

# Mehanizmi rezistencije na kolistin u *Acinetobacter baumannii* izoliranih iz otpadnih voda

---

Kosier, Andrea

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:130241>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Andrea Kosier

**Mehanizmi rezistencije na kolistin u**  
***Acinetobacter baumannii***  
**izoliranih iz otpadnih voda**

Završni rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Andrea Kosier

**Mechanisms of colistin resistance in**  
***Acinetobacter baumannii***  
**isolated from wastewater**

Bachelor thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj završni rad izrađen je u sklopu studijskog programa Molekularne biologije na Mikrobiološkom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Jasne Hrenović.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Završni rad

# Mehanizmi rezistencije na kolistin u *Acinetobacter baumannii* izoliranih iz otpadnih voda

Andrea Kosier

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji višestruko rezistentni izolati bakterije *Acinetobacter baumannii* najveća su prijetnja ljudskom zdravlju. Gubitak dostupnih antibiotika za liječenje infekcija uzrokovanih višestruko rezistentnim *A. baumannii* oživio je klinički interes za kolistin kao antibiotik posljednje linije obrane. Međutim, slučajevi kolistin-rezistentnih bakterija u bolnicama i otpadnim vodama već su zabilježeni. Otpadne vode pružaju bakterijama dobre uvjete za horizontalni prijenos gena te predstavljaju potencijalan put širenja gena rezistencije i rezistentnih izolata po cijelom ekosustavu. U ovome su radu prikupljeni podaci o mehanizmima rezistencije na kolistin u *A. baumannii* izoliranih iz otpadnih voda. U izolatima iz otpadnih voda pronađene su mutacije koje su karakteristične za kliničke izolate rezistentne na kolistin, a to su mutacije u *pmrCAB* operonu i u genima *lpxA*, *lpxC* i *lpxD* koje redom uzrokuju modifikaciju lipopolisaharida, odnosno potpuni gubitak lipopolisaharida vanjske membrane. Nadalje, u vodenom okolišu, premda ne u izolatima *A. baumannii* iz otpadnih voda, uočena je sveprisutnost plazmidnih *mcr* gena odgovornih za kolistinsku rezistenciju. Pretpostavlja se da rezistencija na kolistin nije glavna uloga tih gena, već oni služe za obranu bakterija od bakteriofaga i kationskih antimikrobnih peptida kralježnjaka i beskrležnjaka. Također, pronađeni su sojevi koji su vjerojatno postali kolistin-rezistentni zbog razvoja unakrsne rezistencije pod utjecajem drugih pozitivno nabijenih onečišćivača iz okoliša.

Ključne riječi: *Acinetobacter baumannii*, kolistin, antibiotska rezistencija, otpadne vode

(40 stranica, 4 slike, 144 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: prof. dr. sc. Jasna Hrenović

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Bachelor thesis

# Mechanisms of colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* isolated from wastewater

Andrea Kosier

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

World Health Organization declared multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as one of the greatest threats to human health. Continuous loss of effective antibiotics for therapies of multidrug-resistant *A. baumannii* has revived clinical interest in colistin as a last-line antibiotic. However, cases of colistin-resistant bacteria have already been reported in hospitals and wastewaters. Wastewaters represent hotspots for horizontal gene transfer and a potential pathway for spreading resistant genes and isolates throughout the ecosystem. This thesis collected data on the mechanisms of *A. baumannii* colistin resistance isolated from wastewaters. Characteristic mutations found in colistin-resistant clinical isolates, include either modification or complete loss of lipopolysaccharides due to mutations in the *pmrCAB* operon and *lpxA*, *lpxC* and *lpxD*, respectively, were found in isolates from wastewaters. Furthermore, owing to a large presence of plasmid *mcr* genes observed in the aquatic environment, although not in *A. baumannii* isolates from wastewater, it's believed that the main role of these genes isn't resistance to colistin as it was previously assumed, hence they play a role in the bacterial defense system against bacteriophages and cationic antimicrobial peptides of vertebrates and invertebrates. Also, the development of cross-resistance to colistin, probably under the influence of other positively charged pollutants, was observed.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, colistin, antibiotic resistance, wastewater

