



Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής  
Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας  
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών  
Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας &  
Ανοσολογίας (EMMA)

Μοριακή ανίχνευση των γονιδίων  
*mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4, mcr-5*  
(colistin resistance genes)  
σε υδάτινα περιβαλλοντικά  
στελέχη *E.coli*

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών  
«Βιοϊατρικές Μέθοδοι Και Τεχνολογία Στη Διάγνωση»

Διπλωματική Μεταπτυχιακή Εργασία: Άννα Ψάλτα

Επιβλέποντες: Επικ. Καθ. Απόστολος Μπελούκας  
Δρ. Όλγα Παππά

2019

## Ευχαριστίες

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους βοήθησαν στην εκπόνηση αυτής της διπλωματικής εργασίας. Οφείλω να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, κ. Απόστολο Μπελούκα και την Δρ. Όλγα Παππά, Μεταδιδακτορική Επιστημονικό Συνεργάτη του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, για την εμπιστοσύνη, την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση στην πορεία αυτής της έρευνας.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τις διδακτορικές φοιτήτριες του Εργαστηρίου Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας (EMMA), Κεφάλια Αναστασία – Μαρία και Διολή Χρύσα, αλλά και όλη την ομάδα του ερευνητικού εργαστηρίου του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, για την συνεργασία τους και το όχι μόνο ομαδικό αλλά και φιλικό περιβάλλον που μου χάρισαν.

Ένα ολόψυχο ευχαριστώ αξίζει η διδακτορική φοιτήτρια, Διολή Χρύσα, που επέβλεψε την εκπαίδευσή μου στο ξεκίνημα της μελέτης, βοήθησε από τα πρώτα πειράματα της μελέτης μέχρι και τα τελικά στάδια της συγγραφής της εργασίας, και συνεργάστηκε μαζί μου άψογα καθ' όλη τη διάρκειά της.

Τέλος, δεν θα ήθελα να παραλείψω να αναφερθώ στους δικούς μου ανθρώπους, την οικογένεια και τους φίλους μου, τους οποίους ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου για την καθημερινή στήριξη και βοήθεια από τα πρώτα μου βήματα ως και σήμερα.

## Περίληψη

Τα αντιβιοτικά είναι χημικές ουσίες που δρουν επιλεκτικά έναντι του παθογόνου μικροοργανισμού, χωρίς να βλάπτουν τον ξενιστή. Χρησιμοποιούνται ευρέως για την πρόληψη και τη θεραπεία των ασθενειών, τόσο στην ιατρική όσο και την κτηνιατρική. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια η ευεργετική τους δράση απειλείται σημαντικά λόγω της ραγδαίας εξάπλωσης του φαινομένου της μικροβιακής αντοχής.

Το φαινόμενο της μικροβιακής αντοχής σχετίζεται άμεσα με την αλόγιστη χρήση των αντιβιοτικών. Η επικράτηση πολυανθεκτικών μικροοργανισμών (Multidrug resistant, MDR) σε συνδυασμό με την έλλειψη νέων αντιβιοτικών, οδήγησε στην επανεκτίμηση της πολυμυξίνης E (κολιστίνης). Η χρήση της κολιστίνης είχε απαγορευτεί εξαιτίας της νεφροτοξικότητας και νευροτοξικότητάς της. Εν τούτοις, σήμερα αποτελεί την έσχατη λύση για τη θεραπεία λοιμώξεων που οφείλονται σε πολυανθεκτικούς Gram-αρνητικούς μικροοργανισμούς. Η αυξημένη χρήση της κολιστίνης ευνοεί την ανάπτυξη ανθεκτικών βακτηρίων. Πρόσφατα αποκαλύφθηκε ένας νέος μηχανισμός αντοχής στην κολιστίνη, που σχετίζεται με την παρουσία *mcr* (mobilized colistin resistance) γονιδίων. Τα γονίδια αυτά εδράζονται σε πλασμίδια και επομένως έχουν την ικανότητα να μεταφέρονται οριζοντίως μεταξύ των διαφορετικών βακτηρίων, γεγονός που συμβάλει στην διασπορά της αντοχής.

Η εμφάνιση των *mcr* γονιδίων, τόσο στο νοσοκομειακό χώρο όσο και στον χώρο της κτηνοτροφίας, αλλά και στο περιβάλλον, όπως σε λίμνες, ποτάμια κτλ, αποτελεί μια νέα σοβαρή απειλή για τη Δημόσια Υγεία, καθώς φαίνεται να εξαπλώνεται με μεγάλη ταχύτητα, δεδομένου ότι το *mcr-1* ανιχνεύθηκε σε περισσότερες από 20 χώρες εντός 3 μηνών από την πρώτη του αναφορά.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μοριακή ανίχνευση των γονιδίων που προσδίδουν αντοχή στη κολιστίνη, εφαρμόζοντας τη μέθοδο της multiplex PCR. Συγκεκριμένα, n=70 στελέχη *E.coli*, που είχαν απομονωθεί από υδάτινα περιβάλλοντα (λίμνες, χείμαρρους και πηγάδια), ελέγχθηκαν για την παρουσία των γονιδίων *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* και *mcr-5*. Τα στελέχη κατανεμήθηκαν σε 3 μεγάλες κατηγορίες σύμφωνα με την μικροβιακή τους ευαισθησία, n=39 στελέχη (53%) Multidrug resistant, n=18 (25%) Resistant και n=16 (22%) Non wild type. Κανένα από τα στελέχη δεν βρέθηκε θετικό σε κανένα από τα γονίδια *mcr*.

## Abstract

Antibiotics are chemical substances that are capable either to suppress the bacterial growth or to kill them, without damaging the host. They are extensively used for the prevention and treatment of diseases in human and veterinary medicine. However, in recent years their beneficial effects have been seriously threatened by the rapid spread of antimicrobial resistance.

The phenomenon of antimicrobial resistance is directly related to the unwise use of antibiotics. The prevalence of multidrug resistant (MDR) in combination with the lack of new antibiotics, led to the reassessment of polymyxin E (colistin). The use of colistin has been banned because of nephrotoxicity and neurotoxicity. However, today it is one of the last-resort antibiotics for the treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative microorganisms. Increased use of colistin promotes the development of resistant bacteria. A new mechanism of colistin resistance has recently been revealed, related to the presence of *mcr* (mobilized colistin resistance) genes. These genes are plasmid-encoded and therefore have the ability to transmit horizontally between different bacteria, which contributes to the spread of resistance.

The emergence of *mcr* genes, both in the hospital and in the livestock sector, but also in the environment, such as lakes, rivers, etc., is a new serious threat to public health, as it appears to be spreading rapidly, given that *mcr-1* was detected in more than 20 countries within 3 months of its first report.

The aim of the present research is the molecular detection of plasmid-mediated colistin resistance genes applying the proposed protocol for multiplex PCR. In particular, *n*=70 *E.coli* strains isolated from aquatic environments (lakes, streams and wells), were screened for the presence of the *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* genes. The strains were divided into 3 major classes according to their microbial susceptibility, *n* = 39 strains (53%) Multidrug resistant, *n* = 18 (25%) Resistant and *n* = 16 (22%) Non wild type. None of these strains were positive for the tested *mcr* genes.

## Περιεχόμενα

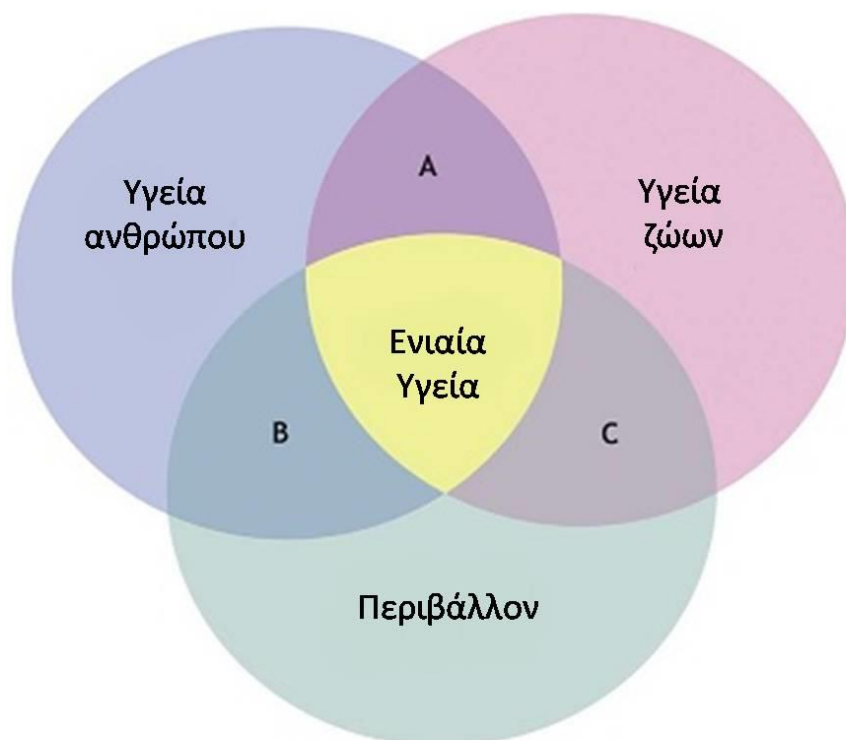
<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b> .....	<b>1</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>2</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b> .....	<b>4</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ</b> .....	<b>5</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>6</b>
<b>ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ1. ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΤΟΧΗ</b> .....	<b>8</b>
<b>1. ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΤΟΧΗ</b> .....	<b>9</b>
1.1 ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ .....	9
1.2 ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ .....	12
1.3 ΑΝΤΟΧΗ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	14
<b>2. ΚΟΛΙΣΤΙΝΗ</b> .....	<b>15</b>
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΚΟΛΙΣΤΙΝΗ .....	15
2.2 ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΚΟΛΙΣΤΙΝΗΣ .....	15
2.4 ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ ΚΟΛΙΣΤΙΝΗΣ .....	17
2.5 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΚΟΛΙΣΤΙΝΗΣ .....	18
2.6 ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΗ ΚΟΛΙΣΤΙΝΗ .....	20
<b>3. MCR (MOBILIZED COLISTIN RESISTANCE) ΓΟΝΙΔΙΑ</b> .....	<b>20</b>
3.1 MCR-1 .....	21
3.2 MCR-2 .....	23
3.3 MCR-3 .....	23
3.4 MCR-4 .....	24
3.5 MCR-5 ΚΑΙ MCR-6.....	25
3.6 MCR-7, MCR-8, MCR-9 .....	25
<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	<b>27</b>
<b>4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b> .....	<b>28</b>
4.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....	28
4.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	28
4.2.1 ΈΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ .....	28
4.2.2 ΈΛΕΓΧΟΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΣΔΙΔΟΥΝ ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΗΝ ΚΟΛΙΣΤΙΝΗ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ (MULTIPLEX) PCR. ....	30
5.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ .....	31
5.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ PCR .....	34
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	<b>35</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	<b>39</b>

### Πίνακας εικόνων

- Εικόνα 1. Διάγραμμα Venn που απεικονίζει τους τρεις τομείς της Ενιαίας Υγείας. (Α) Επιδημιολογικές μελέτες που αφορούν παράγοντες της υγείας των ζώων και του ανθρώπου. (Β) Επιδημιολογικές μελέτες σχετικές με παράγοντες μεταξύ της περιβαλλοντικής και της ανθρώπινης υγείας. (C) Επιδημιολογικές μελέτες σχετικές με παράγοντες μεταξύ της υγείας των ζώων και του περιβάλλοντος. [1] ..... 6
- Εικόνα 2. Οδοί μετάδοσης αντοχής στα αντιβιοτικά. [20]..... 12
- Εικόνα 3. Παραδείγματα διασποράς αντιμικροβιακής αντοχής. Τα αντιβιοτικά καταναλώνονται από τα ζώα και τους ανθρώπους και τα βακτήρια αναπτύσσουν μικροβιακή αντοχή στην εντερική περιοχή. Εν συνεχεία, τα ανθεκτικά βακτήρια είτε μεταδίδονται από άνθρωπο σε άνθρωπο, μέσω της κοινότητας ή εγκαταστάσεις υγείας, είτε από ζώα σε ζώα μέσω του νερού ή λιπασμάτων, είτε από τα ζώα στους ανθρώπους μέσω της κατανάλωσης κρέατος. [9] ..... 13
- Εικόνα 4. (α)Χημική δομή κολιστίνης Α και Β. (b) Χημική δομή της μεθανοσουλφονικής κολιστίνης Α και Β. (CMS) Fatty acid (λιπαρό οξύ): 6 -μεθυλοκτανοϊκό για την κολιστίνη Α και 6- μεθυλεπτανοϊκό για την κολιστίνη Β. Thr: threonine, Leu:leucine, Dab: α,γ-diaminbytiric όπου τα α και γ δείχνουν την αντίστοιχη αμινομάδα που συμμετέχει στον πεπτιδικό δεσμό. [34] ..... 17
- Εικόνα 5. Χημική δομή πολυμυξίνης Β (1) με φαινυλανανίνη στη θέση 6 του επταπεπτιδίου και χημική δομή της κολιστίνης (2) με λευκίνη στη θέση 6 του επταπεπτιδίου. [44] ..... 18
- Εικόνα 6. Μηχανισμός δράσης της κολιστίνης. Η κατιονική δομή κυκλικού δεκαπεπτιδίου της κολιστίνης δεσμεύεται με τα μόρια ανιονικού LPS μετατοπίζοντας το ασβέστιο και το μαγνησίο από την εξωτερική κυτταρική μεμβράνη των Gram-αρνητικών βακτηριδίων, οδηγώντας στη διαπερατότητά της με αποτέλεσμα τη διαρροή περιεχομένων του κυττάρου. Με τη δέσμευση του λιπιδίου Α του LPS, η κολιστίνη έχει επίσης δράση κατά της ενδοτοξίνης. LPS: λιποπολυσακχαρίτες και PBP: πρωτεΐνη δέσμευσης πενικιλίνης. [46] ... 19
- Εικόνα 7. Παράδειγμα αντιβιογράμματος. Στέλεχος *E.coli* δείγματος (121) χείμαρρου. .... 29
- Εικόνα 8. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των PCR προϊόντων. Το θετικό control του *mcr-1* είναι στα 320bp, του *mcr-2* στα 715bp, του *mcr-3* στα 929bp, του *mcr-4* στα 1,116bp και τέλος, του *mcr-5* στα 1,644bp. .... 34

## Εισαγωγή

Η υγεία του ανθρώπου συνδέεται άρρηκτα με την υγεία των ζώων και του περιβάλλοντος, επομένως καθίσταται αναγκαία η διαχείριση της Δημόσιας Υγείας με την ολιστική θεώρηση της Ενιαίας Υγείας. [1] Ο κύριος λόγος για την ανάπτυξη του όρου της Ενιαίας Υγείας αποτέλεσε το παγκόσμιο πρόβλημα της αντιμικροβιακής αντοχής σε σχεδόν όλα τα διαθέσιμα αντιβιοτικά και η ταχεία εξάπλωση των γονιδίων ανθεκτικότητας σε σχεδόν όλους τους βακτηριακούς πληθυσμούς. [2, 3]



**Εικόνα 1.** Διάγραμμα Venn που απεικονίζει τους τρεις τομείς της Ενιαίας Υγείας. (A) Επιδημιολογικές μελέτες που αφορούν παράγοντες της υγείας των ζώων και του ανθρώπου. (B) Επιδημιολογικές μελέτες σχετικές με παράγοντες μεταξύ της περιβαλλοντικής και της ανθρώπινης υγείας. (C) Επιδημιολογικές μελέτες σχετικές με παράγοντες μεταξύ της υγείας των ζώων και του περιβάλλοντος. [1]

Στα κλινικά περιβάλλοντα το φαινόμενο της μικροβιακής αντοχής έχει εκτενώς χαρακτηριστεί και μελετηθεί. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί πως δεν περιορίζεται μόνο στο νοσοκομειακό περιβάλλον. [4] Τα υδάτινα οικοσυστήματα (νερά και λύματα) και τα ζώα είναι γνωστό ότι αποτελούν σημαντικές δεξαμενές πολλών γονιδίων αντοχής, τα οποία μεταφέρονται στον άνθρωπο μέσω ποικίλων οδών. [5]

Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το νέο γονίδιο *mcr*, το οποίο προσδίδει αντοχή στο αντιβιοτικό κολιστίνη, ένας αντιμικροβιακός παράγοντας που έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στη κτηνοτροφία. [6] Πλέον έχουν περιγραφεί αρκετά γονίδια *mcr*, τα οποία έχουν ανιχνευθεί σε στελέχη Εντεροβακτηρίων, και κυρίως σε στελέχη του βακτηρίου *E.coli*, απομονωμένα κατά πλειοψηφία από ζώα, σε μικρότερο ποσοστό από ανθρώπους, ενώ παράλληλα έχουν εντοπιστεί και σε υδάτινα περιβάλλοντα, όπως λίμνες, ποτάμια κ.α. [7] Τα γονίδια αυτά, καθότι εδράζουν σε πλασμίδια με υψηλή συχνότητα μεταφοράς που συνήθως φέρει και άλλους μηχανισμούς αντοχής, αποτελεί νέα απειλή για την Δημόσια Υγεία. [4]

Η μικροβιακή ευαισθησία του βακτηρίου *E.coli* στα «τελευταίας γραμμής» αντιβιοτικά, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως όχι μόνο στη κλινική πράξη, αλλά και στην κτηνοτροφία και τις ιχθυοκαλλιέργειες, έχει μελετηθεί εκτενώς για τα κλινικά στελέχη. [8] Εν τούτοις, η αντίστοιχη πληροφορία όσον αφορά την κοινότητα και τα περιβαλλοντικά ενδιαφέροντα είναι ιδιαίτερα περιορισμένη. Καθώς το βακτήριο αυτό αποτελεί ένα από τα πιο κοινά παθογόνα του ανθρώπου, ο έλεγχος των προφίλ αντοχής του βακτηρίου σε υδάτινα περιβάλλοντα, αλλά και το γενετικό περιβάλλον αυτών κατέχει σημαντική θέση στον χώρο της Δημόσιας και Ενιαίας Υγείας. [9, 10]



# **ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 1. Μικροβιακή αντοχή

### 1.1 Αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά είναι χημικές ουσίες που είναι ικανές είτε να καταστείλουν τη βακτηριακή ανάπτυξη (βακτηριοστατική δράση) ή να καταστρέψουν τα βακτήρια (βακτηριοκτόνο δράση). Χρησιμοποιούνται ευρέως για την πρόληψη και τη θεραπεία των ασθενειών, τόσο στην ιατρική όσο και την κτηνιατρική. [11]

