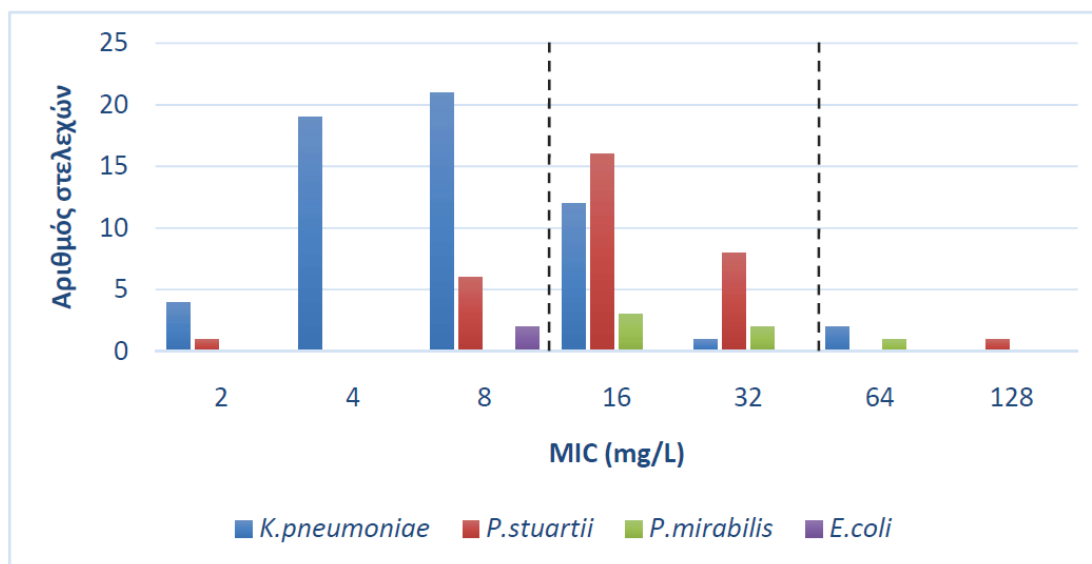
41 στελέχη *K. pneumoniae* (97.6%) έφεραν το *rmtB*, με 34 από αυτά (82.9%) να παράγουν καρβαπενεμάση τύπου KPC, 3 στελέχη (7.3%) δύο καρβαπενεμάσες τύπου KPC και τύπου VIM, 3 στελέχη (7.3%) OXA-48 και ένα στέλεχος (2.4%) καρβαπενεμάση τύπου VIM. Όλα τα στελέχη παρήγαγαν ESBL τύπου VEB και β-λακταμάσες OXA 10/17 και TEM τύπου (Πίνακας 36, Εικόνες 31-36). Τα στελέχη που παρήγαγαν VIM και αυτά που παρήγαγαν VIM και KPC, έφεραν επίσης το γονίδιο *bla*_{SHV} ESBL-τύπου, ενώ δύο από τα στελέχη KPC έφεραν το *bla*_{CTX-M}. Μόνο ένα στέλεχος *K. pneumoniae* (2.4%) έφερε το *armA*. Το στέλεχος παρήγαγε OXA-48 και έφερε τα γονίδια *bla*_{CTX-M} και *bla*_{TEM}.

Έναντι των 42 στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν RMT οι πιο δραστικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες, ήταν η φωσφομυκίνη με δραστικότητα έναντι του 95.2% των στελεχών και οι νέοι συνδυασμοί αναστολέων, κεφαζιδίδμη-αβιμπακτάμη και μεροπενέμη-βαμπορμπακτάμη, οι οποίοι ήταν δραστικοί έναντι του 90.5% των στελεχών (Πίνακας 36). Τα ανθεκτικά στην

κεφαζιδίμη-αβιμπακτάμη στελέχη παρήγαγαν MBL (ένα VIM - και τρία VIM και KPC). Τα ανθεκτικά στη μεροπενέμη-βαμπορμπακτάμη στελέχη παρήγαγαν OXA-48 (n = 2) ή VIM και KPC (n = 2). Είναι ενδιαφέρον ότι ένα από τα στελέχη VIM και ένα από τα KPC και VIM ήταν ευαίσθητα στην μεροπενέμη-βαμπορμπακτάμη. Τέλος, η κολιστίνη ήταν δραστική έναντι μόνο του 19.0% των στελεχών *K. pneumoniae* (Πίνακας 36). Κανένα από τα ανθεκτικά στελέχη δεν έφερε το γονίδιο *mcr*. Η απραμυκίνη, η αμινογλυκοσίδη που δεν επηρεάζεται από τα *rmtB* και *armA*, ήταν δραστική έναντι του 76.2% των στελεχών *K. pneumoniae* με βάση το όριο των 8mg/L, με εύρος MIC 2-128mg / L, MIC₅₀ 16mg/L και MIC₉₀ 32mg/L (Πίνακας 36). Δύο μόνο στελέχη *K. pneumoniae* παρουσίασαν MIC ≥64mg/L στην απραμυκίνη (Διάγραμμα 2).

Τα δεδομένα της PFGE, κατέταξαν τα 42 στελέχη *K. pneumoniae* σε 15 κλώνους (Σχήμα 3). Σε δυο προφίλ PFGE που αντιπροσώπευαν το 69% των στελεχών (29/42) και ήταν τα πιο διαδεδομένα, συμπεριλαμβάνονταν τα περισσότερα στελέχη που παρήγαγαν KPC. Τα στελέχη που έφεραν το *bla_{VIM}* ήταν πολυκλωνικά (τέσσερα προφίλ PFGE για τέσσερα στελέχη), ενώ εκείνα που έφεραν το *bla_{OXA-48}* (n = 4) ανήκαν στο πιο διαδεδομένο προφίλ. Το κυρίαρχο προφίλ PFGE ήταν παρόμοιο με το προφίλ που προέρχονταν από προηγούμενα χαρακτηρισμένα στελέχη που ανήκαν στον ST147 (17-KPC και 4-OXA-48 στελέχη), ακολουθούμενο από το ST258 (8-KPC στελέχη).

Διάγραμμα 2. Δραστικότητα της απραμυκίνης σε RMT-θετικά Εντεροβακτηριακά στελέχη.



Οι διακεκομμένες γραμμές σηματοδοτούν τα όρια ευαισθησίας/αντοχής που αναφέρει το NARMS (National Antibiotic Resistance Monitoring Study) report (CDC, 2003).

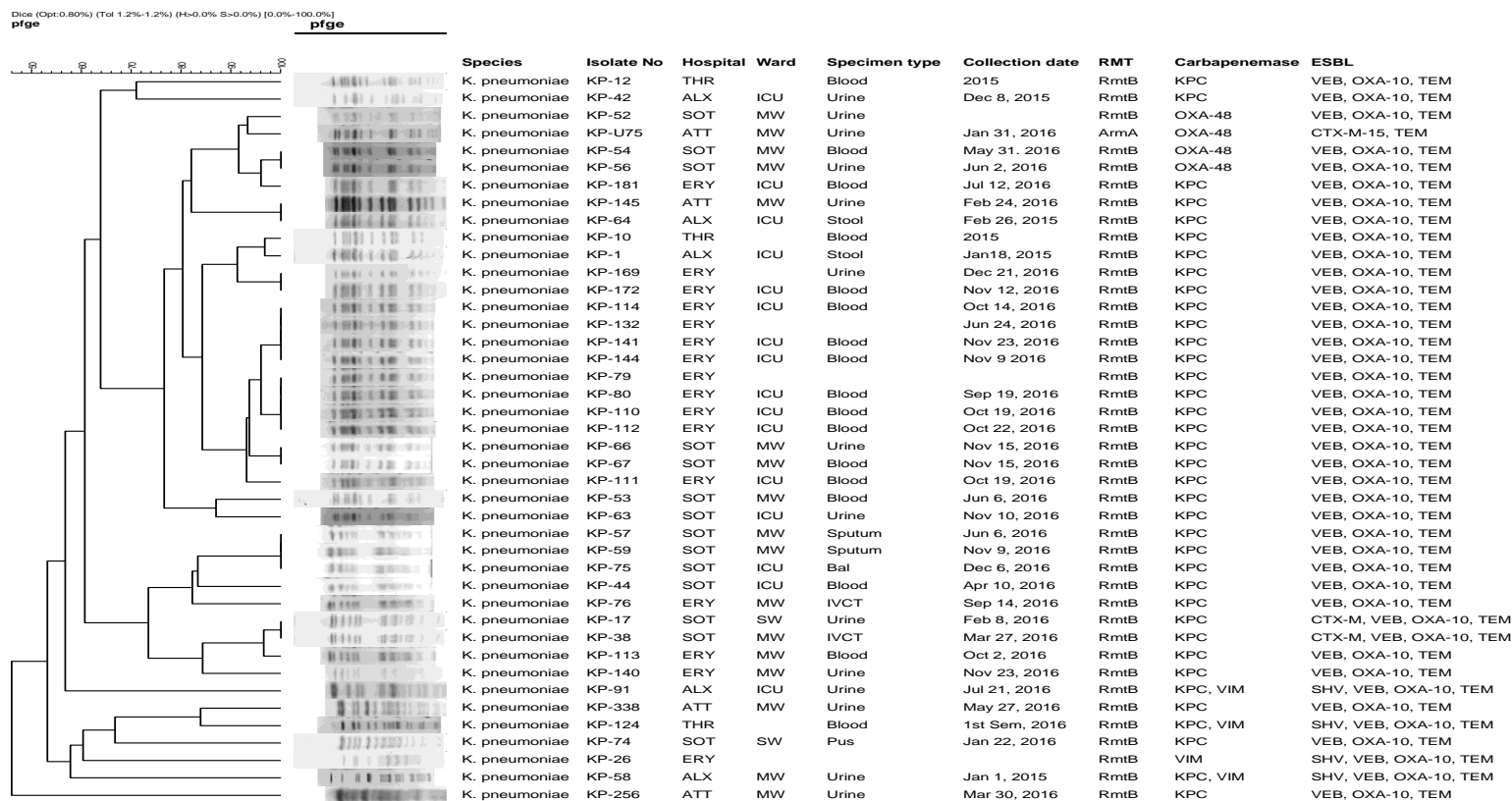
Πίνακας 36. Ευαισθησίες των στελεχών *K. pneumoniae* (n =42) που έφεραν γονίδιο 16S rRNA μεθυλάσης

Αντιμικροβιακός παράγοντας	MIC (mg/L)			Κλινικό όριο ευαισθησίας (mg/L)	Ευαισθησία (%)
	Εύρος	MIC ₅₀	MIC ₉₀		
Ιμιπενέμη	2-64	32	32	≤2	9.5
Μεροπενέμη	2->64	64	>64	≤2	2.4
Μεροπενέμη-βαμπορμπακτάμη					
Όλα τα στελέχη (n=42)	0.016-16	0.5	8	≤8	90.5
Non-MBL στελέχη (n=38)	0.016-16	0.25	4	≤8	94.7
KPC στελέχη (n=34)	0.016-2	0.25	1	≤8	100
Κεφαζιδίμη-αβιμπακτάμη					
Όλα τα στελέχη (n=42)	0.016-≥256	1	2	≤8	90.5
Non-MBL στελέχη (n=38)	0.016-2	1	2	≤8	100
KPC στελέχη (n=34)	0.016-2	1	2	≤8	100
Σιπροφλοξασίνη	0.06->64	>64	>64	≤0.25	2.4
Χλωραμφαινικόλη	8->128	128	>128	≤8	2.4
Κολιστίνη	1->16	8	>16	≤2	19.0
Φωσφομυκίνη	8-1024	16	32	≤32	95.2
Τιγκεκυκλίνη	2-16	8	8	NA	NA
Τριμεθοπρίμη / σουλφαμεθοξαζόλη ^α	32	32	32	≤2	0.0
Απραμυκίνη	2-64	8	16	≤8 ^β	76.2

^α Τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη σε αναλογία 1:19. Οι MICs εκφράζονται ως η συγκέντρωση της τριμεθοπρίμης.

^β Όρια κατηγοριοποίησης της απραμυκίνης (S; ≤8 mg/L, R; ≥64 mg/L) με βάση την πιο πρόσφατη έκθεση National Antibiotic Resistance Monitoring Study (NARMS).

Σχήμα 3. Γενετική σχέση των στελεχών *Klebsiella pneumoniae* που παράγουν 16S rRNA μεθυλάση που μελετήθηκαν, όπως αποτυπώνεται από το δενδρόγραμμα και τον μοριακό χαρακτηρισμό.



* ALX, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών “Αλεξάνδρα”; ATT, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών “Αττικόν”; ERY, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών “Κοργιαλένιο Μπενάκειο ΕΕΣ”; SOT, Γενικό Νοσοκομείο Νοσημάτων Θώρακος Αθηνών “Η Σωτηρία”; THR, Γενικό Νοσοκομείο Ελευσίνας “Θριάσιο”; MW, παθολογικός τομέας; SW, χειρουργικός τομέας; ICU, μονάδα εντατικής θεραπείας; IVCT, άκρη ενδοφλέβιου καθετήρα; RMT, 16S rRNA μεθυλάση; ESBL, ευρέος φάσματος β-λακταμάσες

Καθώς παρατηρήθηκε ότι όλα τα Εντεροβακτηριακά στελέχη που έφεραν RMT παρήγαγαν καρβαπενεμάση, αποφασίσαμε να ελέγξουμε και μια πανελλήνια συλλογή κλινικών στελεχών *K. pneumoniae* που παρήγαγαν καρβαπενεμάση και να μελετηθεί ξεχωριστά ο επιπολασμός των RMTs στην ομάδα αυτή, που ως γνωστόν αποτελεί μεγάλο πρόβλημα στα ελληνικά νοσοκομεία.

Ελέγχθηκαν συνολικά 397 κλινικά στελέχη, που είχαν συλλεχθεί από 15 νοσοκομεία της Ελλάδας. Στο σύνολο των στελεχών το 67.5% (n=268) παρήγαγε KPC, το 13.9% (n=55) NDM, το 9.1% (n=36) VIM, το 3.3% (n=13) OXA-48, το 5.5% (n=22) KPC & VIM, το 0.3% (n=1) KPC & OXA-48 και το 0.5% (n=2) NDM & OXA-48 (Πίνακας 37, Εικόνα 37).

Στο σύνολο των 397 στελεχών, το 67% (n=266) ήταν ανθεκτικά στην αμικασίνη και στην γενταμικίνη, ενώ το 6.8% (n=27) παρουσίαζε υψηλό επίπεδο αντοχή σε όλες τις αμινογλυκοσίδες που ελέγχθηκαν, εκτός της απραμυκίνης, και βρέθηκε να παράγει μεθυλάση. Συγκεκριμένα 26 στελέχη (6.5%) έφεραν το *rmtB*, ενώ ένα μόνο στέλεχος (0.3%) το *armA*. Τα 26 *rmtB*-θετικά στελέχη *K. pneumoniae* απομονώθηκαν από 7 διαφορετικά νοσοκομεία της Κεντρικής Ελλάδας, ενώ το στέλεχος με το *armA* από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου (Πίνακας 37, Εικόνα 37).

Δεκαεννιά από τα 268 στελέχη που παρήγαγαν KPC (7.1%), επτά από τα 36 στελέχη που παρήγαγαν VIM (19.4%) και το στέλεχος που παρήγαγε KPC & OXA-48 ταυτόχρονα έφεραν το *rmtB*, ενώ το *armA* το έφερε ένα στέλεχος που παρήγαγε KPC. Κανένα από τα 55 NDM-, τα 13 OXA-48-, τα 22 KPC & VIM και τα 2 NDM & OXA-48 θετικά στελέχη, δεν παρήγαγε RMT. Όλα τα στελέχη με το *rmtB* παρήγαγαν VEB, OXA 10/17 και TEM τύπου β-λακταμάσες. Τα στελέχη που παρήγαγαν VIM καθώς και δύο KPC στελέχη παρήγαγαν επιπλέον SHV τύπου ESBL.

Έναντι των 27 αυτών στελεχών *K. pneumoniae* οι πιο δραστικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες, ήταν οι νέοι συνδυασμοί αναστολέων, κεφαζιδίμη-αβιμπακτάμη και μεροπενέμη-βαμπορβακτάμη, οι οποίες ήταν δραστικές έναντι του 76% των στελεχών (Πίνακας 38). Τα ανθεκτικά στην κεφαζιδίμη-αβιμπακτάμη στελέχη παρήγαγαν VIM και ένα KPC. Τα ανθεκτικά στη μεροπενέμη-βαμπορβακτάμη στελέχη παρήγαγαν OXA-48 (n = 1) ή VIM.

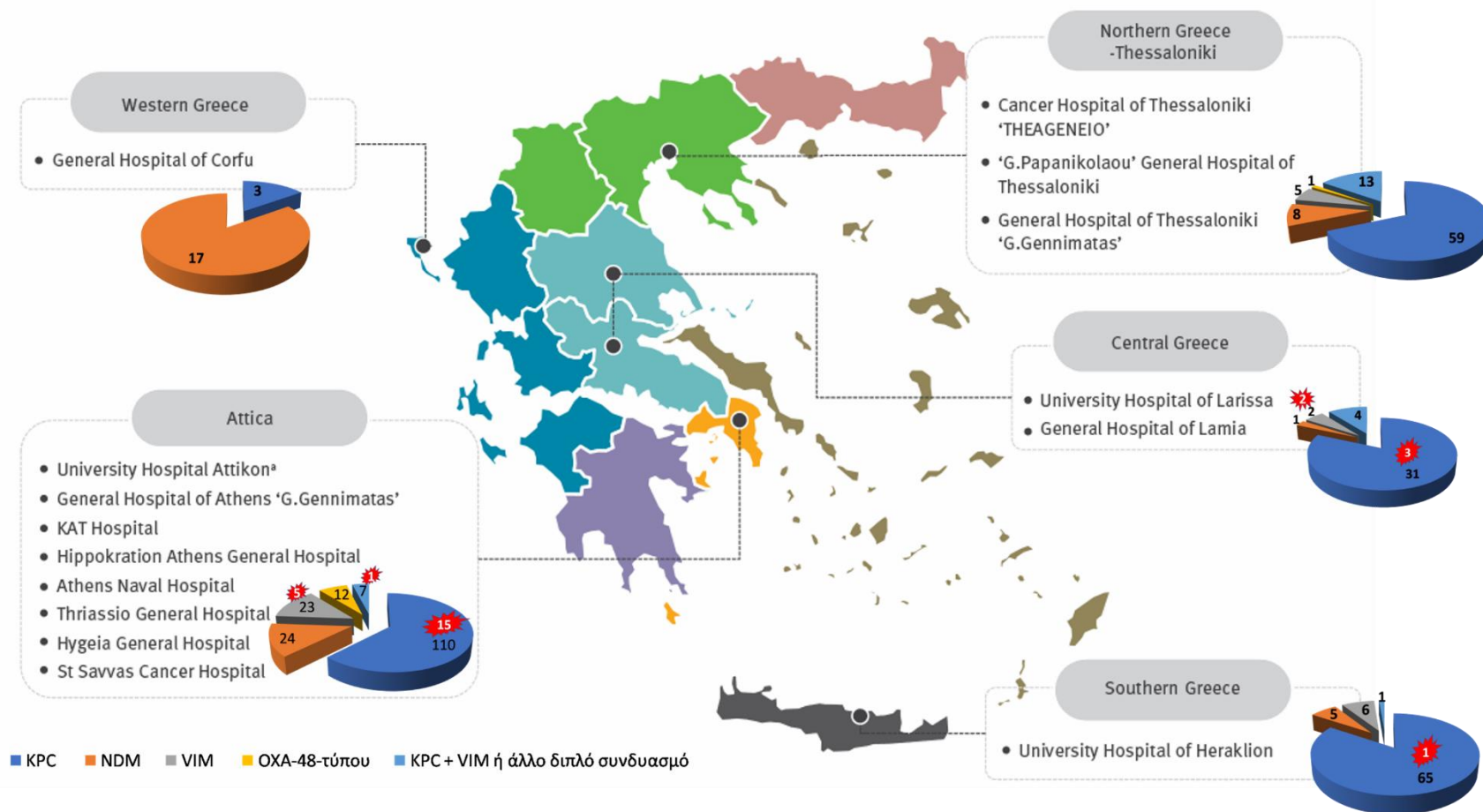
Τέλος, η κολιστίνη ήταν δραστική έναντι μόνο του 22.2% των στελεχών *K.pneumoniae* ενώ η απραμυκίνη ήταν δραστική έναντι του 72% (Πίνακας 39).

Πίνακας 37. Στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάση, ανά νοσοκομείο και ανά τύπο καρβαπενεμάσης και RMT-θετικά στελέχη στο σύνολο των στελεχών αυτών, ανά νοσοκομείο και ανά τύπο καρβαπενεμάσης

Συμμετέχοντα νοσοκομεία	Στελέχη <i>K. pneumoniae</i> που παράγουν καρβαπενεμάση						Στελέχη <i>K. pneumoniae</i> που παράγουν 16S rRNA μεθυλάση			
	Σύνολο	KPC	NDM	VIM	OXA-48- τύπου	KPC & VIM ή άλλος διπλός συνδυασμός	Σύνολο	KPC	VIM	KPC & OXA-48
	n	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
ΜΗΤΡΟΠΟΛΙΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΑΘΗΝΩΝ (ΑΤΤΙΚΗ)	176	110 (62,5%)	24 (13,6%)	23 (13,1%)	12 (6,8%)	7 (4%)	21 (11,9%)	15 (13,6%)	5 (21,7%)	1 (14,3%)
Π.Γ.Ν. «Αττικόν»	34	17 (50%)	10 (29,4%)	1 (2,9%)	4 (11,8%)	2 (5,9%)	3 (8,8%)	3 (17,6%)		
Γ.Ν.Α. «Γ. Γεννηματάς»	25	19 (76%)	2 (8%)	0 (0%)	4 (16%)	0 (0%)	5 (20%)	5 (26,3%)		
Νοσοκομείο «ΚΑΤ»	50	35 (70%)	2 (4%)	9 (18%)	1 (2%)	3 (6%)	9 (18%)	5 (14,3%)	3 (33,3%)	1 (33,3%)
Γ.Ν.Α. «Ιπποκράτειο»	20	13 (65%)	4 (20%)	2 (10%)	0 (0%)	1 (5%)				
Ναυτικό Νοσοκομείο Αθηνών	18	12 (66,7%)	3 (16,7%)	0 (0%)	3 (16,7%)	0 (0%)				
Γ.Ν. Ελευσίνας «Θριάσιο»	7	2 (28,6%)	0 (0%)	5 (71,4%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (14,3%)	1 (50%)		
Γ.Ν. «Υγεία»	19	10 (52,6%)	3 (15,8%)	5 (26,3%)	0 (0%)	1 (5,3%)	3 (15,8%)	1 (10%)	2 (40%)	
Γ. Αντικαρκινικό-Ογκολογικό Νοσοκομείο Αθηνών «Άγιος Σάββας»	3	2 (66,7%)	0 (0%)	1 (33,3%)	0 (0%)	0 (0%)				

Συμμετέχοντα νοσοκομεία	Στελέχη <i>K. pneumoniae</i> που παράγουν καρβαπενεμάση						Στελέχη <i>K. pneumoniae</i> που παράγουν 16S rRNA μεθυλάση			
	Σύνολο	KPC	NDM	VIM	OXA-48- τύπου	KPC & VIM ή άλλος διπλός συνδυασμός	Σύνολο	KPC	VIM	KPC & OXA-48
	n	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ	86	59 (68,6%)	8 (9,3%)	5 (5,8%)	1 (1,2%)	13 (15,1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
«Θεαγένειο» Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης	39	29 (74,4%)	1 (2,6%)	4 (10,3%)	0 (0%)	5 (12,8%)				
Γ.Ν.Θ. «Γ. Παπανικολάου»	27	17 (63%)	1 (3,7%)	1 (3,7%)	0 (0%)	8 (29,6%)				
Γ.Ν.Θ. «Γ. Γεννηματάς»	20	13 (65%)	6 (30%)	0 (0%)	1 (5%)	0 (0%)				
ΚΡΗΤΗ (Π.Γ.Ν. Ηρακλείου)	77	65 (84,4%)	5 (6,5%)	6 (7,8%)	0 (0%)	1 (1,3%)	1 (1,3%)	1 (1,5%)	0 (0%)	0 (0%)
ΚΕΝΤΡΙΚΗ ΕΛΛΑΔΑ	38	31 (81,6%)	1 (2,6%)	2 (5,3%)	0 (0%)	4 (10,5%)	5 (13,2%)	3 (9,7%)	2 (100%)	0 (0%)
Π.Γ.Ν. Λάρισας	20	18 (90%)	0 (0%)	2 (10%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (15%)	1 (5,6%)	2 (100%)	
Γ.Ν. Λαμίας	18	13 (72,2%)	1 (5,6%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (22,2%)	2 (11,1%)	2 (15,4%)		
ΔΥΤΙΚΗ ΕΛΛΑΔΑ (Γ.Ν. Κέρκυρας)	20	3 (15%)	17 (85%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
ΣΥΝΟΛΟ	397	268 (67,5%)	55 (13,9%)	36 (9,1%)	13 (3,3%)	25 (6,3%)	27 (6,8%)	19 (7,1%)	7 (19,4%)	1 (4%)

Εικόνα 37. Γεωγραφικός χάρτης κατανομής των στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάση και 16S RMT. Σε κόκκινο αστέρι τα στελέχη που παράγουν και 16S RMT.