(40 pages, 4 figures, 144 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: prof. dr. sc. Jasna Hrenović

# Sadržaj

<b>1. Uvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Taksonomija i mikrobiološke karakteristike bakterije <i>Acinetobacter baumannii</i></b> .....	<b>2</b>
2. 1. <i>Acinetobacter baumannii</i> rezistentni na antibiotike .....	3
<b>3. Otpadne vode – put širenja antibiotske rezistencije</b> .....	<b>4</b>
3. 1. Kolistin-rezistentni izolati <i>Acinetobacter baumannii</i> iz otpadnih voda .....	6
<b>4. Antibiotik kolistin</b> .....	<b>6</b>
4. 1. Struktura kolistina .....	6
4. 2. Mehanizam djelovanja kolistina .....	8
4. 3. Uporaba kolistina .....	10
<b>5. Mehanizmi rezistencije <i>Acinetobacter baumannii</i> na kolistin</b> .....	<b>11</b>
5. 1. Opći mehanizmi rezistencije u <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	11
5. 2. Mehanizmi rezistencije na kolistin u <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	13
5. 2. 1. Rezistencija na kolistin posredovana kromosomskim genima .....	13
5. 2. 1. 1. Modifikacija lipida A lipopolisaharida .....	13
5. 2. 1. 2. Potpuni gubitak lipopolisaharida .....	15
5. 2. 1. 3. Promjene propusnosti i asimetrije vanjske membrane .....	15
5. 2. 1. 4. Promjene u metabolizmu osmoprotektivnih aminokiselina .....	17
5. 2. 1. 5. Efluks pumpe .....	19
5. 2. 1. 6. Otpuštanje vezikula u izvanstanični okoliš .....	20
5. 2. 2. Rezistencija na kolistin posredovana plazmidnim genima .....	21
5. 3. Mehanizmi rezistencije na kolistin u <i>Acinetobacter baumannii</i> izdvojenih iz otpadnih voda ..	22
5. 3. 1. Mehanizmi rezistencije slični onima u kliničkih izolata .....	22
5. 3. 2. Unakrsna rezistencija .....	24
<b>6. Zaključak</b> .....	<b>25</b>
<b>7. Literatura</b> .....	<b>26</b>
<b>8. Životopis</b> .....	<b>40</b>

# 1. Uvod

*Acinetobacter baumannii* je Gram-negativni kokobacil koji uzrokuje bolničke infekcije širom svijeta. Zahvaljujući brzom stjecanju rezistencije na antibiotike pripada bakterijama rezistentnim na više klasa antibiotika, koji se dijele na višestruko rezistentne (engl. *multidrug resistant* – MDR), prošireno rezistentne (engl. *extensive drug resistant* – XDR) i sveopće rezistentne (engl. *pandrug resistant* – PDR) koje prijete postojećoj antibiotskoj terapiji (Karakonstantis i sur. 2020). Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization* – WHO) uvrstila je karbapenem-rezistentne *A. baumannii* na listu prioriternih rezistentnih bakterija koje zahtijevaju istraživanje i razvoj novih antibiotika, budući da je antibiotska rezistencija jedan od vodećih problema u zdravstvenom sustavu i prijetnja svjetskom zdravlju i razvoju. Bakterijska rezistencija na antibiotike javlja se neovisno o čovjeku, ali se proces ubrzava zlouporabom i prekomjernom primjenom antibiotika u humanoj i veterinarskoj medicini. S obzirom da antibiotici postaju sve manje učinkoviti, sve je veći broj infekcija uzrokovanih s MDR *A. baumannii* teže izliječiti. To pak uzrokuje dulje hospitalizacije i liječenje, veće medicinske troškove, povećan mortalitet i morbiditet te naposljetku nastaju negativne javno-zdravstvene posljedice i globalno-gospodarska opterećenja (World Health Organization 2017).