Τα αντιβιοτικά κατηγοριοποιούνται με βάση τη δράση τους ως αντιβιοτικά στενού ή ευρέως φάσματος. [12] Η υπερβολική χρήση αντιβιοτικών οδηγεί σαφώς στην εξέλιξη της αντοχής. Όταν αναπτύσσεται αντοχή, τα αντιβιοτικά καθίστανται μη αποτελεσματικά στην αντιμετώπιση των μελλοντικών λοιμώξεων. [2] Κάθε φορά που πραγματοποιείται αλόγιστη και άσκοπη χρήση ενός αντιβιοτικού, αυξάνεται ο κίνδυνος ανάπτυξης μη-ιάσιμων λοιμώξεων που οφείλονται σε ανθεκτικά παθογόνα. [9]

Ιδιαίτερα ανησυχητικές είναι οι λοιμώξεις που οφείλονται σε Gram-αρνητικά βακτήρια, καθώς τείνουν να αποκτούν αντοχή σε σχεδόν όλες τις κατηγορίες αντιβιοτικών που θα ήταν χρήσιμες στη θεραπεία. Υπάρχουν πολλές ομάδες αντιβιοτικών, κάθε μία από τις οποίες δρα με συγκεκριμένο τρόπο σε συγκεκριμένο στόχο μέσα στο μικροβιακό κύτταρο. Στον Πίνακα 1. φαίνονται οι ομάδες αντιβιοτικών, κάποια σημαντικά τους χαρακτηριστικά, ο μηχανισμός δράσης τους και η εμφάνιση αντοχής τους. [2, 9]

**Πίνακας 1.** Ομάδες αντιβιοτικών. [6, 9, 13-17]

Ομάδες αντιβιοτικών	Σημαντικά Χαρακτηριστικά	Μηχανισμοί Δράσης	Αντοχή και άλλοι περιορισμοί
<b>Β-λακταμικά αντιβιοτικά</b> (Πενικιλίνες, Κεφαλοσπορίνες, Μονοβακτάμες, Καρβαπενέμες, Αναστολείς β-λακταμασών)	Μια μεγάλη κατηγορία αντιβιοτικών ευρέως φάσματος, που αποτελούν τη βασική θεραπεία για τις λοιμώξεις από Gram-αρνητικά βακτήρια.	Σύνδεση με τις PBP (πενικιλινο-συνδετικές πρωτεΐνες) και με ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την σύνδεση της πεπτιδογλυκάνης (βασικό δομικό συστατικό του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος).	Τα Gram-αρνητικά βακτήρια έχουν αναπτύξει αρκετούς μηχανισμούς αντοχής στα αντιβιοτικά β-λακτάμης. Η αντοχή στις β-λακτάμες οφείλεται στη παραγωγή ενζύμων β-λακταμασών, που υδρολύουν τον δακτύλιο β-λακτάμης, απενεργοποιώντας έτσι τα αντιβιοτικά β-λακτάμης. Ορισμένες β-λακταμάσες υδρολύουν αντιβιοτικά στενού φάσματος ενώ άλλες υδρολύουν μέχρι και τις καρβαπενέμες. Πολλά εντεροβακτηριακά εμφανίζουν αντοχή στις καρβαπενέμες, γνωστά ως CRE.
<b>Πενικιλίνες:</b> <b>Πενικιλίνη G,</b>	Μεταξύ των πρώτων αντιβιοτικών που		Αυτά τα φάρμακα σπανίως συνιστώνται για τη θεραπεία

<p><b>Πενικιλίνη V (Φυσικές), Μεθικιλίνη, Οξακιλίνη, Αμπικιλίνη, Αμοξικιλίνη, Πιπερακιλίνη</b></p>	<p>αναπτύχθηκαν για τη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων. Ελλείψει ανοχής, αυτά τα φάρμακα είναι δραστικά έναντι ευρέως φάσματος βακτηριακών παθογόνων.</p>		<p>σοβαρών λοιμώξεων που οφείλονται σε Gram-αρνητικά βακτήρια. Όλες χρησιμοποιήθηκαν κυρίως για σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις μέχρι την εμφάνιση του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη <i>S.aureus</i> (MRSA) το 1979-1980.</p>
<p><b><u>Κεφαλοσπορίνες:</u></b> <b><u>1ης γενεάς:</u></b> Κεφαδροξίλη, Κεφαζολίνη, Κεφατριζίνη <b><u>2ης γενεάς:</u></b> Κεφαμανδόλη, Κεφακλόρη, Κεφοξιτίνη, Κεφορανίδη, Κεφουροξίμη αζετίλη, Κεφουροξίμη νατριούχος, Κεφπροξίλη, Λορακαρμπέφη <b><u>3ης γενεάς:</u></b> Παρεντερικώς: Κεφντιτορένη Εφταξίμη, Κεφτριαξόνη, Κεφταζιντίμη POS: Κεφιξίμη <b><u>4ης γενεάς:</u></b> Κεφεπίμη</p>	<p>Αντιβιοτικά ευρέως φάσματος. Οι κεφαλοσπορίνες χορηγούνται είτε σε εξωνοσοκομειακές λοιμώξεις, όταν είναι δύσκολο να εντοπισθεί η λοίμωξη ή να προσδιορισθεί το παθογόνο αίτιο (κεφαλοσπορίνες 1<sup>ης</sup> γενεάς), είτε σε ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις (κεφαλοσπορίνες 2<sup>ης</sup>, 3<sup>ης</sup> και 4<sup>ης</sup> γενεάς) από μικρόβια ευαίσθητα μόνο σε αυτές.</p>		<p>Φυσικό αποτέλεσμα από τη χρήση της 1<sup>ης</sup> γενεάς ήταν η επικράτηση ανθεκτικών εντεροβακτηριακών. Τα Gram-αρνητικά βακτήρια, ανθεκτικά στις κεφαλοσπορίνες, πρωτοεμφανίστηκαν στο νοσοκομειακό περιβάλλον αλλά πλέον έχουν εξαπλωθεί και στην κοινότητα.</p>
<p><b><u>Μονοβακτάμες:</u></b> Αζτρεονάμη</p>	<p>Συνθετικά αντιβιοτικά. Η θεραπευτική χρήση τους περιορίζεται συνήθως σε άτομα με αλλεργία σε πενικιλίνες και κεφαλοσπορίνες.</p>		<p>Το πεδίο δράσης τους περιλαμβάνει μόνον Gram-αρνητικά παθογόνα.</p>
<p><b><u>Καρβαπενέμες:</u></b> Ιμιπενέμη, Μεροπενέμη, Ερταπενέμη, Δοριπενέμη</p>	<p>Ευρέως φάσματος αντιβιοτικά β-λακτάμης. Έσχατη λύση για τη θεραπεία σοβαρών Gram-αρνητικά λοιμώξεων.</p>		<p>Ανοχή στις καρβαπενέμες μπορεί να παρατηρηθεί σε Gram-αρνητικά βακτήρια, συμπεριλαμβανομένων των <i>Pseudomonas aeruginosa</i> και <i>Acinetobacter spp.</i> Όταν τα βακτήρια καταστούν ανθεκτικά στις καρβαπενέμες, είναι συνήθως ανθεκτικά σε όλες τις β-λακτάμες.</p>
<p><b><u>Αναστολείς β-λακταμασών:</u></b> Κλαβουλανικό οξύ, Σουλβακτάμη,</p>	<p>Αυτά τα φάρμακα εξακολουθούν να είναι δραστικά εναντίον Gram-αρνητικών βακτηρίων που</p>	<p>Αναστέλλουν την δράση των β-λακταμασών, τις οποίες δεσμεύουν σταθερά, γι' αυτό και αποκαλούνται μη</p>	<p>Τα βακτήρια που είναι ανθεκτικά σε κεφαλοσπορίνες εκτεταμένου φάσματος και σε καρβαπενέμες είναι συνήθως ανθεκτικά και στους</p>

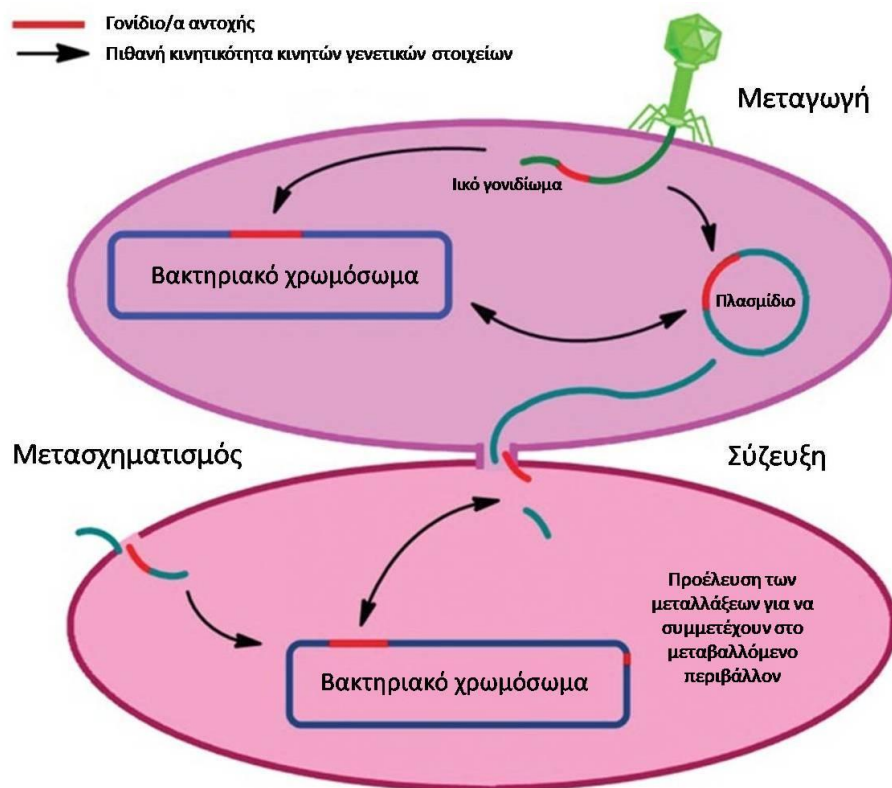
<b>Ταζοβακτάμη</b>	έχουν β-λακταμάσες με περιορισμένη δραστηριότητα για την καταστροφή αντιβιοτικών β-λακτάμης.	αναστρέψιμοι αναστολείς (non reversible inhibitors). Η ταζομπακτάμη είναι η δραστικότερη.	αναστολείς β-λακταμασών. Ανθεκτικά πρέπει να θεωρούνται η <i>Pseudomonas aeruginosa</i> και τα περισσότερα στελέχη <i>Enterobacter sp</i> , <i>Providencia sp</i> και <i>Morganella morganii</i> .
<b>Αμινογλυκοσίδες:</b> Γενταμικίνη, Αμικασίνη, Τομπραμικίνη, Στρεπτομικίνη, Καναμικίνη	Χρησιμοποιούνται συχνά σε συνδυασμό με αντιβιοτικά β-λακτάμης για τη θεραπεία σοβαρών λοιμώξεων οφειλόμενες σε πολυανθεκτικά Gram-αρνητικά βακτήρια.	Αναστολή πρωτεϊνσύνθεσης (συνδέονται με rRNA της 30S υπομονάδα του ριβοσώματος προκαλώντας πρώιμη απελευθέρωση της πεπτιδικής αλυσίδας)	Σπάνια χρησιμοποιούνται αυτά τα φάρμακα μόνα τους λόγω ανησυχιών σχετικά με την αντοχή και τις παρενέργειες (τοξικότητα). Πολλά από τα αρχικά ευαίσθητα στελέχη εντεροβακτηριακών ( <i>K.pneumonia</i> , <i>S.marcescens</i> , <i>E.cloacae</i> , είδη <i>Acinetobacter</i> ), <i>P.aeruginosa</i> , καθώς και σταφυλοκόκκων, έχουν αναπτύξει αντοχή.
<b>Μακρολίδες:</b> Ερυθρομικίνη, Σπιραμικίνη, Κλαριθρομικίνη, Ροξιθρομικίνη, Αζαλίδες (Αζιθρομικίνη), Κετολίδες (Τελιθρομικίνη), Μιντεκαμικίνη	Δρουν κυρίως έναντι των Gram-θετικών και λιγότερο έναντι των Gram-αρνητικών βακτηρίων.	Αναστολή πρωτεϊνσύνθεσης (συνδέονται με rRNA της 50S υπομονάδα του ριβοσώματος εμποδίζοντας με την επιμήκυνση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας)	Δεν δρουν έναντι των εντεροβακτηριακών. Το μεγαλύτερο ποσοστό σταφυλόκοκκων είναι σήμερα ανθεκτικό στην ερυθρομικίνη. Η χρήση τελιθρομικίνης συνοδεύεται από σοβαρές παρενέργειες.
<b>Φθοριοκινολόνες:</b> Σιπροφλοξασίνη, Γατιφλοξασίνη, Λεβοφλοξασίνη, Λομεφλοξασίνη, Μοξιφλοξασίνη, Ναδιφλοξασίνη, Νορφλοξασίνη, Οφλοξασίνη, Πεφλοξασίνη, Προυλιφλοξασίνη	Αντιβιοτικά ευρέως φάσματος που χορηγούνται συχνά από το στόμα.	Αναστέλλουν τη δράση της DNA γυράσης κατά τέτοιο τρόπο ώστε να σταματούν τον βακτηριακό μεταβολισμό και την αναπαραγωγή.	Συνδυασμένη θεραπεία με αντιβιοτικά φθοριοκινολονών και αμινογλυκοσίδων θεωρούνται νέα στρατηγική για την αποφυγή αντοχής μέσω της αναστολής της αντλίας εκροής και / ή της ενίσχυσης της διαπερατότητας της μεμβράνης.
<b>Πολυμυξίνες:</b> Πολυμυξίνη Β Πολυμυξίνη Ε (Κολιστίνη)	Έσχατη λύση έναντι λοιμώξεων οφειλόμενων σε πολυανθεκτικά Gram-αρνητικά βακτήρια, καθώς είναι ιδιαίτερα τοξικό. Χρησιμοποιείται εκτενώς στην κτηνοτροφία για ταχύτερη ανάπτυξη των ζώων.	Καταστροφή της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (αντιδρά με λιποπολυσακχαρίτες και φωσφολιπίδια της εξωτερικής μεμβράνης οδηγώντας στην αύξηση της κυτταρικής διαπερατότητας και τελικά στον κυτταρικό θάνατο).	Διάφορες χρωμοσωμικές μεταλλάξεις σχετίζονται με την αντοχή στη κολιστίνη σε <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> και <i>Klebsiella pneumonia</i> . Τον Νοέμβριο του 2015 αναφέρεται η πρώτη περίπτωση αντοχής στη κολιστίνη σε στέλεχος <i>E.coli</i> , που οφείλεται σε γονίδιο που εδράζεται σε πλασμίδιο, το <i>mcr-1</i> .

## 1.2 Αντοχή στα αντιβιοτικά

Μικροβιακή αντοχή καλείται το φαινόμενο όπου ένας μικροοργανισμός εμφανίζεται ανθεκτικός σε ένα ή και περισσότερους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Κάποια μικροβιακά είδη έχουν ενδογενή αντοχή σε κάποιες ομάδες αντιβιοτικών, ωστόσο ως «μικροβιακή αντοχή στα αντιβιοτικά», με ενδιαφέρον την Δημόσια Υγεία, εννοείται όχι η εγγενής αντοχή, η οποία είναι γνωστή και προκαθορισμένη, αλλά η επίκτητη. [10, 18]

Η μικροβιακή αντοχή είναι ένα φυσικό φαινόμενο που οφείλεται σε αλλαγές στο γενετικό υλικό του μικροοργανισμού, ενώ η «μηχανή» που την τροφοδοτεί είναι η εξελικτική πίεση της επιλογής που προκαλείται από την χρήση των αντιβιοτικών όχι μόνο κατά την κλινική πράξη αλλά και στην κοινότητα, στην κτηνοτροφία και στη γεωργία. [10, 18]

Οι αλλαγές του γενετικού υλικού του μικροβίου σχετίζονται είτε με μεταλλαγές των βακτηριακών γονιδίων είτε με την απόκτηση εξωγενών γενετικών στοιχείων που φέρουν γονίδια αντοχής (π.χ. πλασμίδια). [10, 19] Τα εξωγενή γενετικά στοιχεία μεταδίδονται μέσω σύζευξης, μεταγωγής, στην οποία μεσολαβούν βακτηριοφάγοι, ή μετασηματισμού. Η μετάδοση πλασμιδίου είναι το πιο σημαντικό φαινόμενο που μπορεί να μεταφέρει γονίδια αντοχής σε ένα βακτηριακό κύτταρο. [20]



Εικόνα 2. Οδοί μετάδοσης αντοχής στα αντιβιοτικά. [20]

Η μικροβιακή αντοχή στα αντιβιοτικά που απαντάται σε ζώα παραγωγής μπορεί να μεταδοθεί στους ανθρώπους μέσω της τροφής, του νερού ή μέσω της άμεσης επαφής με τα ζώα. [9] Επιπλέον, η συνεχής μετανάστευση και η ανταλλαγή πληθυσμών μεταξύ των χωρών, καθώς και ο τουρισμός και τα επαγγελματικά ταξίδια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην απόκτηση και διάδοση των πολυανθεκτικών στελεχών. [19, 21]

Η μικροβιακή αντοχή έχει λάβει παγκόσμια διάσταση και αναγνωρίζεται ως μία από τις πιο σοβαρές απειλές για την υγεία, με την ομάδα των παθογόνων ESKAPE να είναι το μεγαλύτερο πρόβλημα. Το ESKAPE είναι το ακρωνύμιο που περιλαμβάνει έξι κοινά παθογόνα που εμφανίζουν αξιοσημείωτες αντοχές: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Enterobacter species*. [22, 23]



**Εικόνα 3.** Παραδείγματα διασποράς αντιμικροβιακής αντοχής. Τα αντιβιοτικά καταναλώνονται από τα ζώα και τους ανθρώπους και τα βακτήρια αναπτύσσουν μικροβιακή αντοχή στην εντερική περιοχή. Εν συνεχεία, τα ανθεκτικά βακτήρια είτε μεταδίδονται από άνθρωπο σε άνθρωπο, μέσω της κοινότητας ή εγκαταστάσεις υγείας, είτε από ζώα σε ζώα μέσω του νερού ή λιπασμάτων, είτε από τα ζώα στους ανθρώπους μέσω της κατανάλωσης κρέατος. [9]