Πίνακας 38. Στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάσες και RMT-θετικά στελέχη, ανά πηγή απομόνωσης

	<i>K. pneumoniae</i>	RMT-θετικά <i>K. pneumoniae</i>
Αιμοκαλλιέργειες	83	9
Βρογχικές εκκρίσεις/BAL	61	1
Πύον	54	4
Άκρο καθετήρα	6	1
Ούρα	165	9
Ορθικό επίχρισμα/ Κόπρανα	20	3
Λοιπά	8	-
Σύνολο (n)	397	27

Πίνακας 39. Ευαισθησίες των στελεχών *K. pneumoniae* που παρήγαγαν καρβαπενεμάση και έφεραν γονίδιο μεθυλάσης (n =27)

Αντιμικροβιακός παράγοντας	MIC (mg/L)			Κλινικό όριο ευαισθησίας (mg/L)	Ευαισθησία (%)
	Εύρος	MIC ₅₀	MIC ₉₀		
Ιμιπενέμη	8->64	32	64	≤2	0.0
Μεροπενέμη	16->64	32	128	≤2	0.0
Μεροπενέμη-βαμπροβακτάμη					
Όλα τα στελέχη (n=27)	0.03->64	0.5	64	≤8	76.0
Non-MBL στελέχη (n=19)	0.03-32	0.25	1	≤8	95.0
KPC στελέχη (n=18)	0.03-32	0.25	4	≤8	100
Κεφταζιδίμη-αβιμπακτάμη					
Όλα τα στελέχη (n=27)	0.25->256	2	>256	≤8	76.0
Non-MBL στελέχη (n=19)	0.25-16	1	2	≤8	95.0
KPC στελέχη (n=18)	0.25-16	1	2	≤8	94.7
Σιπροφλοξασίνη	0.12->64	128	128	≤0.25	3.7
Χλωραμφενικόλη	32->128	256	256	≤8	0.0
Κολιστίνη	1->16	16	32	≤2	22.2
Τιγκεκυκλίνη	0.5->16	2	4	NA	
Τριμεθοπρίμη / σουλφαμεθοξαζόλη ^α	32	32	32	≤2	0.0
Απραμυκίνη	4-64	8	16	≤8 ^β	72.0

^α Τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη σε αναλογία 1:19. Οι MICs εκφράζονται ως η συγκέντρωση της τριμεθοπρίμης.

^β Όρια κατηγοριοποίησης της απραμυκίνης (S; ≤8 mg/L, R; ≥64 mg/L) με βάση την πιο πρόσφατη έκθεση National Antibiotic Resistance Monitoring Study (NARMS)

5.5 Μεταφορά γονιδίων που κωδικοποιούν RMT

Προκειμένου να μελετηθεί το ενδεχόμενο της πιθανής πλασμιδιακής θέσης του γονιδίου *rmtB*, που ανιχνεύθηκε σε όλα πλην ενός (*armA*) τα RMT-θετικά Εντεροβακτηριακά στελέχη της μελέτης, διενεργήθηκαν πειράματα βακτηριακής σύζευξης με το εργαστηριακό στέλεχος *E. coli* RC85R–K12, το οποίο ήταν ανθεκτικό στην ριφαμπικίνη (MIC \geq 512 mg/L).

Σαν δότες χρησιμοποιήθηκαν αντιπροσωπευτικά στελέχη *K.pneumoniae* που παρήγαγαν διαφορετικές καρβαπενεμάσες, και στελέχη *P.mirabilis* και *P.stuartii* που παρήγαγαν ή δεν παρήγαγαν ευρέος φάσματος SHV-τύπου β-λακταμάση (Πίνακας 40). Εξαιρέθηκαν τα στελέχη που ήταν ανθεκτικά στην ριφαμπικίνη.

Πίνακας 40. Στελέχη που επιλέχθηκαν ως δότες του γονιδίου που κωδικοποιούσε για 16S rRNA μεθυλάση, για τα πειράματα βακτηριακής σύζευξης

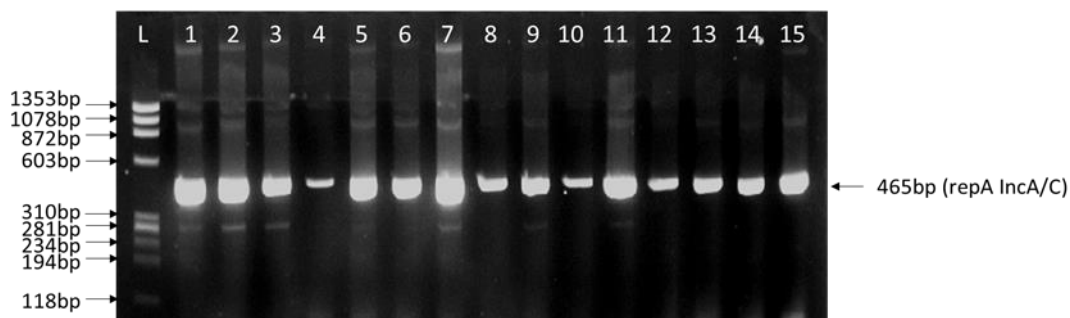
Είδος	Γονότυπος	Αριθμός στελεχών	Στέλεχος
<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{VEB} , <i>bla</i> _{OXA} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>rmtB</i>	32	KP-145
<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{CTX} , <i>bla</i> _{VEB} , <i>bla</i> _{OXA-10} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>rmtB</i>	2	KP-17
<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{VIM} , <i>bla</i> _{VEB} , <i>bla</i> _{OXA-10} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>rmtB</i>	3	KP-58
<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{VIM} , <i>bla</i> _{VEB} , <i>bla</i> _{OXA-10} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>rmtB</i>	1	RIF-R
<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{VEB} , <i>bla</i> _{OXA-10} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>rmtB</i>	3	KP-52
<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>armA</i>	1	RIF-R
<i>P. stuartii</i>	<i>bla</i> _{VIM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{VEB} , <i>bla</i> _{OXA-10} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>rmtB</i>	31	PS-47, PS-61
<i>P. mirabilis</i>	<i>bla</i> _{VIM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{VEB} , <i>bla</i> _{OXA-10} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>rmtB</i>	2	PM-84
<i>P. mirabilis</i>	<i>bla</i> _{VIM} , <i>bla</i> _{VEB} , <i>bla</i> _{OXA-10} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>rmtB</i>	4	PM-148
<i>E. coli</i>	<i>bla</i> _{VIM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{VEB} , <i>bla</i> _{OXA-10} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>rmtB</i>	1	RIF-R
<i>E. coli</i>	<i>bla</i> _{VIM} , <i>bla</i> _{CTX} , <i>bla</i> _{VEB} , <i>bla</i> _{OXA-10} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>rmtB</i>	1	RIF-R

RIF-R, Στέλεχος ανθεκτικό στη ριφαμπικίνη

Μετασυζευγμένες αποικίες ελήφθησαν από όλα τα στελέχη σε συχνότητες που κυμαίνονταν από 10^{-4} έως 10^{-7} συζευγμένα ανά δέκτη. Όλα τα μετασυζευγμένα στελέχη ήταν ανθεκτικά σε κεφταζιδίμη, αμινογλυκοσίδες, κοτριμοξαζόλη, χλωραμφαινικόλη και τετρακυκλίνη και η παρουσία των *rmtB*, *bla_{VEB}*, *bla_{OXA-10}* και *bla_{TEM}* επιβεβαιώθηκε με PCR (Πίνακας 40). Στα μετασυζευγμένα στελέχη που προέκυψαν από δότες *P. mirabilis* και *P. stuartii* που παρήγαγαν VIM καρβαπενεμάση, καθώς και *K. pneumoniae* που παρήγαγε KPC και VIM, παρατηρήθηκαν αυξημένες MICs (πάνω από το όριο ευαισθησίας) στις καρβαπενέμες και φαινότυπος MBL. Η παρουσία του *bla_{VIM}* επιβεβαιώθηκε με PCR. Η παραγωγή SHV επιβεβαιώθηκε επίσης σε όλα τα μετασυζευγμένα στελέχη που περιείχαν το *bla_{VIM}* (Πίνακας 41). Τα μετασυζευγμένα στελέχη, που προέκυψαν από δότες που παρήγαγαν KPC ή OXA-48, ήταν ευαίσθητα στις καρβαπενέμες και δεν ανιχνεύθηκε κανένα γονίδιο καρβαπενεμάσης στον μοριακό έλεγχο με PCR.

Η PFGE του ολικού DNA των μετασυζευγμένων αποικιών, μετά από τη χρήση της S1 νουκλεάσης, αποκάλυψε την παρουσία ενός μόνο πλασμιδίου σε κάθε συζευγμένο στέλεχος με μέγεθος που κυμαίνονταν από 170 έως 200Kb. Σε όλες τις περιπτώσεις τα πλασμίδια αυτά ανήκαν στην ομάδα ασυμβατότητας A/C, όπως φάνηκε από την μέθοδο PbRT. Η PbRT πραγματοποιήθηκε επιπρόσθετα σε όλα τα κλινικά στελέχη που παρήγαγαν RMT και ανέδειξε την παρουσία σε όλα τα στελέχη ενός πλασμιδίου IncA/C (Εικόνα 38) .

Εικόνα 38. Ανίχνευση ρεπλικονίου *rep* μετά από multiplex inc/rep PCR 5



Σειρά L : ΦΧ DNA/HaeIII Ladder

Σειρές 1-15 : Προϊόντα multiplex inc/rep PCR 5 από DNA Εντεροβακτηριακών στελεχών

Πίνακας 41. Ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις στα πιο σημαντικά αντιμικροβιακά και γονίδια αντοχής των κλινικών στελεχών (δότες) και των μετασυζευγμένων στελεχών

Αριθμός στελέχους	Στέλεχος	MIC (mg/L)															Γονότυπος (acquired genes)
		AMK	GM	APR	CAZ	CAZ/AVI	MEM	MER/VAB	IMP	COL	TIG	SXT	CIP	CHL	TC ^a	MIN	
KP-145	<i>K.p</i>	>256	>256	4	>256	0.016	16	0.032	16	32	8	32	128	256	R	16	<i>rmtB, bla_{KPC}, bla_{VEB}, bla_{OXA-10}, bla_{TEM}</i>
RC85/pl145	<i>E.c</i> RC85	>256	>256	4	64	0.12	0.06	0.016	0.06	0.5	1	32	0.06	256	R	16	<i>rmtB, bla_{VEB}, bla_{OXA-10}, bla_{TEM}</i>
KP-17	<i>K.p</i>	>256	>256	2	>256	2	>64	32	>64	64	4	32	128	256	R	>32	<i>rmtB, bla_{KPC}, bla_{CTX-M}, bla_{VEB}, bla_{OXA-10}, bla_{TEM}</i>
RC85/pl17	<i>E.c</i> RC85	>256	>256	2	64	0.12	0.06	0.03	0.06	0.5	2	32	0.06	16	R	16	<i>rmtB, bla_{VEB}, bla_{OXA-10}, bla_{TEM}</i>
KP-52	<i>K.p</i>	>256	>256	4	>256	0.5	8	16	4	1	2	32	128	256	R	16	<i>rmtB, bla_{OXA-48}, bla_{VEB}, bla_{OXA-10}, bla_{TEM}</i>
RC85/pl52	<i>E.c</i> RC85	>256	>256	2	256	0.12	0.06	0.06	0.12	0.25	2	32	0.06	32	R	16	<i>rmtB, bla_{VEB}, bla_{OXA-10}, bla_{TEM}</i>
KP-58	<i>K.p</i>	>256	>256	2	>256	>256	4	1	4	1	4	32	0.06	8	R	16	<i>rmtB, bla_{KPC}, bla_{VIM}, bla_{VEB}, bla_{OXA-10}, bla_{TEM}</i>
RC85/pl58	<i>E.c</i> RC85	>256	>256	2	256	64	0.25	0.12	1	0.5	2	32	0.06	32	R	16	<i>rmtB, bla_{VIM}, bla_{SHV}, bla_{VEB}, bla_{OXA-10}, bla_{TEM}</i>
PM-84	<i>P.m</i>	>256	>256	32	>256	>256	4	0.5	32	IR	IR	32	64	256	IR	IR ^b	<i>rmtB, bla_{VIM}, bla_{SHV}, bla_{VEB}, bla_{OXA-10}, bla_{TEM}</i>
RC85/pl84	<i>E.c</i> RC85	>256	>256	2	128	256	1	0.5	2	0.5	2	32	0.06	32	R	16	<i>rmtB, bla_{VIM}, bla_{SHV}, bla_{VEB}, bla_{OXA-10}, bla_{TEM}</i>
PM-148	<i>P.m</i>	>256	>256	16	>256	>256	0.12	0.06	4	IR	IR	32	8	256	IR	IR ^b	<i>rmtB, bla_{VIM}, bla_{VEB}, bla_{OXA-10}, bla_{TEM}</i>
RC85/pl148	<i>E.c</i> RC85	>256	>256	2	128	0.25	0.06	0.06	0.12	0.5	2	32	0.06	32	R	16	<i>rmtB, bla_{VEB}, bla_{OXA-10}, bla_{TEM}</i>
PS-61	<i>P.s</i>	>256	>256	128	>256	>256	64	1	64	IR	IR	32	8	128	IR	IR ^b	<i>rmtB, bla_{VIM}, bla_{SHV}, bla_{VEB}, bla_{OXA-10}, bla_{TEM}</i>
RC85/pl61	<i>E.c</i> RC85	>256	>256	4	256	256	1	0.5	2	0.25	2	32	0.06	32	R	16	<i>rmtB, bla_{VIM}, bla_{SHV}, bla_{VEB}, bla_{OXA-10}, bla_{TEM}</i>
PS-47	<i>P.s</i>	>256	>256	32	>256	>256	4	0.5	16	IR	IR	32	16	128	IR	IR ^b	<i>rmtB, bla_{VIM}, bla_{SHV}, bla_{VEB}, bla_{OXA-10}, bla_{TEM}</i>
RC85/pl147	<i>E.c</i> RC85	>256	>256	2	128	256	1	0.25	2	0.5	2	32	0.06	32	R	16	<i>rmtB, bla_{VIM}, bla_{SHV}, bla_{VEB}, bla_{OXA-10}, bla_{TEM}</i>
RC85	<i>E.c</i>	2	0.5	2	0.25	0.25	0.06	0.06	0.25	0.5	1	0.5	0.016	8	S	4	none

K.p, *Klebsiella pneumoniae* (κλινικό στέλεχος); *E.c* RC85, *Escherichia coli* RC85 (εργαστηριακό στέλεχος); *P.m*, *Proteus mirabilis* (κλινικό στέλεχος); *P.s*, *Providencia stuartii* (κλινικό στέλεχος)

AMK, αμικασίνη; GM, γενταμικίνη; APR, απραμυκίνη; CAZ, κεφαζιδίμη; CAZ/AVI, κεφαζιδίμη-αβιμπακτάμη; MEM, μεροπενέμη; MER/VAB, μεροπενέμη-βαμπορμπακτάμη; IMP, ιμιπενέμη; COL, κολιστίνη; TIG, τιγκεκυκλίνη; SXT, σουλφαιμεθοξαζόλη-τριμεθοπρίμη; CIP, σιπροφλοξασίνη; CHL, χλωραμφαινικόλη; TC, τετρακυκλίνη; MIN, μινοκυκλίνη

R, ανθεκτικό; IR, ενδογενώς ανθεκτικό

^a Οι MICs στην τετρακυκλίνη (TC) δεν προσδιορίστηκαν και η ευαισθησία αξιολογήθηκε με βάση την μέθοδο διάχυσης των δίσκων

^b Οι MICs στην μινοκυκλίνη (MIN) δεν προσδιορίστηκαν μια και τα στελέχη *P. mirabilis* και *P. stuartii* είναι ενδογενώς ανθεκτικά στις τετρακυκλίνες

5.6 Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των πλασμιδίων

Προσδιορισμός της αλληλουχίας έγινε σε πέντε αντιπροσωπευτικά πλασμίδια (Πίνακας 42). Και τα πέντε πλασμίδια περιείχαν το ρεπλικόνιο rep_{IncC} (προηγουμένως ονομαζόταν $IncA/C2$) (Ambrose *et al.*, 2018), ενώ τα τέσσερα περιείχαν και το rep_{IncR} και χαρακτηρίστηκαν *multireplicons* ($IncC$ και $IncR$) (Πίνακας 43). Επιπλέον, η πλασμιδιακή MLST ($pMLST$) κατέταξε και τα πέντε πλασμίδια στην ST3, η οποία είναι η πιο κοινή υποομάδα των πλασμιδίων $IncA/C$ (Hancock *et al.*, 2017).

Οι αλληλουχίες των πέντε πλασμιδίων εμφάνισαν υψηλή ομοιότητα (>99%) με τρία προηγουμένως δημοσιευμένα $IncA/C2$ πλασμίδια, από τρία στελέχη *K. pneumoniae* (1_GR_13, 2_GR_12 και 16_GR_13), που απομονώθηκαν στην Ελλάδα (αριθμός GenBank CP027043.1, CP027055.1 και CP027038.1), συμπεριλαμβανομένων των περιοχών για την αντιγραφή τους (*repA*), για τον σχηματισμό συζευκτικών ινιδίων και για την ικανότητα μεταφοράς τους (περιοχές *Tra1* και *Tra2*) και της περιοχής συντήρησής τους (οπερόνιο *parAB*).

Εκτός από τον βασικό κορμό, όλα τα πλασμίδια έφεραν μια γονιδιωματική νησίδα, την ARI-B, η οποία βρισκόταν ανάντη (*upstream*) του *Tra1* και αποτελείται από γονίδια που παρείχαν ανοχή σε β-λακτάμες, αμινογλυκοσίδες, τετρακυκλίνες, τριμεθοπρίμη, στρεπτομυκίνη, ριφαμπικίνη, σουλφοναμίδια και χλωραμφαινικόλη (Πίνακας 43).

Πίνακας 42. Πλασμίδια που επιλέχθηκαν για sequencing

Αριθμός στελέχους	Γονότυπος	Προέλευση πλασμιδίου	Επιλογή για Sequencing
RC85/p1145	<i>bla_{VEB}, bla_{OXA-10}, bla_{TEM}, rmtB</i>	<i>K. pneumoniae</i>	Ναι
RC85/p117	<i>bla_{VEB}, bla_{OXA-10}, bla_{TEM}, rmtB</i>	<i>K. pneumoniae</i>	Όχι (ίδιο με το p1145)
RC85/p158	<i>bla_{VIM}, bla_{VEB}, bla_{OXA-10}, bla_{TEM}, rmtB</i>	<i>K. pneumoniae</i>	Ναι
RC85/p147	<i>bla_{VIM}, bla_{SHV}, bla_{VEB}, bla_{OXA-10}, bla_{TEM}, rmtB</i>	<i>P. stuartii</i>	Όχι (ίδιο με το p161)
RC85/p161	<i>bla_{VIM}, bla_{SHV}, bla_{VEB}, bla_{OXA-10}, bla_{TEM}, rmtB</i>	<i>P. stuartii</i>	Ναι
RC85/p184	<i>bla_{VIM}, bla_{SHV}, bla_{VEB}, bla_{OXA-10}, bla_{TEM}, rmtB</i>	<i>P. mirabilis</i>	Ναι
RC85/p1148	<i>bla_{VEB}, bla_{OXA-10}, bla_{TEM}, rmtB</i>	<i>P. mirabilis</i>	Ναι

Πίνακας 43. Γονίδια αντοχής των πλασμιδίων που περιέχουν το *rmtB1*

Πλασμίδια	pI58	pI61	pI84	pI148	pI52	pI67585*
Αντιμικροβιακή ομάδα που επηρεάζεται	Γονίδια αντοχής					
Αμινογλυκοσίδες	<i>aac(6')-II</i>	<i>aac(6')-II</i>	<i>aac(6')-II</i>	-	-	-
	<i>aadA1</i>	<i>aadA1</i>	<i>aadA1</i>	<i>aadA1</i>	<i>aadA1</i>	<i>aadA1</i>
	<i>aadA2</i>	<i>aadA2</i>	<i>aadA2</i>	<i>aadA2</i>	-	<i>aadA2</i>
	<i>ant(2'')-Ia</i>	<i>ant(2'')-Ia</i>	<i>ant(2'')-Ia</i>	<i>ant(2'')-Ia</i>	<i>ant(2'')-Ia</i>	<i>ant(2'')-Ia</i>
	<i>aph(3'')-Ia</i>	<i>aph(3'')-Ia</i>	<i>aph(3'')-Ia</i>	<i>aph(3'')-Ia</i>	-	<i>aph(3'')-Ia</i>
	<i>aph(3'')-Ib</i>	<i>aph(3'')-Ib</i>	<i>aph(3'')-Ib</i>	<i>aph(3'')-Ib</i>	<i>aph(3'')-Ib</i>	<i>aph(3'')-Ib</i>
	<i>aph(6)-Id</i>	<i>aph(6)-Id</i>	<i>aph(6)-Id</i>	<i>aph(6)-Id</i>	<i>aph(6)-Id</i>	<i>aph(6)-Id</i>
	<i>rmtB1</i>	<i>rmtB1</i>	<i>rmtB1</i>	<i>rmtB1</i>	<i>rmtB1</i>	<i>rmtB1</i>
β-λακτάμες	<i>bla_{VIM-1}</i>	<i>bla_{VIM-1}</i>	<i>bla_{VIM-1}</i>	-	-	-
	<i>bla_{VEB-1}</i>	<i>bla_{VEB-1}</i>	<i>bla_{VEB-1}</i>	<i>bla_{VEB-1}</i>	<i>bla_{VEB-1}</i>	<i>bla_{VEB-25}</i>
	<i>bla_{OXA-10}</i>	<i>bla_{OXA-10}</i>	<i>bla_{OXA-10}</i>	<i>bla_{OXA-10}</i>	<i>bla_{OXA-10}</i>	<i>bla_{OXA-10}</i>
	<i>bla_{TEM-1}</i>	<i>bla_{TEM-1}</i>	<i>bla_{TEM-1}</i>	<i>bla_{TEM-1}</i>	<i>bla_{TEM-1}</i>	<i>bla_{TEM-1}</i>
	<i>bla_{SHV-5}</i>	<i>bla_{SHV-5}</i>	<i>bla_{SHV-5}</i>	-	-	-
Φαινικόλη	<i>cmlA5</i>	<i>cmlA5</i>	<i>cmlA5</i>	<i>cmlA5</i>	<i>cmlA5</i>	<i>cmlA5</i>
Ριφαμπικίνη	<i>arr-2</i>	<i>arr-2</i>	<i>arr-2</i>	<i>arr-2</i>	<i>arr-2</i>	<i>arr-2</i>
Σουλφοναμίδη	<i>sul1</i>	<i>sul1</i>	<i>sul1</i>	<i>sul1</i>	<i>sul1</i>	<i>sul1</i>
	<i>sul2</i>	<i>sul2</i>	<i>sul2</i>	<i>sul2</i>	<i>sul2</i>	<i>sul2</i>
Τετρακυκλίνη	<i>tet(A)</i>	<i>tet(A)</i>	<i>tet(A)</i>	<i>tet(A)</i>	<i>tet(A)</i>	<i>tet(A)</i>
	<i>tet(G)</i>	<i>tet(G)</i>	<i>tet(G)</i>	<i>tet(G)</i>	<i>tet(G)</i>	<i>tet(G)</i>
Τριμεθοπρίμη	<i>dfrA1</i>	<i>dfrA1</i>	<i>dfrA1</i>	-	-	-
	<i>dfrA12</i>	<i>dfrA12</i>	<i>dfrA12</i>	<i>dfrA12</i>	-	<i>dfrA12</i>
	-	-	-	-	<i>dfrA14</i>	-
	-	-	-	-	<i>dfrA23</i>	-
	Τύπος ασυμβατότητας (σύστημα αντιγραφής πλασμιδίου)					
	IncC	IncC, IncR	IncC, IncR	IncC, IncR	IncC, IncR	IncC, IncR
	Πατρικό στέλεχος / παραγόμενη καρβαπενεμάση					
	<i>K. pneumoniae</i> KPC+VIM	<i>P. stuartii</i> VIM	<i>P. mirabilis</i> VIM	<i>P. mirabilis</i> VIM	<i>K. pneumoniae</i> OXA-48	<i>K. pneumoniae</i> KPC

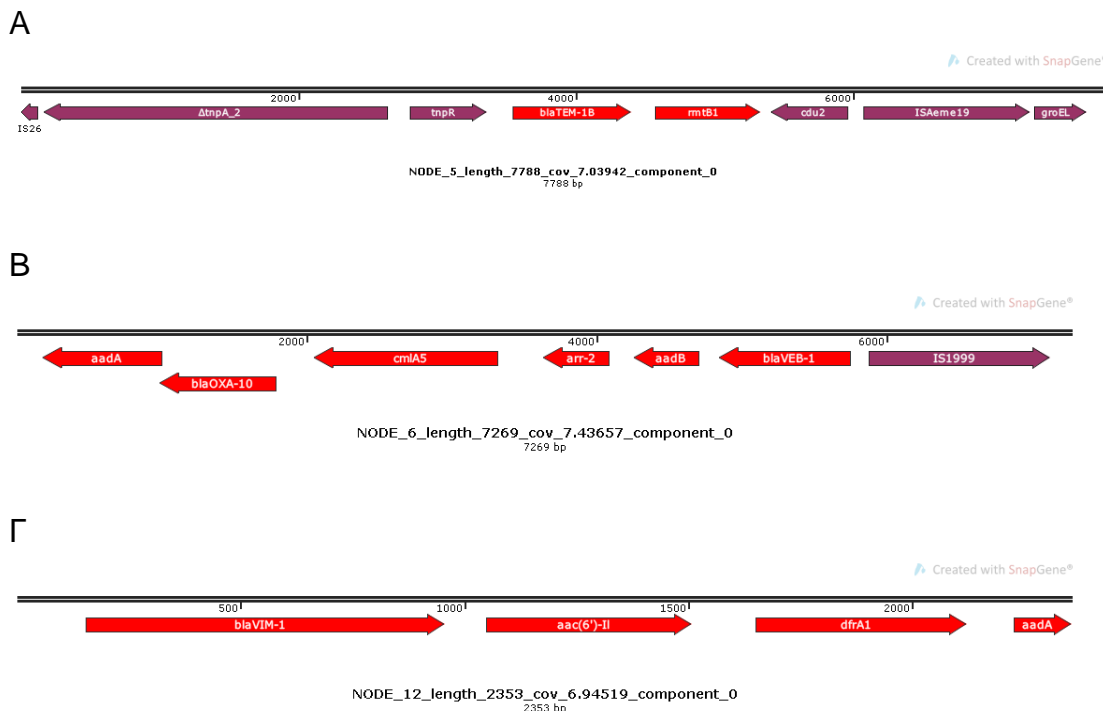
* Το πλασμίδιο pI67585 έχει προστεθεί για σύγκριση (Galani *et al.*, 2020).