Kolistin je antibiotik posljednje linije obrane koji se koristi za liječenje infekcija uzrokovanih MDR Gram-negativnim bakterijama, uključujući infekcije karbapenem-rezistentnim *A. baumannii*. Međutim, već su zabilježeni slučajevi kolistin-rezistentnih bakterija i širenja pripadajućih gena rezistencije među bakterijama (Hussein i sur. 2021), tako da postoji kritična potreba za učinkovitim mjerama prevencije uporabe antibiotika na globalnoj razini kako bi se kontrolirao porast i širenje tih gena te posljedične infekcije, s obzirom da je kolistin često jedini učinkoviti antibiotik protiv MDR *A. baumannii* i drugih patogena (World Health Organization 2017).

Pojava bakterijske rezistencije na antibiotike dugo se smatrala kliničkim problemom, ali su istraživanja izvanbolničkih okoliša otkrila važne nekliničke čimbenike u širenju gena antibiotske rezistencije (Berglund 2015). Tako se postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda smatraju jednim od najvećih izvora gena rezistencije i rezistentnih izolata otpuštenih u okoliš budući da prikupljanje vode iz kanalizacije te uvjeti pročišćavanja stvaraju optimalan okoliš za horizontalni prijenos gena i selekciju bakterija rezistentnih na antibiotike. U takvim postrojenjima postoje brojni neriješeni problemi u pogledu mikrobiološkog pročišćavanja voda, pa izlazne vode iz takvih postrojenja često u okoliš ispuštaju gene rezistencije i rezistentne bakterije, a procjenjuje se da gotovo 99% ukupne bakterijske zajednice u



pročišćenju otpadnoj vodi ima potencijal stjecanja rezistencije na bilo koju vrstu antibiotika (Rizzo i sur. 2013). Takvi izolati u okolišu predstavljaju rizik za javno zdravlje i izvor sporadičnih infekcija u ljudi i životinja izloženih otpadnim vodama (Jovcic i sur. 2021).

Iako trenutno kolistin-rezistentni *A. baumannii* čine manje od 1% kliničkih izolata, oni predstavljaju značajan izazov javnom zdravstvu (Lima i sur. 2018). Postoji puno dokaza o karbapenem-rezistentnim *A. baumannii* izoliranim iz otpadnih voda, ali još nije utvrđeno puno slučajeva izolata *A. baumannii* iz otpadnih voda rezistentnih na kolistin, tako da su molekularni mehanizmi rezistencije na karbapeneme ekoloških izolata u *A. baumannii* dobro opisani, dok s druge strane nema puno podataka o mehanizmima rezistencije na kolistin (Jovcic i sur. 2021). Cilj je ovog rada prikupiti dostupne podatke o mehanizmima rezistencije na kolistin u *A. baumannii* izoliranih iz otpadnih voda kako bi se bolje razumio razvoj bakterijske rezistencije na kolistin, preveniralo njezino nastajanje te kako bi se poboljšale strategije u produljenju kliničke uporabe kolistina kao antibiotika posljednje linije obrane.

## **2. Taksonomija i mikrobiološke karakteristike bakterije *Acinetobacter baumannii***

Bakterija *A. baumannii* pripada rodu *Acinetobacter*, iz porodice *Moraxellaceae*, kojeg karakteriziraju kratki, pleomorfni Gram-negativni kokobacili. Rod *Acinetobacter* također opisuju nepokretni i nesporogeni obligatni aerobi koji ne fermentiraju šećere i koji su na biokemijskim testovima oksidaza-negativni i katalaza-pozitivni. Njihova DNA sadrži od 39% do 47% gvanozinskih i citozinskih parova baza. Bakterije roda *Acinetobacter* stvaraju glatke, sivkasto-bijele i sluzave kolonije na 37°C na čvrstim podlogama koje se obično koriste u dijagnostičke svrhe, poput ovčjeg krvnog agara ili triptičnog sojinog agara (Peleg i sur. 2008).