### 1.3 Αντοχή του βακτηρίου *Escherichia coli*

Το βακτήριο *Escherichia coli* είναι ραβδοειδές Gram-αρνητικό βακτήριο και ανήκει στην οικογένεια των *Enterobacteriaceae*. Αποτελεί μέλος της φυσιολογικής εντερικής μικροχλωρίδας του ανθρώπου και των θερμόαιμων ζώων. Είναι ένας ευκαιριακά παθογόνος μικροοργανισμός διαθέτοντας ένα ευρύ φάσμα λοιμογόνων παραγόντων και ευθύνεται για πολλές παθήσεις, όπως γαστρεντερίτιδα, ουρολοιμώξεις και βακτηριαμία (σήψη). Αποτελεί το συχνότερο Gram-αρνητικό βακτήριο που απομονώνεται σε περιστατικά βακτηριαμίας και είναι υπεύθυνο για το 80% των ουρολοιμώξεων της κοινότητας, για πολλές ενδοσοκομειακές λοιμώξεις ενώ παράλληλα αναφέρεται ως η κύρια αιτία γαστρεντερίτιδας στις αναπτυσσόμενες χώρες. [8, 10] Επιπλέον, το βακτήριο *E.coli* καθώς ζει ελεύθερα στο περιβάλλον (έδαφος, υδάτινα ενδιαιτήματα) συγκαταλέγεται στους βασικούς αιτιολογικούς παράγοντες τροφιμογενών και υδατογενών λοιμώξεων παγκοσμίως. [24]

Τα παθογόνα στελέχη *E.coli* είναι, τα εντεροαιμορραγικά στελέχη *E.coli* (EHEC), που συμπεριλαμβάνουν και το στέλεχος *E.coli* που παράγει την τοξίνη Shiga (STEC) και προκαλούν αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (HUS), τα εντεροπαθογόνα στελέχη *E.coli* (EPEC) που προκαλούν διάρροια και έμετο σε παιδιά, τα εντεροτοξινογόνα στελέχη *E.coli* (ETEC) που προκαλούν διάρροια σε ταξιδιώτες όλων των ηλικιών, το εντεροσυσσωρευόμενα στελέχη *E.coli* (EAEC) που προκαλούν διάρροια και τα εντεροδιεισδυτικά στελέχη *E.coli* (EIEC) που προκαλούν διάρροια σε ενήλικες και παιδιά, και σχετίζεται στενά με *Shigella spp.* Επίσης, τα εξωεντερικά στελέχη *E.coli* (ExPEC) μπορούν να προκαλέσουν νεογνική μηνιγγίτιδα, σήψη και λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος. [8, 24, 25]

Το βακτήριο *E.coli* δεν έχει κανένα εγγενή μηχανισμό αντοχής, επομένως η εμφάνιση οποιασδήποτε αντοχής οφείλεται στην απόκτηση γονιδίων αντοχής. Εντοπίζεται συχνά σε διαφορετικά υδάτινα ενδιαιτήματα εμφανίζοντας ποικίλους μηχανισμούς αντοχής, με πιο πρόσφατη την παρουσία ενός νέου πλασμιδιακού γονιδίου, το *mcr-1*, που προσδίδει αντοχή στην κολιστίνη. [6, 10, 18, 25]

## 2. Κολιστίνη

### 2.1 Εισαγωγή στη κολιστίνη

Οι λοιμώξεις που οφείλονται σε πολυανθεκτικούς (Multidrug resistant, MDR) μικροοργανισμούς, δηλαδή παθογόνα ανθεκτικά στα περισσότερα διαθέσιμα αντιβιοτικά, αποτελούν σημαντικό πρόβλημα για τη δημόσια υγεία. Σοβαρές νοσοκομειακές λοιμώξεις λόγω πολυανθεκτικών (MDR) Gram-αρνητικών βακτηρίων ευθύνονται πλέον για την υψηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα στον άνθρωπο. [26] Η έλλειψη αποτελεσματικών και νεότερων αντιβιοτικών ώθησαν την ιατρική κοινότητα να επαναχρησιμοποιήσει παλαιότερα αντιβιοτικά και συγκεκριμένα τη κολιστίνη (πολυμυξίνη E), η οποία αποτελεί σήμερα έσχατη λύση στο πλαίσιο της θεραπείας λοιμώξεων που προκαλούνται από τα πολυανθεκτικά βακτήρια (MDR), όπως *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* και *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*). [17, 27]

Η κολιστίνη, γνωστή και ως πολυμυξίνη E, ανήκει στις πολυμυξίνες. Οι πολυμυξίνες είναι μια ομάδα πολυπεπτιδικών αντιβιοτικών που αποτελούνται από πέντε διαφορετικές χημικές ενώσεις (πολυμυξίνη A, B, C, D, και E). Οι πολυμυξίνες είναι πολύ τοξικές για χρήση στον άνθρωπο, εκτός από τη πολυμυξίνη B και τη πολυμυξίνη E (κολιστίνη) που έχουν χρησιμοποιηθεί στην κλινική πρακτική, και η διαφορά τους αφορά ένα μόνο αμινοξύ. Η κολιστίνη παράγεται από καλλιέργειες *Bacillus polymyxa*, υποείδος *colistinus*, όπου απομονώθηκε για πρώτη φορά στην Ιαπωνία από τον Dr. Yasuo Koyama το 1949 και αποτελεί το πρώτο αντιβιοτικό ιαπωνικής προέλευσης παγκοσμίως. [26-32]

### 2.2 Χρήση της κολιστίνης

Στο εμπόριο η κολιστίνη είναι διαθέσιμη σε δύο μορφές, η θειική κολιστίνη (Colistin sulfate, CS) που είναι πολυκατιόν, και η νατριούχος κολιστιμεθάτη (Colistimethate sodium, CMS) που είναι πολυανιών σε φυσιολογικό pH. Η CS, η οποία έχει τη μορφή του θειϊκού άλατος της κολιστίνης, χρησιμοποιείται είτε με στοματική χορήγηση όπου λαμβάνεται σαν δισκίο ή σιρόπι είτε τοπικά όπου χρησιμοποιείται με τη μορφή σκόνης. Η CMS, είναι το μετά Νατρίου άλας της μεθανοσουλφονικής κολιστίνης, η οποία χρησιμοποιείται παρεντερικά και είναι λιγότερο τοξική από την CS. Και οι δύο μορφές κολιστίνης μπορούν να χορηγηθούν και με τη μορφή αερολύματος. [27, 28, 33, 34]

Θεραπευτικά, η κολιστίνη χρησιμοποιήθηκε στην Ιαπωνία και στην Ευρώπη κατά τη δεκαετία του 1950 και στις ΗΠΑ το 1959 με τη μορφή του μετά Νατρίου άλατος της μεθανοσουλφονικής κολιστίνης (CMS). [28, 31] Παρόλα αυτά, η χρήση των πολυμυξινών περιορίστηκε από τα τέλη της δεκαετίας του 1970 λόγω της μεγάλης νεφροτοξικότητας και νευροτοξικότητας που εμφάνιζαν, με αποτέλεσμα να αντικατασταθούν από άλλα αντιβιοτικά, χαμηλότερης τοξικότητας. Τόσο η νεφροτοξικότητα όσο και η νευροτοξικότητα είναι δοσοεξαρτώμενες. [30, 35] Η κολιστίνη εισήχθη εκ νέου στην κλινική πρακτική κατά τη



δεκαετία του 2000 λόγω της αναδυόμενης αύξησης των πολυανθεκτικών (MDR) αρνητικών κατά Gram παθογόνων σε συνδυασμό με τη μη ανακάλυψη νέων αντιβιοτικών. [28, 36]

Εκτός από την κλινική πράξη, η κολιστίνη έχει χρησιμοποιηθεί και στην κτηνοτροφία και ιδιαίτερα στους χοίρους. Παγκοσμίως έχει σημειωθεί ιδιαίτερη χρήση αντιβιοτικών με τη προσθήκη τους στη ζωοτροφή με αποτέλεσμα την αξιοσημείωτη βελτίωση στον ρυθμό σύλληψης, το ποσοστό γέννησης, την έκκριση γάλακτος και τη σωματική ανάπτυξη των ζώων, αλλά και για την πρόληψη, θεραπεία και έλεγχο λοιμώξεων από παθογόνα, όπως *E.coli*, *S.aureus*, *S.pneumonia*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* και άλλα. Η Κίνα είναι ένας από τους υψηλότερους χρήστες κολιστίνης στον κόσμο, τόσο στη κτηνοτροφία όσο και στη γεωργία. Συνεπώς, η χρήση κολιστίνης στις κτηνοτροφικές παραγωγές είναι ένας πολύ γνωστός παράγοντας που συμβάλλει στην εξάπλωση της αντοχής σε αυτή μεταξύ των ζώων και του περιβάλλοντος, με επακόλουθο τη μετάδοση στον άνθρωπο. [6, 37, 38]

Δεδομένης της σημασίας που έχει η κολιστίνη ως αντιβιοτικό, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization, WHO) την έχει χαρακτηρίσει ως κρίσιμα σημαντικό αντιβιοτικό για την ιατρική του ανθρώπου, καθώς είναι η τελευταία λύση σε σοβαρές λοιμώξεις που οφείλονται σε ισχυρά παθογόνα. [39]

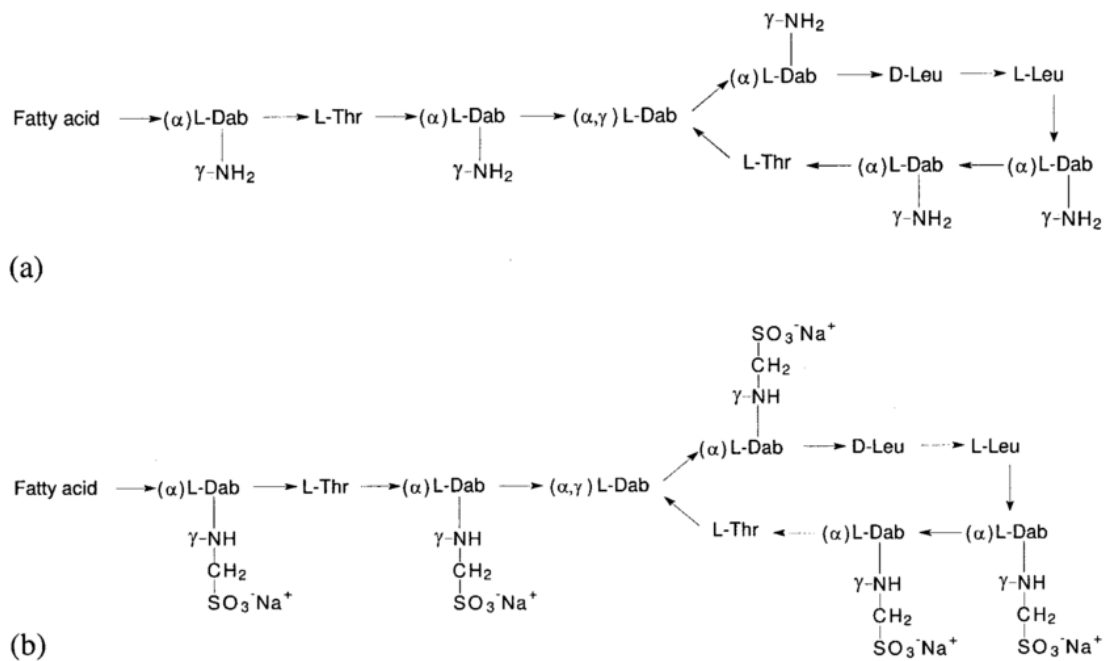
### 2.3 Αντιμικροβιακό φάσμα

Η κολιστίνη είναι δραστική έναντι στα περισσότερα Gram-αρνητικά αερόβια βακτήρια, όπως *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Echerichia coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila*, *Citrobacter spp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Yersinia pseudotuberculosis* και *Pasteurella spp*, *Brucella spp.* και *Aeromonas spp.*, εκτός από το είδος *A.jandaei*, αν και η *A.hydrophila* έχει επαγωγική αντοχή. Αντιθέτως, οι *Proteus spp.*, *Neisseria spp.*, *Burkholderia spp.*, *Edwardsiella spp.*, *Providencia spp.*, *Vibrio spp.*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas mallei*, *Moraxella catarrhalis* και *Serratia spp.* είναι ανθεκτικά, ενώ τα είδη *Campylobacter* ποικίλλουν ως προς την ευαισθησία τους στην κολιστίνη. [27-29, 34, 40]

Επιπλέον, η κολιστίνη παρουσιάζει δυνητικά δραστικότητα ενάντια και σε διάφορα μυκοβακτηρίδια όπως είναι το *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium phlei* και *Mycobacterium smegmatis*. Τα Gram-θετικά βακτήρια δεν περιέχουν LPS στο κυτταρικό τους τοίχωμα και ως εκ τούτου δεν είναι ευαίσθητα στις πολυμυξίνες. Η κολιστίνη δεν έχει καμία δράση στους Gram-θετικούς και Gram-αρνητικούς αερόβιους κόκκους, στους Gram-θετικούς αερόβιους βάκιλλους, στα παράσιτα, τους μύκητες και σε όλα τα αναερόβια βακτήρια. [27, 28, 41]

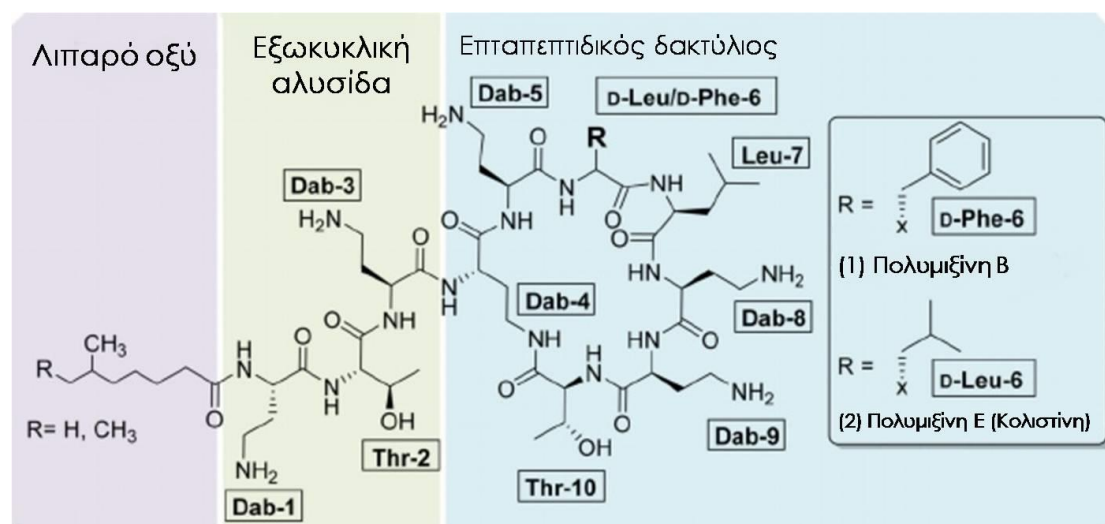
## 2.4 Χημική δομή κολιστίνης

Η κολιστίνη είναι ένα κατιονικό λιποπεπτίδιο, μοριακού βάρους 1750 Da, το οποίο αποτελείται από ένα κυκλικό επταπεπτίδιο με μια τριπεπτιδική πλευρική αλυσίδα ακυλωμένη στο N-τελικό άκρο από ένα λιπαρό οξύ. Τα αμινοξέα που συνθέτουν το αμιδικό της άκρο είναι η D-λευκίνη, η L-θρεονίνη και το L-α-γαμινοβουτυρικό οξύ (Dab). Αυτό το αμιδικό άκρο είναι που συνδέεται με το λιπαρό οξύ συνθέτοντας, έτσι, το μόριο της κολιστίνης. Τα δύο κύρια συστατικά της κολιστίνης είναι η κολιστίνη A (πολυμυξίνη E<sub>1</sub>) και κολιστίνη B (πολυμυξίνη E<sub>2</sub>). Ανάλογα με το ποιο είναι το λιπαρό οξύ που συνδέεται με την πλευρική αλυσίδα του δεκαπεπτιδίου καθορίζεται το αν η κολιστίνη θα είναι A (6-μεθυλο-οκταν-οϊκό οξύ) ή B (6-μεθυλο-επτανοϊκό οξύ). Διαφορετικά φαρμακευτικά παρασκευάσματα κολιστίνης μπορεί να περιέχουν διαφορετικές ποσότητες αυτών των δύο συστατικών. [28, 29, 42]



**Εικόνα 4.** (a) Χημική δομή κολιστίνης A και B. (b) Χημική δομή της μεθανοσουλφονικής κολιστίνης A και B. (CMS) Fatty acid (λιπαρό οξύ): 6-μεθυλοοκτανοϊκό για την κολιστίνη A και 6-μεθυλεπτανοϊκό για την κολιστίνη B. Thr: threonine, Leu: leucine, Dab: α,γ-diaminobutyric όπου τα α και γ δείχνουν την αντίστοιχη αμινομάδα που συμμετέχει στον πεπτιδικό δεσμό. [34]

Όπως προαναφέρθηκε, η κολιστίνη ανήκει στην ομάδα των πολυμυξινών με αποτέλεσμα η χημική δομή της να είναι παρόμοια με αυτή της πολυμυξίνης Β, με τη μόνη διαφορά ότι στη θέση 6 του επταπεπτιδίου η πολυμυξίνη Β έχει το αμινοξύ φαινυλανανίνη (Phe) αντί για λευκίνη (Leu) που έχει η κολιστίνη. Συνήθως, η πολυμυξίνη Β χορηγείται με τη μορφή θειικού αλάτος, ενώ η κολιστίνη με τη μορφή μετά Νατρίου άλας της μεθανοσουλφονικής κολιστίνης (CMS). Η CMS παράγεται από την αντίδραση της κολιστίνης αρχικά με φορμαλδεΰδη και στη συνέχεια με θειώδες νάτριο με αποτέλεσμα να έχουμε την προσθήκη σουλφομεθυλομάδων στις πρωτοταγείς αμινομάδες της κολιστίνης που βρίσκονται πάνω στο Dab. Σε υδατικό περιβάλλον η CMS υδρολύεται και παράγει διάφορα σουλφομεθυλιωμένα παράγωγα και κολιστίνη, γι' αυτό και αποτελεί ένα προ φάρμακο της κολιστίνης όταν χορηγείται παρεντερικά. [43, 44]