Και στα πέντε πλασμίδια, το *rmtB-1* εντοπίστηκε κατάντη (downstream) ενός τρανσποζονίου τύπου Tn2 και του γονιδίου *bla_{TEM-1b}* (Εικόνα 39Α). Το Tn2 ήταν περικομμένο σε όλες τις περιπτώσεις από την αλληλουχία εισδοχής IS26, που είχε εισαχθεί στο γονίδιο της τρανσποζάσης του Tn2. Η κατάντη περιοχή του γονιδίου *rmtB1* πλαισιώθηκε από έναν μεταφορέα Na⁺/K⁺ και την αλληλουχία εισδοχής ISAeme91, που κωδικοποιεί μια τρανσποζάση της υπερικογένειας ISL3.

Επιπρόσθετα, ένα ιντεγκρόνιο τάξης 1 που φέρει το γονίδιο *bla_{VEB-1}* ως την πρώτη γονιδιακή κασέτα, ακολουθούμενη από τις κασέτες των *aadB*, *arr2*, *cmlA5*, *bla_{OXA-10}* και *aadA1*, εντοπίστηκε και στα πέντε πλασμίδια. Ανάντη του *bla_{VEB-1}*, υπήρχε μία αλληλουχία εισδοχής IS1999 που παρείχε έναν ισχυρό υποκινητή για την έκφραση του *bla_{VEB}* (Εικόνα 39B).

Στα πλασμίδια που έφεραν και το γονίδιο *bla_{VIM-1}*, οι γονιδιακές κασέτες *bla_{VIM-1}*, *aacA7*, *dfrA1* και *aadA1*, περιέχονταν σε μεταβλητή περιοχή ιντεγκρονίου, όμοιου με το In-e541, που αποτελεί τη συνήθη δομή που φέρει το *bla_{VIM-1}* στα στελέχη *K. pneumoniae* που απομονώνονται στην Ελλάδα (Εικόνα 39Γ) (Miriagou *et al.*, 2003).

Εικόνα 39. Γενετικό περιβάλλον των γονιδίων *rmtB1* (Α), *bla_{VEB-1}* (Β) και *bla_{VIM-1}* (Γ).



cdu2: γονίδιο αντλίας Na⁺/H⁺

groEL: γονίδιο πρωτεΐνης θερμικού σοκ της οικογένειας των συνοδών πρωτεϊνών (ειδικές πρωτεΐνες που υποβοηθούν την σωστή πτύχωση άλλων πρωτεϊνών)

arr-2: γονίδιο ανοχής στη ριφαμπικίνη

dfrA1: γονίδιο ανοχής στην τριμεθοπρίμη

*Οι χάρτες σχεδιάστηκαν με το SnapGene® Viewer Version 5.1.3.1 (<http://www.snapgene.com>).

V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παραγωγή 16S rRNA μεθυλασών είναι ένας αναδυόμενος μηχανισμός αντοχής στις αμινογλυκοσίδες σε Gram-αρνητικά βακτήρια και προσδίδουν αντοχή υψηλού επιπέδου (MICs >256 mg/L) σε όλες τις κλινικά σημαντικές αμινογλυκοσίδες με ένα μόνο γονίδιο. Πριν από την παρούσα μελέτη, σποραδικά στελέχη που παράγουν 16S rRNA μεθυλάσες ήταν γνωστό ότι υπήρχαν στην Ελλάδα (Galani *et al.*, 2012; Galani *et al.*, 2013; Galani *et al.*, 2016), χωρίς όμως να έχουν πραγματοποιηθεί πολυκεντρικές επιδημιολογικές μελέτες και ως εκ τούτου να μην είναι γνωστός ο επιπολασμός τους στη χώρα μας.

Η παρούσα μελέτη διεξήχθη για να απαντήσει σε ερωτήματα σχετικά με την επιδημιολογία των 16S rRNA μεθυλασών σε Gram-αρνητικά μικρόβια: Ποιός είναι ο ακριβής επιπολασμός των RMTs σε *A. baumannii*, *P. aeruginosa* και σε Εντεροβακτηριακά στελέχη; Μήπως η αυξημένη συχνότητα απομόνωσης των στελεχών αυτών οφείλεται στη διασπορά ενός συγκεκριμένου κλώνου, ή μήπως είναι αποτέλεσμα οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων μεταξύ περισσότερων κλώνων; Θα μπορούσε να οφείλεται στη διάδοση ενός συζευκτικού πλασμιδίου μεταξύ των διαφόρων μικροβιακών ειδών; Και αν ναι, συνυπάρχει με άλλα γονίδια αντοχής σε αντιβιοτικά, δημιουργώντας XDR ή ακόμα και PDR στελέχη; Πώς επηρεάζει αυτή η επιδημιολογία την κλινική χρήση των αμινογλυκοσιδών στην πράξη; Ποιές θεραπευτικές επιλογές απομένουν στη φαρέτρα μας για την αντιμετώπιση αυτών των στελεχών;

Στο πλαίσιο αυτό μελετήθηκαν 639 Gram-αρνητικά στελέχη (347 στελέχη *A. baumannii*, 111 στελέχη *K. pneumoniae*, 33 στελέχη *P. stuartii*, 8 στελέχη *P. mirabilis*, 2 στελέχη *E. coli*, 138 στελέχη *P. aeruginosa*), που απομονώθηκαν τη χρονική περίοδο 2015-2016 από νοσηλευόμενους ασθενείς νοσοκομείων της Αθήνας και παρουσίαζαν αντοχή σε όλες τις αμινογλυκοσίδες που είχαν ελεγχθεί στα μικροβιολογικά εργαστήρια του εκάστοτε νοσοκομείου.

Acinetobacter baumannii

Όσον αφορά στα στελέχη *A. baumannii*, διαπιστώσαμε ότι η συχνότητα ανίχνευσης γονιδίου που κωδικοποιεί 16S rRNA μεθυλάση ήταν 93.7% μεταξύ όλων των ανθεκτικών στις αμινογλυκοσίδες στελεχών που ελέγχθηκαν και 63.5% μεταξύ όλων των στελεχών *A. baumannii* που απομονώθηκαν από τα συνεργαζόμενα νοσοκομεία τη διετία 2015-2016. Μοναδικό γονίδιο RMT που ανιχνεύθηκε στα στελέχη *A. baumannii* ήταν το *armA*, ενώ όλα τα *armA*-θετικά στελέχη παρήγαγαν OXA-23 καρβαπενεμάση.

Η επιδημιολογική κατάσταση του ανθεκτικού στις καρβαπενέμες *A. baumannii* (CRAB) στην Ελλάδα ορίζεται ως ενδημική (Lötsch *et al.*, 2019). Από το 2000 έως το 2009, τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *A. baumannii* που απομονώθηκαν στην Ελλάδα παρήγαγαν την καρβαπενεμάση OXA-58, με τον IC I να είναι ο πιο κοινός κλώνος μέχρι το 2004 και τον IC II να επικρατεί κατά την

περίοδο 2005-2009 (Gogou *et al.*, 2011). Στέλεχος *A. baumannii*, ανθεκτικό στις καρβαπενέμες, που παρήγαγε OXA-23, περιγράφηκε για πρώτη φορά στη χώρα μας το 2010 (Liakopoulos *et al.*, 2012). Σε δύο πανελλαδικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν το 2015, τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *A. baumannii* παρήγαγαν σχεδόν όλα καρβαπενεμάση OXA-23 και ανήκαν κυρίως στον IC II (Pournaras *et al.*, 2017). Κατά τη διάρκεια δε των ετών αυτών (2010 - 2015), η αντοχή στην γενταμικίνη αυξήθηκε από 69.3 σε 86.4% ($p=0.014$) και η αντοχή στην τομπραμυκίνη από 59.8 σε 76.8% ($p=0.011$) (Daforoulou *et al.*, 2018) με πιθανό λόγο την επικράτηση σταδιακά του κλώνου IC II που παράγει τις OXA-23 και ArmA (Galani *et al.*, 2015).

Η συσχέτιση μεταξύ του κλώνου IC II και του *armA*, που έχει περιγραφεί ήδη σε άλλες χώρες (Karah *et al.*, 2012; Serutiene *et al.*, 2012), επιβεβαιώνεται και στην παρούσα μελέτη για τα ελληνικά στελέχη που παράγουν καρβαπενεμάση OXA-23. Στελέχη *A. baumannii* που έφεραν το γονίδιο *armA* αναφέρθηκαν πρώτη φορά το 2003 στη Νότια Κορέα (Lee *et al.*, 2006) και έκτοτε, αυτό το γονίδιο έχει βρεθεί σε στελέχη από την Κίνα, το Βιετνάμ, την Ιαπωνία, τη Βόρεια Αμερική, τη Νορβηγία, την Ιταλία, τη Βουλγαρία, το Ιράν και την Αλγερία (Potron *et al.*, 2015).

Το *armA* βρίσκεται πάντα σε ένα λειτουργικό σύνθετο τρανσποζόνιο Tn1548 (Doi *et al.*, 2007b) και παρά το γεγονός ότι είναι αρκετά διαδεδομένο μεταξύ των στελεχών του *A. baumannii*, η περιεκτικότητά του σε GC είναι 30%, και διαφέρει σημαντικά από αυτή του γονιδιώματος του πυρήνα του *A. baumannii* που εκτιμάται περίπου σε 39%. Αυτό δείχνει ότι το *armA* αποκτήθηκε οριζόντια από μια άγνωστη προς το παρόν πηγή (Doi *et al.*, 2007b). Αξίζει να σημειωθεί ότι το γονίδιο που κωδικοποιεί την ArmA συχνά αναφέρεται μεταξύ των στελεχών *A. baumannii* που παράγουν OXA-23, ωστόσο τα δύο γονίδια δεν έχουν αναφερθεί σε κοινό πλασμίδιο (Karah *et al.*, 2012; Brigante *et al.*, 2012; Strateva *et al.*, 2012). Αν και δεν διερευνήσαμε στην παρούσα μελέτη την θέση που βρίσκονται τα γονίδια *bla*_{OXA-23} και *armA*, τα διαθέσιμα δεδομένα από WGS στελεχών *A. baumannii* του IC II από την Ελλάδα δείχνουν το *bla*_{OXA-23}, στο χρωμόσωμα, επί του Tn2006, με ένα IS_{Aba1} ανάντη που συσχετίζεται με αυξημένη έκφραση (Turton *et al.*, 2006) και το *armA*, επίσης στο χρωμόσωμα επί του Tn1548.

Ανησυχία προκαλούν τα υψηλά ποσοστά των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες και στις αμινογλυκοσίδες στελεχών *A. baumannii*, που αντιπροσωπεύουν από 50 έως και 90% του συνόλου των *A. baumannii*, που απομονώθηκαν στα συμμετέχοντα νοσοκομεία. Η μεγάλη πλειονότητα των στελεχών *A. baumannii* με *armA* ήταν PDR (66.8%), ενώ το υπόλοιπο 33.2% ήταν XDR. Υπάρχουν πολύ λίγες αντιμικροβιακές ουσίες που διατηρούν τη δραστηριότητά τους κατά των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *A. baumannii*, συμπεριλαμβανομένης της κολιστίνης, της τριμεθοπρίμης/σουλφαμεθοξαζόλης, της τιγκεκυκλίνης και της μινוקυκλίνης, οι οποίες έχουν αρκετούς γνωστούς περιορισμούς (Isler *et al.*, 2018). Η παρούσα μελέτη επιβεβαίωσε ότι το πιο δραστικό αντιμικροβιακό ήταν η τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη, η

οποία ανέστειλε μόνο το 17.8%, ενώ η κολιστίνη το 15.4% και η μινοκυκλίνη μόνο το 3.7% των στελεχών *A. baumannii* που παρήγαγαν μεθυλάση και καρβαπενεμάση στα ελληνικά νοσοκομεία. Το υψηλό ποσοστό αντοχής στην κολιστίνη που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη πιθανότατα σχετίζεται με χρωμοσωμικές μεταλλάξεις, καθώς δεν εντοπίστηκαν *mcr*-θετικά στελέχη και θα μπορούσαν να αποδοθούν σε αυξημένη χορήγηση κολιστίνης στην Ελλάδα, λόγω περιορισμένων θεραπευτικών επιλογών κατά των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες και στις αμινογλυκοσίδες στελεχών. Τέλος, η τιγκεκυκλίνη, που παρουσιάζει τιμές MIC₅₀ 4mg/L και MIC₉₀ 8mg/L, έχει προταθεί σαν θεραπευτική επιλογή κατά των σοβαρών λοιμώξεων από στελέχη *A. baumannii*, χορηγούμενη σε υψηλές δοσολογίες και μόνο όταν δεν υπάρχει εναλλακτική θεραπευτική επιλογή (Bassetti *et al.*, 2021b).

Νέες αντιμικροβιακές ουσίες με σημαντική *in vitro* δράση έναντι των MDR *A. baumannii*, που έχουν πάρει έγκριση από τον FDA και τον EMA, είναι η κεφιντεροκόλη και η εραβακυκλίνη. Η κλινική μελέτη CREDIBLE-CR εγείρει όμως σοβαρή ανησυχία για τη χορήγηση της κεφιντεροκόλης, καθότι αναφέρει αυξημένη θνητότητα σε ασθενείς που λαμβάνουν αυτό το φάρμακο (Bassetti *et al.*, 2021a). Επισημαίνεται, ότι στην παρούσα μελέτη, δεν πραγματοποιήθηκε έλεγχος ευαισθησίας για αυτά τα νέα αντιμικροβιακά φάρμακα. Τέλος, ο συνδυασμός σουλμπακτάμης/ντουρλομπακτάμης, που ολοκλήρωσε πρόσφατα τη δοκιμή Φάσης 3 (ATTACK trial) και βρίσκεται επί του παρόντος σε τελικό στάδιο ανάπτυξης για τη θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από *Acinetobacter spp.*, ελέγχθηκε έναντι στελεχών *A. baumannii* από την Ελλάδα και ήταν δραστήριος τόσο σε στελέχη του κλώνου IC II, όσο και του IC I με MIC₅₀ και MIC₉₀ 4mg/L και στις δύο περιπτώσεις (Petropoulou *et al.*, 2022).

Pseudomonas aeruginosa

Όσον αφορά στα στελέχη *P. aeruginosa*, που ελέγχθηκαν στην παρούσα μελέτη, δεν βρέθηκε στη συλλογή μας στέλεχος που να παράγει 16S rRNA μεθυλάση, αν και 33 στελέχη (27%) παρουσίαζαν υψηλού επιπέδου αντοχή σε αμικασίνη, γενταμικίνη και τομπραμυκίνη. Η αντοχή αυτή προκύπτει προφανώς από τη συνύπαρξη αμινογλυκοσιδο-τροποποιητικών ενζύμων, μειωμένης κυτταρικής διαπερατότητας και αυξημένης ενεργού εκροής (Poole, 2005a). Ωστόσο, δεν μπορεί να αποκλειστεί η ύπαρξη μιας «νέας» RMT, το γονίδιο της οποίας δεν ανιχνεύθηκε από το πρωτόκολλο της PCR που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη.

Εντεροβακτηριακά

Όσον αφορά στα Εντεροβακτηριακά στελέχη, προέκυψαν αρκετά αξιοσημείωτα ευρήματα. Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι στα συμμετέχοντα νοσοκομεία της Αθήνας υπάρχει μεγάλος επιπολασμός των RMTs μεταξύ των στελεχών *P. stuartii* που απομονώθηκαν (55.1%), ενώ συγκεκριμένα μεταξύ των

ανθεκτικών στην αμικασίνη και τη γενταμικίνη στελεχών *P. stuartii* 93.9% βρέθηκαν να παράγουν RMT. Αντίστοιχα, στο σύνολο των στελεχών *K.pneumoniae* που απομονώθηκαν, ο επιπολασμός των RMTs υπολογίστηκε στο 3.9%, ενώ μεταξύ των ανθεκτικών στις αμινογλυκοσίδες στελεχών *K.pneumoniae*, 37.9% βρέθηκαν να φέρουν γονίδιο που κωδικοποιεί RMT. Καταγράφηκαν επίσης σποραδικές περιπτώσεις RMT-θετικών *P. mirabilis* και *E.coli*. Το ποσοστό των στελεχών που παράγουν RMT στη δεύτερη συλλογή, που αποτελείται από στελέχη *K. pneumoniae* που παρήγαγαν καρβαπενεμάση και συλλέχθηκαν από 15 νοσοκομεία της Ελλάδας, είναι 6.8%. Παρατηρήθηκε ότι τα όλα τα *rmtB*-θετικά στελέχη *K. pneumoniae* προήλθαν από νοσοκομεία της Αττικής και της Κεντρικής Ελλάδας (Λάρισα, Λαμία), ενώ το ένα στέλεχος *K. pneumoniae* που έφερε το *armA* απομονώθηκε από το ΠαΓΝΗ της Κρήτης.

Επιπλέον, παρατηρήσαμε ότι όλα τα RMT-θετικά Εντεροβακτηριακά παρήγαγαν καρβαπενεμάσες, και ανεξάρτητα από τον τύπο της καρβαπενεμάσης, το *rmtB* ήταν το πιο κοινό γονίδιο RMT που ανιχνεύθηκε (>98%). Τα αποτελέσματά μας συνάδουν με τα αναφερόμενα από τους Castanheira *et al.*, σχετικά με 4.680 Εντεροβακτηριακά στελέχη από 26 ευρωπαϊκές και γειτονικές χώρες, συμπεριλαμβανομένης της Ελλάδας, που ανακτήθηκαν κατά τη διάρκεια της διατροφής 2014-2015 (Castanheira *et al.*, 2018). Στη μελέτη αυτή, το 1.4% των στελεχών που απομονώθηκαν (n = 60) ήταν ανθεκτικά (MICs υψηλότερες από την υψηλότερη συγκέντρωση που δοκιμάστηκε) σε όλες τις αμινογλυκοσίδες που αξιολογήθηκαν, συμπεριλαμβανομένης της πλαζομικίνης, και έφεραν γονίδια RMT, με πιο συχνό το *rmtB1* (23 στελέχη, που περιλαμβάνουν 20 στελέχη *K. pneumoniae*, 1 στέλεχος *P. mirabilis* και 2 στελέχη *P. stuartii*), ακολουθούμενο από το *armA* (σε 16 στελέχη). Μεταξύ των ελληνικών στελεχών (n=22), επτά είχαν γονίδιο RMT, πέντε το *rmtB1* και δύο το *armA*, ενώ μεταξύ των χωρών με διαφορετική επιδημιολογία ήταν η Τουρκία (n=10 με 9 *rmtC* και 1 *rmtF1*), η Ρωσία (n=23 με 3 *armA*, 17 *rmtB1* και 3 *rmtC*) και η Λευκορωσία (n=9 με 8 *rmtF1* και 1 *armA2*) (Castanheira *et al.*, 2018).

Σε όλα τα *rmtB*-θετικά στελέχη της μελέτης μας, το *rmtB1* βρισκόταν σε πλασμίδια ομάδας ασυμβατότητας IncC, τα οποία αποτελούν μια ομάδα συζευκτικών, αυτομεταφερόμενων πλασμιδίων, που παρουσιάζονται σε μικρό αριθμό αντιγράφων και σχετίζονται με τη διάδοση πολλών κλινικά σημαντικών γονιδίων αντοχής (Carattoli *et al.*, 2012). Επιπλέον, κάποια από τα IncC πλασμίδια, που φέρουν το *rmtB1* στην παρούσα μελέτη, φέρουν και το γονίδιο *bla_{VIM}*, αλλά όχι το *bla_{KPC}* ή το *bla_{OXA-48}*. Πλασμίδια τύπου IncA/C που φέρουν το γονίδιο *bla_{VIM-1}* έχουν εντοπιστεί σε στελέχη *P. mirabilis* και *P. stuartii* που απομονώθηκαν στην Ελλάδα (Papagiannitsis *et al.*, 2012; Giakkouri *et al.*, 2015). Σε ένα στέλεχος *P. stuartii* που απομονώθηκε στην Ελλάδα έχει επίσης περιγραφεί ένα πλασμίδιο, που φέρει το *bla_{VIM-1}*, και έχει τον βασικό σκελετό του IncA/C αλλά και ένα επιπλέον ρεπλικόνιο, το IncR, και χαρακτηρίζεται ως multi-replicon (Drieux *et al.*, 2013).

Τα πλασμίδια τύπου IncA/C είναι υπαίτια και για την παγκόσμια εξάπλωση του γονιδίου ESBL *bla*_{VEB-1} στα μέλη της οικογένειας των Εντεροβακτηριακών (Poirel *et al.*, 2007). Το πρώτο συζευκτικό πλασμίδιο, στο οποίο συνυπάρχουν τα *rmtB1*, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{SHV-5}, *bla*_{TEM-1}, *bla*_{OXA-10} και *bla*_{VEB-1}, αναφέρθηκε σε κλινικό στέλεχος *P. stuartii*, το οποίο προκάλεσε επιδημία σε ιδιωτικό νοσοκομείο της Αθήνας (Galani *et al.*, 2013), και αργότερα σε παρόμοια επιδημία, σε άλλο νοσοκομείο της Αθήνας, το πλασμίδιο χαρακτηρίστηκε περαιτέρω ως multi-replicon (IncC και IncR) (Οικονομου *et al.*, 2016). Αξίζει να σημειωθεί ότι το *rmtB1* ανιχνεύτηκε πρόσφατα σε παρόμοιο συζευκτικό πλασμίδιο, στο οποίο συνυπήρχαν τα γονίδια *bla*_{VEB-25} ή *bla*_{VEB-14}, κατά τη διάρκεια της διερεύνησης μιας επιδημίας στελεχών *K. pneumoniae* από ελληνικό νοσοκομείο, που παρήγαγαν KPC-2 και παρουσίαζαν αντοχή στην κεφταζιδίμη/αβιμπακτάμη (λόγω αμινοξικών αλλαγών στη VEB) (Galani *et al.*, 2020).

Το γενετικό περιβάλλον του *rmtB1* που περιγράφεται στην παρούσα μελέτη ήταν παρόμοιο με ένα σύνθετο τρανσποζόνιο που αναφέρθηκε το 2017 σε ένα MDR στέλεχος *E. coli*, το οποίο απομονώθηκε από ένα νοσηλευόμενο ασθενή στη Γαλλία (Morel *et al.*, 2017). Η αλληλουχία εισδοχής ISAeme91, που βρίσκεται κατάντη του *rmtB1*, κωδικοποιεί μια τρανσποζάση της υπεριοικογένειας ISL3 και παρουσιάζει ομολογία 99% με μια τρανσποζάση που εντοπίστηκε σε στέλεχος *Aeromonas media* που απομονώθηκε από δείγματα νερού που συλλέχθηκαν από την Ανατολική Λίμνη, Γουχάν, στην Κίνα (Morel *et al.*, 2017). Συνήθως, κατάντη του *rmtB* βρίσκεται το γονίδιο *qepA* (εκροή κινολονών) και η αλληλουχία εισδοχής ISCR3 (Berçot *et al.*, 2008).