Bakterije roda *Acinetobacter* pojavljuju se u tlu i vodi (Baumann 1968), kanalizaciji (Warskow i Juni 1972), svježim i smrznutim ribljim proizvodima (Gennari i Stegagno 1985), sirovom i zamrznutom povrću (Gennari i Stegagno 1986) te pokvarenom mesu, mlijeku i siru (Gennari i sur. 1992). Neke su vrste dio fiziološke flore ljudske kože, posebice u vlažnim područjima poput aksila, prepona, nožnih prstiju te dišnog sustava (Bergogne-Bitirezin i Towner 1996).

Nakon prvog opisa roda početkom 20. stoljeća, ova skupina prošla je izvanrednu i složenu taksonomsku povijest. Taksonomija ove skupine stalno se nadopunjavala i pročišćavala od kada su 1980-

ih bakterije ovog roda prepoznate kao bolnički patogeni (Dijkshoorn i sur. 2007). U svojem istraživanju Bouvet i Grimont (1987) na temelju DNA-DNA hibridizacije izdvojili su 12 DNA skupina, odnosno genovrsta, a Vijayakumar i suradnici (2019) pripisali su rodu *Acinetobacter* 59 vrsta od kojih 11 vrsta ima definirana imena, a 15 vrsta okvirne opise. Na primjer, kompleks *Acinetobacter calcoaceticus* – *Acinetobacter baumannii*, poznatiji kao ACB kompleks, sastoji se od 4 vrste: *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii* te *A. nosocomialis*, koje su blisko povezane i međusobno ih je teško razlikovati po fenotipskim svojstvima (Gerner-Smidt 1992). U istraživanjima Nemeca i suradnika (2015) te Cosgaya i suradnika (2016) u ACB kompleks ubrojene su još dvije vrste *Acinetobacter seifertii* i *Acinetobacter dijkshoorniae*, tako da se ACB kompleks sastoji od pet *Acinetobacter* vrsta povezanih s ljudskim bolestima (*A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. seifertii* i *A. dijkshoorniae*) i od jedne okolišne vrste najčešće izolirane iz tla (*A. calcoaceticus*).

Identifikacija bakterija *Acinetobacter* na razini vrste i dalje je komplicirana i izazovna. Bakterije *A. baumannii*, *A. pittii* i *A. nosocomialis* još uvijek je teško precizno identificirati u većini laboratorija i predstavljaju tri klinički najznačajnije vrste iz roda *Acinetobacter* budući da uzrokuju širok spektar infekcija stečenih unutar i izvan bolničkog okruženja (Dijkshoorn i sur. 2007), uključujući meningitis, bakteremije, infekcije mokraćnog trakta i kože te respiratorne i gastrointestinalne infekcije (McConnell i sur. 2013). Međutim, Turton i suradnici (2006) pronašli su gen *blaOXA-51* kao pouzdan biomarker za identifikaciju vrste *A. baumannii* unutar ACB kompleksa. Gen je smješten na bakterijskom kromosomu i te bakterije pokazuje slabu hidrolizu karbapenema (Evans i Amyes 2014).

## **2. 1. *Acinetobacter baumannii* rezistentni na antibiotike**

Prevelika zlouporaba antibiotika uzrokovala je pojavu bakterija rezistentnih na više klasa antibiotika (MDR) (Magiorakos i sur. 2012). Bakterija *A. baumannii* pripada ESKAPE bakterijama, zajedno s *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* spp., koje predstavljaju globalnu prijetnju ljudskom zdravlju i terapijski izazov zbog stalne pojave novih rezistentnih sojeva. Stjecanje gena rezistencije ESKAPE bakterija, smanjilo je mogućnosti liječenja ozbiljnih infekcija zbog neuspješne terapije, a povećalo težinu bolesti i stopu smrtnosti (De Oliveira i sur. 2020).