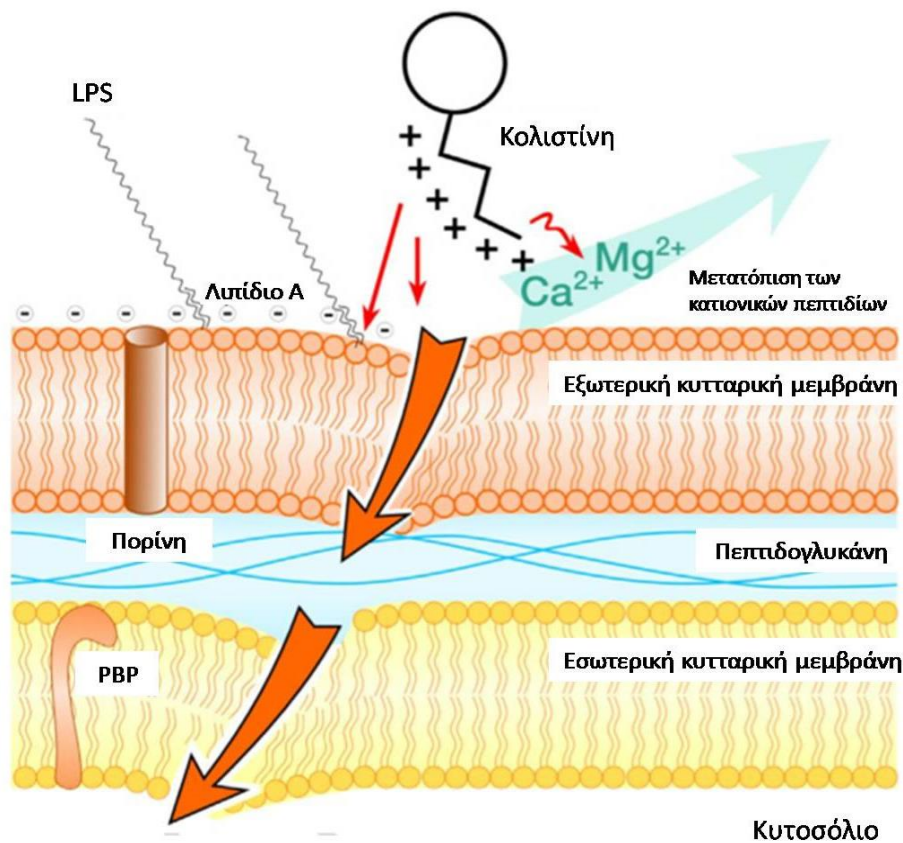


Εικόνα 5. Χημική δομή πολυμυξίνης Β (1) με φαινυλανανίνη στη θέση 6 του επταπεπτιδίου και χημική δομή της κολιστίνης (2) με λευκίνη στη θέση 6 του επταπεπτιδίου. [44]

## 2.5 Μηχανισμός δράσης της κολιστίνης

Δεδομένου ότι η κολιστίνη έχει παρόμοια δομή με την πολυμυξίνη Β, πιστεύεται να έχουν πανομοιότυπο μηχανισμό δράσης. Η κολιστίνη είναι ένα αντιβιοτικό με βακτηριοκτόνο δράση, δρώντας στην κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων. Στα Gram-αρνητικά βακτήρια η εξωτερική μεμβράνη περιλαμβάνει ένα εσωτερικό τμήμα φωσfolιπιδίων και ένα εξωτερικό τμήμα λιποπολυσακχαρήτη (LPS). Ο LPS είναι αρνητικά φορτισμένο μόριο και αποτελείται από το λιπίδιο Α, τον πυρήνα πολυσακχαρήτη (core) και το Ο-αντιγόνο. [30, 34, 36]

Ο μηχανισμός δράσης της κολιστίνης λαμβάνει χώρα μέσω των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων που δημιουργούνται ανάμεσα στο κατιονικό άκρο της κολιστίνης και στον λιποπολυσακχαρήτη (LPS). [45] Πιο συγκεκριμένα, η κολιστίνη ανταγωνίζεται τα δισθενή κατιόντα μαγνησίου ( $Mg^{2+}$ ) και ασβεστίου ( $Ca^{2+}$ ) τα οποία βρίσκονται στο αρνητικά φορτισμένο φωσφορικό άκρο του λιπιδίου A του λιποπολυσακχαρήτη (LPS). [30] Αυτά τα δυο κατιόντα είναι σημαντικά για τη σταθεροποίηση του LPS και η απομάκρυνση τους έχει σαν αποτέλεσμα την καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης του βακτηρίου. Έτσι, η κυτταρική μεμβράνη του βακτηρίου αποκτά αυξημένη διαπερατότητα που οδηγεί σε λύση, διαρροή του ενδοκυτταρικού περιεχομένου του προς τα έξω και τελικά σε κυτταρικό θάνατο. [28] Λόγω της διατάραξης της ακεραιότητας της μεμβράνης από την κολιστίνη, υδρόφιλα αντιβιοτικά όπως ριφαμπικίνη, καρβαπενέμες, γλυκοπεπτίδια ή τετρακυκλίνες συνεργάζονται συνεργικά. [36]



**Εικόνα 6.** Μηχανισμός δράσης της κολιστίνης. Η κατιονική δομή κυκλικού δεκαπεπτιδίου της κολιστίνης δεσμεύεται με τα μόρια ανιονικού LPS μετατοπίζοντας το ασβέστιο και το μαγνησίο από την εξωτερική κυτταρική μεμβράνη των Gram-αρνητικών βακτηριδίων, οδηγώντας στη διαπερατότητά της με αποτέλεσμα τη διαρροή περιεχομένων του κυττάρου. Με τη δέσμευση του λιπιδίου A του LPS, η κολιστίνη έχει επίσης δράση κατά της ενδοτοξίνης. LPS: λιποπολυσακχαρίτες και PBP: πρωτεΐνη δέσμευσης πενικιλίνης. [46]

Επίσης, η κολιστίνη έχει και αντι-ενδοτοξινική δράση. Η ενδοτοξίνη των Gram-αρνητικών βακτηρίων είναι το λιπίδιο A, ένα τμήμα του LPS, με το οποίο συνδέεται η κολιστίνη καθιστώντας ανενεργό το LPS. [28] Έτσι, εμποδίζει το λιπίδιο A να απελευθερώσει κυτταροκίνες οι οποίες είναι υπεύθυνες για την πρόκληση ενδοτοξικού shock στον ασθενή. [47] Εκτός από τη δράση της κολιστίνης στην κυτταρική μεμβράνη, έχουν περιγραφεί και ενδοκυτταρικοί μηχανισμοί δράσης, στους οποίους περιλαμβάνονται η αναστολή του αναπνευστικού ενζύμου NADH-κινόνη οξυδορεντουκτάση, αλλά και ο σχηματισμός ριζών υδροξυλίου που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόκληση βακτηριακού κυτταρικού θανάτου μέσω οξειδωτικής βλάβης στο DNA, τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες. [48, 49]

## 2.6 Αντοχή στη κολιστίνη

Δεδομένου της ολοένα αυξανόμενης χρήσης της τα τελευταία χρόνια, η ανάπτυξη αντοχής φαίνεται να προκαλεί ιδιαίτερη ανησυχία τόσο για τη δημόσια υγεία, όσο και για τη γεωργική και κτηνοτροφική παραγωγή. [45]

Η αντοχή στην πολυμυξίνη είναι το αποτέλεσμα της τροποποίησης του βακτηριακού λιπιδίου A, συστατικό του λιποπολυσακχαρίτη (LPS), με προσθήκη 4'-φωσφοαιθανολαμίνης (PEA) ή 4-αμινο-4-δεοξυ-L-αραβινόζη (L-Arap4N). [50] Η αντοχή, συνήθως, προκαλείται από χρωμόσωμα και αφορά τις μεταβολές του PhoP-PhoQ και/ ή PmrA-PmrB, όπου και τα δύο (TCSs) αποτελούν ρυθμιστικά συστήματα δύο συστατικών, τα οποία μετατρέπουν σε λιγότερο ανιονικό το λιπίδιο A, το οποίο οδηγεί σε μικρότερη ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση με τα θετικά φορτία της κολιστίνης. [28, 45]

Παρά το γεγονός ότι αυτή η μετάλλαξη αποτελεί σημαντική αιτία ανθεκτικότητας στην κολιστίνη, η αντοχή σχετίζεται με πολλαπλούς μοριακούς μηχανισμούς. Τον Νοέμβριο του 2015 έγινε η πρώτη αναφορά αντοχής στη κολιστίνη, μεσολαβούμενη από το πλασμιδιακό γονίδιο, το *mcr-1*. Η χρήση κολιστίνης στις ζωοτροφές έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση αντοχής σε αυτή. [6, 45]

## 3. MCR (Mobilized Colistin Resistance) γονίδια

Τα γονίδια αντοχής στην κολιστίνη (Mobilized Colistin Resistance - *mcr*) είναι γονίδια που εδράζονται σε πλασμίδιο και προσδίδουν αντοχή σε αυτή. Έως σήμερα, έχουν περιγραφεί εννέα *mcr* γονίδια (*mcr-1* έως *mcr-9*), όπως φαίνεται στον Πίνακα 2. Η παγκόσμια διασπορά των γονιδίων αυτών αποτελεί σοβαρή απειλή για τη δημόσια υγεία, διότι αμφισβητείται πια η αποτελεσματικότητα της κολιστίνης. Τα γονίδια *mcr* έχουν παγκόσμια κατανομή και έχουν εντοπιστεί τόσο σε τρόφιμα, ζώα, ανθρώπους όσο και σε υδάτινα ενδιαιτήματα (π.χ. λίμνες, ποτάμια κ.α.). Σχεδόν σε κάθε γονίδιο έχουν ανευρεθεί και υπότυποι, που διαφέρουν μεταξύ τους στον αριθμό νουκλεοτιδίων. Ωστόσο, έως σήμερα, κανένα από τα γονίδια *mcr* δεν έχει ανιχνευθεί στην Ελλάδα. [51, 52]

**Πίνακας 2.** MCR γονίδια. [6, 51, 53-59]

Γονίδια	Χώρα αναφοράς	Δείγμα	Στελέχη αναφοράς	Υπότυποι
<i>mcr-1</i>	Κίνα	Κρέας από κοτόπουλο και χοίρο, Ασθενείς	<i>Escherichia coli</i> & <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>mcr-1.2</i> – <i>mcr-1.21</i>
<i>mcr-2</i>	Βέλγιο	Χοίροι	<i>Escherichia coli</i>	<i>mcr-2.2<sup>a</sup></i>
<i>mcr-3</i>	Κίνα	Χοίροι	<i>Escherichia coli</i>	<i>mcr-3.2</i> – <i>mcr-3.30</i>
<i>mcr-4</i>	Ιταλία, Ισπανία, Βέλγιο	Χοίροι	<i>Salmonella enterica</i> & <i>Escherichia coli</i>	<i>mcr-4.2</i> – <i>mcr-4.6</i>
<i>mcr-5</i>	Γερμανία	Κόπρανα χοίρων	<i>Salmonella enterica</i>	<i>mcr-5.2</i> , <i>mcr-5.3</i>
<i>mcr-6</i>	Μεγάλη Βρετανία	Κόκαλα υγείων χοίρων	<i>Moraxella sp.</i>	-
<i>mcr-7</i>	Κίνα	Κοτόπουλα	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
<i>mcr-8</i>	Κίνα	Κόπρανα χοίρων	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>mcr-8.2</i>
<i>mcr-9</i>	Ηνωμένες Πολιτείες	Άνθρωπος (Ασθενής)	<i>Salmonella enterica</i>	-

a: Το *mcr-2.2* μετονομάστηκε σε *mcr-6*. [57]

### 3.1 MCR-1

Στην Κίνα, τον Νοέμβρη του 2015, αναφέρθηκε για πρώτη φορά ένα πλασμιδιακό γονίδιο, το *mcr-1* (NG\_050417), σε στελέχη *Escherichia coli* και *Klebsiella pneumoniae*, που απομονώθηκαν από δείγματα ζώων και ανθρώπων. Το πρώτο πλασμίδιο που έφερε το γονίδιο *mcr-1* ανήκε στην ομάδα IncI21. Η μετάδοση του *mcr-1* πραγματοποιείται μέσω της οριζόντιας μεταφοράς και κωδικοποιεί μια τρανσφεράση φωσφοαιθανολαμίνης (PEA), η οποία τροποποιεί το λιπίδιο A της κυτταρικής μεμβράνης, μειώνοντας τη συγγένεια με τη κολιστίνη και προσδίδοντας αντοχή σε αυτή. [6] Οι πιο συχνές ομάδες ασυμβατότητας των *mcr-1*- πλασμιδίων είναι οι IncI2, IncHI2 και IncX4, ενώ οι ομάδες IncF, IncN, IncP, IncQ και IncX είναι σπανιότερες. [60] Έως σήμερα το γονίδιο *mcr-1* έχει εντοπιστεί σε χώρες της Ασίας, της Αφρικής, της Ευρώπης και της Αμερικής. [61]

Ενδιαφέρον έχει μια έρευνα που διεξήχθη το 2016 στην Κίνα, σε στελέχη *E.coli* που απομονώθηκαν από κοτόπουλο, το χρονικό διάστημα μεταξύ 1970 και 2014. Το γονίδιο *mcr-1* ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά σε τρία στελέχη *E.coli* που απομονώθηκαν στη δεκαετία του 1980, τότε που άρχισε η χρήση της κολιστίνης στα ζώα παραγωγής. [62] Το 2008 στο Βιετνάμ, έγινε η πρώτη αναφορά του *mcr-1*-θετικού στελέχους *Shigella sonnei* σε ανθρώπινο δείγμα. [63]

Στην Ευρώπη, το παλαιότερο εύρημα του γονιδίου *mcr-1* που εντοπίστηκε σε στέλεχος *E.coli* που απομονώθηκε από διαρροϊκά κόπρανα μόσχου, ανέρχεται στην Γαλλία το 2005. [64] Επίσης, το γονίδιο *mcr-1* ήταν παρόν σε ανθεκτικά στην κολιστίνη στελέχη *E.coli* απομονωμένα από χοίρους στο Βέλγιο κατά την περίοδο 2011-2012. [65] Αυτά τα ευρήματα αποδεικνύουν ότι το γονίδιο *mcr-1* προϋπήρχε στα *Enterobacteriaceae* αλλά δεν ήταν γνωστό μέχρι πρόσφατα. Όσον αφορά το περιβάλλον, και συγκεκριμένα το νερό, στελέχη *E.coli* θετικά σε *mcr-1* έχουν απομονωθεί από δείγματα ποταμιού (Ελβετία [66] και Κίνα [67, 68]), θάλασσας (Αλγερία [69]) και λύματος (Ισπανία [70]).

Έπειτα από αναζήτηση σε διεθνή βιβλιογραφία τον Ιούλιο 2019, το γονίδιο *mcr-1* έχει ανευρεθεί σε *E.coli*, *Shigella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Citrobacter freundii* και *Enterobacter*. [71] Συνολικά έχουν αναφερθεί είκοσι ένα (21) υπότυποι του *mcr-1*. [72] Παρακάτω αναφέρονται οι περιπτώσεις πρώτης αναφοράς τους. Δίπλα στο κάθε γονίδιο αναγράφεται ο GenBank αριθμός τους. Το GenBank αποτελεί βάση δεδομένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών και των μεταφραστικών πρωτεϊνών τους.

Το *mcr-1.2* (NG\_051170.1) εντοπίστηκε στην Ιταλία, σε στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* που απομονώθηκε από ορθικό επίχρισμα λευχαιμικού παιδιού. [73] Το *mcr-1.3* (NG\_052861) εντοπίστηκε στη Κίνα, σε στέλεχος *E.coli* που απομονώθηκε από κοτόπουλα. [74] Το *mcr-1.4* (NG\_052664) εντοπίστηκε στη Κίνα, σε στέλεχος *E.coli* που απομονώθηκε από λύματα. [75] Το *mcr-1.5* (NG\_052663) εντοπίστηκε στην Αργεντινή, σε στέλεχος *E.coli* που απομονώθηκε από ουροδόχο κύστη ανθρώπου. [76] Το *mcr-1.6* (NG\_052893) εντοπίστηκε στη Κίνα, σε στέλεχος *Salmonella enterica* που απομονώθηκε από υγιή άνθρωπο. [77] Το *mcr-1.7* (NG\_054678) εντοπίστηκε στη Κίνα, σε στέλεχος *E.coli* που απομονώθηκε από λύματα. [75] Το *mcr-1.8* (NG\_05469) εντοπίστηκε στο Μπρουνέι, σε στέλεχος *E.coli* που απομονώθηκε από πουλερικά. [78] Το *mcr-1.9* (NG\_055582) εντοπίστηκε στη Πορτογαλία, σε στέλεχος *E.coli* που απομονώθηκε από χοίρο. [79]

Το *mcr-1.10* (NG\_055583) εντοπίστηκε στη Μεγάλη Βρετανία, σε στέλεχος *Moraxella spp.* που απομονώθηκε από χοίρο. [57] Το *mcr-1.11* (NG\_055784) εντοπίστηκε στο Περού, σε στέλεχος *E.coli* που απομονώθηκε από καλλιέργεια αίματος ανθρώπου. [80] Το *mcr-1.12* (NG\_056412) εντοπίστηκε στην Ιαπωνία, σε στέλεχος *E.coli* που απομονώθηκε από χοίρο. [81] Το *mcr-1.13* (NG\_057466) εντοπίστηκε στη Γερμανία, σε στέλεχος *E.coli* που απομονώθηκε από γαλοπούλα. [82] Το *mcr-1.14* (LS398440) εντοπίστηκε στη Μεγάλη Βρετανία, σε στέλεχος *E.coli* που απομονώθηκε από κόπρανα χοίρου. [83] Το *mcr-1.15* εντοπίστηκε στη Κίνα, σε στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* που απομονώθηκε από κόπρανα κοτόπουλου. [84] Το *mcr-1.16* (NG\_064787) εντοπίστηκε στη Κίνα, σε στέλεχος *E.coli* που απομονώθηκε από κοτόπουλο. [85] Το *mcr-1.17* (NG\_064788) εντοπίστηκε στη Κίνα, σε στέλεχος *E.coli* που απομονώθηκε από κόπρανα αγελάδας. [86] Το *mcr-1.18* (NG\_064789) εντοπίστηκε στη Κίνα, σε στέλεχος *E.coli* που απομονώθηκε από κοτόπουλο. [87] Το *mcr-1.19* (MK490674) εντοπίστηκε στη Κίνα, σε στέλεχος *Salmonella enterica* που απομονώθηκε από δείγμα αυγού. [88] Το *mcr-1.20* (NG\_065450) εντοπίστηκε στο Ηνωμένο Βασίλειο, σε

στέλεχος *E.coli* που απομονώθηκε από κόπρωνα χοίρων. [89] Το *mcr-1.21* (NG\_065451) εντοπίστηκε στη Κίνα, σε στέλεχος *E.coli* που απομονώθηκε από κόπρωνα. [90] Ο συχνότερος υπότυπος του γονιδίου *mcr-1*, είναι ο *mcr-1.2* που έχει αναβρεθεί κυρίως σε *Klebsiella pneumoniae*, αλλά και σε *Salmonella enterica* και *E.coli*. [91]