Η φωσφομυκίνη ήταν το πλέον δραστικό φάρμακο με ευαισθησία 95.2% έναντι των στελεχών *K. pneumoniae*, 83.3% έναντι των στελεχών *P. mirabilis*, ενώ και τα δύο στελέχη *E. coli* ήταν ευαίσθητα. Ο συνδυασμός κεφταζιδίμης/αβιμπακτάμης ήταν δραστικός έναντι του 100% των στελεχών *K. pneumoniae* που δεν παρήγαγαν MBL, ενώ ο συνδυασμός μεροπενέμης/βαμπορμπακτάμης, ο οποίος δεν έχει κυκλοφορήσει ακόμα στη χώρα μας, ήταν δραστικός έναντι του 100% των στελεχών *K. pneumoniae*, που παρήγαγαν KPC. Αντίστοιχα υψηλά ήταν και τα ποσοστά στη συλλογή των στελεχών *K. pneumoniae* που παρήγαγαν καρβαπενεμάση (δεύτερη συλλογή), με 95% ευαισθησία στον συνδυασμό κεφταζιδίμης/αβιμπακτάμης και 100% ευαισθησία στον συνδυασμό μεροπενέμης/βαμπορμπακτάμης. Τα υψηλά ποσοστά της αντοχής στην κολιστίνη που παρατηρήθηκαν μεταξύ των στελεχών *K. pneumoniae* και των δύο συλλογών (81% στην πρώτη και 77.8% στην δεύτερη) πιθανότατα σχετίζονται με χρωμοσωμικές μεταλλάξεις, καθώς δεν εντοπίστηκαν *mcr*-θετικά στελέχη. Όπως αναφέρθηκε ήδη και για τα στελέχη *A. baumannii*, τα ποσοστά αυτά θα μπορούσαν να αποδοθούν σε αυξημένη χορήγηση κολιστίνης στην Ελλάδα, λόγω περιορισμένων θεραπευτικών επιλογών κατά των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες και στις αμινογλυκοσίδες στελεχών.

Στις νέες αντιμικροβιακές ουσίες κατά των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες Εντεροβακτηριακών στελεχών, που έχουν πάρει έγκριση από τον FDA και τον EMA και που δεν ελέγχθηκαν στην παρούσα μελέτη, ανήκουν ο συνδυασμός

ιμιπενέμης/σιλαστατίνης/ρελεβακτάμης, η πλαζομικίνη, η εραβακυκλίνη και η κεφιντεροκόλη. Ο συνδυασμός ιμιπενέμης/σιλαστατίνης/ρελεβακτάμης, όπως και ο συνδυασμός μεροπενέμης/αβιμπακτάμης, επιδεικνύει εξαίρετη δράση έναντι των Εντεροβακτηριακών στελεχών, που παράγουν KPC, αλλά όχι και αυτών που παράγουν MBL ή OXA-48 (Zhanel *et al.*, 2018). Η πλαζομικίνη είναι ευαίσθητη στη δράση των 16S rRNA μεθυλασών και γι' αυτό δεν μπορεί να αποτελέσει θεραπευτική επιλογή για RMT-θετικά Εντεροβακτηριακά στελέχη (Galani *et al.*, 2019). Τέλος, ο συνδυασμός αζτρεονάμης/αβιμπακτάμης, που αναστέλλει τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος των Εντεροβακτηριακών στελεχών που παράγουν MBL, βρίσκεται ακόμη σε κλινική μελέτη Φάσης 3 (Bassetti *et al.*, 2021b).

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας έχει επισημάνει την ανάγκη για νέες αντιμικροβιακές ουσίες για την καταπολέμηση των λοιμώξεων, τόσο από *A. baumannii*, όσο και από τα Εντεροβακτηριακά στελέχη που παράγουν καρβαπενεμάση (WHO, 2017). Από την άποψη αυτή, ένα αξιοσημείωτο εύρημα της μελέτης μας ήταν η *in vitro* δράση της απραμικίνης. Η απραμικίνη είναι μια δομικά μοναδική αμινογλυκοσίδη, που έλαβε άδεια χρήσης από το 1980 για από του στόματος χρήση στην κτηνιατρική και μέχρι πρότινος δεν είχε αξιολογηθεί για κλινική χρήση. Είναι δραστική έναντι των στελεχών που παράγουν RMT, εκτός από την NpmA (Livermore *et al.*, 2011a), και δεν αδρανοποιείται από τα περισσότερα από τα γνωστά αμινογλυκοσιδο-τροποποιητικά ένζυμα (Ramirez & Tolmasky, 2010). Είναι αξιοσημείωτο ότι για το εξαιρετικά ανθεκτικό σύνολο των στελεχών *A. baumannii* που παράγουν ArmA, μόνο ένα στέλεχος (0.3%) παρουσίαζε τιμή MIC για την απραμικίνη ανώτερη του επιδημιολογικού ορίου αντοχής (64mg/L), ενώ για το σύνολο των RMT-θετικών στελεχών *K. pneumoniae* και των δύο συλλογών η απραμικίνη ήταν δραστική έναντι του 73.9%, με μόνο τρία στελέχη να παρουσιάζουν MIC \geq 64 mg/L. Αυτό είναι σύμφωνο με τα προηγούμενα στοιχεία που αποδεικνύουν ότι η απραμικίνη έχει ευρεία δράση έναντι παθογόνων πολυανθεκτικών (MDR) που αποτελούν προτεραιότητα για τον ΠΟΥ, όπως τα Εντεροβακτηριακά που παράγουν καρβαπενεμάση (Livermore *et al.*, 2011a; Smith & Kirby, 2016; Hu *et al.*, 2017; Juhas *et al.*, 2019) και το *A. baumannii* (Kang *et al.*, 2018). Αυτή τη στιγμή μια κρυσταλλική ελεύθερη βάση της απραμικίνης με κωδικό EBL-1003, βρίσκεται σε κλινική ανάπτυξη με την υποστήριξη του Innovative Medicines Initiative's European Gram-Negative Antibacterial Engine (IMI ENABLE) (Theuretzbacher *et al.*, 2020). Αν και αντοχή στην απραμικίνη σε κλινικά στελέχη έχει ήδη περιγραφεί από το 1993 λόγω παραγωγής AAC(3)-IV (Hunter *et al.*, 1993), η χρησιμότητά της έναντι των Gram-αρνητικών στελεχών XDR θα εξαρτηθεί από τη μελλοντική επιδημιολογία της αντοχής στις αμινογλυκοσίδες, με την ταχεία ανάπτυξη και εξάπλωση της αντοχής να αναμένεται όταν η απραμικίνη χρησιμοποιηθεί κλινικά.

Στους περιορισμούς της παρούσας μελέτης περιλαμβάνεται η έλλειψη αλληλούχισης ολόκληρου του γονιδιώματος όλων των στελεχών για την περαιτέρω διευκρίνηση όλων των μηχανισμών αντοχής σε διάφορα αντιμικροβιακά. Επιπλέον, δεν προχωρήσαμε στην ανασύσταση της αλληλουχίας ολόκληρων των κυκλικών πλασμιδίων, αλλά προσδιορίσαμε τη θέση του *rmtB1* στα πλασμίδια IncC, χαρακτηρίσαμε το στοιχείο που μεταφέρει το *rmtB1* και προσδιορίσαμε όλα τα γονίδια αντοχής που βρίσκονται στο πλασμίδιο IncC των στελεχών. Στα στελέχη *A. baumannii* δεν ανιχνεύσαμε τη θέση του γονιδίου *armA*, καθώς θεωρήσαμε ότι ο κλώνος που επικρατεί στην Ελλάδα φιλοξενεί το συγκεκριμένο γονίδιο στο χρωμόσωμα, όπως διαπιστώνεται από τα δεδομένα WGS, που έχουν μέχρι σήμερα κατατεθεί στην GenBank.

Τα στελέχη της παρούσας μελέτης απομονώθηκαν κατά τα έτη 2015-2016 και ενδέχεται να μην αντικατοπτρίζουν την πιο πρόσφατη επιδημιολογική κατάσταση στην Ελλάδα. Ωστόσο, σύμφωνα με το WHONET Greece (<http://www.mednet.gr/whonet/>), τα ποσοστά αντοχής στις αμινογλυκοσίδες φαίνεται να είναι σταθερά κατά τη διάρκεια των ετών 2015 έως 2019. Επιπλέον, δύο πρόσφατες αναφορές αποκάλυψαν παρόμοια συζευκτικά πλασμίδια που φέρουν το *rmtB1* σε στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν KPC-2 (Galani *et al.*, 2020; Voulgari *et al.*, 2020), δείχνοντας ότι το πλασμίδιο αυτό εξακολουθεί να κυκλοφορεί στα ελληνικά νοσοκομεία.

Εν κατακλείδι, η μελέτη αυτή υπογραμμίζει την επικράτηση της μεθυλάσης ArmA μεταξύ των ανθεκτικών στις αμινογλυκοσίδες κλινικών στελεχών *A. baumannii* και την ταυτόχρονη παραγωγή της με καρβαπενεμάση OXA-23 σε στελέχη XDR ή PDR του IC II που κυκλοφορούν σε νοσοκομεία της Αθήνας, καθώς και τη διάδοση της μεθυλάσης RmtB μεταξύ των ήδη MDR Εντεροβακτηριακών στελεχών και τη συσχέτισή της με πλασμίδια IncC που είναι σημαντικοί παράγοντες για την εξάπλωση των βασικών γονιδίων αντοχής στα αντιβιοτικά. Συμπερασματικά, πρέπει να εκπονηθούν αυστηρά μέτρα ελέγχου των λοιμώξεων για να αποτραπεί η εξάπλωση πολυανθεκτικών στελεχών, όπως αυτά που περιγράφονται σε αυτήν την μελέτη, με την ταυτόχρονη παραγωγή καρβαπενεμασών και μεθυλασών. Δεδομένου ότι η συχνότητα εμφάνισης των γονιδίων 16S rRNA μεθυλασών στη χώρα μας είναι ήδη αρκετά υψηλή για στελέχη *A. baumannii* και *P. stuartii*, πρέπει να αποφεύγεται η χορήγηση αμινογλυκοσιδών για λοιμώξεις από αυτά τα στελέχη, ενώ σε λοιμώξεις από *K. pneumoniae* θα πρέπει να γίνεται με σκεπτικισμό, καθότι η ανίχνευση των RMTs σε αυτά τα στελέχη εξακολουθεί να παραμένει κάτω του 10%. Τέλος, αυτή η μελέτη φωτίζει την πολλά υποσχόμενη *in vitro* δράση της απραμυκίνης ενάντια σε αυτήν τη συλλογή στελεχών και υπογραμμίζει την ανάγκη για περαιτέρω αξιολόγησή της για τη θεραπεία των πολυανθεκτικών αυτών στελεχών.

VI. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι αμινογλυκοσίδες έχουν μέχρι στιγμής αποτελέσει βασικό όπλο στη θεραπεία απειλητικών για τη ζωή λοιμώξεων, αλλά δυστυχώς, η δραστηριότητά

τους έχει περιοριστεί λόγω της διάδοσης διαφόρων μηχανισμών αντοχής. Η παραγωγή 16S rRNA μεθυλασών είναι ένας αναδυόμενος μηχανισμός αντοχής, που θέτει σε απόλυτο κίνδυνο την κλινική αποτελεσματικότητα των αμινογλυκοσιδών.

Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η συχνότητα ανίχνευσης γονιδίων που κωδικοποιούν μεθυλάση σε πληθυσμό Gram-αρνητικών μικροβίων που απομονώνονται από νοσηλευόμενους ασθενείς νοσοκομείων της Αθήνας είναι υψηλότερη από ότι είχε μέχρι σήμερα αναφερθεί στη χώρα μας.

Η εμφάνιση αντοχής στις αμινογλυκοσίδες μέσω 16S rRNA μεθυλίωσης είναι πιο συχνή σε στελέχη *A. baumannii* (63.5%) και *P. stuartii* (55.1%) και λιγότερο συχνή, αλλά αυξανόμενη σε στελέχη *K. pneumoniae* (3.9%). Συγκεκριμένα, σε σύγκριση με προηγούμενη επιδημιολογική μελέτη της ομάδας μας το 2009, που αφορούσε όμως μόνο ένα νοσοκομείο (Galani *et al.*, 2012), παρατηρήθηκε αύξηση του επιπολασμού των RMTs σε στελέχη *K. pneumoniae* από 0.2 σε 3.9%. Η μεθυλίωση του 16S rRNA φαίνεται να είναι πιο σπάνια σε στελέχη *P. mirabilis* και *E. coli*, καθώς στην παρούσα μελέτη βρέθηκαν μόνο σποραδικά στελέχη αυτών των ειδών με γονίδιο μεθυλάσης.

Σε στελέχη *A. baumannii* παρατηρήθηκε επικράτηση του γονιδίου *armA*, ενώ στα Εντεροβακτηριακά στελέχη επικράτηση του γονιδίου *rmtB*. Δεν βρέθηκε στέλεχος *P. aeruginosa* που να παράγει μεθυλάση.

Τα *armA*-θετικά στελέχη *A. baumannii* ήταν κυρίως παραγωγοί OXA-23 και ανήκαν στον διεθνή κλώνο IC II. Η μεγάλη πλειονότητα των στελεχών *A. baumannii* με *armA* ήταν PDR (66.8%), ενώ το υπόλοιπο 33.2% ήταν XDR. Σε αυτά τα στελέχη παρατηρήθηκε ανησυχητικά μεγάλο ποσοστό αντοχής στην κολιστίνη (84.6%). Η τιγεκυκλίνη χαρακτηριζόταν από υψηλές τιμές MIC₅₀ και MIC₉₀ (4 και 8mg/L, αντίστοιχα), ενώ η τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη ήταν δραστική έναντι μόνο του 17.8% των στελεχών.

Όσον αφορά τα Εντεροβακτηριακά στελέχη, όλα τα RMT-θετικά στελέχη παρήγαγαν και καρβαπενεμάση. Για το λόγο αυτό, ελέγχθηκε μία πανελλήνια συλλογή στελεχών *K. pneumoniae* που παρήγαγαν καρβαπενεμάση, με τον επιπολασμό των RMT σε αυτόν τον πληθυσμό να ανέρχεται στο 6.8%. Από αυτή τη συλλογή, 19.4% και 7.5% των στελεχών που παρήγαγαν VIM και KPC αντίστοιχα, έφεραν γονίδιο μεθυλάσης. Κανένα από τα Εντεροβακτηριακά στελέχη των δύο συλλογών που παρήγαγαν NDM δεν έφερε γονίδιο μεθυλάσης, όπως έχει αναφερθεί σε στελέχη από άλλες χώρες.

Επισημάνθηκε συνύπαρξη του *bla*_{VIM-1} και του *rmtB* στο ίδιο πλασμίδιο σε στελέχη *P. stuartii*, *P. mirabilis* και *K. pneumoniae*, ενώ το *bla*_{KPC} δεν βρέθηκε σε καμία περίπτωση στο ίδιο πλασμίδιο με το *rmtB*. Η συνύπαρξη στο ίδιο πλασμίδιο γονιδίων αντοχής σε αμινογλυκοσίδες, β-λακτάμες, χλωραμφαινικό-λη, τετρακυκλίνες, σουλφοναμίδες και τριμεθοπρίμη ενέχει τον κίνδυνο η χρήση

αμινογλυκοσιδών να συμβάλλει στην επιλογή και εξάπλωση της πολυαντοχής στα Εντεροβακτηριακά.

Η ανίχνευση γονιδίων 16S rRNA μεθυλασών ολοένα και αυξάνεται στην Ελλάδα, αλλά εξακολουθεί σε γενικές γραμμές να είναι λιγότερο από 10% στα στελέχη *K. pneumoniae* και η εμπειρική χρήση των αμινογλυκοσιδών ως μονοθεραπεία ή και σε συνδυασμό θα πρέπει να γίνεται με σκεπτικισμό. Δεδομένου ότι η συχνότητα εμφάνισης των γονιδίων 16S rRNA μεθυλασών στη χώρα μας είναι ήδη αρκετά υψηλή για στελέχη *A. baumannii* και *P. stuartii*, πρέπει να αποφεύγεται η χορήγηση αμινογλυκοσιδών για λοιμώξεις από αυτά τα στελέχη.

Αξιοσημείωτο εύρημα της μελέτης μας ήταν η *in vitro* δράση της απραμυκίνης. Για το εξαιρετικά ανθεκτικό σύνολο των στελεχών *A. baumannii* που παράγουν ArmA, μόνο ένα στέλεχος (0.3%) παρουσίαζε τιμή MIC για την απραμυκίνη ανώτερη του επιδημιολογικού ορίου αντοχής (64mg/L), ενώ για το σύνολο των RMT-θετικών στελεχών *K. pneumoniae* και των δύο συλλογών η απραμυκίνη ήταν δραστική έναντι του 73.9%, με μόνο τρία στελέχη να παρουσιάζουν MIC \geq 64 mg/L.

Συνοψίζοντας, τα γονίδια RMTs αποτελούν μια πραγματική απειλή που εντούτοις, μπορεί να διαλάθει της προσοχής. Οι παραπάνω παρατηρήσεις συνεισφέρουν στην καλύτερη κατανόηση της επιδημιολογίας των στελεχών *A. baumannii* και των Εντεροβακτηριακών στελεχών που παράγουν 16S rRNA μεθυλάση και στην διαμόρφωση κατάλληλων στρατηγικών για την αναχαίτιση της διασποράς τους. Η εξάπλωση XDR στελεχών που παράγουν ταυτόχρονα καρβαπενεμάσες και 16S rRNA μεθυλάσες προκαλεί μεγάλη ανησυχία, καθώς μπορεί να αποτελέσει μεγάλη απειλή στο μέλλον, και επιβάλλει την ανάγκη για συνεχή παρακολούθηση αυτών των παθογόνων.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μεθυλίωση του 16S ριβοσωμικού RNA (rRNA) έχει αναφερθεί σαν ένας αναδυόμενος μηχανισμός αντοχής στις αμινογλυκοσίδες σε παθογόνα Gram-αρνητικά μικρόβια από το 2003 και αναφέρεται όλο και περισσότερο παγκοσμίως. Δέκα διαφορετικά γονίδια (*rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*, *rmtF*, *rmtG*, *rmtH*, *armA*, *hpmA*) που κωδικοποιούν τα αντίστοιχα ένζυμα έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα, σε κλινικά αλλά και σε κτηνιατρικά στελέχη, και προσδίδουν υψηλού επιπέδου αντοχή σε όλες τις κλινικά χρησιμοποιούμενες αμινογλυκοσίδες. Τα γονίδια αυτά βρίσκονται κυρίως σε τρανσποζόνια πάνω σε συζευκτικά πλασμίδια που τους δίνουν τη δυνατότητα οριζόντιας εξάπλωσης, γεγονός που μπορεί εν μέρει να εξηγήσει την παγκόσμια εξάπλωση αυτού του μηχανισμού σε μικρόβια της οικογένειας των Εντεροβακτηριακών και σε μη ζυμωτικά βακτήρια, συμπεριλαμβανομένων των *P. aeruginosa* και *Acinetobacter* spp. Μεγάλη ανησυχία προκαλεί η ανάπτυξη πολυαντοχής των μικροβίων που παράγουν 16S rRNA μεθυλάσες μέσω της συσσώρευσης διαφόρων γονιδίων μικροβιακής αντοχής, καθώς αρκετά από αυτά τα στελέχη έχουν βρεθεί να παράγουν ταυτόχρονα και καρβαπενεμάσες ή ευρέος φάσματος β-λακταμάσες. Μέχρι στιγμής, έχουν αναφερθεί 16S rRNA μεθυλάσες σε τουλάχιστον 30 χώρες ή περιοχές. Η παγκόσμια εξάπλωσή τους εξελίσσεται σε μια σοβαρή απειλή, γεγονός που συνεπάγεται την ανάγκη συνέχισης της έρευνας με απώτερο σκοπό τον περιορισμό της περαιτέρω διάδοσής τους.

Στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η διερεύνηση της ύπαρξης γονιδίων που κωδικοποιούν 16S rRNA μεθυλάσες στα Εντεροβακτηριακά στελέχη αλλά και στα στελέχη *P. aeruginosa* και *Acinetobacter* spp. που απομονώνονται από καλλιέργειες ασθενών που νοσηλεύονται σε μεγάλα νοσοκομεία της Αθήνας και ο ακριβής επιπολασμός τους τα έτη 2015 - 2016. Επιπρόσθετος στόχος ήταν η μελέτη του γενετικού υποστρώματός τους και της συνύπαρξής τους με γονίδια αντοχής για άλλες ομάδες αντιμικροβιακών, όπως οι β-λακτάμες (β-λακταμάσες), οι καρβαπενέμες (καρβαπενεμάσες) και οι κινολόνες (*qnr*, *aac(6)-cr*, *oqxAB*), στα ίδια συζευκτικά πλασμίδια.

Η συλλογή και μελέτη των στελεχών έγινε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Λοιμώξεων και Αντιμικροβιακής Θεραπείας της Δ' Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Από τα μικροβιολογικά εργαστήρια των συνεργαζόμενων νοσοκομείων συλλέχθηκαν Gram-αρνητικά στελέχη (Εντεροβακτηριακά, *P.aeruginosa* ή *Acinetobacter* spp.) που παρουσίαζαν ταυτόχρονα αντοχή στην αμικασίνη και στην γενταμικίνη. Τα στελέχη συγκεντρώθηκαν στο κεντρικό εργαστήριο, όπου έγινε προσδιορισμός των ελάχιστων ανασταλτικών συγκεντρώσεων (MIC) στις αμινογλυκοσίδες αμικασίνη, γενταμικίνη, τομπραμυκίνη και απραμυκίνη. Ακολούθησε μοριακός έλεγχος με PCR για ανίχνευση γονιδίων 16S rRNA μεθυλοτρανσφερασών στα στελέχη που παρουσίαζαν υψηλού επιπέδου αντοχή. Όσον αφορά την αντοχή σε άλλα αντιβιοτικά, προσδιορίστηκε η ευαισθησία των RMT-θετικών στελεχών σε όλες τις κλινικά σημαντικές ομάδες αντιμικροβιακών, ενώ με μοριακό έλεγχο έγινε η

διερεύνηση για την ύπαρξη καρβαπενεμασών και για την κλωνικότητα των στελεχών ανά είδος. Στη συνέχεια ελέγχθηκε η πιθανή πλασμιδιακή θέση του γονιδίου *rmtB* που βρέθηκε στα Εντεροβακτηριακά στελέχη, η δυνατότητα μεταφοράς του, καθώς και η συνύπαρξη στο ίδιο πλασμίδιο άλλων γονιδίων αντοχής. Τέλος έγινε σύγκριση των πλασμιδίων που έφεραν το *rmtB* και είχαν απομονωθεί από διαφορετικούς γονότυπους Εντεροβακτηριακών στελεχών. Καθώς παρατηρήθηκε ότι όλα τα RMT-θετικά Εντεροβακτηριακά στελέχη παρήγαγαν καρβαπενεμάση, ελέγχθηκε επιπλέον και μια πανελλήνια συλλογή κλινικών στελεχών *K. pneumoniae* που παρήγαγαν καρβαπενεμάση (της ίδιας χρονικής περιόδου) για να μελετηθεί ξεχωριστά ο επιπολασμός των RMTs στην ομάδα αυτή.

Η μεθυλάση ArgA κυριαρχεί μεταξύ των ανθεκτικών στις αμινογλυκοσίδες κλινικών στελεχών *A. baumannii*, που κυκλοφορούν στα νοσοκομεία της Αθήνας. Τα στελέχη αυτά παράγουν παράλληλα καρβαπενεμάση, κατά κύριο λόγο OXA-23, είναι XDR ή PDR, και ανήκουν στον διεθνή κλώνο IC II. Στα Εντεροβακτηριακά στελέχη παρατηρήθηκε επίσης σαφής συσχέτιση της παραγωγής μεθυλάσης RmtB με γονίδια καρβαπενεμάσης, γεγονός ιδιαίτερα ανησυχητικό, καθώς οι RMTs και οι καρβαπενεμάσες προσδίδουν αντοχή σε πολλές κατηγορίες αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία των λοιμώξεων από Gram-αρνητικά βακτήρια. Όσον αφορά τη συλλογή των στελεχών *K. pneumoniae* που παρήγαγαν καρβαπενεμάση, το 6.8% των στελεχών βρέθηκε να παράγει και μεθυλάση.

Πολύ υψηλά ποσοστά αντοχής στην κολιστίνη παρατηρήθηκαν τόσο στα στελέχη *A. baumannii*, όσο και στα στελέχη *K. pneumoniae*. Η φωσφομυκίνη ήταν ο πιο δραστικός παράγοντας έναντι του συνόλου των Εντεροβακτηριακών, ενώ οι συνδυασμοί κεφταζιδίμης/αβιμπακτάμης και μεροπενέμης/ βαμπορμπακτάμης έδειξαν άριστη δράση έναντι των στελεχών *K. pneumoniae* που παρήγαγαν KPC ή/και OXA-48 ο πρώτος και KPC ο δεύτερος.

Επιπλέον, αυτή η μελέτη κατέδειξε μια πολλά υποσχόμενη *in vitro* δράση της απραμυκίνης έναντι των XDR και PDR *A. baumannii* στελεχών, αλλά και έναντι των πολυανθεκτικών στελεχών *K. pneumoniae*, που δικαιολογεί περαιτέρω αξιολόγηση της για τη θεραπεία λοιμώξεων από αυτά τα στελέχη, καθώς μπορεί να αποτελέσει βάση για σχεδιασμό παραγώγων με ακόμη καλύτερη δράση και μειωμένη τοξικότητα.

Ο εντοπισμός του *rmtB* σε συζευκτικό πλασμίδιο, μαζί με τα γονίδια *bla_{VEB}*, *bla_{OXA-10}* και *bla_{TEM}*, καθώς και ο εντοπισμός των *bla_{VIM}* και *bla_{SHV}* στο ίδιο πλασμίδιο σε στελέχη *P. mirabilis*, *P. stuartii*, και *E. coli*, κάνει την κατάσταση ακόμη πιο ανησυχητική και επιβάλλει την ανάγκη για παρακολούθηση καθώς και τη λήψη μέτρων για τον περιορισμό της εξάπλωσης του.