Zbog visoke tolerancije na stresan okoliš i rezistencije na višestruke klase antibiotika, *A. baumannii* preživljava unutar bolnica i širi se kao bolnički patogen osobito u kritično bolesnih pacijenata

što doprinosi povećanju morbiditeta i mortaliteta (Antunes i sur. 2014). Visok rizik zaraze s *A. baumannii* proizlazi iz niza faktora kao što su dug boravak na intenzivnoj njezi i dugotrajna hospitalizacija, prethodno uzimanje antimikrobne terapije, izloženost mehaničkoj ventilaciji, dijaliza, korištenja alata (npr. katetera, endotrahealne sonde ili nazogastrične sonde), veliki i hitni kirurški zahvati, starija životna dob, mala porođajna težina ili nedonoščad (Djordjevic i sur. 2016; Baran i sur. 2008; Lee i sur. 2018, Fukuta i sur. 2013).

Prošireno rezistentna *A. baumannii* (XDR) je MDR izolat rezistentan na skoro sve antimikrobne lijekove, osim na polimiksine i tigeciklin, dok je sveopće rezistentna *A. baumannii* (PDR) XDR izolat rezistentan na sve antimikrobne lijekove, uključujući polimiksine i tigeciklin (Karakonstantis i sur. 2020).

Karbapenemi su bili prevladavajući antibiotici za liječenje MDR *A. baumannii* infekcija, ali je njihova prekomjerna uporaba tijekom posljednjih godina dovela do povećane pojave rezistencije na njih (Nordmann i Poirel 2019) tako da je 2017. godine Svjetska zdravstvena organizacija rangirala karbapenem-rezistentne *A. baumannii* (engl. *carbapenem resistant A. baumannii* – CRAB) kao primarni prioritet za istraživanje i razvoj antibiotika (World Health Organization 2017). Danas su za liječenje CRAB infekcija, kao antibiotici zadnje linije obrane, dostupni tigeciklin, monociklin i polimiksini, uključujući kolistin (Yang i sur. 2019).

Prema Institutu za kliničke i laboratorijske standarde (*The Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI*) i prema Europskom odboru za ispitivanje osjetljivosti na antimikrobne lijekove (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) granice osjetljivosti na kolistin za *A. baumannii* definirane su s minimalnim inhibitornim koncentracijama: MIC  $\leq$  2 mg / L, što znači da su bakterije, koje prežive navedenu koncentraciju kolistina, rezistentne (Satlin i sur. 2020).

### **3. Otpadne vode – put širenja antibiotske rezistencije**

Bakterije rezistentne na antibiotike i pripadajući geni rezistencije nastaju i šire se među ljudima, životinjama, biljkama i okolišem (tlom, vodom i zrakom) (Larsson i sur. 2018). Svjetska zdravstvena organizacija predložila je plan za borbu protiv širenja antibiotske rezistencije na globalnoj razini koji obuhvaća svaku domenu u kojoj ljudi interferiraju s okolišem (World Health Organization 2020) te se iz tog razloga nadziru i prate geografski i vremenski trendovi širenja takvih gena kako bi se predvidjeli i razumjeli utjecaji rezistentnih sojeva na ljudsko zdravlje (Berendonk i sur. 2015).

Jedan od najvažnijih puteva za širenje antibiotske rezistencije u okoliš jesu postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda budući da ona prikupljanju urbane i ruralne otpadne vode koje čine velik udio ljudskog otpada (Higgins i sur. 2018). U zemljama u razvoju, postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda dizajnirana su prvenstveno za uklanjanje organskih onečišćenja dok su mikrobiološka onečišćenja u drugom planu (Bhatt i sur. 2020). Međutim, s obzirom da u takva postrojenja ulaze otpadne vode iz različitih izvora, poput kućanstava, industrija, bolnica i farmi, ona sadrže bakterije iz različitih okoliša, stoga mikrobiom takvih postrojenja ima osobine mikrobioma ljudske populacije koji uključuje bakterije rezistentne na antibiotike te pripadajuće gene rezistencije (Rizzo i sur. 2013).