### 3.2 MCR-2

Το 2016 στο Βέλγιο αναφέρθηκε πρώτη φορά σε στέλεχος *E.coli* που απομονώθηκε από χοίρο, το γονίδιο *mcr-2* (NG\_051171), μια τρानσφεράση φωσφοαιθανολαμίνης, που ήταν τοποθετημένη στο πλασμίδιο IncX4. Οι τρानσφεράσεις φωσφοαιθανολαμίνης που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *mcr-1* και *mcr-2*, αντίστοιχα, μοιράζονται ταυτότητα 80,65% στο επίπεδο αλληλουχίας αμινοξέων. Τα πλησιέστερα ομόλογά τους βρέθηκαν σε *Raenibacillus sorphorae* (ταυτότητα 63%) και *Moraxella osloensis* (ταυτότητα 64%). [53, 60]

Στη Μεγάλη Βρετανία εντοπίστηκαν *mcr-1* και *mcr-2* σε στέλεχος *Moraxella spp.*, που απομονώθηκε από δεξαμενή με συγκεντρωμένες περιεκτικότητες κοκάλων υγιών χοίρων, όπου συλλέχθηκαν έπειτα από σφαγή από αγροκτήματα κατά τη περίοδο 2014-2015. Σε στέλεχος *Moraxella Pluranimalium* αναγνωρίστηκαν παραλλαγές του *mcr-2*, και ονομάστηκε *mcr-2.2* (NG\_055496), ενώ στη συνέχεια μετονομάστηκε σε *mcr-6* (NG\_055781). [57, 59]

### 3.3 MCR-3

Το 2017 εντοπίστηκε στη Κίνα το γονίδιο *mcr-3* (NG\_055505), σε στέλεχος *E.coli* που απομονώθηκε από κόπρωνα υγιούς χοίρου, που συλλέχθηκαν το 2015. [54] Έπειτα από αναζήτηση σε διεθνή βιβλιογραφία τον Ιούλιο 2019, το γονίδιο *mcr-3* έχει εντοπιστεί σε *Enterobacter*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *E.coli* και *Shigella*. Έως σήμερα, έχουν περιγραφεί είκοσι εννέα (29) υπότυποι του γονιδίου *mcr-3*. Παρακάτω αναφέρονται οι περιπτώσεις πρώτης αναφοράς τους. [92] Ο πιο συχνός υπότυπος του γονιδίου *mcr-3*, είναι το *mcr-3.5* που έχει ανιχνευτεί κυρίως σε *E.coli*, αλλά και σε *Shigella*. [93]

Το *mcr-3.2* (NG\_055523) εντοπίστηκε στη Ταϊλάνδη, σε στέλεχος *Shigella sonnei* που απομονώθηκε από ορθικό επίχρισμα. [94] Το *mcr-3.3* (NG\_055783) εντοπίστηκε στη Κίνα, σε στέλεχος *Aeromonas veronii* που απομονώθηκε από κρέας κοτόπουλου. [95] Το *mcr-3.4* (NG\_055492) εντοπίστηκε στη Ταϊλάνδη, σε στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* που απομονώθηκε από ανθρώπινο πύον. [96] Το *mcr-3.5* (NG\_055782) εντοπίστηκε στη Κίνα σε στέλεχος *E.coli*. [97] Το *mcr-3.6* (NG\_055660) εντοπίστηκε στη Γερμανία, σε στέλεχος *Aeromonas allosaccharophila* που απομονώθηκε από ψάρι, σε δείγμα του 2005. [98] Το *mcr-3.7* (NG\_055661) εντοπίστηκε στη Γερμανία, σε στέλεχος *Aeromonas media* που απομονώθηκε από γαλοπούλα, σε δείγμα του 2012. [98] Το *mcr-3.8* (NG\_055662) και το



*mcr-3.9* (NG\_055663) εντοπίστηκαν στη Γερμανία, σε στέλεχος *Aeromonas hydrophila* που απομονώθηκε από ψάρι, σε δείγμα του 2006. [98]

Το *mcr-3.10* (NG\_055799) εντοπίστηκε στη Κίνα, σε στέλεχος *Aeromonas caviae* που απομονώθηκε από πάπια. [99] Το *mcr-3.11* (NG\_056184) εντοπίστηκε στη Βραζιλία σε στέλεχος *E.coli*. [100] Το *mcr-3.12* (NG\_057484) εντοπίστηκε στη Βραζιλία, σε στέλεχος *E.coli* που απομονώθηκε από κόπρانا χοίρου. [101] Το *mcr-3.13* (NG\_060514) εντοπίστηκε στη Κίνα, σε στέλεχος *Aeromonas caviae* που απομονώθηκε από ανθρώπινο ορθικό επίχρισμα. [102] Το *mcr-3.14* (NG\_060515) εντοπίστηκε στη Κίνα, σε στέλεχος *Aeromonas bivalnium* που απομονώθηκε από υδάτινο περιβάλλον, σε δείγμα του 2017. [103] Το *mcr-3.15* (NG\_060516) εντοπίστηκε στη Κίνα, σε στέλεχος *Aeromonas media* που απομονώθηκε από κρέας κοτόπουλου, σε δείγμα του 2017. [104]

Το *mcr-3.16* (NG\_060517) εντοπίστηκε στη Κίνα, σε στέλεχος *Aeromonas salmonicida* που απομονώθηκε από κρέας κοτόπουλου, σε δείγμα του 2017. [105] Το *mcr-3.17* (NG\_060518) εντοπίστηκε στη Κίνα, σε στέλεχος *Aeromonas allosaccharophila* που απομονώθηκε από κρέας κοτόπουλου, σε δείγμα του 2017. [106] Το *mcr-3.18* (NG\_060519) εντοπίστηκε στη Κίνα, σε στέλεχος *Aeromonas caviae* που απομονώθηκε από υδάτινο περιβάλλον, σε δείγμα του 2017. [107] Το *mcr-3.19* (NG\_055497) εντοπίστηκε στη Κίνα, σε στέλεχος *Citrobacter freundii* που απομονώθηκε από χοίρο, σε δείγμα του 2014. [108] Το *mcr-3.20* (NG\_055493) εντοπίστηκε στη Ταϊλάνδη, σε στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* που απομονώθηκε από ούρα, σε δείγμα του 2015. [109] Το *mcr-3.21* (NG\_065453) εντοπίστηκε σε στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* που απομονώθηκε από κόπρانا. [110] Το *mcr-3.22* (NG\_060581) εντοπίστηκε στη Ταϊλάνδη, σε στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* που απομονώθηκε από ορθικό επίχρισμα χοίρου, σε δείγμα του 2016. [111]

Το *mcr-3.23* (NG\_060583) εντοπίστηκε στη Ταϊλάνδη, σε στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* που απομονώθηκε από ανθρώπινο ορθικό επίχρισμα, σε δείγμα του 2016. [112] Το *mcr-3.24* (NG\_060580) εντοπίστηκε στη Ταϊλάνδη, σε στέλεχος *Shigella sonnei* που απομονώθηκε από ανθρώπινο ορθικό επίχρισμα, σε δείγμα του 2015. [113] Το *mcr-3.25* (NG\_060585) εντοπίστηκε στη Κίνα, σε στέλεχος *Aeromonas veronii* που απομονώθηκε από ανθρώπινα κόπρانا, σε δείγμα του 2017. [114] Το *mcr-3.26* (NG\_065455) εντοπίστηκε σε στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* που απομονώθηκε από κόπρانا. [110] Το *mcr-3.27* (NG\_064790) εντοπίστηκε στη Μαλαισία, σε στέλεχος *Aeromonas hydrophila* που απομονώθηκε από περιτοναϊκό υγρό. [115] Το *mcr-3.29* (NG\_064791) εντοπίστηκε στο Βιετνάμ, σε στέλεχος *E.coli* που απομονώθηκε από ανθρώπινα κόπρانا, σε δείγμα του 2015. [116]

### 3.4 MCR-4

Το γονίδιο *mcr-4* εντοπίστηκε το 2013 στην Ιταλία, σε στέλεχος *Salmonella enterica* που απομονώθηκε από χοίρο, το 2015 και 2016 εντοπίστηκε στην Ισπανία και το Βέλγιο, σε

στέλεχος *E.coli* που απομονώθηκε από κόπρانا χοίρου. [55] Έπειτα από αναζήτηση σε διεθνή βιβλιογραφία τον Ιούλιο 2019, το γονίδιο *mcr-4* έχει απομονωθεί από στελέχη *Salmonella enterica*, *Enterobacter* και *Vibrio cholerae*. Έχουν περιγραφεί έξι (6) υπότυποι του γονιδίου *mcr-4*. Παρακάτω αναφέρονται οι περιπτώσεις πρώτης αναφοράς τους. [117]

Το *mcr-4.1* (NG\_057470) και το *mcr-4.2* (NG\_057471) εντοπίστηκαν στη Γερμανία, σε στέλεχος *E.coli* που απομονώθηκε από χοίρο, σε δείγμα του 2011. [118] Το *mcr-4.3* (NG\_057461) εντοπίστηκε σε στέλεχος *Enterobacter cloacae*. [119] Το *mcr-4.4* (NG\_057465) και το *mcr-4.5* (NG\_057464) εντοπίστηκαν στην Ισπανία, σε στέλεχος *E.coli* που απομονώθηκε από κόπρانا χοίρου. [120] Το *mcr-4.6* (NG\_061608) εντοπίστηκε σε στέλεχος *Salmonella enterica*. [121] Ο συχνότερος υπότυπος του γονιδίου *mcr-4*, είναι το *mcr-4.3* και έχει βρεθεί κυρίως σε *Acinetobacter baumannii*, αλλά και σε *Salmonella enterica* και *Enterobacter*. [117]

### 3.5 MCR-5 και MCR-6

Το 2017 στη Γερμανία, εντοπίστηκε το γονίδιο *mcr-5* (NG\_055658) σε στέλεχος *Salmonella enterica* που απομονώθηκε από δείγμα κοπράνων χοίρου. [56] Έπειτα από αναζήτηση σε διεθνή βιβλιογραφία τον Ιούλιο 2019, το γονίδιο *mcr-5* έχει εντοπιστεί κυρίως σε στελέχη *E.coli* αλλά και *Salmonella enterica* και *Pseudomonas aeruginosa*. Έχουν περιγραφεί δύο (2) υπότυποι του γονιδίου *mcr-5*. [122] Το *mcr-5.2* (NG\_057467) εντοπίστηκε στη Γερμανία, σε στέλεχος *E.coli* που απομονώθηκε από χοίρο. [123] Το *mcr-5.3* (NG\_061405) εντοπίστηκε στη Βραζιλία, σε στέλεχος *E.coli* που απομονώθηκε από πνεύμονα μολυσμένου αλόγου. [124]

Στη Μεγάλη Βρετανία σε στέλεχος *Moraxella Pluranimalium*, που απομονώθηκε από δεξαμενή με συγκεντρωμένες περιεκτικότητες κοκάλων υγείων χοίρων, που συλλέχθηκαν έπειτα από σφαγή από αγροκτήματα κατά τη περίοδο 2014-2015, αναγνωρίστηκαν παραλλαγές του *mcr-2*, και ονομάστηκε *mcr-2.2* (NG\_055496), ενώ στη συνέχεια μετονομάστηκε σε *mcr-6* (NG\_055781). [57, 59]

### 3.6 MCR-7, MCR-8, MCR-9

Το 2017 στη Κίνα εντοπίστηκε το γονίδιο *mcr-7* (NG\_056413) σε στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* που απομονώθηκε από κοτόπουλο, σε δείγμα που συλλέχθηκε τη χρονική περίοδο 2010-2015. Το γονίδιο αυτό φαίνεται να φέρεται σε πλασμίδιο τύπου IncI2. [59]

Το 2018, γίνεται γνωστό το γονίδιο *mcr-8* (NG\_061399). Το *mcr-8* εντοπίστηκε στη Κίνα, σε στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* που απομονώθηκε από κόπρانا χοίρου, τη χρονική περίοδο 2015-2017. Το γονίδιο αυτό φέρεται σε συζευκτικό πλασμίδιο τύπου IncFII

σε *Klebsiella pneumoniae*. [58] Έπειτα από αναζήτηση σε διεθνή βιβλιογραφία τον Ιούλιο 2019, έχει βρεθεί ένας υπότυπος του *mcr-8*, το *mcr-8.2* (NG\_061627) που εντοπίστηκε στην Κίνα, σε στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* που απομονώθηκε από άνθρωπο. [125]

Τέλος, το 2019, ανευρέθηκε το γονίδιο *mcr-9* (NG\_064792) σε στέλεχος πολυανθεκτικής *Salmonella enterica*, που απομονώθηκε το 2010 από ασθενή στις Ηνωμένες Πολιτείες, που όμως δεν είχε λάβει ποτέ κολιστίνη. Τα πλασμίδια που έφεραν το γονίδιο ήταν, μεταξύ άλλων, και IncHI2 και IncHI2A. [51]

# ***ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ***

## 4. Πειραματικό μέρος εργασίας

### 4.1 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μοριακός έλεγχος στελεχών *E.coli* για την παρουσία των γονιδίων *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* και *mcr-5*, που προσδίδουν αντοχή στη κολιστίνη, με τη μέθοδο της multiplex PCR. Συνολικά ελέγχθηκαν n=70 στελέχη *E.coli* που είχαν απομονωθεί από υδάτινα περιβάλλοντα. Συγκεκριμένα, n=3 απομονώθηκαν από πηγάδι το 2012, n=22 από λίμνη το 2007 και n=45 από χείμαρρους το 2013.

Τα στελέχη από το πηγάδι (n=3) συλλέχθηκαν από τη Λέρο-Γούρνα/ Δωδεκάνησα στις 12/9/2012. Τα στελέχη από τη λίμνη, (n=22) συλλέχθηκαν από διαφορετικά σημεία από τη λίμνη του Μαραθώνα, τη χρονική περίοδο 30/03/2007 – 10/07/2007. Τα στελέχη από τους χείμαρρους (n=45) συλλέχθηκαν από διαφορετικά σημεία στη Μυτιλήνη στις 05/12/2013.

Τα στελέχη αυτά μετά την απομόνωση, ταυτοποιήθηκαν και φυλάχθηκαν σε κατάλληλες συνθήκες στο αρχείο μικροβιακών στελεχών του Εργαστηρίου Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, κάποια από τα *mcr* γονίδια εντοπίστηκαν σε δείγματα που συλλέχθηκαν αρκετά χρόνια, έως και δεκαετίες, πίσω. Το γεγονός αυτό, αποτέλεσε σημαντικός και ενθαρρυντικός παράγοντας ώστε να πραγματοποιηθεί έρευνα των στελεχών *E.coli* του αρχείου, που συλλέχθηκαν τα έτη 2007, 2012 και 2013.

### 4.2 Υλικά και μέθοδοι

#### 4.2.1 Έλεγχος επιπέδων ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

Ο έλεγχος των στελεχών *E.coli* ως προς τα επίπεδα ευαισθησίας τους στα αντιβιοτικά πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών (disk diffusion assay) σε άγαρ (αντιβιογράμμα - μέθοδος Kirby-Bauer).



**Εικόνα 7.** Παράδειγμα αντιβιογράμματος. Στέλεχος *E.coli* δείγματος (121) χείμαρρου.

Τα δισκία αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν παροθιάζονται στον Πίνακα 3. Τα όρια ευαισθησίας καθορίστηκαν σύμφωνα με το EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) [126] και CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

**Πίνακας 3.** Δισκία αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο επιπέδων ευαισθησίας στα αντιβιοτικά.

Κατηγορία αντιβιοτικού	Αντιβιοτικό	Δισκίο	Όρια
Πενικιλίνες	Πιπερακιλίνη	<b>PIP</b>	WT: $\geq 20^1$
	Αμπικιλίνη	<b>AMP</b>	WT: $\geq 14^1$
Κεφαλοσπορίνες	Κεφαλοθίνη	<b>CF</b>	S: $\geq 18$ ; I: 15-17; R: $\leq 14^2$
	Κεφοξιτίνη	<b>FOX</b>	WT: $\geq 19^1$
	Κεφταξίμη	<b>CTX</b>	WT: $\geq 23^1$
	Κεφταζιδίμη	<b>CAZ</b>	WT: $\geq 22^1$
	Κεφουροξίμη	<b>CXM</b>	WT: $\geq 18^1$
	Κεφεπίμη	<b>FEP</b>	WT: $\geq 28^1$
β-λακταμικό/ Αναστολείς β-λακταμασών	Αμοξικιλίνη + Κλαβουλανικό οξύ	<b>AMC</b>	WT: $\geq 19^1$
	Πιπερακιλίνη + Ταζοβακτάμη	<b>TZP</b>	WT: $\geq 20^1$
Μονοβακτάμες	Αζτρεονάμη	<b>ATM</b>	WT: $\geq 26^1$
Καρβαπενέμες	Ερταπενέμη	<b>ERT</b>	WT: $\geq 29^1$
	Μεροπενέμη	<b>MEM</b>	WT: $\geq 25^1$
Αμονιγλυκοσίδες	Γενταμικίνη	<b>GN</b>	WT: $\geq 16^1$
	Στρεπτομυκίνη	<b>S</b>	S: $\geq 15$ ; I: 12-14; R: $\leq 11^2$

	Αμικασίνη	<b>AK</b>	WT: $\geq 18^1$
Φθοροκινολόνες	Σιπροφλοξασίνη	<b>CIP</b>	WT: $\geq 25^1$
Ανάμεικτοι παράγοντες	Τριμεθοπρίμη – σουλφαμεθοξαζόλη	<b>SXT</b>	WT: $\geq 16^1$

<sup>1</sup> Σύμφωνα με EUCAST. [126] <sup>2</sup> Σύμφωνα με CLSI.

#### 4.2.2 Έλεγχος παρουσίας γονιδίων που προσδίδουν ανοχή στην κολιστίνη με την τεχνική της πολλαπλής (multiplex) PCR.

Στα πλαίσια των πειραμάτων τα περιβαλλοντικά στελέχη ελέγχθηκαν για την ύπαρξη των γονιδίων *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* και *mcr-5*, μέσω της τεχνικής της πολλαπλής (multiplex) PCR.