Συμπερασματικά, η παραγωγή 16S rRNA μεθυλασών είναι ένας αναδυόμενος μηχανισμός αντοχής, ικανός να θέσει σε κίνδυνο την κλινική αποτελεσματικότητα όλων των αμινογλυκοσιδών, ακόμα και των νεότερων που δεν βρίσκονται ακόμα σε κλινική χρήση.

ABSTRACT

Methylation of 16S ribosomal RNA (rRNA) has emerged as a novel aminoglycoside resistance mechanism in pathogenic gram-negative bacteria since 2003 and is increasingly reported worldwide.

Ten different genes (*rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*, *rmtF*, *rmtG*, *rmtH*, *armA* and *npmA*) that encode the respective enzymes have been described to date, not only in clinical but also in veterinary strains and their presence confers high-level resistance to all clinically relevant aminoglycosides. These genes are mostly located on transposons within transferable plasmids, which provides them with the potential to spread horizontally and may in part explain the rapid worldwide distribution among Enterobacterales and non-glucose-fermenting bacilli of human and animal origin. One great concern is the multidrug resistance development in RMT-producing pathogenic bacteria through further accumulation of various antimicrobial resistance genes such as carbapenem-hydrolyzing β -lactamases. Thus far, RMTs have been reported from at least 30 countries or regions. The worldwide dissemination is becoming a serious global concern and this implies the necessity to continue investigations on the trend of RMTs to restrict their further distribution.

The aim of this study was to investigate the prevalence of 16S rRNA methylases in consecutively collected Gram-negative isolates (Enterobacterales, *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp.) from patients treated in major hospitals in Athens Metropolitan area and the Greek province during a two-year period (2015 – 2016). An additional goal was to study their genetic background and their coexistence with resistance genes for other groups of antimicrobials, such as β -lactams (β -lactamases), carbapenems (carbapenemases) and quinolones (*qnr*, *aac* (6') - cr, *oqxAB*), in the same conjugative plasmids.

The study took place at the Infectious Diseases Laboratory of the 4th Department of Internal Medicine of the National and Kapodistrian University of Athens in Greece. Single-patient, Gram-negative clinical isolates (Enterobacterales, *P. aeruginosa* or *Acinetobacter* spp.), resistant to both amikacin and gentamicin, were collected from the Microbiology Departments of the collaborating hospitals. All isolates were sent to the central laboratory for MIC determination to various aminoglycosides with the broth dilution technique. Highly resistant isolates were examined for the presence of 16S rRNA methylase (RMT) genes (*armA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtA*, *rmtD* and *npmA*) by PCR. In all RMT-producing isolates, ESBL and carbapenemase production was confirmed by PCR, and the clonal relatedness and the plasmid contents were also characterized. The possible plasmid locus of the *rmtB* gene found in Enterobacterial strains, its transferability, and the coexistence of other resistance genes in the same plasmid were then tested. Finally, the plasmids carrying *rmtB* isolated from different genera/genotypes of Enterobacterial strains were compared with each other. As all RMT-positive Enterobacterales were also carbapenemase producers, another

nationwide collection of carbapenemase-producing *K. pneumoniae* isolates (of the same time-period) was tested, with the aim of estimating the prevalence of RMT-production for this specific population.

ArmA predominates among the aminoglycoside-resistant clinical strains of *A. baumannii* in Greek hospitals. These strains also produce carbapenemases, mainly OXA-23, they are XDR or PDR, and belong to the international clone IC II. In enterobacterial strains, a clear association of 16S rRNA methylase (RmtB) production with carbapenemase genes has also been observed, causing particular concern, as this combination confers resistance to many antibiotic classes used to treat Gram infections. The prevalence of RMT genes among the carbapenemase-producing *K. pneumoniae* isolates was 6.8%.

Very high rates of colistin resistance were observed in both *A. baumannii* strains and *K. pneumoniae* strains. Fosfomycin was the most active agent against all Enterobacterales, while the combinations of ceftazidime / avibactam and meropenem / vaborbactam showed excellent activity against *K. pneumoniae* strains, that produced KPC and/or OXA-48 the former and KPC the latter.

In addition, this study demonstrated a promising *in vitro* effect of apramycin against XDR and PDR *A. baumannii* strains, but also against the MDR *K. pneumoniae* strains, thus justifying the need for its further evaluation for the treatment of infections by these strains, as it may be the basis for designing derivative drugs with even better action and reduced toxicity.

The detection of *rmtB* in a conjugative plasmid, together with the *bla*_{VEB}, *bla*_{OXA-10} and *bla*_{TEM} genes, as well as the detection of *bla*_{VIM} and *bla*_{SHV} in the same plasmid in *P. mirabilis*, *P. stuartii*, and *E. coli* strains also raise great concern, implying the need for monitoring as well as measures to limit its spread.

In conclusion, the production of 16S rRNA methylases is an emerging mechanism of resistance, capable of jeopardizing the clinical efficacy of all aminoglycosides, including even newer ones that have not yet been clinically used.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Πετρίκκος Γ. Αμινογλυκοσίδες. Από: Γιαμαρέλλου Ε., εκδ. Λοιμώξεις & Αντιμικροβιακή Θεραπεία. Εκδ. Π.Χ. Πασχαλίδης, 2009;83-95
- Aggen JB, Armstrong ES, Goldblum AA, Dozzo P, Linsell MS, Gliedt MJ, *et al.* Synthesis and spectrum of the neoglycoside ACHN-490. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(11):4636-4642
- Aghazadeh M, Rezaee MA, Nahaei MR, Mahdian R, Pajand O, Saffari F, *et al.* Dissemination of aminoglycoside-modifying enzymes and 16S rRNA methylases among *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Microb Drug Resist.* 2013;19(4):282-288
- Ainsa JA, Pérez E, Pelicic V, Berthet FX, Gicquel B, Martín C. Aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase genes are universally present in *Mycobacteria*: characterization of the *aac(2')-Ic* gene from *Mycobacterium tuberculosis* and the *aac(2')-Id* gene from *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol.* 1997;24:431-441
- Aires JR, Köhler T, Nikaido H, Plésiat P. Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:2624-2628
- Al-Gallas N, Abbassi MS, Gharbi B, Manai M, Ben Fayala MN, Bichihi R, *et al.* Occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and *rmtB* gene in *Salmonella enterica* serovar enteritidis and Typhimurium isolated from food-animal products in Tunisia. *Foodborne Pathog Dis.* 2013;10(9):813-819
- Al-Kadmy IMS, MUSAHER HK, Al-Kaabi MHAA, Al-Jubori SS. Detection of 16S ribosomal RNA methylation in extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from Baghdad hospitals. *Iraqi Journal of Biotechnology.* 2015;14(1):53-62
- Allmansberger R, Brau B, Piepersberg W. Genes for gentamicin-(3)-N-acetyltransferases III and IV. *Mol Gen Genet.* 1985;198:514-520
- Al Sheikh YA, Marie MA, John J, Krishnappa LG, Dabwab KH. Prevalence of 16S rRNA methylase genes among β -lactamase-producing Enterobacteriaceae clinical isolates in Saudi Arabia. *Libyan J Med.* 2014;9:24432
- Ambrose SJ, Harmer CJ, Hall RM. Compatibility and entry exclusion of IncA and IncC plasmids revisited: IncA and IncC plasmids are compatible. *Plasmid.* 2018;96-97:7-12
- Arpin C, Quentin C, Grobost F, Cambau E, Robert J, Dubois V, *et al.* Nationwide survey of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in the French community setting. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63:1205-1214

Avent ML, Rogers BA, Cheng AC, Paterson DL. Current use of aminoglycosides: indications, pharmacokinetics and monitoring for toxicity. *Intern Med J*. 2011;41(6):441-449

Ayad A, Drissi M, de Curraize C, Dupont C, Hartmann A, Solanas S, *et al*. Occurrence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in extended-spectrum β -lactamases producing *Escherichia coli* in Algerian hospitals. *Front Microbiol*. 2016;7:1409

Azucena E, Mobashery S. Aminoglycoside-modifying enzymes: mechanisms of catalytic processes and inhibition. *Drug Resist Updat*. 2001;4:106-117

Bado I, Papa-Ezdra R, Delgado-Blas JF, Gaudio M, Gutiérrez C, Cordeiro NF, *et al*. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in the intensive care unit of Uruguay's university hospital identifies the first *rmtC* gene in the species. *Microb Drug Resist*. 2018;24(7):1012-1019

Bakour S, Alsharapy SA, Touati A, Rolain JM. Characterization of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates carrying blaOXA-23 carbapenemase and 16S rRNA methylase *armA* genes in Yemen. *Microb Drug Resist*. 2014;20(6):604-609

Balwit JM, van Langewelde P, Vann JM, Proctor RA. Gentamicin-resistant menadione and hemin auxotrophic *Staphylococcus aureus* persist within cultured endothelial cells. *J Infect Dis*. 1994;170:1033-1037

Bartoloni A, Sennati S, Di Maggio T, Mantella A, Riccobono E, Strohmeyer M, *et al*. Antimicrobial susceptibility and emerging resistance determinants (blaCTX-M, rmtB, fosA3) in clinical isolates from urinary tract infections in the Bolivian Chaco. *Int J Infect Dis*. 2016;43:1-6

Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem*. 1995;226:235-240

Barrons RW. Drug-induced neuromuscular blockade and myasthenia gravis. *Pharmacotherapy*. 1997;17(6):1220-1232

Bassetti M, Echols R, Matsunaga Y, Ariyasu M, Doi Y, Ferrer R, *et al*. Efficacy and safety of cefiderocol or best available therapy for the treatment of serious infections caused by carbapenem-resistant Gram-negative bacteria (CREDIBLE-CR): a randomised, open-label, multicentre, pathogen-focused, descriptive, phase 3 trial. *Lancet Infect Dis*. 2021a;21(2):226-240

Bassetti M, Vena A, Giacobbe DR, Castaldo N. Management of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative pathogens: recent advances and future directions. *Arch Med Res*. 2021b;52(8):817-827

Beauclerk AA, Cundliffe E. Sites of action of two ribosomal RNA methylases responsible for resistance to aminoglycosides. *J Mol Biol*. 1987;193:661-671

- Begg EJ, Barclay ML. Aminoglycosides – 50 years on. *Br J Clin Pharmacol*. 1995a;39:597-603
- Begg EJ, Barclay ML, Duffull SB. A suggested approach to once-daily aminoglycoside dosing. *Br J Clin Pharmacol*. 1995b;39(6):605-609
- Bennett PM. Genome plasticity: insertion sequence elements, transposons and integrons, and DNA rearrangement. *Methods Mol Biol*. 2004;266:71-113
- Bennett PM. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol*. 2008;153(1):S347-S357
- Benvetiste R, Davies J. Structure-activity relationships among the aminoglycoside antibiotics: role of hydroxyl and amino groups. *Antimicrob Agents Chemother*. 1973;4:402-409
- Berçot B, Poirel L, Nordmann P. Plasmid-mediated 16S rRNA methylases among extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:4526-4527
- Berçot B, Poirel L, Ozdamar M, Hakko E, Türkoglu S, Nordmann P. Low prevalence of 16S methylases among extended-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* from a Turkish hospital. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(4):797-798
- Beyrouthy R, Robin F, Hamze M, Bonnet R. IncFIIk plasmid harbouring an amplification of 16S rRNA methyltransferase-encoding gene *rmtH* associated with mobile element *ISCR2*. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(2):402-406
- Blackwell GA, Holt KE, Bentley SD, Hsu LY, Hall RM. Variants of AbGRI3 carrying the *armA* gene in extensively antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* from Singapore. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(4):1031-1039
- Blackwell GA, Nigro SJ, Hall RM. Evolution of AbGRI2-0, the Progenitor of the AbGRI2 Resistance Island in Global Clone 2 of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;60(3):1421-9
- Block M, Blanchard DL. Aminoglycosides. [Updated 2021 Jul 23]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541105/>
- Bogaerts P, Galimand M, Bauraing C, Deplano A, Vanhoof R, De Mendonca R, *et al*. Emergence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. *J Antimicrob Chemother*. 2007;59(3):459-464
- Bonnet R, Dutour C, Sampaio JL, Chanal C, Sirot D, Labia R, *et al*. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240→Gly. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:2269-2275

Bonnin RA, Poirel L, Licker M, Nordmann P. Genetic diversity of carbapenem-hydrolysing β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Romanian hospitals. Clin Microbiol Infect. 2011;17(10):1524-1528

Bordeleau E, Stogios PJ, Evdokimova E, Koteva K, Savchenko A, Wright GD. ApmA is a unique aminoglycoside antibiotic acetyltransferase that inactivates apramycin. mBio. 2021;12(1):e02705-20

Bouzidi N, Aoun L, Dekhil M, Granier SA, Poirel L, Brisabois A, *et al.* Co-occurrence of aminoglycoside resistance gene *armA* in non-Typhi *Salmonella* isolates producing CTX-M-15 in Algeria. J Antimicrob Chemother. 2011;66(9):2180-2181

Bradford PA, Bratu S, Urban C, Visalli M, Mariano N, Landman D, *et al.* Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 β -lactamases in New York City. Clin Infect Dis. 2004;39:55-60

Brigante G, Migliavacca R, Bramati S, Motta E, Nucleo E, Manenti M, *et al.* Emergence and spread of a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clone producing both the carbapenemase OXA-23 and the 16S rRNA methylase ArmA. J Med Microbiol. 2012;61(5):653-661

Bryan LE, O'Hara K, Wong S. Lipopolysaccharide changes in impermeability-type aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 1984;26:250-255

Bryan L, Kwan S. Role of ribosomal binding, membrane potential, and electron transport in bacterial uptake of streptomycin and gentamicin. Antimicrob Agents Chemother. 1983;23:835-845

Bueno MF, Francisco GR, Cerdeira L, Lenne S, Souza TA, Lincopan N, *et al.* Draft genome sequence of an aminoglycoside-resistant RmtG-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST235 isolated from a cystic fibrosis patient. J Glob Antimicrob Resist. 2017;8:106-107

Bueno MF, Francisco GR, de Oliveira Garcia D, Doi Y. Complete sequences of multidrug resistance plasmids bearing *rmtD1* and *rmtD2* 16S rRNA methyltransferase genes. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60(3):1928-1931

Bueno MF, Francisco GR, O'Hara JA, de Oliveira Garcia D, Doi Y. Coproduction of 16S rRNA methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M group extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57:2397-2400

Burk DL, Berghuis AM. Protein kinase inhibitors and antibiotic resistance. Pharmacol Ther. 2002;93:283-292

- Cao XL, Cheng L, Zhang ZF, Ning MZ, Zhou WQ, Zhang, *et al.* Survey of clinical extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter cloacae* isolates in a Chinese tertiary hospital, 2012-2014. *Microb Drug Resist.* 2017;23(1):83-89
- Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods.* 2005;63:219-228
- Carattoli A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:2227-2238
- Carattoli A, Villa L, Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Evolution of IncA/C *bla*_{CMY-2} carrying plasmids by acquisition of the *bla*_{NDM-1} carbapenemase gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(2):783-786
- Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, *et al.* *In silico* detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58:3895-3903
- Carter AP, Clemons WM, Brodersen DE, Morgan-Warren RJ, Wimberly BT, Ramakrishnan V. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature.* 2000;407:340-348
- Castanheira M, Deshpande LM, Melano RG, Mendes RE, Jones RN. Characterization of two new variants of 16S rRNA methylase encoding genes, *rmtB2* and *rmtB3*. 22nd European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases (ECCMID); London, United Kingdom; 2012; P1245
- Castanheira M, Deshpande LM, Woosley LN, Serio AW, Krause KM, Flamm RK. Activity of plazomicin compared with other aminoglycosides against isolates from European and adjacent countries, including *Enterobacteriaceae* molecularly characterized for aminoglycoside-modifying enzymes and other resistance mechanisms. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(12):3346-3354
- Castanheira M, Fritsche TR, Sader HS, Jones RN. RmtD 16S RNA methylase in epidemiologically unrelated SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(4):1587-1588
- Cavalcanti FLDS, Mirones CR, Paucar ER, Montes LA, Leal-Balbino TC, de Moraes, *et al.* Mutational and acquired carbapenem resistance mechanisms in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110(8):1003-1009
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS): 2001 Annual Report. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2003

Cerdeira L, Fernandes MR, Francisco GR, Bueno MFC, Lenne S, Souzaet TA, *et al.* Draft genome sequence of a hospital-associated clone of *Klebsiella pneumoniae* ST340/CC258 coproducing RmtG and KPC-2 isolated from a paediatric patient. *Genome Announc.* 2016;4(6):e01130-16

Chatterjee S, Datta S, Roy S, Ramanan L, Saha A, Viswanathan R, *et al.* Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter spp.* causing neonatal sepsis: focus on NDM-1 and its linkage to ISAba125. *Front Microbiol.* 2016;7:1126

Chen F, Wang L, Wang M, Xie Y, Xia X, Li X, *et al.* Genetic characterization and *in vitro* activity of antimicrobial combinations of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* from a general hospital in China. *Oncol Lett.* 2018;15(2):2305-2315

Chen L, Chen ZL, Liu JH, Zeng ZL, Ma JY, Jiang HX. Emergence of RmtB methylase-producing *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* isolates from pigs in China. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59(5):880-885

Chen X, He L, Li Y, Zeng Z, Deng Y, Liu Y, *et al.* Complete sequence of a F2:A-:B- plasmid pHN3A11 carrying *rmtB* and *qepA*, and its dissemination in China. *Vet Microbiol.* 2014;174(1-2):267-271

Choi MJ, Lim SK, Nam HM, Kim AR, Jung SC, Kim MN. Apramycin and gentamicin resistances in indicator and clinical *Escherichia coli* isolates from farm animals in Korea. *Foodborne Pathog Dis.* 2011;8:119-123

Christie PJ, Korman RZ, Zahler SA, Adsit JC, Dunny GM. Two conjugation systems associated with *Streptococcus faecalis* plasmid pCF10: identification of a conjugative transposon that transfers between *S. faecalis* and *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 1987;169:2529-2536

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition.* CLSI document M07-A10. Wayne, PA: CLSI; 2015.

Coffey GL, Anderson LE, Fischer MW, Galbraith MM, Hillegas AB, Kohberger DL, *et al.* Biological studies of paromomycin. *Antibiot Chemother (Northfield).* 1959;9:730-738

Conn GL, Savic M, Macmaster R. Antibiotic resistance in bacteria through modification of nucleosides in 16S ribosomal RNA. In: Grosjean H, ed. *DNA and RNA Modification Enzymes: Structure, mechanism, function and evolution.* Austin, Texas. Landes BioScience. 2009;525-536

Coque TM, Baquero F, Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill.* 2008;13

Corrêa LL, Montezzi LF, Bonelli RR, Moreira BM, Picão RC. Revised and updated multiplex PCR, targeting acquired 16S rRNA methyltransferases. *Int J Antimicrob Agents*. 2014;43:479-481

Costello SE, Deshpande LM, Davis AP, Mendes RE, Castanheira M. Aminoglycoside-modifying enzymes and 16S ribosomal RNA methyltransferases-encoding genes among a global collection of Gram-negative isolates. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019;16:278-285

Craig WA. Optimizing aminoglycoside use. *Crit Care Clin*. 2011. 27:107-121

Culebras E, Martinez JL. Aminoglycoside resistance mediated by the bifunctional enzyme 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase-2''-O-aminoglycoside phosphotransferase. *Front Biosci*. 1999;4:D1-8

Cundliffe E, Dermain AL. Avoidance of suicide in antibiotic-producing microbes. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2010;37:643-672

Cundliffe E. How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annu Rev Microbiol*. 1989;43:207-233

Dafopoulou K, Tsakris A, Pournaras S. Changes in antimicrobial resistance of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* group isolated in Greece, 2010-2015. *J Med Microbiol*. 2018;67(4):496-498

Dakhl ZF, Alwan SK. Dissemination of aminoglycosides resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Al-Diwaniya hospitals. *Int J Adv Res*. 2015;3(11):376-384

Datta N, Hedges RW. Compatibility groups among fi – R factors. *Nature*. 1971;234:222-223

Davis MA, Baker KN, Orfe LH, Shah DH, Besser TE, Call DR. Discovery of a gene conferring multiple-aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(6):2666-2669

Del Pozo E, Baeyens JM. Effects of calcium channel blockers on neuromuscular blockade induced by aminoglycoside antibiotics. *Eur J Pharmacol*. 1986;128(1-2):49-54

Deng Y, He L, Chen S, Zheng H, Zeng Z, Liu Y, *et al*. F33:A-:B- and F2:A-:B- plasmids mediate dissemination of *rmtB*-*bla*_{CTX-M-9} group genes and *rmtB*-*qepA* in Enterobacteriaceae isolates from pets in China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011a;55:4926-4929

Deng Y, Zeng Z, Chen S, He L, Liu Y, Wu C, *et al*. Dissemination of IncFII plasmids carrying *rmtB* and *qepA* in *Escherichia coli* from pigs, farm workers and the environment. *Clin Microbiol Infect*. 2011b;17:1740-1745

Deng Y, Zeng Z, Tian W, Yang T, Liu JH. Prevalence and characteristics of *rmtB* and *gcpA* in *Escherichia coli* isolated from diseased animals in China. *Front Microbiol.* 2013;4:198

Denisuik AJ, Karlowsky JA, Denisuik T, Nichols WW, Keating TA, Adam HJ, *et al.* In vitro activity of ceftazidime-avibactam against 338 molecularly characterized gentamicin-nonsusceptible Gram-negative clinical isolates obtained from patients in Canadian Hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(6):3623-3626

Destache CJ. Aminoglycoside-Induced Nephrotoxicity—A Focus on Monitoring: A review of Literature. *J Pharm Pract.* 2014;27(6):562-566

Dobner P, Bretzel G, Rüscher-Gerdes S, Feldmann K, Rifai M, Löscher T, *et al.* Geographic variation of the predictive values of genomic mutations associated with streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Cell Probes.* 1997;11:123-126

Doi Y, Adams-Haduch JM, Paterson DL. Genetic environment of 16S rRNA methylase gene *rmtD*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008a;52:2270-2272

Doi Y, Adams JM, Yamane K, Paterson DL. Identification of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical strains in North America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007b;51:4209-4210

Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis.* 2007a;45:88-94

Doi Y, de Oliveira Garcia D, Adams J, Paterson DL. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo-beta-lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007c;51:852-856

Doi Y, Ghilardi AC, Adams J, de Oliveira Garcia D, Paterson DL. High prevalence of metallo-beta-lactamase and 16S rRNA methylase coproduction among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007d;51:3388-3390

Doi Y, Hazen TH, Boitano M, Tsai YC, Clark TA, Korlach J, *et al.* Whole-genome assembly of *Klebsiella pneumoniae* coproducing NDM-1 and OXA-232 carbapenemases using single-molecule, real-time sequencing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(10):5947-5953

Doi Y, Wachino J, Arakawa Y. Aminoglycoside resistance: the emergence of acquired 16S ribosomal RNA methyltransferases. *Infect Dis Clin North Am.* 2016;30(2):523-537

Doi Y, Wachino J, Arakawa Y. Nomenclature of plasmid-mediated 16S rRNA methylases responsible for aminoglycoside resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008b;52:2287-2288

Doi Y, Yokoyama K, Yamane K, Wachino J, Shibata N, Yagi T, *et al.* Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:491-496

Dolejska M, Villa L, Hasman H, Hansen L, Carattoli A. Characterization of IncN plasmids carrying *bla*_{CTX-M-1} and *qnr* genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* from animals, the environment and humans. *J Antimicrob Chemother.* 2013a;68:333-339

Dolejska M, Villa L, Poirel L, Nordmann P, Carattoli A. Complete sequencing of an IncHI1 plasmid encoding the carbapenemase NDM-1, the ArmA 16S RNA methylase and a resistance-nodulation-cell division/multidrug efflux pump. *J Antimicrob Chemother.* 2013b;68(1):34-39

Domingues S, da Silva GJ, Nielsen KM. Integrons: vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria. *Mobile Genetic Elements.* 2012;2(5):211-223

Dortet L, Bonnin RA, Bernabeu S, Escaut L, Vittecoq D, Girlich D, *et al.* First occurrence of OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Serbia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(10):5724-5730

Dortet L, Flonta M, Boudehen YM, Creton E, Bernabeu S, Vogel A, *et al.* Dissemination of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* in Romania. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(11):7100-7103

Dortet L, Poirel L, Al Yaqoubi F, Nordmann P. NDM-1, OXA-48 and OXA-181 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Sultanate of Oman. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:E144-148

Drieux L, Decré D, Frangeul L, Arlet G, Jarlier V, Sougakoff W. Complete nucleotide sequence of the large conjugative pTC2 multireplicon plasmid encoding the VIM-1 metallo- β -lactamase. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68:97-100

Durante-Mangoni E, Grammatikos A, Utili R, Falagas ME. Do we still need aminoglycosides? *Int J Antimicrob Agents.* 2009;33(3):201-205

Du XD, Li DX, Hu GZ, Wang Y, Shang YH, Wu CM, *et al.* *Tn1548*-associated *armA* is co-located with *qnrB2*, *aac(6')-Ib-cr* and *bla*_{CTX-M-3} on an IncFII plasmid in a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B strain isolated from chickens in China. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:246-248