Οι εκκινητές και τα θετικά controls που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 4. Τα θετικά controls προμηθεύτηκαν από το Πανεπιστήμιο της Δανίας (Technical University of Denmark). Χρησιμοποιήθηκε ο θερμικός κυκλοποιητής Advanced primus 25, Peqlab, Invitro Manufacture, και οι συνθήκες λειτουργίας αναγράφονται στον Πίνακα 5. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν της Rebelo A.R. et al, 2018. [121]

**Πίνακας 4.** Εκκινητές και θετικά controls που χρησιμοποιήθηκαν. [121]

Γονίδιο	Εκκινητές	Αλληλουχία (5'-3')	Μέγεθος (bp)	Θετικά controls
<b><i>mcr-1</i></b>	mcr1_320bp_fw	AGTCCGTTTGTCTTGTTGGC	320	<i>Escherichia coli</i> 2012-60-1176-27
	mcr1_320bp_rev	AGATCCTTGGTCTCGGCTTG		
<b><i>mcr-2</i></b>	mcr2_700bp_fw	CAAGTGTGTTGGTCGCAGTT	715	<i>E.coli</i> KP37
	mcr2_700bp_rev	TCTAGCCCGACAAGCATACC		
<b><i>mcr-3</i></b>	mcr3_900bp_fw	AAATAAAAATTGTTCCGCTTATG	929	<i>E coli</i> 2013-SQ352
	mcr3_900bp_rev	AATGGAGATCCCCGTTTTT		
<b><i>mcr-4</i></b>	mcr4_1100bp_fw	TCACTTTCATCACTGCGTTG	1,116	<i>E.coli</i> DH5α
	mcr4_1100bp_rev	TTGGTCCATGACTACCAATG		
<b><i>mcr-5</i></b>	MCR5_fw	ATGCGGTTGTCTGCATTTATC	1,644	<i>Salmonella</i> 13-SA01718
	MCR5_rev	TCATTGTGGTTGTCTTTTCTG		

Πίνακας 5. Συνθήκες Multiplex PCR. [121]

Συνθήκες Multiplex PCR			
Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
Αρχική αποδιάταξη	94 °C	15 min	1 κύκλος
Αποδιάταξη	94 °C	30 sec	25 κύκλοι
Υβριδισμός	58 °C	90 sec	
Επέκταση	72 °C	60 sec	
Τελική επέκταση	72 °C	10 min	1 κύκλος
Συντήρηση	4 °C	∞	

## 5. Αποτελέσματα

### 5.1 Αποτελέσματα ελέγχου επιπέδων ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

Από τα n=70 στελέχη που ελέγχθηκαν, τα n=39 (53%) ήταν Multidrug resistant, τα n=18 (25%) ήταν Resistant και τα n=16 (22%) ήταν Non wild type. Κανένα από τα στελέχη δεν ήταν wild type. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αντοχής, αποτελεί το στέλεχος *E.coli* (λ60) που συλλέχθηκε στις 10/7/2007 από λίμνη στη Σταμάτα-Μαραθώνας, καθώς παρουσίασε αντοχή σε πέντε κατηγορίες αντιβιοτικών, και συγκεκριμένα σε Κεφαλοσπορίνες (Κεφαλοθίνη, Κεφεπίμη, Κεφοξιτίνη, Κεφταζιδίμη), σε Καρβαπενέμες (Μεροπενέμη, Ερταπενέμη), σε Πενικιλίνες (Αμπικιλίνη), σε Αμινογλυκοσίδες (Γενταμικίνη, Αμικασίνη, Στρεπτομυκίνη), σε β-λακταμικό/Αναστολείς (Αμοξικιλίνη+Κλαβουλανικό οξύ) και σε Φθοριοκινολόνες (Σιπροφλοξασίνη).

Επίσης, το στέλεχος *E.coli* (105) που συλλέχθηκε στις 5/12/2013 από χείμαρρο στα Παράκοιλα-Μυτιλήνη, καθώς παρουσίασε αντοχή σε επτά κατηγορίες αντιβιοτικών, και συγκεκριμένα σε Κεφαλοσπορίνες (Κεφαλοθίνη, Κεφεπίμη), σε Καρβαπενέμες (Ερταπενέμη), σε Πενικιλίνες (Αμπικιλίνη), σε β-λακταμικό/Αναστολείς (Αμοξικιλίνη+Κλαβουλανικό οξύ), σε Φθοριοκινολόνες (Σιπροφλοξασίνη), Αμινογλυκοσίδες (Αμικασίνη) και σε Σουλφοναμίδες (Τριμεθοπρίμη-Σουλφαμεθοξαζόλη)

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 6Α και στον Πίνακα 6Β. Με κόκκινο χρώμα τονίζονται τα στελέχη με αξιοσημείωτες αντοχές. (NON WT: Non Wild Type, R: Resistant, MDR: Multidrug Resistant)



**Πίνακας 6Α.** Αποτελέσματα αντιβιογραμμάτων. Όπου NON WT - Non Wild Type, R – Resistant, MDR – Multidrug Resistant.

Στέλεχος	Ημερομηνία συλλογής	Περιοχή	Πηγή	Προφίλ αντοχής	Φαινότυπος αντοχής
29	12/9/2012	Λέρος-Γούρνα/ Δωδεκάνησα	Πηγάδι	S	NON WT
30	12/9/2012	Λέρος-Γούρνα/ Δωδεκάνησα	Πηγάδι	S	NON WT
31	12/9/2012	Λέρος-Γούρνα/ Δωδεκάνησα	Πηγάδι	S-FEP	R
λ46	30/3/2007	Βεντούρι/ Μαραθώνας	Λίμνη	CF-S-DEP-MEM-AK	MDR
λ47	16/4/2007	Κιούρκα/ Μαραθώνας	Λίμνη	CF-S-AMP-GM-FEP-MEM-AK	MDR
λ48	9/4/2007	Βαρνάβας/ Μαραθώνας	Λίμνη	CF-S-AMP-FEP-AK	MDR
λ49	9/4/2007	Βαρνάβας/ Μαραθώνας	Λίμνη	CF-S-AMP-ATM-FEP-AK	MDR
λ50	9/4/2007	Λίμνη Μαραθώνα - Ρέμα Αγ. Στέφανος	Λίμνη	CF-ERT-FEP-AK	MDR
λ51	12/4/2007	Σταμάτα/ Μαραθώνας	Λίμνη	CF-S-AMP-FEP-AK	MDR
λ52	16/4/2007	Λίμνη Μαραθώνα – Ρέμα Βαρνάβα	Λίμνη	CF-ART-FEP-AK	MDR
λ53	10/7/2007	Λίμνη Μαραθώνα – Ρέμα Βαρνάβα	Λίμνη	ERT	NON WT
λ54	10/7/2007	Λίμνη Μαραθώνα – Πύργος Υδροληψίας Βεντούρι	Λίμνη	ERT	NON WT
λ55	10/7/2007	Λίμνη Μαραθώνα – Πύργος Υδροληψίας Βεντούρι	Λίμνη	CF-ERT-FEP	R
λ56	10/7/2007	Λίμνη Μαραθώνα – Πύργος Υδροληψίας Βεντούρι	Λίμνη	ERT	NON WT
λ57	10/7/2007	Λίμνη Μαραθώνα – Ρέμα Βαρνάβα	Λίμνη	ERT-FEP	R
λ58	10/7/2007	Λίμνη Μαραθώνα – Ρέμα Βαρνάβα	Λίμνη	FEP	NON WT
λ59	10/7/2007	Λίμνη Μαραθώνα – Ρέμα Βαρνάβα	Λίμνη	CF-ERT-PIP-GM-FEP-MEM-AK	MDR
λ60	10/7/2007	Σταμάτα/ Μαραθώνας	Λίμνη	CF-S-AMP-CAZ-GM-AMC-FOX-FEP-MEM-AK-CIP	MDR
λ61	10/7/2007	Βεντούρι/ Μαραθώνας	Λίμνη	CF-S-CAZ-GM-AMC-FEP-MEM-AK	MDR
λ62	10/7/2007	Βαρνάβας/ Μαραθώνας	Λίμνη	CF-S-FEP-AK	R
λ63	9/4/2007	Λίμνη Μαραθώνα – Ρέμα Βαρνάβα	Λίμνη	CF-ERT-GM-FEP-MEM-AK	MDR
λ64	9/4/2007	Λίμνη Μαραθώνα – Ρέμα Βαρνάβα	Λίμνη	CF-ERT-FEP	R
λ65	9/4/2007	Λίμνη Μαραθώνα – Πύργος Υδροληψίας Βεντούρι	Λίμνη	CF-ERT-FEP-AK	MDR
λ66	9/4/2007	Βαρνάβας/ Μαραθώνας	Λίμνη	CF-S-FEP-AK	R
λ67	16/4/2007	Βαρνάβας/ Μαραθώνας	Λίμνη	CF-GM-FEP-CIP	MDR

PIP:Πιπερακίνη, AMP:Αμπικιλίνη, CF:Κεφαλοθίνη, FOX:Κεφοξίτη, CTX:Κεφτοαζίμη, CAZ:Κεφταζιδίμη, CXM:Κεφουροξίμη, FEP:Κεφεπίμη, AMC:Αμοξικιλίνη + Κλαβουλανικό οξύ, TZP:Πιπερακίνη + Ταζοβακτάμη, ATM:Αζτρεονάμη, ERT:Ερταπενέμη, MEM:Μεροπενέμη, GN:Γενταμικίνη, S:Στρεπτομυκίνη, AK:Αμικασίνη, CIP:Σιπροφλοξασίνη, SXT:Τριμεθοπρίμη-Σουλφαμεθοξαζόλη

**Πίνακας 6B.** Αποτελέσματα αντιβιογραμμάτων. Όπου NONWT- Non Wild Type, R – Resistant, MDR – Multidrug Resistant.

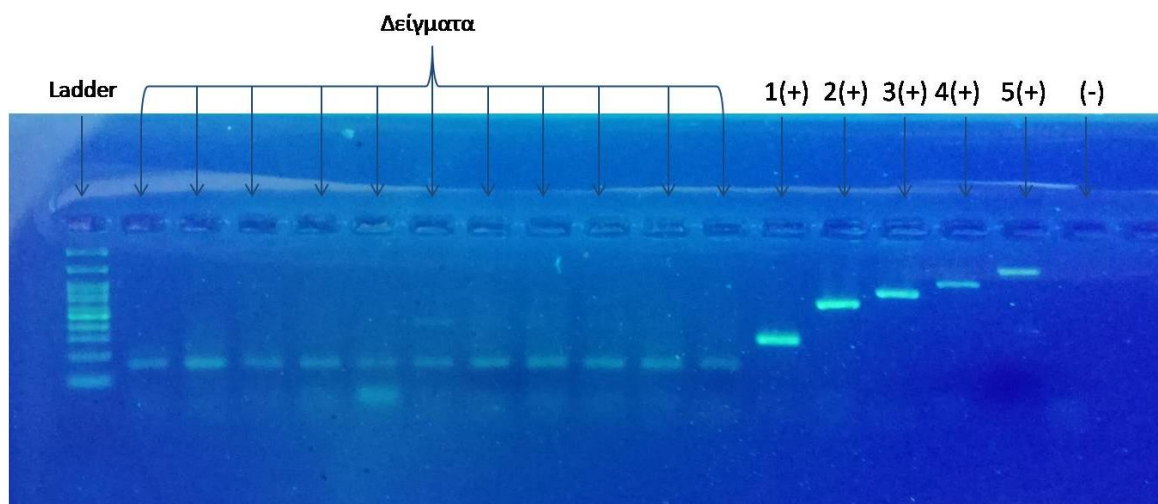
Στέλεχος	Ημερομηνία συλλογής	Περιοχή	Πηγή	Προφίλ αντοχής	Φαινότυπος αντοχής
81	5/12/2013	Γλάρος/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	S	NON WT
82	5/12/2013	Γλάρος/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	S	NON WT
83	5/12/2013	Λούτσα/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	CF-CXM-PIP-AMC-MEM	MDR
84	5/12/2013	Άγιος Παύλος/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	CF-CXM-PIP-AMC-MEM	MDR
85	5/12/2013	Μακρύς γιαλός/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	S-CAZ-GM	MDR
86	5/12/2013	Μακρύς γιαλός/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	CF-S-AMC-MEM	R
87	5/12/2013	Μακρύς γιαλός/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	S	NON WT
88	5/12/2013	Μακρύς γιαλός/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	S	NON WT
89	5/12/2013	Αχλαδερή/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	S-CAZ	R
90	5/12/2013	Αχλαδερή/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	S	NON WT
91	5/12/2013	Αχλαδερή/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	S	NON WT
92	5/12/2013	Αχλαδερή/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	S-AMC	R
92	5/12/2013	Αχλαδερή/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	S-FEP	NON WT
93	5/12/2013	Βούβαρης/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	S	NON WT
94	5/12/2013	Βούβαρης/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	S	NON WT
95	5/12/2013	Βούβαρης/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	S	NON WT
96	5/12/2013	Μιλοπόταμος/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	CF-ERT-S-AK	MDR
97	5/12/2013	Μιλοπόταμος/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	CF-ERT-S-AK	MDR
98	5/12/2013	Τσκινιάς/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	CF-CXM-S-CAZ-PIP-AMC-MEM-AK	MDR
99	5/12/2013	Τσκινιάς/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	CF-ERT-AMP-AMC-AK	MDR
100	5/12/2013	Ποταμιά/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	CF-ERT-FEP-AK	MDR
101	5/12/2013	Ποταμιά/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	CF-ERT-AMP-AMC-FEP-AK	MDR
102	5/12/2013	Ποταμιά/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	CF-ERT-S-AK	MDR
103	5/12/2013	Ποταμιά/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	ERT-S	R
104	5/12/2013	Ποταμιά/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	CF-ERT-AMC-FEP	MDR
105	5/12/2013	Παράκοιλα/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	CF-ERT-AMP-AMC-SXT-FEP-AK-CIP	MDR
106	5/12/2013	Παράκοιλα/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	CF-ERT-AMP-AMC-FEP-AK	MDR
107	5/12/2013	Παράκοιλα/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	CF-AMC	R
108	5/12/2013	Παράκοιλα/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	CF-AMC	R
109	5/12/2013	Παράκοιλα/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	CF-ERT-AMP-AMC-FEP	MDR
110	5/12/2013	Παράκοιλα/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	CF-ERT-CAZ-AMC-FEP	MDR
111	5/12/2013	Γλάρος/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	CF-AMC	R
112	5/12/2013	Γλάρος/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	CF-ERT-AMC-FEP	MDR
113	5/12/2013	Λούτσα/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	CF-ERT-AMC	MDR
115	5/12/2013	Λούτσα/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	CF-ERT-CAZ-AMC-FEP-MEM-AK	MDR
116	5/12/2013	Λούτσα/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	CF-ERT-AMP-AMC-FEP-MEM	MDR
117	5/12/2013	Άγιος Παύλος/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	CF-ERT-AMP-AMC-FEP	MDR

118	5/12/2013	Άγιος Παύλος/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	CF -ERT-AMC-AK	<b>MDR</b>
119	5/12/2013	Παράκοιλα/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	CF-ERT-AMP-AMC-FEP	<b>MDR</b>
120	5/12/2013	Παράκοιλα/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	CF-ERT-AMP-AMC-FEP	<b>MDR</b>
121	5/12/2013	Γλάρος/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	CF-ERT-AMC	<b>MDR</b>
122	5/12/2013	Γλάρος/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	CF-AMC	<b>R</b>
123	5/12/2013	Μακρύς γιαλός/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	CF-ERT-AMP-AMC-FEP-AK	<b>MDR</b>
124	5/12/2013	Μακρύς γιαλός/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	CF-AMC-CIP	<b>MDR</b>
125	5/12/2013	Μακρύς γιαλός/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	CF-AMC-FEP	<b>R</b>
126	5/12/2013	Βούβαρης/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	CF-CXM-ERT-AMP-AMC-FEP	<b>R</b>
127	5/12/2013	Μιλοπόταμος/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	CF-AMC	<b>R</b>
128	5/12/2013	Τσικνιάς/ Μυτιλήνη	Χείμαρρος	CF-AMC	<b>R</b>

PIP:Πιπερακιλίνη, AMP:Αμπικιλίνη, CF:Κεφαλοθίνη, FOX:Κεφοξίτινη, CTX:Κεφταξίμη, CAZ:Κεφταζιδίμη, CXM:Κεφουροξίμη, FEP:Κεφεπίμη, AMC:Αμοξικιλίνη + Κλαβουλανικό οξύ, TZP:Πιπερακιλίνη + Ταζοβακτάμη, ATM:Αζτρεονάμη, ERT:Ερταπενέμη, MEM:Μεροπενέμη, GN:Γενταμικίνη, S:Στρεπτομυκίνη, AK:Αμικασίνη, CIP:Σιπροφλοξασίνη, SXT:Τριμεθοπρίμη-Σουλφαμεθοξαζόλη

## 5.2 Αποτελέσματα της αντίδρασης PCR

Από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), δεν βρέθηκε κανένα θετικό στέλεχος σε κανένα από τα γονίδια αντοχής *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*. Στην Εικόνα 8 φαίνεται ένα παράδειγμα αποτελέσματος ηλεκτροφόρησης αρνητικών δειγμάτων σε gel αγαρόζης με χρωστική midori.



**Εικόνα 8.** Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των PCR προϊόντων. Το θετικό control του *mcr-1* είναι στα 320bp, του *mcr-2* στα 715bp, του *mcr-3* στα 929bp, του *mcr-4* στα 1,116bp και τέλος, του *mcr-5* στα 1,644bp.

## Συζήτηση

Η σταδιακή αύξηση της αντοχής στα αντιβιοτικά που ξεκίνησε στη δεκαετία του 1970 μεταξύ των Gram-αρνητικών βακτηρίων αποτελεί ένα κρίσιμο παγκόσμιο ζήτημα. Η διασπορά πολυανθεκτικών στελεχών (MDR - Multidrug-resistant), εξαιρετικά ανθεκτικών στελεχών (XDR – Extensively drug-resistant) και πανανθεκτικών στελεχών (PDR - Pandrug-resistant), *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* και *Pseudomonas aeruginosa*, έχει λάβει παγκόσμιες διαστάσεις. [60] Η μικροβιακή αντοχή αναγνωρίζεται ως μία από τις πιο σοβαρές παγκόσμιες απειλές για την υγεία του ανθρώπου τον 21ο αιώνα. Το ζήτημα της μικροβιακής αντοχής απαιτεί συντονισμένες προσπάθειες καθώς και στενή διεθνή συνεργασία, δεδομένου ότι επηρεάζει άμεσα την Ενιαία Υγεία. [18, 127]

Στα κλινικά περιβάλλοντα το φαινόμενο της μικροβιακής αντοχής έχει εκτενώς χαρακτηριστεί και μελετηθεί. [128] Πολλά δημοσιευμένα δεδομένα από τη διεθνή βιβλιογραφία, υποδεικνύουν ότι η επαφή με ανθεκτικά βακτήρια δεν περιορίζεται μόνο στα νοσοκομεία, αλλά τα γονίδια αντοχής και τα βακτηριακά στελέχη μεταφέρονται το ίδιο εύκολα και μέσω ποικίλων περιβαλλοντικών οδών. [129, 130]

Η Ελλάδα παρουσιάζει μείωση όσον αφορά στη χρήση των αντιβιοτικών από τους πολίτες σύμφωνα και με τις πρόσφατες δημοσκοπήσεις του Ευρωβαρόμετρου. Παρόλα αυτά οι Έλληνες φαίνεται να τείνουν στην χρήση αντιβιοτικών για ένα απλό κρυολόγημα ή μια ίωση. Στην Ελλάδα ο απολογισμός της απώλειας των ανθρώπινων ζωών από λοιμώξεις από πολυανθεκτικά βακτήρια φθάνει κάθε χρόνο τους 1.627 νεκρούς. [131] Η κατανάλωση των αντιβιοτικών και η μικροβιακή αντοχή δεν αφορά μόνο την ανθρώπινη υγεία, αλλά και των ζώων και του περιβάλλοντος. [132, 133]

Τα τελευταία χρόνια έχει αρχίσει να γίνεται ευρέως αποδεκτό ότι, τα υδάτινα οικοσυστήματα παίζουν σημαντικό ρόλο ως δεξαμενές και φορείς για πολλά γονίδια αντοχής. [134, 135] Χαρακτηριστικό παράδειγμα αναδυόμενων γονιδίων που προσδίδουν αντοχή σε αντιβιοτικά κρίσιμα στην κλινική πράξη και όχι μόνο, είναι τα *mcr*, τα οποία προσδίδουν αντοχή στην κολιστίνη. Τα γονίδια *mcr* έχουν εντοπιστεί κυρίως σε εντεροβακτηριακά, και κυρίως σε στελέχη *E.coli*, τόσο κλινικά όσο και περιβαλλοντικά. [6] Στην Ελλάδα δεν υπάρχουν δεδομένα για τα γονίδια *mcr*.

Στην παρούσα εργασία ελέγχθηκαν στελέχη *E.coli*, για την παρουσία των γονιδίων *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* και *mcr-5*, [121] που είχαν απομονωθεί από υδάτινα περιβάλλοντα. Συγκεκριμένα, n=3 απομονώθηκαν από πηγάδι το 2012, n=22 από λίμνη το 2007 και n=45 από χειμάρρους το 2013. Κανένα από τα περιβαλλοντικά στελέχη *E.coli* που ελέγχθηκαν δεν ήταν *mcr*-θετικό. Ωστόσο, κανένα από αυτά δεν ήταν άγριου τύπου. Το 53% (n=39) των στελεχών χαρακτηρίστηκε ως MDR, δηλαδή ως πολυανθεκτικά, καθώς εμφάνισαν αντοχή σε τουλάχιστον 1 παράγοντα σε  $\geq 3$  κατηγορίες αντιβιοτικών. Οι υψηλές

αντοχές σε ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά στη κλινική πράξη, κρίνεται ανησυχητικό για την δημόσια υγεία, δεδομένου ότι αφορά στελέχη που απομονώθηκαν από υδάτινα περιβάλλοντα. [12]

Για να ξεπεραστεί το πρόβλημα της πολύ-αντοχής, τόσο σε κλινικά όσο και σε περιβαλλοντικά ενδιαιτήματα, απαιτείται διεξοδική μελέτη, η οποία θα αποκαλύψει πώς προσαρμόζονται τα βακτήρια σε διαφορετικά ενδιαιτήματα όπως το νερό, πώς αποκτούν νέα γονίδια ανθεκτικότητας, πώς αναπτύσσουν τρόπους επικοινωνίας μεταξύ διαφορετικών οικοτόπων και πολλών άλλων μηχανισμών. Επομένως, η ανίχνευση γονιδίων αντοχής στο νερό κατέχουν κεντρικό ρόλο στη διασφάλιση της Δημόσιας Υγείας. [129]

Το βακτήριο *E.coli* απαντάται στο έδαφος και στο υδάτινο οικοσύστημα, ενώ παράλληλα συγκαταλέγεται στα πιο κοινά παθογόνα του ανθρώπου και ευθύνεται για πολλές λοιμώξεις της κοινότητας και του νοσοκομείου. [18] Ταυτόχρονα, θεωρείται βασικός δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης, τόσο του πρωτογενούς, όσο και του κατεργασμένου νερού και επομένως αποτελεί υποχρεωτική μικροβιολογική παράμετρο ελέγχου νερού, σύμφωνα με την ελληνική και ευρωπαϊκή νομοθεσία (ΚΥΑ Γ1(δ)/ ΓΠ οικ.67322). [136, 137]

Η ανάλυση του πόσιμου και μη νερού ως προς την μικροβιολογική του ποιότητα είναι ιδιαίτερα σημαντική έτσι ώστε να εντοπιστούν πιθανές πρόσφατες ή παλαιότερες μολύνσεις υπεύθυνες για την ανάπτυξη πλήθους υδατογενών επιδημιών [138] και ιδιαίτερα επικίνδυνων για την Δημόσια Υγεία. [139, 140] Ο έλεγχος της παρουσίας των προφίλ αντοχής και των γονοτύπων υδατογενών βακτηρίων, όπως του βακτηρίου *E.coli*, ολοκληρώνει το προφίλ μιας υδατογενούς επιδημίας και ενισχύει την επιδημιολογική επιτήρηση με στόχο πάντα την διατήρηση της Δημόσιας Υγείας. [136]

Το βακτήριο *E.coli*, εκτός του ότι αποτελεί βασικό δείκτη κοπρανώδους επιμόλυνσης, [136] έχει ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη και διασπορά του γονιδίου *mcr* τόσο στο κλινικό όσο και στο υδάτινο περιβάλλον [6], όχι μόνο μεταξύ στελεχών του είδους αλλά και σε άλλα βακτηριακά είδη. Στην Κίνα, το 2015, αναφέρθηκε για πρώτη φορά το πλασμιδιακό γονίδιο *mcr-1* σε στελέχη *E.coli* και *Klebsiella pneumoniae*, που απομονώθηκαν από δείγματα ζώων και ανθρώπων. Το πρώτο πλασμίδιο που έφερε το γονίδιο *mcr-1* ανήκε στην ομάδα IncI21. [6] Το γονίδιο *mcr-1.2* περιγράφηκε για πρώτη φορά σε πλασμίδιο IncX4 σε στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* που απομονώθηκε από ανθρώπινο δείγμα στην Ιταλία, το 2016. [73] Επίσης στην Ιταλία, το 2018, αυτός ο υπότυπος βρέθηκε σε IncX4 πλασμίδιο σε στέλεχος *Salmonella spp.* και *E.coli* στο έντερο γαλοπούλας. [82] Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν τη μετάδοση του *mcr*-θετικού IncX4 πλασμιδίου μεταξύ διαφορετικών βακτηριδιακών ειδών, με τη δυνατότητα μετάδοσης από ζώα στον άνθρωπο ή αντίστροφα.

Έως σήμερα, στο υδάτινο περιβάλλον έχει εντοπιστεί το *mcr-1* στη Βραζιλία σε στέλεχος *E.coli* που απομονώθηκε από δείγμα νερού θαλάσσης που συλλέχθηκε το 2016 [141], στην Κίνα σε στέλεχος *E.coli* που απομονώθηκε από δείγμα νερού από ποτίστρα

κοτόπουλων που συλλέχθηκε το 2016 [142], στην Κίνα σε στέλεχος *E.coli* που απομονώθηκε από νερά σε σφαγεία κοτόπουλων και χοίρων που απομονώθηκε από *E.coli* που συλλέχθηκε το 2016 [143], στην Κίνα σε στελέχη *E.coli* που απομονώθηκε από δείγμα νερού ποταμιού που συλλέχθηκε το 2015 [144], στην Κίνα σε στέλεχος *Vibrio parahaemolyticus* που απομονώθηκε από δείγμα νερού που συλλέχθηκε το 2014 [145], στη Μαλαισία σε στέλεχος *E.coli* που απομονώθηκε από δείγμα νερού που συλλέχθηκε το 2013 [146].

Δεν είναι και λίγες οι αναφορές όπου εντοπίστηκαν και υπότυποι του γονιδίου στο βακτήριο σε υδάτινα οικοσυστήματα. Το *mcr-1.5* εντοπίστηκε το 2016 στην Αλγερία σε στέλεχος *E.coli* που απομονώθηκε από δείγμα νερού θαλάσσης. [147] Το *mcr-3.14* εντοπίστηκε το 2017 στη Κίνα σε στέλεχος *Aeromonas bivalvium* που απομονώθηκε από υδάτινο περιβάλλον. [103] Το *mcr-3.18* εντοπίστηκε το 2017 στη Κίνα σε στέλεχος *Aeromonas caviae* που απομονώθηκε από υδάτινο περιβάλλον. [107]

Το πρόβλημα της λειψυδρίας, αλλά και η υποβάθμιση της ποιότητας του νερού είναι πλέον ένα φαινόμενο γνωστό και καλά χαρακτηρισμένο παγκοσμίως, όπου η κλιματική αλλαγή και η τεράστια βιομηχανική ανάπτυξη αποτελούν τους δυο βασικότερους αιτιολογικούς παράγοντες. [148-150] Το νερό της λίμνης χρησιμοποιείται για άρδευση καλλιεργειών, για παραγωγή υδροηλεκτρικής ενέργειας, για ποικίλες ανθρώπινες δραστηριότητες (όπως υδροποδήλατο, κανό-καγιακ, SUP κ.α.) αλλά και αποτελεί πηγή τροφών (ψάρια γλυκού νερού) και ορυκτών. [151] Σήμερα τα συστήματα ποταμών και λιμνών λειτουργούν ως επικοινωνιακές συνδέσεις και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και στη ναυτιλία. [150]

Τόσο το σύνολο των χρήσεων αυτών, όσο και το γεγονός ότι σε πολλές λίμνες εκβάλουν λύματα, το νερό που χρησιμοποιείται εν τέλει αποτελεί σημαντική δεξαμενή βακτηρίων και μπορεί να συσχετιστεί με την εξάπλωση ανθεκτικών βακτηρίων που δύναται να προκαλέσουν μη ιάσιμες λοιμώξεις (όπως π.χ. του ουροποιητικού ή γαστρεντερικού συστήματος) στον άνθρωπο. [140] Ως εκ τούτου, ο μικροβιολογικός έλεγχος του νερού κρίνεται απαραίτητος διότι μέσω αυτού εκτιμάται η μικροβιολογική ποιότητα των υδάτων.

Συμπερασματικά, η ανίχνευση στην παρούσα έρευνα ανθεκτικών και πολυανθεκτικών στελεχών *E.coli* απομονωμένων από υδάτινα περιβάλλοντα κρούει το σήμα κινδύνου για την Δημόσια Υγεία. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να πραγματοποιούνται συστηματικές μελέτες σε δείγματα ποικίλων υδάτινων οικοσυστημάτων που θα στοχεύουν στον έλεγχο της μικροβιακής αντοχής και των μηχανισμών αντοχής των στελεχών *E.coli*, στην ανάλυση του γενετικού τους υποβάθρου καθώς και στην ανίχνευση των κυκλοφορούντων γονοτύπων. [140]

Σε αντίθεση με τις βάσεις δεδομένων και τα Συστήματα Επιτήρησης που παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τα τροφιμογενή νοσήματα και τις ζωνοσούς [Το Σύστημα

Επιδημιολογικής Παρακολούθησης (TESSy) και το Σύστημα Πληροφοριών Επιδημιολογικών Πληροφοριών (ΕΠΙΣ) του ECDC [152] δεν υπάρχουν ισοδύναμα συστήματα για τα υδάτινα οικοσυστήματα. Η δημιουργία μιας βάσης δεδομένων αμιγώς περιβαλλοντικής φαίνεται πλέον επιτακτική για την καταγραφή και την διάχυση των φαινοτύπων και γονοτύπων πολυανθεκτικών στελεχών στα υδάτινα οικοσυστήματα.

## Βιβλιογραφία

1. Davis, M.F., et al., *Checklist for One Health Epidemiological Reporting of Evidence (COHERE)*. *One Health*, 2017. **4**: p. 14-21.
2. Ventola, C.L., *The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats*. *P T*, 2015. **40**(4): p. 277-83.
3. Stalsby Lundborg, C., et al., *Protocol: a 'One health' two year follow-up, mixed methods study on antibiotic resistance, focusing children under 5 and their environment in rural India*. *BMC Public Health*, 2015. **15**: p. 1321.
4. Bengtsson-Palme, J., E. Kristiansson, and D.G.J. Larsson, *Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance*. *FEMS Microbiol Rev*, 2018. **42**(1).
5. Karkman, A., K. Parnanen, and D.G.J. Larsson, *Fecal pollution can explain antibiotic resistance gene abundances in anthropogenically impacted environments*. *Nat Commun*, 2019. **10**(1): p. 80.
6. Liu, Y.Y., et al., *Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study*. *Lancet Infect Dis*, 2016. **16**(2): p. 161-8.
7. NIH, *Reference Gene Catalog (mcr)*. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, 2019.
8. Jang, J., et al., *Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications-a review*. *J Appl Microbiol*, 2017. **123**(3): p. 570-581.
9. CDC, *Antibiotic Resistance Threats In The United States*. 2013.
10. ECDC, *Antimicrobial resistance surveillance in Europe, 2015*. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net), 2015.
11. Milic, N., et al., *Occurrence of antibiotics as emerging contaminant substances in aquatic environment*. *Int J Environ Health Res*, 2013. **23**(4): p. 296-310.
12. Manyi-Loh, C., et al., *Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications*. *Molecules*, 2018. **23**(4).
13. Bush, K. and P.A. Bradford, *beta-Lactams and beta-Lactamase Inhibitors: An Overview*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2016. **6**(8).
14. Begg, E.J. and M.L. Barclay, *Aminoglycosides--50 years on*. *Br J Clin Pharmacol*, 1995. **39**(6): p. 597-603.
15. Dinos, G.P., *The macrolide antibiotic renaissance*. *Br J Pharmacol*, 2017. **174**(18): p. 2967-2983.
16. Ezelarab, H.A.A., et al., *Recent updates of fluoroquinolones as antibacterial agents*. *Arch Pharm (Weinheim)*, 2018. **351**(9): p. e1800141.
17. Baron, S., et al., *Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns*. *Int J Antimicrob Agents*, 2016. **48**(6): p. 583-591.
18. ECDC, *Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2017*. SURVEILLANCE REPORT, 2017.
19. Authority, E.F.S., *The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017*. *EFSA Journal*, 2019. **17**(2).



20. Aslam, B., et al., *Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis*. Infect Drug Resist, 2018. **11**: p. 1645-1658.
21. van der Bij, A.K. and J.D. Pitout, *The role of international travel in the worldwide spread of multiresistant Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemother, 2012. **67**(9): p. 2090-100.
22. Rice, L.B., *Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE*. J Infect Dis, 2008. **197**(8): p. 1079-81.
23. Pendleton, J.N., S.P. Gorman, and B.F. Gilmore, *Clinical relevance of the ESKAPE pathogens*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2013. **11**(3): p. 297-308.
24. Ishii, S. and M.J. Sadowsky, *Escherichia coli in the Environment: Implications for Water Quality and Human Health*. Microbes Environ, 2008. **23**(2): p. 101-8.
25. Allocati, N., et al., *Escherichia coli in Europe: an overview*. Int J Environ Res Public Health, 2013. **10**(12): p. 6235-54.
26. Kasiakou, S.K., et al., *Combination therapy with intravenous colistin for management of infections due to multidrug-resistant Gram-negative bacteria in patients without cystic fibrosis*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(8): p. 3136-46.
27. Bialvaei, A.Z. and H. Samadi Kafil, *Colistin, mechanisms and prevalence of resistance*. Curr Med Res Opin, 2015. **31**(4): p. 707-21.
28. Falagas, M.E. and S.K. Kasiakou, *Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections*. Clin Infect Dis, 2005. **40**(9): p. 1333-41.
29. Storm, D.R., K.S. Rosenthal, and P.E. Swanson, *Polymyxin and related peptide antibiotics*. Annu Rev Biochem, 1977. **46**: p. 723-63.
30. Gupta, S., et al., *Colistin and polymyxin B: a re-emergence*. Indian J Crit Care Med, 2009. **13**(2): p. 49-53.
31. Kumazawa, J. and M. Yagisawa, *The history of antibiotics: the Japanese story*. J Infect Chemother, 2002. **8**(2): p. 125-33.
32. Conly, J. and B. Johnston, *Colistin: the phoenix arises*. Can J Infect Dis Med Microbiol, 2006. **17**(5): p. 267-9.
33. Li, J., et al., *Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections*. Lancet Infect Dis, 2006. **6**(9): p. 589-601.
34. Li, J., et al., *Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria*. Int J Antimicrob Agents, 2005. **25**(1): p. 11-25.
35. Evans, M.E., D.J. Feola, and R.P. Rapp, *Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria*. Ann Pharmacother, 1999. **33**(9): p. 960-7.
36. Karaikos, I., et al., *Colistin: still a lifesaver for the 21st century?* Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2017. **13**(1): p. 59-71.
37. Hao, H., et al., *Benefits and risks of antimicrobial use in food-producing animals*. Front Microbiol, 2014. **5**: p. 288.
38. Ghafur, A., et al., *Detection of chromosomal and plasmid-mediated mechanisms of colistin resistance in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae from Indian food samples*. J Glob Antimicrob Resist, 2019. **16**: p. 48-52.
39. Organization, W.H., *Critically important antimicrobials for human medicine*. World Health Organization, 2016. **5th revision 2016**.

40. Karaikos, I. and H. Giamarellou, *Multidrug-resistant and extensively drug-resistant Gram-negative pathogens: current and emerging therapeutic approaches*. Expert Opin Pharmacother, 2014. **15**(10): p. 1351-70.
41. Dijkmans, A.C., et al., *Colistin: Revival of an Old Polymyxin Antibiotic*. Ther Drug Monit, 2015. **37**(4): p. 419-27.
42. Katz, E. and A.L. Demain, *The peptide antibiotics of Bacillus: chemistry, biogenesis, and possible functions*. Bacteriol Rev, 1977. **41**(2): p. 449-74.
43. Bergen, P.J., et al., *Colistin methanesulfonate is an inactive prodrug of colistin against Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(6): p. 1953-8.
44. Gallardo-Godoy, A., et al., *Activity and Predicted Nephrotoxicity of Synthetic Antibiotics Based on Polymyxin B*. J Med Chem, 2016. **59**(3): p. 1068-77.
45. Rhouma, M., F. Beaudry, and A. Letellier, *Resistance to colistin: what is the fate for this antibiotic in pig production?* Int J Antimicrob Agents, 2016. **48**(2): p. 119-26.
46. Martis, N., S. Leroy, and V. Blanc, *Colistin in multi-drug resistant Pseudomonas aeruginosa blood-stream infections: a narrative review for the clinician*. J Infect, 2014. **69**(1): p. 1-12.
47. Gough, M., R.E. Hancock, and N.M. Kelly, *Antiendotoxin activity of cationic peptide antimicrobial agents*. Infect Immun, 1996. **64**(12): p. 4922-7.
48. Sampson, T.R., et al., *Rapid killing of Acinetobacter baumannii by polymyxins is mediated by a hydroxyl radical death pathway*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(11): p. 5642-9.
49. Deris, Z.Z., et al., *A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity*. J Antibiot (Tokyo), 2014. **67**(2): p. 147-51.
50. Zhang, H., et al., *Expression characteristics of the plasmid-borne mcr-1 colistin resistance gene*. Oncotarget, 2017. **8**(64): p. 107596-107602.
51. Carroll, L.M., et al., *Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene mcr-9 in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible Salmonella enterica Serotype Typhimurium Isolate*. MBio, 2019. **10**(3).
52. Gutierrez, C., et al., *Genetic analysis of the first mcr-1 positive Escherichia coli isolate collected from an outpatient in Chile*. Braz J Infect Dis, 2019.
53. Xavier, B.B., et al., *Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in Escherichia coli, Belgium, June 2016*. Euro Surveill, 2016. **21**(27).
54. Yin, W., et al., *Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene mcr-3 in Escherichia coli*. MBio, 2017. **8**(3).
55. Carattoli, A., et al., *Novel plasmid-mediated colistin resistance mcr-4 gene in Salmonella and Escherichia coli, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016*. Euro Surveill, 2017. **22**(31).
56. Borowiak, M., et al., *Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, mcr-5, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi B*. J Antimicrob Chemother, 2017. **72**(12): p. 3317-3324.
57. AbuOun, M., et al., *mcr-1 and mcr-2 (mcr-6.1) variant genes identified in Moraxella species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015*. J Antimicrob Chemother, 2018. **73**(10): p. 2904.