Du XD, Liu HB, Wu CM, Li XS, Cao XY, Cui BA, *et al.* The genetic environment of *armA* on pHNE, an IncN plasmid, in one *Escherichia coli* isolate from a chicken. J Antimicrob Chemother. 2010;65:2694-2695

Du XD, Wu CM, Liu HB, Li XS, Beier RC, Xiao F, *et al.* Plasmid-mediated *ArmA* and *RmtB* 16S rRNA methylases in *Escherichia coli* isolated from chickens. J Antimicrob Chemother. 2009;64(6):1328-1330

El-Sayed-Ahmed MA, Amin MA, Tawakol WM, Loucif L, Bakour S, Rolain JM. High prevalence of *bla*_{NDM-1} carbapenemase-encoding gene and 16S rRNA *armA* methyltransferase among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates, Egypt. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59(6):3602-3605

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0, 2022. Available from: <http://www.eucast.org>

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 2.01, 2017. Available from: https://www.eucast.org/resistance_mechanisms/

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial consumption in the EU/EEA (ESAC-Net) - Annual Epidemiological Report 2020. Stockholm: ECDC; 2021

Falagas ME, Karageorgopoulos DE, Nordmann P. Therapeutic options for infections with Enterobacteriaceae producing carbapenem-hydrolyzing enzymes. Future Microbiol. 2011;6:653-666

Fiett J, Baraniak A, Izdebski R, Sitkiewicz I, Żabicka D, Meler A, *et al.* The first NDM metallo- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolate in Poland: evolution of IncFII-type plasmids carrying the *bla*_{NDM-1} gene. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(2):1203-1207

Filgona F, Banerjee T, Anupurba S. Incidence of the novel *rmtF* and *rmtG* methyltransferases in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae from a hospital in India. J Infect Dev Ctries. 2015;9(9):1036-1039

Folster JP, Rickert R, Barzilay EJ, Whichard JM. Identification of the aminoglycoside resistance determinants *armA* and *rmtC* among non-Typhi *Salmonella* isolates from humans in the United States. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53:4563-4564

Fontes LC, Neves PR, Oliveira S, Silva KC, Hachich EM, Sato MI, *et al.* Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* coproducing metallo- β -lactamase SPM-1 and 16S

rRNA methylase RmtD1 in an urban river. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(6):3063-3064

Forge A, Schacht J. Aminoglycoside antibiotics. *Audiol Neurootol.* 2000;5:3-22

Francisco GR, Nora ST, Bueno MF, da Silva Filho LV, de Oliveira Garcia D. Identification of aminoglycoside-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing RmtG 16S rRNA methyltransferase in a cystic fibrosis patient. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(5):2967-2968

Freeman CD, Nicolau DP, Belliveau PP, Nightingale CH. Once-daily dosing of aminoglycosides: review and recommendations for clinical practice. *J Antimicrob Chemother.* 1997;39(6):677-686

Fritsche TR, Castanheira M, Miller GH, Jones RN, Armstrong ES. Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae from Europe, North America, and Latin America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(5):1843-1845

Fu T, Du XD, Cheng PP, Li XR, Zhao XF, Pan YS. Characterization of a *rmtB*-carrying IncI1 ST136 plasmid in avian *Escherichia coli* isolates from chickens. *J Med Microbiol.* 2016;65:387-391

Galani I, Anagnostoulis G, Chatzikonstantinou M, Petrikkos G, Souli M. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* co-producing OXA-48, CTX-M-15, and ArmA in Greece. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22(10):898-899

Galani I, Chatzikonstantinou M, Katsala D, Petrikkos G, Souli M. Prevalence of 16S rRNA methylase genes in *Acinetobacter baumannii* isolates in Greece in a three-year period. In 25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) 2015, Copenhagen, Denmark, Abs 0293

Galani I, Karaikos I, Souli M, Papoutsaki V, Galani L, Gkoufa A, *et al.* Outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* endowed with ceftazidime-avibactam resistance mediated through a VEB-1-mutant (VEB-25), Greece, September to October 2019. *Euro Surveill.* 2020; 25(3):2000028

Galani I, Nafplioti K, Adamou P, Karaikos I, Giamarellou H, Souli M, *et al.* Nationwide epidemiology of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Greek hospitals, with regards to plazomicin and aminoglycoside resistance. *BMC Infect Dis.* 2019;19(1):167

Galani I, Souli M, Panagea T, Poulakou G, Kanellakopoulou K, Giamarellou H. Prevalence of 16S rRNA methylase genes in Enterobacteriaceae isolates from a Greek university hospital. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:E52-54

Galani L, Galani I, Souli M, Karaiskos I, Katsouda E, Patrozou E, *et al.* Nosocomial dissemination of *Providencia stuartii* isolates producing extended-spectrum β -lactamases VEB-1 and SHV-5, metallo- β -lactamase VIM-1, and RNA methylase RmtB. *J Glob.* 2013;1(2):115-116

Galimand M, Courvalin P, Lambert T. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:2565-2571

Galimand M, Courvalin P, Lambert T. RmtF, a new member of the aminoglycoside resistance 16S rRNA N7 G1405 methyltransferase family. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:3960-3962

Galimand M, Sabtcheva S, Courvalin P, Lambert T. Worldwide disseminated *armA* aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:2949-2953

Gamal D, Fernández-Martínez M, Salem D, El-Defrawy I, Montes LÁ, Ocampo-Sosa AA, *et al.* Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Egypt containing *bla*_{NDM-1} on IncR plasmids and its association with *rmtF*. *Int J Infect Dis.* 2016;43:17-20

Garneau-Tsodikova S, Labby KJ. Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. *Medchemcomm.* 2016;7(1):11-27

Ghotaslou R, Yeganeh Sefidan F, Akhi MT, Asgharzadeh M, Mohammadzadeh Asl Y. Dissemination of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes and *armA* among Enterobacteriaceae isolates in Northwest Iran. *Microb Drug Resist.* 2017;23(7):826-832

Giakkoupi P, Pappa O, Polemis M, Vatopoulos AC, Miriagou V, Zioga A, *et al.* Emerging *Klebsiella pneumoniae* isolates coproducing KPC-2 and VIM-1 carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:4048-4050

Giakkoupi P, Tryfinopoulou K, Polemis M, Pappa O, Miriagou V, Vatopoulos A. Circulation of a multiresistant, conjugative, IncA/C plasmid within the nosocomial *Providencia stuartii* population in the Athens area. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015;82:62-64

Giannouli M, Cuccurullo S, Crivaro V, Di Popolo A, Bernardo M, Tomasone F, *et al.* Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care hospital in Naples, Italy, shows the emergence of a novel epidemic clone. *J Clin Microbiol.* 2010;48:1223-1230

Giannouli M, Tomasone F, Agodi A, Vahaboglu H, Daoud Z, Triassi M, *et al.* Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*

strains in intensive care units of multiple Mediterranean hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63(4):828-830

Gniadkowski M, Schneider I, Palucha A, Jungwirth R, Mikiewicz B, Bauernfeind A. Cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolates from a hospital in Warsaw, Poland: identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(4):827-832

Gogou V, Pournaras S, Giannouli M, Voulgari E, Piperaki ET, Zarrilli R, *et al.* Evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages: a 10 year study in Greece (2000–09). *J. Antimicrob Chemother.* 2011;66:2767-2772

Gokemn TG, Nagiyev T, Meral M, Onlen C, Heydari F, Koksall F. NDM-1 and RmtC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Turkey. *Jundishapur J Microbiol.* 2016;9(10):e33990

Golebiewski M, Kern-Zdanowicz I, Zienkiewicz M, Adamczyk M, Żylińska J, Baraniak A, *et al.* Complete nucleotide sequence of the pCTX-M3 plasmid and its involvement in spread of the extended-spectrum beta-lactamase gene *bla*_{CTX-M-3}. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:3789-3795

González-Zorn B, Catalan A, Escudero JA, Domínguez L, Teshager T, Porrero C, *et al.* Genetic basis for dissemination of *armA*. *J Antimicrob Chemother.* 2005a;56:583-585

González-Zorn B, Teshager T, Casas M, Porrero MC, Moreno MA, Courvalin P, *et al.* *armA* and aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis.* 2005b;11:954-956

Granier SA, Hidalgo L, San Millan A, Escudero JA, Gutierrez B, Brisabois A, *et al.* ArmA methyltransferase in a monophasic *Salmonella enterica* isolate from food. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(11):5262-5266

Grosso F, Carvalho KR, Quinteira S, Ramos A, Carvalho-Assef AP, Asensi MD, *et al.* OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii*: a new hotspot of diversity in Rio de Janeiro? *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(1):62-65

Guo Q, Spychala CN, McElheny CL, Doi Y. Comparative analysis of an IncR plasmid carrying *armA*, *bla*_{DHA-1} and *qnrB4* from *Klebsiella pneumoniae* ST37 isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2016;7(4):882-886

Guo Q, Wang P, Ma Y, Yang Y, Ye X, Wang M. Co-production of SFO-1 and DHA-1 β -lactamases and 16S rRNA methylase ArmA in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:2361-2366

Guo X, Dillon BB, Ginn AN, Wiklendt AM, Partridge SR, Iredell JR. Simple multiplex real-time PCR for rapid detection of common 16S rRNA methyltransferase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014;80(1):29-31

Gurung M, Moon DC, Tamang MD, Kim J, Lee YC, Seol SY, *et al.* Emergence of 16S rRNA methylase gene *armA* and cocarriage of *bla_{IMP-1}* in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from South Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010;68:468-470

Hancock SJ, Phan MD, Peters KM, Forde BM, Chong TM, Yin WF, *et al.* Identification of IncA/C plasmid replication and maintenance genes and development of a plasmid multilocus sequence typing scheme. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61:e01740-16

Haldorsen BC, Simonsen GS, Sundsfjord A, Samuelsen O; Norwegian Study Group on Aminoglycoside Resistance. Increased prevalence of aminoglycoside resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Norway is associated with the acquisition of AAC(3)-II and AAC(6')-Ib. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014;78(1):66-69

Hasani A, Sheikhalizadeh V, Ahangarzadeh Rezaee M, Rahmati-Yamchi M, Hasani A, Ghotaslou R, *et al.* Frequency of aminoglycoside-modifying enzymes and *armA* among different sequence groups of *Acinetobacter baumannii* in Iran. *Microb Drug Resist.* 2016;22(5):347-353

Hatch RA, Schiller NL. Alginate lyase promotes diffusion of aminoglycosides through the extracellular polysaccharide of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42:974-977

Heang V, Hout B, Prouty MG, Supraprom C, Ford GW, Newell SW, *et al.* Detection of *qnrVC* and *rmtB* genes from a multidrug-resistant *Ralstonia pickettii* wound infection isolate in Cambodia. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;44(1):84-85

Hedge SS, Javid-Majd F, Blanchard JS. Overexpression and mechanistic analysis of chromosomally encoded aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase (AAC(2')-Ic) from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem.* 2001;276:45876-45881

Helaly GF, Abou Shleib H, Fanaki NH, Abdel Kader O, Ali GH. Potential co-prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qepA* and 16S rRNA methylase *rmtB* among *E. coli* clinical Isolates from Alexandria- Egypt. *J Egypt Public Health Assoc.* 2010;85(5-6):247-272

He T, Wei R, Zhang L, Sun L, Pang M, Wang R, *et al.* Characterization of NDM-5-positive extensively resistant *Escherichia coli* isolates from dairy cows. *Vet Microbiol.* 2017;207:153-158

Heuer H, Krögerrecklenfort E, Wellington EM, Egan S, van Elsas JD, van Overbeek L, *et al.* Gentamicin resistance genes in environmental bacteria: prevalence and transfer. *FEMS Microbiol Ecol.* 2002;42(2):289-302

Hidalgo L, Hopkins KL, Gutierrez B, Ovejero CM, Shukla S, Douthwaite S, *et al.* Association of the novel aminoglycoside resistance determinant RmtF with NDM carbapenemase in Enterobacteriaceae isolated in India and the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(7):1543-1550

Hidalgo L, Hopkins KL, Wareham DW, Gutierrez B, González-Zorn B. Association of extended-spectrum β -Lactamase VEB-5 and 16S rRNA methyltransferase ArmA in *Salmonella enterica* from the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(9):4985-4987

Higgins CE, Kastner RE. Nebramycin, a new broad-spectrum antibiotic complex. II. Description of *Streptomyces tenebrarius*. *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda).* 1967;7:324-331

Hollingshead S, Vapneck D. Nucleotide sequence analysis of a gene encoding a streptomycin/spectinomycin adenyltransferase. *Plasmid.* 1985;13:17-30

Hopkins KL, Escudero JA, Hidalgo L, Gonzalez-Zorn B. 16S rRNA methyltransferase RmtC in *Salmonella enterica* serovar Virchow. *Emerg Infect Dis.* 2010;16:712-715

Hopkins KL, Meunier D, Findlay J, Mustafa N, Parsons H, Pike R, *et al.* SPM-1 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277 in the UK. *J Med Microbiol.* 2016;65(7):696-697

Ho PL, Leung LM, Chow KH, Lai EL, Lo WU, Ng TK. Prevalence of aminoglycoside modifying enzyme and 16S ribosomal RNA methylase genes among aminoglycoside-resistant *Escherichia coli* isolates. *J Microbiol, Immunol Infect.* 2016;49(1):123-136

Ho PL, Lo WU, Yeung MK, Lin CH, Chow KH, Ang I, *et al.* Complete sequencing of pNDM-HK encoding NDM-1 carbapenemase from a multidrug-resistant *Escherichia coli* strain isolated in Hong Kong. *PLoS One.* 2011;6:e17989

Hotta K, Sunada A, Ishikawa J, Mizuno S, Ikeda Y, Kondo S. The novel enzymatic 3'-N-acetylation of arbekacin by an aminoglycoside 3-N-acetyltransferase of *Streptomyces* origin and the resulting activity. *J Antibiot (Tokyo).* 1998;51:735-742

Houghton JL, Green KD, Chen W, Garneau-Tsodikova S. The future of aminoglycosides: the end or renaissance? *Chembiochem.* 2010;11:880-902

Hou J, Huang X, Deng Y, He L, Yang T, Zeng Z, *et al.* Dissemination of the fosfomicin resistance gene *fosA3* with CTX-M β -lactamase genes and *rmtB*

carried on IncFII plasmids among *Escherichia coli* isolates from pets in China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(4): 2135-2138

Huang J, Deng S, Ren J, Tu J, Ye M, Wang M. Characterization of a *bla*_{NDM-1}-harboring plasmid from a *Salmonella enterica* clinical isolate in China. *Mol Med Rep.* 2017;16(2):1087-1092

Hu F, Munoz-Price LS, DePascale D, Rivera JI, Doi Y. *Klebsiella pneumoniae* sequence type 11 isolate producing RmtG 16S rRNA methyltransferase from a patient in Miami, Florida. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(8):4980-4981

Hunter JE, Hart CA, Shelley JC, Walton JR, Bennett M. Human isolates of apramycin-resistant *Escherichia coli* which contain the genes for the AAC(3)IV enzyme. *Epidemiol Infect.* 1993;110(2):253-259

Husain N, Tkaczuk KL, Tulsidas SR, Kaminska KH, Cubrilo S, Maravić-Vlahovicek G, *et al.* Structural basis for the methylation of G1405 in 16S rRNA by aminoglycoside resistance methyltransferase Sgm from an antibiotic producer: a diversity of active sites in m7G methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:4120-4132

Huth M, Alharazneh AM, Ricci A, Luk L, Cheng AG. Gentamicin ototoxicity requires functional mechanotransducer channels. *Otolaryngol Head Neck Surgery.* 2011;145:94-194

Hu Y, Liu L, Zhang X, Feng Y, Zong Z. *In vitro* activity of neomycin, streptomycin, paromomycin and apramycin against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae clinical strains. *Front Microbiol.* 2017;8:2275

Islam MA, Talukdar PK, Hoque A, Huq M, Nabi A, Ahmed D, *et al.* Emergence of multidrug-resistant NDM-1-producing Gram-negative bacteria in Bangladesh. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31(10):2593-2600

Isler B, Doi Y, Bonomo RA, Paterson DL. New treatment options against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;63:pil: e01110-18

Ito A, Nishikawa T, Matsumoto S, Yoshizawa H, Sato T, Nakamura R, *et al.* Siderophore cephalosporin cefiderocol utilizes ferric iron transporter systems for antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(12):7396-7401

Ito A, Sato T, Ota M, Takemura M, Nishikawa T, Toba S, *et al.* *In vitro* antibacterial properties of cefiderocol, a novel siderophore cephalosporin, against Gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(1):e01454-17

Jackson J, Chen C, Buising K. Aminoglycosides: how should we use them in the 21st century? *Curr Opin Infect Dis.* 2013;26(6):516-525

- Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis*. 2005;41:S120-126
- Jain A, Srivastava P. Broad host range plasmids. *FEMS Microbiol Lett*. 2013;348(2):87-96
- James PD, Raut S, Rivard GE, Poon MC, Warner M, McKenna S, *et al*. Aminoglycoside suppression of nonsense mutations in severe hemophilia. *Blood*. 2005;106:3043-3048
- Jana S, Deb JK. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006;70:140-150
- Jiang H, Sha SH, Schacht J. Rac/Rho pathway regulates actin depolymerization induced by aminoglycoside antibiotics. *J Neurosci Res*. 2006;83:1544-1551
- Jiang H, Talaska AE, Schacht J, Sha SH. Oxidative imbalance in the aging inner ear. *Neurobiol Aging*. 2007;28:1605-1612
- Jiang M, Karasawa T, Steyger PS. Aminoglycoside-Induced Cochleotoxicity: A Review. *Front Cell Neurosci*. 2017;11:308
- Jiang Y, Yu D, Wei Z, Shen P, Zhou Z, Yu Y. Complete nucleotide sequence of *Klebsiella pneumoniae* multidrug resistance plasmid pKP048, carrying *bla*_{KPC-2}, *bla*_{DHA-1}, *qnrB4*, and *armA*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54:3967-3969
- Jin JS, Kwon KT, Moon DC, Lee JC. Emergence of 16S rRNA methylase RmtA in colistin-only-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* in South Korea. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;33(5):490-491
- Jones D, Metzger HJ, Schatz A, Waksman SA. Control of Gram-negative bacteria in experimental animals by streptomycin. *Science*. 1944;100(2588):103-105
- Juhas M, Widlake E, Teo J, Huseby DL, Tyrrell JM, Polikanov YS, *et al*. *In vitro* activity of apramycin against multidrug-, carbapenem- and aminoglycoside-resistant Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2019;74:944-952
- Kabins SA, Nathan C, Cohen S. *In vitro* comparison of netilmicin, a semisynthetic derivative of sisomicin, and four other aminoglycoside antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*. 1976;10(1):139-145
- Kang AD, Smith KP, Berg AH, Truelson KA, Eliopoulos GM, McCoy C, *et al*. Efficacy of apramycin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in the murine neutropenic thigh model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62:pii:e02585-17

Kang AD, Smith KP, Eliopoulos GM, Berg AH, McCoy C, Kirby JE. *In vitro* apramycin activity against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017;88:188-191

Kang HY, Kim KY, Kim J, Lee JC, Lee YC, Cho DT, *et al*. Distribution of conjugative-plasmid-mediated 16S rRNA methylase genes among amikacin-resistant Enterobacteriaceae isolates collected in 1995 to 1998 and 2001 to 2006 at a university hospital in South Korea and identification of conjugative plasmids mediating dissemination of 16S rRNA methylase. *J Clin Microbiol*. 2008;46:700-706

Kang HY, Tamang MD, Seol SY, Kim J. Dissemination of plasmid-mediated *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, and *qepA* genes among 16S rRNA methylase producing Enterobacteriaceae in Korea. *J Bacteriol Virol*. 2009;39(3):173-182

Kapmaz M, Erdem F, Abulaila A, Yeniaras E, Oncul O, Aktas Z. First detection of NDM-1 with CTX-M-9, TEM, SHV and RmtC in *Escherichia coli* ST471 carrying IncI2, A/C and Y plasmids from clinical isolates in Turkey. *J Glob Antimicrob Resist*. 2016;7:152-153

Karah N, Dwibedi CK, Sjöström K, Edquist P, Johansson A, Wai SN, *et al*. Novel aminoglycoside resistance transposons and transposon derived circular forms detected in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(3):1801-1818

Karah N, Giske CG, Sundsfjord A, Samuelsen Ø. A diversity of OXA-carbapenemases and class 1 integrons among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Sweden belonging to different international clonal lineages. *Microb Drug Resist*. 2011a;17(4):545-549

Karah N, Haldorsen B, Hermansen NO, Tveten Y, Ranghildstveit E, Skutlaberg DH, *et al*. Emergence of OXA-carbapenemase- and 16S rRNA methylase-producing international clones of *Acinetobacter baumannii* in Norway. *J Med Microbiol*. 2011b;60:515-521

Karah N, Sundsfjord A, Towner K, Samuelsen Ø. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug Resist Updat*. 2012;15:237-247

Karthikeyan K, Thirunarayan MA, Krishnan P. Coexistence of *bla*_{OXA-23} with *bla*_{NDM-1} and *armA* in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65:2253-2254

Kawaguchi H, Naito T, Nakagawa S, Fujisawa KI. BB-K 8, a new semisynthetic aminoglycoside antibiotic. *J Antibiot (Tokyo)*. 1972;25:695-708

- Keeling KM, Bedwell DM. Suppression of nonsense mutations as a therapeutic approach to treat genetic diseases. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2011. 2:837-852
- Kellermayer R. Translational readthrough induction of pathogenic nonsense mutations. *Eur J Med Genet*. 2006;49(6):445-450
- Khong WX, Marimuthu K, Teo J, Ding Y, Xia E, Lee JJ, *et al*. Tracking inter-institutional spread of NDM and identification of a novel NDM-positive plasmid, pSg1-NDM, using next-generation sequencing approaches. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71(11):3081-3089
- Kiaei S, Moradi M, Hosseini Nave H, Hashemizadeh Z, Taati-Moghadam M, Kalantar-Neyestanaki D. Emergence of co-existence of *bla*_{NDM} with *rmtC* and *qnrB* genes in clinical carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in burning center from southeast of Iran. *Folia Microbiol*. 2018;64(1):55-62
- Kieffer N, Nordmann P, Aires-de-Sousa M, Poirel L. High prevalence of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae among hospitalized children in Luanda, Angola. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(10):6189-6192
- Kim ES, Jeong JY, Choi SH, Lee SO, Kim SH, Kim MN, *et al*. Plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump gene, *qepA*, in *Escherichia coli* clinical isolates in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009;65(3):335-338
- Kim JW, Heo ST, Jin JS, Choi CH, Lee YC, Jeong YG, *et al*. Characterization of *Acinetobacter baumannii* carrying *bla*_{OXA-23}, *bla*_{PER-1} and *armA* in a Korean hospital. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14(7):716-718
- Kohanski MA, Dwyer DJ, Wierzbowski J, *et al*. Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death. *Cell*. 2008;135:679-690
- Kondo S, Hotta K. Semisynthetic aminoglycoside antibiotics: Development and enzymatic modifications. *J Infect Chemother*. 1999;1:1-9
- Koulenti D, Song A, Ellingboe A, Abdul-Aziz MH, Harris P, Gavey E, *et al*. Infections by multidrug-resistant Gram-negative bacteria: what's new in our arsenal and what's in the pipeline? *Int J Antimicrob Agents*. 2019;53(3):211-224
- Krause KM, Serio AW, Kane TR, Connolly LE. Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(6):a027029
- Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, *et al*. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis*. 2010;10:597-602
- Lambert T. Antibiotics that affect the ribosome. *Rev Sci Tech*. 2012;31(1):57-64

- Lean SS, Yeo CC, Suhaili Z, Thong KL. Comparative genomics of two ST 195 carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* with different susceptibility to polymyxin revealed underlying resistance mechanism. *Front Microbiol.* 2016;6:1445
- LeBras M, Chow I, Mabasa VH, Ensom MH. Systematic review of efficacy, pharmacokinetics, and administration of intraventricular aminoglycosides in adults. *Neurocrit Care.* 2016;25(3):492-507
- Lee CS, Hu F, Rivera JI, Doi Y. *Escherichia coli* sequence type 354 coproducing CMY-2 cephalosporinase and RmtE 16S rRNA methyltransferase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014a;58(7):4246-4247
- Lee CS, Li JJ, Doi Y. Complete sequence of conjugative IncA/C plasmid encoding CMY-2 β -lactamase and RmtE 16S rRNA methyltransferase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59:4360-4361
- Lee CS, Vasoo S, Hu F, Patel R, Doi Y. *Klebsiella pneumoniae* ST147 coproducing NDM-7 carbapenemase and RmtF 16S rRNA methyltransferase in Minnesota. *J Clin Microbiol.* 2014b;52(11):4109-4110
- Lee HB, Kim Y, Kim JC, Choi GJ, Park SH, Kim CJ, *et al.* Activity of some aminoglycoside antibiotics against true fungi, *Phytophthora* and *Pythium* species. *J Appl Microbiol.* 2005;99:836-843
- Lee HW, Kang HY, Shin KS, Kim J. Multidrug-resistant *Providencia* isolates carrying *bla*_{PER-1}, *bla*_{VIM-2}, and *armA*. *J Microbiol.* 2007;45(3):272-274
- Lee H, Yong D, Yum JH, Roh KH, Lee K, Yamane K, *et al.* Dissemination of 16S rRNA methylase-mediated highly amikacin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006;56(3):305-312
- Leigue L, Warth JF, Melo LC, Silva KC, Moura RA, Barbato L, *et al.* MDR ST2179-CTX-M-15 *Escherichia coli* co-producing RmtD and AAC(6')-Ib-cr in a horse with extraintestinal infection, Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(4):1263-1265
- Leis JA, Rutka JA, Gold WL. Aminoglycoside-induced ototoxicity. *CMAJ.* 2015;187(1):E52
- Liakopoulos A, Miriagou V, Katsifas EA, Karagouni AD, Daikos GL, Tzouveleki LS, *et al.* Identification of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* in Greece, 2010 to 2011. *Euro Surveill.* 2012;17:pil:20117
- Liao XP, Liu BT, Yang QE, Sun J, Li L, Fang LX, *et al.* Comparison of plasmids coharboring 16S rRNA methylase and extended-spectrum β -lactamase genes among *Escherichia coli* isolates from pets and poultry. *J Food Prot.* 2013;76(12):2018-2023

Li B, Pacey MP, Doi Y. Chromosomal 16S ribosomal RNA methyltransferase RmtE1 in *Escherichia coli* sequence type 448. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(5):876-878

Li DX, Zhang SM, Hu GZ, Wang Y, Liu HB, Wu CM, *et al.* Tn3-associated *rmtB* together with *qnrS1*, *aac(6')-Ib-cr* and *bla_{CTX-M-15}* are co-located on an F49:A-B-plasmid in an *Escherichia coli* ST10 strain in China. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:236-238

Li JJ, Munoz-Price LS, Spychala CN, DePascale D, Doi Y. New Delhi metallo- β -lactamase-1-producing *Klebsiella pneumoniae*, Florida, USA. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(4):744-748

Lincopan, N, Neves P, Mamizuka EM, Levy CE. Balanoposthitis caused by *Pseudomonas aeruginosa* co-producing metallo- β -lactamase and 16S rRNA methylase in children with hematological malignancies. *Int J Infect Dis.* 2010;14(4):e344-e347

Liou GF, Yoshizawa S, Courvalin P, Galimand M. Aminoglycoside resistance by ArmA-mediated ribosomal 16S methylation in human bacterial pathogens. *J Mol Biol.* 2006;359:358-364

Liu BT, Liao XP, Yue L, Chen XY, Li L, Yang SS, *et al.* Prevalence of β -lactamase and 16S rRNA methylase genes among clinical *Escherichia coli* isolates carrying plasmid-mediated quinolone resistance genes from animals. *Microb Drug Resist.* 2013;19(3):237-245

Liu JH, Deng YT, Zeng ZL, Gao JH, Chen L, Arakawa Y, *et al.* Coprevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QepA, Qnr, and AAC(6')-Ib-cr among 16S rRNA methylase RmtB-producing *Escherichia coli* isolates from pigs. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:2992-2993

Livermore DM, Mushtaq S, Warner M, Zhang JC, Maharjan S, Doumith M, *et al.* Activity of aminoglycosides, including ACHN-490, against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2011a;66:48-53

Livermore DM, Walsh TR, Toleman M, Woodford N. Balkan NDM-1: escape or transplant? *Lancet Infect Dis.* 2011b;11:164

Lötsch F, Albiger B, Monnet DL, Struelens MJ, Seifert H, Kohlenberg A, *et al.* Epidemiological situation, laboratory capacity and preparedness for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Europe, 2019. *Euro Surveill.* 2020;25(45):2001735

Lopez-Novoa JM, Quiros Y, Vicente L, Morales AI, Lopez-Hernandez FJ. New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. *Kidney Int.* 2011;79:33-45

- Lovering AM, White LO, Reeves DS. AAC(1): a new aminoglycoside-acetylating enzyme modifying the C1 aminogroup of apramycin. *J Antimicrob Chemother.* 1987;20:803-813
- Macmaster R, Zelinskaya N, Savic M, Rankin CR, Conn GL. Structural insights into the function of aminoglycoside-resistance A1408 16S rRNA methyltransferases from antibiotic-producing and human pathogenic bacteria. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:7791-7799
- Maeyama Y, Taniguchi Y, Hayashi W, Ohsaki Y, Osaka S, Koide S, *et al.* Prevalence of ESBL/AmpC genes and specific clones among the third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae from canine and feline clinical specimens in Japan. *Vet Microbiol.* 2018;216:183-189
- Magnet S, Blanchard JS. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem Rev.* 2005;105:477-498
- Mahillon J, Chandler M. Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62(3):725-774
- Mancini S, Poirel L, Corthesy M, Greub G, Nordmann P. *Klebsiella pneumoniae* co-producing KPC and RmtG, finally targeting Switzerland. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2018a;90(2):151-152
- Mancini S, Poirel L, Tritten ML, Lienhard R, Bassi C, Nordmann P. Emergence of an MDR *Klebsiella pneumoniae* ST231 producing OXA-232 and RmtF in Switzerland. *J Antimicrob Chemother.* 2018b; 73(3):821-823
- Marsh JW, Pacey MP, Ezeonwuka C, Ohm SL, Snyder D, Cooper VS, *et al.* *Clostridioides difficile*: a potential source of NpmA in the clinical environment. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(2):521-523
- Martinez FJ, Leffler DA, Kelly CP. *Clostridium difficile* outbreaks: prevention and treatment strategies. *Risk Manag Healthc.* 2012;5:55-64
- Martinez T, Martinez I, Vazquez GJ, Aquino EE, Robledo IE. Genetic environment of the KPC gene in *Acinetobacter baumannii* ST2 clone from Puerto Rico and genomic insights into its drug resistance. *J Med Microbiol.* 2016;65(8):784-792
- Martins WMBS, Gales AC. Frequent Tn2 misannotation in the genetic background of *rmtB*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(8):e00811-17
- Mason DJ, Dietz A, Smith RM. Actinospectacin, a new antibiotic. I. Discovery and biological properties. *Antibiot Chemother.* 1961;11:118-122
- Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in

Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44(12):3322-3327

Matsushita T, Sati GC, Kondasinghe N, Pirrone MG, Kato T, Waduge P, *et al*. Design, multigram synthesis, and *in vitro* and *in vivo* evaluation of propylamycin: a semisynthetic 4,5-deoxystreptamine class aminoglycoside for the treatment of drug-resistant Enterobacteriaceae and other Gram-negative pathogens. J Am Chem Soc. 2019;141(12):5051-5061

Matt T, Ng CL, Lang K, Sha SH, Akbergenov R, Shcherbakov D, *et al*. Dissociation of antibacterial activity and aminoglycoside ototoxicity in the 4-monosubstituted 2-deoxystreptamine apramycin. Proc Natl Acad Sci. 2012;109:10984-10989

Ma XJ, Yang HF, Liu YY, Mei Q, Ye Y, Li HR, *et al*. The emergence of the 16S rRNA methyltransferase RmtB in a multidrug-resistant *Serratia marcescens* isolate in China. Ann Lab Med. 2015;35:172-174

Mazei D. Integrons: agents of bacterial evolution. Nat Rev Microbiol. 2006;4:608-620

McGann P, Hang J, Clifford RJ, Yang Y, Kwak YI, Kuschner RA, *et al*. Complete sequence of a novel 178-kilobase plasmid carrying bla_{NDM-1} in a *Providencia stuartii* strain isolated in Afghanistan. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56:1673-1679

McGowan JE Jr. Economic impact of antimicrobial resistance. Emerg Infect Dis. 2001;7:286-292

McKay GA, Thompson PR, Wright GD. Broad spectrum aminoglycoside phosphotransferase type III from *Enterococcus*: overexpression, purification, and substrate specificity. Biochemistry. 1994;33:6936-6944

McManus MC. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. Am J Health Syst Pharm. 1997;54:1420-1433

Meier A, Kirschner P, Bange FC, Vogel U, Böttger EC. Genetic alterations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: mapping of mutations conferring resistance. Antimicrob Agents Chemother. 1994;38:228-233

Meradji S, Barguigua A, Bentakouk MC, Nayme K, Zerouali K, Mazouz D, *et al*. Epidemiology and virulence of VIM-4 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from burn patients in eastern Algeria. Burns. 2016;42:906-918

Miller GH, Sabatelli FJ, Hare RS, Glupczynski Y, Mackey P, Shlaes D, *et al*. The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms-changes with time and

geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns? Aminoglycoside Resistance Study Groups. Clin Infect Dis. 1997; 24(Suppl1):S46-62

Minamimura M, Taniyama Y, Inoue E, Mitsuhashi S. *In vitro* antibacterial activity and β -lactamase stability of CP-70,429 a new penem antibiotic. Antimicrob Agents Chemother. 1993;37(7):1547-1551

Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. Aminoglycosides: activity and resistance. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43:727-737

Miriagou V, Tzelepi E, Gianneli D, Tzouvelekis LS. *Escherichia coli* with a self-transferable, multiresistant plasmid coding for metallo-beta-lactamase VIM-1. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47:395-7

Miriagou V, Tzelepi E, Kotsakis SD, Daikos GL, Bou Casals J, Tzouvelekis LS. Combined disc methods for the detection of KPC- and/or VIM-positive *Klebsiella pneumoniae*: improving reliability for the double carbapenemase producers. Clin Microbiol Infect. 2013;19:E412-415

Mohanam L, Menon T. Emergence of RmtC and RmtF 16S rRNA methyltransferase in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Indian J Med Microbiol. 2017;35(2):282-285

Moissenet D, Weill FX, Arlet G, Harrois D, Girardet JP, Vu-Thien H. *Salmonella enterica* serotype Gambia with CTX-M-3 and *armA* resistance markers: nosocomial infections with a fatal outcome. J Clin Microbiol. 2011;49(4):1676-1678

Morel F, Decousser JW, Kumanski S, Cambau E, Denamur E, Berçot B. Association of the 16S rRNA methylase gene *rmtB* with a novel insertion sequence element belonging to the ISL3 family. Int J Antimicrob Agents. 2017;49:117-118

Moura Q, Fernandes MR, Cerdeira L, Santos ACM, de Souza TA, Lenne S, *et al.* Draft genome sequence of a multidrug-resistant *Aeromonas hydrophila* ST508 strain carrying *rmtD* and *bla*_{CTX-M-131} isolated from a bloodstream infection. J Glob. 2017;10:289-290

Mushtaq S, Irfan S, Sarma JB, Doumith M, Pike R, Pitout J, *et al.* Phylogenetic diversity of *Escherichia coli* strains producing NDM-type carbapenemases. J Antimicrob Chemother. 2011;66(9):2002-2005

Naas T, Bentchouala C, Cuzon G, Yaou S, Lezzar A, Smati F, *et al.* Outbreak of *Salmonella enterica* serotype Infantis producing ArmA 16S RNA methylase and CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamase in a neonatology ward in Constantine, Algeria. Int J Antimicrob Agents. 2011;38:135-139

- Naas T, Bogaerts P, Bauraing C, Degheldre Y, Glupczynski Y, Nordmann P. Emergence of PER and VEB extended-spectrum β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58:178-182
- Nagabhushan TL, Cooper AB, Tsai H, Daniels PJ, Miller GH. The syntheses and biological properties of 1-N-(S-4-amino-2-hydroxybutyryl)-gentamicin B and 1-N-(S-3-amino-2-hydroxypropionyl)-gentamicin B. *J Antibiot (Tokyo).* 1978;31(7):681-687
- Nagasawa M, Kaku M, Kamachi K, Shibayama K, Arakawa Y, Yamaguchi K, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification assay for 16S rRNA methylase genes in Gram-negative bacteria. *J Infect Chemother.* 2014;20(10):635-638
- Nakashima T, Teranishi M, Hibi T, Kobayashi M, Umemura M. Vestibular and cochlear toxicity of aminoglycosides - a review. *Acta Otolaryngol.* 2000;120:904-911
- Nara T, Yamamoto M, Kawamoto I, Takayama K, Okachi R, Takasawa S, *et al.* Fortimicins A and B, new aminoglycoside antibiotics. I. Producing organism, fermentation and biological properties of fortimicins. *J Antibiot.* 1977;30(7): 533-540
- Nematzadeh S, Shahcheraghi F, Iversen A, Giske CG. Successful international clones of blaCTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* with coexpression of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) determinants in Tehran hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015;83(4):371-374
- Nessar R, Reytrat JM, Murray A, Gicquel B. Genetic analysis of new 16S rRNA mutations conferring aminoglycoside resistance in *Mycobacterium abscessus*. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(8):1719-1724
- Novick RP, Clowes RC, Cohen SN, Curtiss R 3rd, Datta N, Falkow S. Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. *Bacteriol Rev.* 1976;40:168-189
- Nudelman I, Glikin D, Smolkin B, Hainrichson M, Belakhov V, Baasov T. Repairing faulty genes by aminoglycosides: development of new derivatives of geneticin (G418) with enhanced suppression of diseases-causing nonsense mutations. *Bioorg Med Chem.* 2010;18:3735-3746
- Nüesch-Inderbinen MT, Hächler H, Kayser FH. Detection of genes coding for extended-spectrum SHV β -lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with the E test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1996;15:398-402
- O'Connor M, De Stasio EA, Dahlberg AE. Interaction between 16S ribosomal RNA and ribosomal protein S12: differential effects of paromomycin and streptomycin. *Biochimie.* 1991;73:1493-1500

- Oda T, Mori T, Itō H, Kunieda T, Munakata K. Studies on new antibiotic lividomycins. I. Taxonomic studies on the lividomycin-producing strain *Streptomyces lividus* nov. sp. J Antibiot. 1971;24(6):333-338
- O'Hara JA, McGann P, Snesrud EC, Clifford RJ, Waterman PE, Lesho EP, *et al.* Novel 16S rRNA methyltransferase RmtH produced by *Klebsiella pneumoniae* associated with war-related trauma. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57:2413-2416
- Oikonomou O, Liakopoulos A, Phee LM, Betts J, Mevius D, Wareham DW. *Providencia stuartii* isolates from Greece: co-carriage of cephalosporin (*bla*_{SHV-5}, *bla*_{VEB-1}), carbapenem (*bla*_{VIM-1}), and aminoglycoside (*rmtB*) resistance determinants by a multidrug-resistant outbreak clone. Microb Drug Resist. 2016;22:379-386
- Oizumi K, Ariji F, Kumano N, Oka S, Konno K. Action mechanism of 3',4'-dideoxykanamycin B (DKB) on *Klebsiella pneumoniae*. Sci Rep Res Inst, Tohoku Univ. 1974;21(3-4):47-53
- Pagkalis S, Mantadakis E, Mavros MN, Ammari C, Falagas ME. Pharmacological considerations for the proper clinical use of aminoglycosides. Drugs. 2011;71(17):2277-2294
- Pan YS, Yuan L, Zong ZY, Liu JH, Wang LF, Hu GZ. A multidrug-resistance region containing *bla*_{CTX-M-65}, *fosA3* and *rmtB* on conjugative IncFII plasmids in *Escherichia coli* ST117 isolates from chicken. J Med Microbiol. 2014;63:485-488
- Papagiannitsis CC, Miriagou V, Kotsakis SD, Tzelepi E, Vatopoulos AC, Petinaki E, *et al.* Characterization of a transmissible plasmid encoding VEB-1 and VIM-1 in *Proteus mirabilis*. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56:4024-4025
- Park SR, Park JW, Ban YH, Sohng JK, Yoon YJ. 2-Deoxystreptamine-containing aminoglycoside antibiotics: Recent advances in the characterization and manipulation of their biosynthetic pathways. Nat Prod Rep. 2013;30:11-20
- Park YJ, Yu JK, Kim SI, Lee K, Arakawa Y. Accumulation of plasmid-mediated fluoroquinolone resistance genes, *qepA* and *qnrS1*, in *Enterobacter aerogenes* co-producing RmtB and class A β -lactamase LAP-1. Ann Clin Lab Sci. 2009;39:55-59
- Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. FEMS Microbiol Rev. 2009;33(4):757-784
- Passarelli-Araujo H, Palmeiro JK, Moharana KC, Pedrosa-Silva F, Dalla-Costa LM, Venancio TM. Molecular epidemiology of 16S rRNA methyltransferase in Brazil: RmtG in *Klebsiella aerogenes* ST93 (CC4). An Acad Bras Cienc. 2019;91(suppl 1):e20180762

Périchon B, Bogaerts P, Lambert T, Frangeul L, Courvalin P, Galimand M. Sequence of conjugative plasmid pIP1206 mediating resistance to aminoglycosides by 16S rRNA methylation and to hydrophilic fluoroquinolones by efflux. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(7):2581-2592

Périchon B, Courvalin P, Galimand M. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:2464-2469

Petersen TN, Rasmussen S, Hasman H, Carøe C, Bælum J, Charlotte A, *et al.* Meta-genomic analysis of toilet waste from long distance flights; a step towards global surveillance of infectious diseases and antimicrobial resistance. *Sci Rep.* 2015;5:11444

Petropoulou D, Siopi M, Vourli S, Pournaras S. Activity of sulbactam-durlobactam and comparators against a national collection of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Greece. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;11:814530

Piekarska K, Zacharczuk K, Wołkowicz T, Rzeczkowska M, Bareja E, Olak M, *et al.* Distribution of 16S rRNA methylases among different species of aminoglycoside-resistant Enterobacteriaceae in a tertiary care hospital in Poland. *Adv Clin Exp Med.* 2016;25(3):539-544

Piepersberg W. Streptomycin and related aminoglycosides. *Biotechnology.* 1995;28:531-570

Pitart C, Solé M, Roca I, Román A, Moreno A, Vila J, *et al.* Molecular characterization of bla_{NDM-5} carried on an IncFII plasmid in an *Escherichia coli* isolate from a nontraveler patient in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(1):659-662

Pittenger RC, Wolfe RN, Hoehn MM, Marks PN, Daily WA, McGuire JM. Hygromycin. I. Preliminary studies on the production and biologic activity of a new antibiotic. *Antibiot Chemother.* 1953;3(12):1268-1278

Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Analysis of the resistome of a multidrug-resistant NDM-1-producing *Escherichia coli* strain by high-throughput genome sequencing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011a;55:4224-4229

Poirel L, Cattoir V, Nordmann P. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance; Interactions between Human, Animal, and Environmental Ecologies. *Front Microbiol.* 2012;3:24

Poirel L, Goutines J, Aires-de-Sousa M, Nordmann P. High rate of association of 16S rRNA methylases and carbapenemases in Enterobacteriaceae recovered

from hospitalized children in Angola. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(4):e00021-18

Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:15-22

Poirel L, Labarca J, Bello H, Rioseco ML, Bernabeu S, Nordmann P. Emergence of the 16S rRNA methylase RmtG in an extended-spectrum- β -lactamase-producing and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate in Chile. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014a;58(1):618-619

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

Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, *et al.* Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:891-897

Poirel L, Revathi G, Bernabeu S, Nordmann P. Detection of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Kenya. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011b;55:934-936

Poirel L, Savov E, Nazli A, Trifonova A, Todorova I, Gergova I, *et al.* Outbreak caused by NDM-1- and RmtB-producing *Escherichia coli* in Bulgaria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014b;58(4):2472-2474

Poirel L, Schrenzel J, Cherkaoui A, Bernabeu S, Renzi G, Nordmann P. Molecular analysis of NDM-1-producing enterobacterial isolates from Geneva, Switzerland. *J Antimicrob Chemother.* 2011c;66(8):1730-1733

Poirel L, Villa L, Bertini A, Pitout JD, Nordmann P, Carattoli A. Expanded-spectrum β -lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:803-805

Poole K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005a;49(2):479-487

Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2005b;56:20-51

Potron A, Poirel L, Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;45:568-585

Pournaras S, Dafopoulou K, Del Franco M, Zarkotou O, Dimitroulia E, Protonotariou E, *et al.* Predominance of international clone 2 OXA-23-producing-*Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Greece, 2015: results of a nationwide study. *Int J Antimicrob Agents.* 2017;49:749-753

Prammananan T, Sander P, Brown BA, Frischkorn K, Onyi GO, Zhang Y, *et al.* A single 16S ribosomal RNA substitution is responsible for resistance to amikacin and other 2-deoxystreptamine aminoglycosides in *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae*. *J Infect Dis.* 1998;177(6):1573-1581

Pulss S, Semmler T, Prenger-Berninghoff E, Bauerfeind R, Ewers C. First report of an *Escherichia coli* strain from swine carrying an OXA-181 carbapenemase and the colistin resistance determinant MCR-1. *Int J Antimicrob Agents.* 2017;50(2):232-236

Quiles MG, Rocchetti TT, Fehlberg LC, Kusano EJ, Chebabo A, Pereira RM, *et al.* Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and *armA* among Brazilian Enterobacteriaceae isolates. *Braz J Med Biol Res.* 2015;48(2):174-177

Rahal JJ, Simberkoff MS, Kagan K, Moldover NH. Bactericidal efficacy of Sch 20569 and amikacin against gentamicin-sensitive and -resistant organisms. *Antimicrob Agents Chemother.* 1976;9(4):595-599

Rahman M, Prasad KN, Pathak A, Pati BK, Singh A, Ovejero CM, *et al.* RmtC and RmtF 16S rRNA methyltransferase in NDM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(11):2059-2062

Rahman M, Shukla SK, Prasad KN, Ovejero CM, Pati BK, Tripathi A, *et al.* Prevalence and molecular characterization of New Delhi metallo- β -lactamases NDM-1, NDM-5, NDM-6 and NDM-7 in multidrug-resistant Enterobacteriaceae from India. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;44(1):30-37

Ramirez MS, Quiroga C, Centrón D. Novel rearrangement of a class 2 integron in two non-epidemiologically related isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:5179-5181

Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat.* 2010;13:151-171

Ramos PIP, Picão RC, de Almeida LGP, Lima NCB, Girardello R, Vivan ACP, *et al.* Comparative analysis of the complete genome of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* Kp13 reveals remarkable genome plasticity and a wide repertoire of virulence and resistance mechanisms. *BMC Genomics.* 2014;15:54

Ranganathan D, Varghese JM, Fassett RG, Lipman J, D'Intini V, Healy H, *et al.* Optimizing intraperitoneal gentamicin dosing in peritoneal dialysis patients with peritonitis (GIPD) study. *BMC Nephrol.* 2009;10:42

- Rather PN, Orosz E, Shaw KJ, Hare R, Miller G. Characterization and transcriptional regulation of the 2'-N-acetyltransferase gene from *Providencia stuartii*. J Bacteriol. 1993;175:6492-6498
- Revathi G, Siu LK, Lu PL, Huang LY. First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in East Africa. Int J Infect Dis. 2013;17(12):e1255-58
- Rich DP, Anderson MP, Gregory RJ, Cheng SH, Paul S, Jefferson DM, *et al.* Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. Nature. 1990;347(6291):358-363
- Rosenberg EY, Ma D, Nikaido H. AcrD of *Escherichia coli* is an aminoglycoside efflux pump. J Bacteriol. 2000;182(6):1754-1756
- Rubin JE, Peirano G, Peer AK, Govind CN, Pitout JD. NDM-1-producing Enterobacteriaceae from South Africa: moving towards endemicity? Diagn Microbiol Infect Dis. 2014;79(3):378-380
- Rutka J. Aminoglycoside Vestibulotoxicity. Adv Otorhinolaryngol. 2019;82:101-110
- Sabtcheva S, Saga T, Kantardjiev T, Ivanova M, Ishii Y, Kaku M. Nosocomial spread of *armA*-mediated high-level aminoglycoside resistance in Enterobacteriaceae isolates producing CTX-M-3 β -lactamase in a cancer hospital in Bulgaria. J Chemother. 2008;20(5):593-599
- Salabi AE, Toleman MA, Weeks J, Bruderer T, Frei R, Walsh TR. First report of the metallo- β -lactamase SPM-1 in Europe. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54:582
- Salipante SJ, Hall BG. Determining the limits of the evolutionary potential of an antibiotic resistance gene. Mol Biol Evol. 2003;20:653-659
- Salloum T, Arabaghian H, Alousi S, Abboud E, Tokajian S. Genome sequencing and comparative analysis of an NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST15 isolated from a refugee patient. Pathog Glob Health. 2017;111(4):166-175
- Samuelsen Ø, Toleman MA, Hasseltvedt V, Fuursted K, Leegaard TM, Walsh TR, *et al.* Molecular characterization of VIM-producing *Klebsiella pneumoniae* from Scandinavia reveals genetic relatedness with international clonal complexes encoding transferable multidrug resistance. Clin Microbiol Infect. 2011;17:1811-1816
- Saranathan R, Kumari R, Kalaivani R, Suresh S, Rani A, Purty S, *et al.* Detection of IS*Aba1* in association with a novel allelic variant of the β -lactamase ADC-82 and class D β -lactamase genes mediating carbapenem resistance among the clinical isolates of MDR *A. baumannii*. J Med Microbiol. 2017;66(2):103-111

Sartor AL, Raza MW, Abbasi SA, Day KM, Perry JD, Paterson DL, *et al.* Molecular epidemiology of NDM-1-producing Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii* isolates from Pakistan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(9):5589-5593

Sati GC, Shcherbakov D, Hobbie SN, Vasella A, Böttger EC, Crich D. N6', N6'''', and O4' modifications to neomycin affect ribosomal selectivity without compromising antibacterial activity. *ACS Infect Dis.* 2017;3(5):368-377

Sato R, Tanigawara Y, Kaku M, Aikawa N, Shimizu K. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic relationship of arbekacin for treatment of patients infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(11):3763-3769