58. Wang, X., et al., *Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, mcr-8, in NDM-producing Klebsiella pneumoniae*. *Emerg Microbes Infect*, 2018. **7**(1): p. 122.
59. Yang, Y.Q., et al., *Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-7.1 in Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*, 2018. **73**(7): p. 1791-1795.
60. Jeannot, K., A. Bolard, and P. Plesiat, *Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms*. *Int J Antimicrob Agents*, 2017. **49**(5): p. 526-535.
61. Irrgang, A., et al., *Prevalence of mcr-1 in E. coli from Livestock and Food in Germany, 2010-2015*. *PLoS One*, 2016. **11**(7): p. e0159863.
62. Shen, Z., et al., *Early emergence of mcr-1 in Escherichia coli from food-producing animals*. *Lancet Infect Dis*, 2016. **16**(3): p. 293.
63. Pham Thanh, D., et al., *Inducible colistin resistance via a disrupted plasmid-borne mcr-1 gene in a 2008 Vietnamese Shigella sonnei isolate*. *J Antimicrob Chemother*, 2016. **71**(8): p. 2314-7.
64. Haenni, M., et al., *Co-occurrence of extended spectrum beta lactamase and MCR-1 encoding genes on plasmids*. *Lancet Infect Dis*, 2016. **16**(3): p. 281-2.
65. Malhotra-Kumar, S., et al., *Colistin resistance gene mcr-1 harboured on a multidrug resistant plasmid*. *Lancet Infect Dis*, 2016. **16**(3): p. 283-4.
66. Zurfuh, K., et al., *Occurrence of the Plasmid-Borne mcr-1 Colistin Resistance Gene in Extended-Spectrum-beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in River Water and Imported Vegetable Samples in Switzerland*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016. **60**(4): p. 2594-5.
67. Yang, D., et al., *The Occurrence of the Colistin Resistance Gene mcr-1 in the Haihe River (China)*. *Int J Environ Res Public Health*, 2017. **14**(6).
68. Wu, J., et al., *Evidence for Environmental Dissemination of Antibiotic Resistance Mediated by Wild Birds*. *Front Microbiol*, 2018. **9**: p. 745.
69. Drali, R., et al., *Emergence of mcr-1 plasmid-mediated colistin-resistant Escherichia coli isolates from seawater*. *Sci Total Environ*, 2018. **642**: p. 90-94.
70. Ovejero, C.M., et al., *Spread of mcr-1-carrying Enterobacteriaceae in sewage water from Spain*. *J Antimicrob Chemother*, 2017. **72**(4): p. 1050-1053.
71. *AMR\_genotypes:mcr-1*. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, 2019.
72. *MCR-1 family phosphoethanolamine--lipid A transferase gene family*. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, 2019.
73. Di Pilato, V., et al., *mcr-1.2, a New mcr Variant Carried on a Transferable Plasmid from a Colistin-Resistant KPC Carbapenemase-Producing Klebsiella pneumoniae Strain of Sequence Type 512*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016. **60**(9): p. 5612-5.
74. Yang, Y.Q., et al., *Colistin Resistance Gene mcr-1 and Its Variant in Escherichia coli Isolates from Chickens in China*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017. **61**(5).
75. Zhao, F., et al., *Remarkable Diversity of Escherichia coli Carrying mcr-1 from Hospital Sewage with the Identification of Two New mcr-1 Variants*. *Front Microbiol*, 2017. **8**: p. 2094.
76. Tijet, N., et al., *Molecular characteristics of mcr-1-carrying plasmids and new mcr-1 variant recovered from polyclonal clinical Escherichia coli from Argentina and Canada*. *PLoS One*, 2017. **12**(7): p. e0180347.
77. Lu, X., et al., *MCR-1.6, a New MCR Variant Carried by an IncP Plasmid in a Colistin-Resistant Salmonella enterica Serovar Typhimurium Isolate from a Healthy Individual*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017. **61**(5).

78. Abdul Momin, H.F., Liakopoulos,A., Bean,D.C. and wareham,D.W., *Phosphoethanolamine transferases (Unpublished)*. National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA, 2017.
79. Manageiro, V., et al., *IncX4 Plasmid Carrying the New mcr-1.9 Gene Variant in a CTX-M-8-Producing Escherichia coli Isolate Recovered From Swine*. Front Microbiol, 2019. **10**: p. 367.
80. Deshpande, L., Hubler,C., Davis,A. and Castanheira,M., *Colistin resistance determinant mcr-1.11 (Unpublished)*. National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA, 2018.
81. Nishino, Y., Shimojima,Y., Suzuki,Y., Ida,M., Fukui,R., Kuroda,S., Hirai,A. and Sadamasu,K., *A new variant of mcr-1 in Escherichia coli isolated from pork (Unpublished)*. National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA, 2018.
82. Alba, P., et al., *Molecular Epidemiology of mcr-Encoded Colistin Resistance in Enterobacteriaceae From Food-Producing Animals in Italy Revealed Through the EU Harmonized Antimicrobial Resistance Monitoring*. Front Microbiol, 2018. **9**: p. 1217.
83. Duggett, N., *Escherichia coli mcr-1 gene for phosphoethanolamine--lipid A transferase, strain Escherichia coli, isolate SFV97, allele mcr-1.14*. ANIMAL AND PLANT HEALTH AGENCY, Woodham Lane, New Haw, Addlestone, United Kingdom, 2018.
84. GenBank, *Klebsiella pneumoniae KP138 mcr-1 gene for phosphoethanolamine--lipid A transferase MCR-1.15, complete CDS*. National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA, 2018.
85. Zhu, Y., Zhang,W., Schwarz,S. and Liu,S., *A novel mcr-1 variant mcr-1.16 identified from Escherichia coli isolate EC32 from chicken in China (Unpublished)*. National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA, 2019.
86. Zhu, Y., Zhang,W., Schwarz,S. and Liu,S., *A novel mcr-1 variant mcr-1.17 identified from Escherichia coli isolate ECK2 from dairy cow in China (Unpublished)*. National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA, 2019.
87. GenBank, *Escherichia coli sc12-96 mcr-1 gene for phosphoethanolamine--lipid A transferase MCR-1.18, complete CDS*. National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA, 2019.
88. Hu, Y., Fanning,S. and Li,F., *mcr-1.19, a New mcr Variant Carried by an IncHI2 Plasmid in a Colistin-Resistant and ESBL positive Salmonella enterica Serovar Typhimurium Isolate from Egg sample in (Unpublished)*. National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA, 2019.
89. GenBank, *Escherichia coli mcr-1 gene for phosphoethanolamine--lipid A transferase MCR-1.20, complete CDS*. National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA, 2019.
90. GenBank, *Escherichia coli QHXN2016-F200 mcr-1 gene for phosphoethanolamine--lipid A transferase MCR-1.21, complete CDS*. National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA, 2019.
91. *AMR\_genotypes:mcr-1.2*. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, 2019.
92. NIH, *gene\_family:(mcr-3)*. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, 2019.

93. NIH, *AMR\_genotypes:mcr-3.5*. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, 2019.
94. GenBank, *Shigella sonnei ECCTRSRTH02 mcr-3 gene for phosphoethanolamine--lipid A transferase MCR-3.2, complete CDS*. National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA, 2017.
95. Ling, Z., et al., *Chromosome-Mediated mcr-3 Variants in Aeromonas veronii from Chicken Meat*. Antimicrob Agents Chemother, 2017. **61**(11).
96. GenBank, *Klebsiella pneumoniae PB517 mcr-3 gene for phosphoethanolamine--lipid A transferase MCR-3.4, complete CDS*. National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA, 2018.
97. Liu, L., Feng, Y. and Zong, Z., *The complete sequence of plasmid pMCR3\_WCHEC-LL123 (Unpublished)*. National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA, 2017.
98. Eichhorn, I., et al., *Identification of novel variants of the colistin resistance gene mcr-3 in Aeromonas spp. from the national resistance monitoring programme GERM-Vet and from diagnostic submissions*. J Antimicrob Chemother, 2018. **73**(5): p. 1217-1221.
99. Wang, X., et al., *Presence of an mcr-3 Variant in Aeromonas caviae, Proteus mirabilis, and Escherichia coli from One Domestic Duck*. Antimicrob Agents Chemother, 2018. **62**(2).
100. Xiang, R., Liu, B., Zhang, A., Ye, X., Yang, Y., Cheng, Y. and Wang, H., *The identification of a new mcr-3 variant mcr-3.11 (Unpublished)*. National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA, 2018.
101. Kieffer, N., et al., *Genetic and Functional Characterization of an MCR-3-Like Enzyme-Producing Escherichia coli Isolate Recovered from Swine in Brazil*. Antimicrob Agents Chemother, 2018. **62**(7).
102. GenBank, *Aeromonas caviae ZJ33-3 mcr-3 gene for phosphoethanolamine--lipid A transferase MCR-3.13, complete CDS*. National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA, 2018.
103. GenBank, *Aeromonas bivalvium ZJ19-2 mcr-3 gene for phosphoethanolamine--lipid A transferase MCR-3.14, complete CDS*. National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA, 2018.
104. GenBank, *Aeromonas media Z1-6 mcr-3 gene for phosphoethanolamine--lipid A transferase MCR-3.15, complete CDS*. National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA, 2018.
105. GenBank, *Aeromonas salmonicida ZJ5-5 mcr-3 gene for phosphoethanolamine--lipid A transferase MCR-3.16, complete CDS*. National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA, 2018.
106. GenBank, *Aeromonas allosaccharophila Z9-6 mcr-3 gene for phosphoethanolamine--lipid A transferase MCR-3.17, complete CDS*. National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA, 2018.
107. GenBank, *Aeromonas caviae ZJ66-1 mcr-3 gene for phosphoethanolamine--lipid A transferase MCR-3.18, complete CDS*. National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA, 2018.
108. GenBank, *Citrobacter freundii D36-1 mcr-3 gene for phosphoethanolamine--lipid A transferase MCR-3.19, complete CDS*. National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA, 2018.

109. GenBank, *Klebsiella pneumoniae* PB395 *mcr-3* gene for phosphoethanolamine--lipid A transferase MCR-3.20, complete CDS. National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA, 2018.
110. Hadjadj, L.a.R., J.-M., *Mcr3* alleles (Unpublished). National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA, 2019.
111. GenBank, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* KPCTRSRTH02 *mcr-3* gene for phosphoethanolamine--lipid A transferase MCR-3.22, complete CDS. National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA, 2019.
112. GenBank, *Klebsiella pneumoniae* KPCTRSRTH08 *mcr-3* gene for phosphoethanolamine--lipid A transferase MCR-3.23, complete CDS. National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA, 2018.
113. GenBank, *Shigella sonnei* ECSW+12 *mcr-3* gene for phosphoethanolamine--lipid A transferase MCR-3.24, complete CDS. National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA, 2018.
114. GenBank, *Aeromonas veronii* 126-14 *mcr-3* gene for phosphoethanolamine--lipid A transferase MCR-3.25, complete CDS. National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA, 2018.
115. Chan, Y.X., Chua, H.K. and Chan, G.K., Draft genome of *Aeromonas hydrophila* strain 173 (Unpublished). National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA, 2019.
116. Yang, Q.E., High prevalence of co-existed *mcr-1*- and *mcr-3*- plasmids in multidrug-resistant *Escherichia coli* from human in Vietnam (Unpublished). National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA, 2019.
117. NIH, *gene\_family:(mcr-4)*. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, 2019.
118. Hammerl, J.A., Diversity of *mcr-4* gene alleles (Unpublished). National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA, 2018.
119. Teo, J.W.P., et al., *mcr-3* and *mcr-4* Variants in Carbapenemase-Producing Clinical Enterobacteriaceae Do Not Confer Phenotypic Polymyxin Resistance. *J Clin Microbiol*, 2018. **56**(3).
120. Garcia, V., et al., Co-occurrence of *mcr-1*, *mcr-4* and *mcr-5* genes in multidrug-resistant ST10 Enterotoxigenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Spain (2006-2017). *Int J Antimicrob Agents*, 2018. **52**(1): p. 104-108.
121. Rebelo, A.R., et al., Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Euro Surveill*, 2018. **23**(6).
122. NIH, *gene\_family:(mcr-5)*. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, 2019.
123. Hammerl, J.A., et al., *mcr-5* and a novel *mcr-5.2* variant in *Escherichia coli* isolates from food and food-producing animals, Germany, 2010 to 2017. *J Antimicrob Chemother*, 2018. **73**(5): p. 1433-1435.
124. Fernandes, M.R., et al., Novel *mcr-5.3* variant in a CTX-M-8-producing *Escherichia coli* ST711 isolated from an infected horse. *J Antimicrob Chemother*, 2018. **73**(12): p. 3520-3522.
125. Xiang, R.a.W., H., Identified a colistin-resistance gene *mcr-8.2* in *klebsiella pneumoniae* (Unpublished). National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA, 2018.

126. EUCAST, *Antimicrobial wild type distributions of microorganisms, Species: Escherichia coli (Method: Disk diffusion)*.
127. Pogue, J.M., et al., *Appropriate antimicrobial therapy in the era of multidrug-resistant human pathogens*. Clin Microbiol Infect, 2015. **21**(4): p. 302-12.
128. Perry, J., N. Waglechner, and G. Wright, *The Prehistory of Antibiotic Resistance*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2016. **6**(6).
129. Pappa, O., et al., *Typing of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from Greek water samples by three typing methods: serotyping, Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)*. Water Sci Technol, 2013. **67**(6): p. 1380-8.
130. Pappa, O., et al., *Antibiotic resistance profiles of Pseudomonas aeruginosa isolated from various Greek aquatic environments*. FEMS Microbiol Ecol, 2016. **92**(6): p. fiw086.
131. ΕΟΔΥ, *Ημερίδα για τη Μικροβιακή Αντοχή: Η διαχρονικότερη κρίση Δημόσιας Υγείας στην Ελλάδα*. Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας (ΕΟΔΥ), 2019.
132. Dimitra, E.C.a.P., *Monitoring and documenting systemic and health effects of health reforms in Greece*. World Health Organization, 2019.
133. Economou Charalampos, K.D., Karanikolos Marina, Maresso Anna *Health Systems in Transition, Greece: Health system review*. World Health Organization 2017.
134. Brechet, C., et al., *Wastewater treatment plants release large amounts of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli into the environment*. Clin Infect Dis, 2014. **58**(12): p. 1658-65.
135. Murray R.P., R.K.S., Pfaller M.A, *Medical Microbiology*. Elsevier Inc., 2012. **6th Edition**.
136. Σανδαλάκης, Β., "Ποιότητα νερών - Ο ρόλος του περιφερειακού εργαστηρίου Δημόσιας Υγείας". ΚΕΕΛΠΝΟ, 2014.
137. 3282/B/19-9-2017, Κ.Υ.Α.Γ.Δ.Γ.ο.-Φ., *Ποιότητα νερού ανθρώπινης κατανάλωσης σε συμμόρφωση προς τις διατάξεις της οδηγίας 98/8/ΕΚ του Συμβουλίου της Ευρωπαϊκής Ένωσης, της 3ης Νοεμβρίου 1998 όπως τροποποιήθηκε με την οδηγία (ΕΕ) 2015/1787 (L260, 7.10.2015)*. Τράπεζα Πληροφοριών Νομοθεσίας, 2017.
138. Li, C., et al., *Characterization of bacterial community dynamics in a full-scale drinking water treatment plant*. J Environ Sci (China), 2017. **51**: p. 21-30.
139. Ramirez-Castillo, F.Y., et al., *Waterborne pathogens: detection methods and challenges*. Pathogens, 2015. **4**(2): p. 307-34.
140. Pandey, P.K., et al., *Contamination of water resources by pathogenic bacteria*. AMB Express, 2014. **4**: p. 51.
141. University of Sao Paulo, M.F., *Pathogen: environmental/food/other sample from Escherichia coli*. National Center for Biotechnology Information, 2016.
142. Peking University People's Hospital, R.W., *Pathogen: clinical or host-associated sample from Escherichia coli*. National Center for Biotechnology Information, 2017.
143. Peking University People's Hospital, R.W., *Pathogen: environmental/food/other sample from Escherichia coli*. National Center for Biotechnology Information, 2017.
144. Sichuan University, K.Y., *Microbe sample from Escherichia coli*. National Center for Biotechnology Information, 2018.
145. Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, C.Y., *Pathogen: clinical or host-associated sample from Vibrio parahaemolyticus*. National Center for Biotechnology Information, 2017.

146. University of Malaya, P.L.Y., *Escherichia coli* E13. National Center for Biotechnology Information, 2014.
147. Drali, R.a.D., A., *Escherichia coli* strain M49 NODE\_91\_length\_2719\_cov\_22.2241, whole genome shotgun sequence. Bacteriology, Institut Pasteur, Route du Petit Staoueli, Dely Brahim, Algiers 16000, Algeria, 2019.
148. Mekonnen, M.M. and A.Y. Hoekstra, *Four billion people facing severe water scarcity*. Sci Adv, 2016. **2**(2): p. e1500323.
149. Mpandeli, S., et al., *Climate Change Adaptation through the Water-Energy-Food Nexus in Southern Africa*. Int J Environ Res Public Health, 2018. **15**(10).
150. K., L.R., *Lake*. ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA, 2019.
151. Kim Rutledge, M.M., Diane Boudreau, Tara Ramroop, Santani Teng, Erin Sprout, Hilary Costa, Hilary Hall, Jeff Hunt, *Lake*. National Geographic, 2011.
152. ECDC, E.a.E., *ECDC /EFSA /EMA first joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals*. EFSA Journal, 2015.