Saule M, Samuelsen Ø, Dumpis U, Sundsfjord A, Karlson A, Balode A, *et al.* Dissemination of a carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strain belonging to International Clone II/sequence type 2 and harboring a novel AbaR4-like resistance island in Latvia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(2):1069-1072

Savic M, Lovric J, Tomic TI, Vasiljevic B, Conn GL. Determination of the target nucleosides for members of two families of 16S rRNA methyltransferases that confer resistance to partially overlapping groups of aminoglycoside antibiotics. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:5420-5431

Schatz A, Bugie E, Waksman SA. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1944;55(1):66-69

Seiffert SN, Marschall J, Perreten V, Carattoli A, Furrer H, Endimiani A. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* co-producing NDM-1, OXA-48, CTX-M-15, CMY-16, QnrA and ArmA in Switzerland. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;44(3):260-262

Sekizuka T, Matsui M, Yamane K, Takeuchi F, Ohnishi M, Hishinuma A, *et al.* Complete sequencing of the bla_{NDM-1}-positive IncA/C plasmid from *Escherichia coli* ST38 isolate suggests a possible origin from plant pathogens. *PLoS One.* 2011;6:e25334

Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S, *et al.* PCR detection of metallo-β-lactamase gene (*bla_{IMP}*) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum β-lactams. *J Clin Microbiol.* 1996;34:2909–2913

Seputiene V, Povilonis J, Suziedeliene E. Novel variants of AbaR resistance islands with a common backbone in *Acinetobacter baumannii* isolates of European clone II. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:1969-1973

Serio AW, Keepers T, Andrews L, Krause KM. Aminoglycoside revival: review of a historically important class of antimicrobials undergoing rejuvenation. *EcoSal Plus*. 2018;8(1)

Shaeer KM, Zmarlicka MT, Chahine EB, Piccicacco N, Cho JC. Plazomicin: a next-generation aminoglycoside. *Pharmacotherapy*. 2019;39(1):77-93

Shakil S, Akram M, Ali SM, Khan AU. Acquisition of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* strains in male and female infants admitted to a neonatal intensive care unit: molecular epidemiology and analysis of risk factors. *J Med Microbiol*. 2010;59(8):948-954

Shakil S, Khan R, Zarrilli R, Khan AU. Aminoglycosides versus bacteria – a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground. *J Biomed Sci* 2008;15:5-14

Shalev M, Kandasamy J, Skalka N, Belakhov V, Rosin-Arbesfeld R, Baasov T. Development of generic immunoassay for the detection of a series of aminoglycosides with 6'-OH group for the treatment of genetic diseases in biological samples. *J Pharm Biomed Anal*. 2013;75:33-40

Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev*. 1993;57:138-163

Sheng JF, Li JJ, Tu S, Sheng ZK, Bi S, Zhu MH, *et al.* *bla*_{KPC} and *rmtB* on a single plasmid in *Enterobacter amnigenus* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from the same patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31:1585-1591

Shin SY, Kwon KC, Park JW, Song JH, Ko YH, Sung JY, *et al.* Characteristics of *aac(6')-Ib-cr* gene in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Chungnam area. *Korean J Lab Med*. 2009;29(6):541-550

Shomura T, Ezaki N, Tsuruoka T, Niwa T, Akita E. Studies on antibiotic SF-733, a new antibiotic. I. Taxonomy, isolation and characterization. *J Antibiot*. 1970;23(3):155-161

Shrestha S, Tada T, Shrestha B, Kirikae T, Ohara H, Rijal BP, *et al.* Emergence of aminoglycoside resistance due to armA methylase in multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in a university hospital in Nepal. *J Nepal Health Res Counc*. 2016;14(33):72-76

Sidjabat HE, Nimmo GR, Walsh TR, Binotto E, Htin A, Hayashi Y, *et al.* Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* due to the New Delhi Metallo- β -lactamase. *Clin Infect Dis*. 2011;52:481-484

Sidjabat HE, Townell N, Nimmo GR, George NM, Robson J, Vohra R, *et al.* Dominance of IMP-4-producing *Enterobacter cloacae* among carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Australia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(7):4059-4066

Siguiet P, Gourbeyre E, Chandler M. Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiol Rev.* 2014;38(5):865-891

Silveira MC, Albano RM, Asensi MD, Carvalho-Assef AP. Description of genomic islands associated to the multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone ST277. *Infect Genet Evol.* 2016;42:60-65

Smith KP, Kirby JE. Evaluation of apramycin activity against carbapenem resistant and -susceptible strains of Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016;86:439-441

Smith S, Rowbotham NJ, Charbek E. Inhaled antibiotics for pulmonary exacerbations in cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018. 10(10):CD008319

Solé M, Pitart C, Roca I, Fàbrega A, Salvador P, Muñoz L, *et al.* First description of an *Escherichia coli* strain producing NDM-1 carbapenemase in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:4402-4404

Sonnevend A, Ghazawi A, Al Munthari N, Pitout M, Hamadeh MB, Hashmey R, *et al.* Characteristics of epidemic and sporadic strains of *Acinetobacter baumannii* isolated in Abu Dhabi hospitals. *J Med Microbiol.* 2013;62(4):582-590

Sonnevend Á, Ghazawi A, Hashmey R, Haidermota A, Girgis S, Alfaresi M, *et al.* Multihospital occurrence of pan-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 147 with an ISEcp1-directed blaOXA-181 insertion in the *mgrB* gene in the United Arab Emirates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(7):e00418-17

Speldooren V, Heym B, Labia R, Nicolas-Chanoine MH. Discriminatory detection of inhibitor-resistant beta-lactamases in *Escherichia coli*, by single-strand conformation polymorphism-PCR. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42:879-884

Strateva T, Markova B, Marteva-Proevska Y, Ivanova D, Mitov I. Widespread dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 carbapenemase and ArmA 16S ribosomal RNA methylase in a Bulgarian university hospital. *Braz J Infect Dis.* 2012;16(3):307-310

Stürenburg E, Mack D. Extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *J Infect.* 2003;47:273-295

Sunada A, Nakajima M, Ikeda Y, Kondo S, Hotta K. Enzymatic 1-N-acetylation of paromomycin by an actinomycete strain #8 with multiple aminoglycoside resistance and paromomycin sensitivity. *J Antibiot (Tokyo)*. 1999;52:809-814

Taber HW, Mueller JP, Miller PF, Arrow AS. Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. *Microbiol Rev*. 1987;51:439-457

Tada T, Hishinuma T, Watanabe S, Uchida H, Tohya M, Kuwahara-Arai K, *et al*. Molecular characterization of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in hospitals in Myanmar. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63(5):e02397-18

Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Dahal RK, Mishra SK, Ohara H, Shimada K, *et al*. Dissemination of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with various combinations of carbapenemases (NDM-1 and OXA-72) and 16S rRNA methylases (ArmA, RmtC and RmtF) in Nepal. *Int J Antimicrob Agents*. 2013a;42(4):367-378

Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Kato Y, Ohmagari N, Takeshita N, Hung NV, *et al*. Emergence of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in hospitals in Vietnam. *BMC Infect Dis*. 2013b;13:251

Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Nga TT, Thu le TA, Son NT, *et al*. Dissemination of clonal complex 2 *Acinetobacter baumannii* strains co-producing carbapenemases and 16S rRNA methylase *armA* in Vietnam. *BMC Infect Dis*. 2015;15:433

Tada T, Shimada K, Mya S, Zan KN, Kuwahara K, Kirikae T, *et al*. A new variant of 16S rRNA methylase, RmtD3, in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in Myanmar. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(1):e01806-17

Tada T, Shimada K, Satou K, Hirano T, Pokhrel BM, Sherchand JB, *et al*. Metallo- β -lactamases (DIM-1, NDM-1, VIM-2)- and a 16S rRNA methyltransferase (RmtB4, RmtF2)- producing *Pseudomonas aeruginosa* in Nepal. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017a;61:e00694-17

Tada T, Tsuchiya M, Shimada K, Nga TTT, Thu LTA, Phu TT, *et al*. Dissemination of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with various combinations of carbapenemases (KPC-2, NDM-1, NDM-4, and OXA-48) and 16S rRNA methylases (RmtB and RmtC) in Vietnam. *BMC Infect Dis*. 2017b;17(1):467

Tada T, Uchida H, Hishinuma T, Watanabe S, Tohya M, Kuwahara-Arai K, *et al*. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from hospitals in Myanmar. *J Glob Antimicrob Resist*. 2020;22:122-125

Taitt CR, Leski TA, Erwin DP, Odundo EA, Kipkemoi NC, Ndonge JN, *et al.* Antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae* stool isolates circulating in Kenya. PLOS one. 2017;12(6):e0178880.

Takahashi Y, Igarashi M. Destination of aminoglycoside antibiotics in the 'post-antibiotic era'. J Antibiot (Tokyo). 2017. Epub ahead of print

Tamang MD, Seol SY, Oh JY, Kang HY, Lee JC, Lee CY, *et al.* Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnrA*, *qnrB*, and *qnrS* among clinical isolates of Enterobacteriaceae in a Korean hospital. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52(11):4159-4162

Tavakoli N, Comanducci A, Dodd HM, Lett MC, Albiger B, Bennett P. IS 1294, a DNA element that transposes by RC transposition. Plasmid. 2000;44(1):66-84

Tenover FC, Gilbert T, O'Hara P. Nucleotide sequence of a novel kanamycin resistance gene, *aphA-7*, from *Campylobacter jejuni* and comparison to other kanamycin phosphotransferase genes. Plasmid. 1989;22:52-58

Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. Am J Med. 2006;119(6 Suppl 1):S3-10;S62-70

Theuretzbacher U, Bush K, Harbarth S, Paul M, Rex JH, Tacconelli E, *et al.* Critical analysis of antibacterial agents in clinical development. Nat Rev Microbiol. 2020;18(5):286-298

Thomas CM, Nielsen KM. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. Nat Rev Microbiol. 2005;3(9):711-721

Tijet N, Andres P, Chung C, Lucero C; WHONET-Argentina Group, Low DE, *et al.* *rmtD2*, a new allele of a 16S rRNA methylase gene, has been present in Enterobacteriaceae isolates from Argentina for more than a decade. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55:904-909

Tijet N, Richardson D, MacMullin G, Patel SN, Melano RG. Characterization of multiple NDM-1-producing Enterobacteriaceae isolates from the same patient. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59(6):3648-3651

Tojo M, Mawatari M, Hayakawa K, Nagamatsu M, Shimada K, Mezaki K, *et al.* Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from a traveller returned from Brunei. J Infect Chemother. 2015;21(3):212-214

Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? Microbiol Mol Biol Rev. 2006;70(2):296-316

Toleman MA, Walsh TR. Combinatorial events of insertion sequences and ICE in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Rev. 2011;35(5):912-935

Tolmasky ME. Aminoglycoside-modifying enzymes: characteristics, localization, and dissemination. In: Bonomo RA, Tolmasky ME, editors. Enzyme mediated resistance to antibiotics: mechanisms, dissemination, and prospects for inhibition. ASM PRESS; Washington DC. 2007

Towner KJ, Levi K, Vlassiadi M; ARPAC Steering Group. Genetic diversity of carbapenem resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Europe. Clin Microbiol Infect. 2008;14:161-167

Tsilipounidaki K, Athanasakopoulou Z, Müller E, Burgold-Voigt S, Florou Z, Braun SD, *et al.* Plethora of resistance genes in carbapenem-resistant Gram-negative bacteria in Greece: no end to a continuous genetic evolution. Microorganisms. 2022;10(1):159

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;13:807-815

Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, *et al.* The role of IS*Aba1* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. FEMS Microbiol Lett. 2006;258(1):72-77

Umezawa H. Kanamycin: its discovery. Ann N Y Acad Sci. 1958;76(2):20-26

Umezawa H, Ueda M, Maeda K, Yagishita K, Kondo S, Okami Y, *et al.* Production and isolation of a new antibiotic: kanamycin. J Antibiot (Tokyo). 1957;10(5):181-188

Upadhyay S, Joshi SR, Khyriem AB, Bhattacharya P. Acquired 16S methyltransferase associated high level aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* recovered from ICU patients from a tertiary referral hospital of northeast India. Int J Infect Dis. 2016;45(1):46

Urbanowicz P, Izdebski R, Baraniak A, Żabicka D, Ziółkowski G, Hryniewicz W, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* with NDM-1, DIM-1 and PME-1 β -lactamases, and RmtD3 16S rRNA methylase, encoded by new genomic islands. J Antimicrob Chemother. 2019;74(10):3117-3119

Vahaboglu H, Ozturk R, Akbal H, Saribas S, Tansel O, Coşkun F. Practical approach for detection and identification of OXA-10-derived ceftazidime-hydrolyzing extended-spectrum beta-lactamases. J Clin Microbiol. 1998;36:827-829

Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. Clin Microbiol Rev. 2003;16:430-450

- Vanhoof R, Hannecart-Pokorni E, Content J. Nomenclature of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42:483
- Vanhoof R, Sonck P, Hannecart-Pokorni E. The role of lipopolysaccharide anionic binding sites in aminoglycoside uptake in *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia*. *J Antimicrob Chemother.* 1995;35(1):167-171
- Vetting MW, de Carvalho LPS, Yu M, Hedge SS, Magnet S, Roderick SL, *et al.* Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. *Arch Biochem Biophys.* 2005;433(1):212-226
- Vetting MW, Park CH, Hedge SS, Jacoby GA, Hooper DC, Blanchard JS. Mechanistic and structural analysis of aminoglycoside N-acetyltransferase AAC(6')-Ib and its bifunctional, fluoroquinolone-active AAC(6')-Ib-cr variant. *Biochemistry.* 2008;47:9825-9835
- Veyssier P, Bryskier A. Aminocyclitol Aminoglycosides. In: Bryskier A, ed. *Antimicrobial Agents: Antibacterials and Antifungals.* ASM Press, 2005;453-469
- Villa L, García-Fernández A, Fortini D, Carattoli A. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65:2518-2529
- Vinal K, Conn GL. Substrate recognition and modification by a pathogen-associated aminoglycoside resistance 16S rRNA methyltransferase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(5):e00077-17
- Vliegenthart JS, Ketelaar-van Gaalen PA, van de Klundert JA. Nucleotide sequence of the *aacC3* gene, a gentamicin resistance determinant encoding aminoglycoside (3)-N-acetyltransferase III expressed in *Pseudomonas aeruginosa* but not in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991;35:892-897
- Voulgari E, Kotsakis SD, Giannopoulou P, Perivolioti E, Tzouvelekis LS, Miriagou V. Detection in two hospitals of transferable ceftazidime-avibactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* due to a novel VEB β -lactamase variant with a Lys234Arg substitution, Greece, 2019. *Euro Surveill.* 2020;25:1900766
- Wachino J, Arakawa Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug Resist Updat.* 2012;15(3):133-148
- Wachino J, Doi Y, Arakawa Y. Aminoglycoside Resistance: Updates with a Focus on Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. *Infect Dis Clin North Am.* 2020;34(4):887-902

Wachino J, Shibayama K, Kimura K, Yamane K, Suzuki S, Arakawa Y. RmtC introduces G1405 methylation in 16S rRNA and confers high-level aminoglycoside resistance on Gram-positive microorganisms. *FEMS Microbiol Lett.* 2010;311(1):56-60

Wachino J, Shibiyama K, Kurokawa K, Kimura K, Yamane K, Suzuki S, *et al.* Novel plasmid-mediated 16S rRNA m1A1408 methyltransferase, NpmA, found in a clinically isolated *Escherichia coli* strain resistant to structurally diverse aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:4401-4409

Wachino J, Yamane K, Kimura K, Shibata N, Suzuki S, Ike Y, *et al.* Mode of transposition and expression of 16S rRNA methyltransferase gene *rmtC* accompanied by *ISEcp1*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006a;50:3212-3215

Wachino J, Yamane K, Shibayama K, Kurokawa H, Shibata N, Suzuki S, *et al.* Novel plasmid-mediated 16S rRNA methylase, RmtC, found in a *Proteus mirabilis* isolate demonstrating extraordinary high-level resistance against various aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006b;50(1):178-184

Wagner A. Cooperation is fleeting in the world of transposable elements. *PLoS Comput Biol.* 2006;2(12):e162

Waksman SA, Lechevalier HA. Neomycin, a new antibiotic active against streptomycin-resistant bacteria, including tuberculosis organisms. *Science.* 1949;109(2830):305-307

Walkty A, Karlowsky JA, Baxter MR, Adam HJ, Boyd D, Bharat A, *et al.* Frequency of 16S ribosomal RNA methyltransferase detection among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates obtained from patients in Canadian hospitals (CANWARD, 2013–2017). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2019;94(2):199-201

Wangkheimayum J, Paul D, Dhar D, Nepram R, Chetri S, Bhowmik D, *et al.* Occurrence of acquired 16S methyltransferase mediated aminoglycoside resistance in clinical isolates of Enterobacteriaceae within a tertiary referral hospital of northeast India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(6):e01037-16

Wang L, Pulk A, Wasserman MR, Feldman MB, Altman RB, Cate JH, *et al.* Allosteric control of the ribosome by small-molecule antibiotics. *Nat Struct Mol Biol.* 2012;19:957-963

Wang Y, Zhang A, Yang Y, Lei C, Jiang W, Liu B, *et al.* Emergence of *Salmonella enterica* serovar Indiana and California isolates with concurrent resistance to cefotaxime, amikacin and ciprofloxacin from chickens in China. *Int J Food Microbiol.* 2017;262:23-30

Wargo KA, Edwards JD. Aminoglycoside-Induced Nephrotoxicity. *J Pharm Pract.* 2014;27(6):573-577

Waterman PE, McGann P, Snesrud E, Clifford RJ, Kwak YI, Munoz-Urbizo IP, *et al.* Bacterial peritonitis due to *Acinetobacter baumannii* sequence type 25 with plasmid-borne New Delhi metallo- β -lactamase in Honduras. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(9):4584-4586

Weinstein MJ, Luedemann GM, Oden EM, Wagman GH, Rosselet JP, Marquez JA, *et al.* Gentamicin, a new antibiotic complex from *Micromonospora*. *J Med Chem.* 1963;6:463-464

Weinstein MJ, Marquez JA, Testa RT, Wagman GH, Oden EM, Waitz JA. Antibiotic 6640, a new *Micromonospora*-produced aminoglycoside antibiotic. *J Antibiot.* 1970;23(11):551-554

Wick WE, Welles JS. Nebramycin, a new broad-spectrum antibiotic complex. IV. *In vitro* and *in vivo* laboratory evaluation. *Antimicrob Agents Chemother.* 1967;7:341-348

Williamson DA, Sidjabat HE, Freeman JT, Roberts SA, Silvey A, Woodhouse R, *et al.* Identification and molecular characterisation of New Delhi metallo- β -lactamase-1 (NDM-1)- and NDM-6-producing Enterobacteriaceae from New Zealand hospitals. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;39(6):529-533

Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, *et al.* Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents.* 2006;27:351-353

World Health Organization (WHO). Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline. Geneva: World Health Organization; 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO

World Health Organization (WHO). Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery and Development of New Antibiotics. Geneva: World Health Organization; 2017. Available at: <https://www.who.int/medicines/publications/global-prioritylist-antibiotic-resistant-bacteria/en>

Wu JJ, Chen HM, Ko WC, Wu HM, Tsai SH, Yan JJ. Prevalence of extended-spectrum β -lactamases in *Proteus mirabilis* in a Taiwanese university hospital, 1999 to 2005: identification of a novel CTX-M enzyme (CTX-M-66). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;60(2):169-175

Xia J, Fang LX, Cheng K, Xu GH, Wang XR, Liao XP, *et al.* Clonal Spread of 16S rRNA methyltransferase-producing *Klebsiella pneumoniae* ST37 with high prevalence of ESBLs from companion animals in China. *Front Microbiol.* 2017;8:529

- Xia J, Sun J, Li L, Fang LX, Deng H, Yang RS, *et al.* First report of the IncI1/ST898 conjugative plasmid carrying *rmtE2* 16S rRNA methyltransferase gene in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(12):7921-7922
- Yamane K, Doi Y, Yokoyama K, Yagi T, Kurokawa H, Shibata N, *et al.* Genetic environments of the *rmtA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:2069-2074
- Yamane K, Rossi F, Baberino MGMA, Adams-Haduch JM, Doi Y, Paterson DL. 16S ribosomal RNA methylase RmtD produced by *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(3):746-747
- Yamane K, Wachino J, Doi Y, Kurokawa H, Arakawa Y. Global spread of multiple aminoglycoside resistance genes. *Emerg Infect Dis.* 2015;11(6):951-953
- Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Shibata N, Kato H, Shibayama K, *et al.* 16S rRNA methylase-producing, gram-negative pathogens, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:642-646
- Yang L, Yang L, Lü DH, Zhang WH, Ren SQ, Liu YH, *et al.* Co-prevalence of PMQR and 16S rRNA methylase genes in clinical *Escherichia coli* isolates with high diversity of CTX-M from diseased farmed pigeons. *Vet Microbiol.* 2015;178(3-4):238-245
- Yang X, Liu W, Liu Y, Wang J, Lv L, Chen X, *et al.* F33: A-: B-, IncHI2/ST3, and IncI1/ST71 plasmids drive the dissemination of *fosA3* and *bla*_{CTX-M-55/-14/-65} in *Escherichia coli* from chickens in China. *Front Microbiol.* 2014;5:688
- Yang YX, Yang YQ, Lei CW, Liu BH, Jiang W, Wang HN, *et al.* Characterization of pHeBE7, an IncFII-type virulence-resistance plasmid carrying *bla*_{CTX-M-98b}, *bla*_{TEM-1}, and *rmtB* genes, detected in *Escherichia coli* from a chicken isolate in China. *Plasmid.* 2017;92:37-42
- Yang Y, Zhang A, Lei C, Wang H, Guan Z, Xu C, *et al.* Characteristics of plasmids coharboring 16S rRNA methylases, CTX-M, and virulence factors in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from chickens in China. *Foodborne Pathog Dis.* 2015;12(11):873-880
- Yan JJ, Wu JJ, Ko WC, Tsai SH, Chuang CL, Wu HM, *et al.* Plasmid-mediated 16S rRNA methylases conferring high-level aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from two Taiwanese hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54:1007-1012
- Yao Q, Zeng Z, Hou J, Deng Y, He L, Tian W, *et al.* Dissemination of the *rmtB* gene carried on IncF and IncN plasmids among Enterobacteriaceae in a pig farm and its environment. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(11):2475-2479

- Yeganeh Sefidan F, Mohammadzadeh-Asl Y, Ghotaslou R. High-level resistance to aminoglycosides due to 16S rRNA methylation in Enterobacteriaceae isolates. *Microb Drug Resist.* 2019;25(9):1261-1265
- Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, *et al.* Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet.* 2003;362:1888-1893
- Yoon EJ, Kang DY, Yang JW, Kim D, Lee H, Lee KJ, *et al.* New Delhi metallo- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in South Korea between 2010 and 2015. *Front Microbiol.* 2018;9:571
- Yuan M, Hall LM, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM, Livermore DM. SHV-13, a novel extended-spectrum β -lactamase, in *Klebsiella pneumoniae* isolates from an intensive care unit in Amsterdam. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:1081-1084
- Yu T, He T, Yao H, Zhang JB, Li XN, Zhang RM, *et al.* Prevalence of 16S rRNA methylase gene *rmtB* among *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis in Ningxia, China. *Foodborne Pathog Dis.* 2015;12(9):770-777
- Zacharczuk K, Piekarska K, Szych J, Jagielski M, Hidalgo L, San Millán A, *et al.* Plasmid-borne 16S rRNA methylase ArmA in aminoglycoside-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Poland. *J Med Microbiol.* 2011;60:1306-1311
- Zaman SB, Hussain MA, Nye R, Mehta V, Mamun KT, Hossain N. A review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing. *Cureus.* 2017;9(6):e1403
- Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, *et al.* Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:2640-2644
- Zenati K, Sahli F, Garcia V, Bakour S, Belhadi D, Rolain JM, *et al.* Occurrence and clonal diversity of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* recovered from inanimate surfaces in Algerian hospital environment: first report of *armA*, *qnrB* and *aac(6')-Ib-cr* genes. *J Glob Antimicrob Resist.* 2017;10:148-153
- Zhanel GG, Lawrence CK, Adam H, Schweizer F, Zelenitsky S, Zhanel M, *et al.* Imipenem-Relebactam and Meropenem-Vaborbactam: two novel carbapenem- β -lactamase inhibitor combinations. *Drugs.* 2018;78(1):65-98
- Zhang W, Fisher JF, Mobashery S. The bifunctional enzymes of antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol.* 2009;12:505-511
- Zhao WS, Liu GY, Mi ZH, Zhang F. Coexistence of *bla*_{OXA-23} with *armA* and novel *gyrA* mutation in a pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolate from the blood of a patient with haematological disease in China. *J Hosp Infect.* 2011;77:278-279

Zhou Y, Yu H, Guo Q, Xu X, Ye X, Wu S, *et al.* Distribution of 16S rRNA methylases among different species of Gram-negative bacilli with high-level resistance to aminoglycosides. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010;29(11):1349-1353

Zong Z, Partridge SR, Iredell JR. RmtC 16S rRNA methyltransferase in Australia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:794-795

Zurfluh K, Bagutti C, Brodmann P, Alt M, Schulze J, Fanning S, *et al.* Wastewater is a reservoir for clinically relevant carbapenemase- and 16S rRNA methylase-producing Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents.* 2017;50(3):436-440