U takvim postrojenjima bakterije iz različitih okoliša mogu stupiti u kontakt s drugim bakterijama (npr. ljudskim patogenima), horizontalno izmijeniti gene (engl. *horizontal gene transfer* – HGT) te tako proširiti distribuciju gena rezistencije unutar mikrobne zajednice (Martínez 2009). HGT obuhvaća konjugaciju, transformaciju i transdukciju, a ti procesi olakšani su visokim koncentracijama bakterija i njihovim bliskim kontaktom (Smets i sur. 1990). Ako se geni rezistencije nalaze na mobilnim genetskim elementima, kao što su plazmidi, transpozoni i integroni, veća je vjerojatnost za prijenos gena između bakterija pa ti geni predstavljaju veći rizik za širenje bakterijske rezistencije na antibiotike (Martínez i sur. 2014). Postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda smatraju se rezervoarom i žarišnim mjestom za HGT i selekciju rezistentnih bakterija i pripadajućih gena rezistencije protiv različitih klasa antibiotika ( $\beta$ -laktama, aminoglikozida, kinolona, tetraciklina, sulfonamida, makrolida), ali cijela dinamika širenja rezistencije na antibiotike u njima još nije posve poznata (Pärnänen i sur. 2019).

Otpadne vode sadrže antibiotike, dezinficijense, biocide, farmaceutike i teške metale koji, čak i pri niskim koncentracijama, mogu stvoriti selekcijski pritisak na bakterije i potaknuti ih na HGT u otpadnim vodama (Aminov 2011). Odabir fenotipova rezistentnih na antibiotike uzrokuju koncentracije navedenih spojeva koje su često manje od propisanih koncentracija prilikom terapije i minimalnih inhibitornih koncentracija (engl. *minimum inhibitory concentration* – MIC). Bioraspoloživost spojeva varira ovisno o spoju, a jedinstvena kombinacija raznovrsnih spojeva u takvom okolišu predstavlja ozbiljnu prijetnju u širenju antibiotske rezistencije među patogenim bakterijama. Samo jedan mobilni genski element često sadrži gene zaslužne za rezistenciju na više od jednog antibiotskog spoja, što znači da se taj gen može odabrati za rezistenciju na širok spektar antibiotika. Nadalje, isti mobilni element također može sadržavati gen za rezistenciju na dezinficijens ili na metal te se tako udio rezistentnih bakterija na antibiotike može povećati selektivnim pritiskom uzrokovanim neantibiotskim tvarima (Pal i sur 2015).

Širenje patogena s genima rezistencije u okoliš predstavlja potencijalnu prijetnju ekosustavu zbog širenja gena rezistencije ljudskih patogena na okolišne bakterije i obrnuto (Dekić i sur. 2018). To predstavlja potencijalni put kolonizacije i neprestane infekcije ljudi i životinja koji su u doticaju s otpadnim vodama. Na primjer, ljudi se mogu zaraziti konzumacijom povrća koje se prethodno zalijevalo nedovoljno pročišćenom vodom (Christou i sur. 2017), plivanjem u kontaminiranim vodama (Leonard i sur. 2015) ili u interakciji s prethodno koloniziranim organizmima, poput riba, koji su čovjeku bitni za komercijalnu, prehrambenu ili rekreacijsku svrhu (Burger 2002).

### **3. 1. Kolistin-rezistentni izolati *Acinetobacter baumannii* iz otpadnih voda**

Prvi okolišni izolat MDR *A. baumannii* srodan kliničkom izolatu pronađen je u nezagađenoj rijeci Seini u Francuskoj (Girlich i sur. 2010), a poslije su iz netretiranih bolničkih otpadnih voda i postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda identificirane klinički značajne *A. baumannii* po cijelom svijetu (Ferreira i sur. 2011; Zhang i sur. 2013; Hrenovic i sur. 2014; Seruga Music sur. 2017; Eze i sur. 2021; Hubeny i sur. 2022).

Jovic i suradnici (2020) izolirali su iz bolničkih otpadnih voda i postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda u Zagrebu u Hrvatskoj sedam klinički značajnih izolata rezistentnih na karbapeneme, fluorokinolone i kolistin koji su preživjeli tijekom 50 dana praćenja u riječnoj vodi.

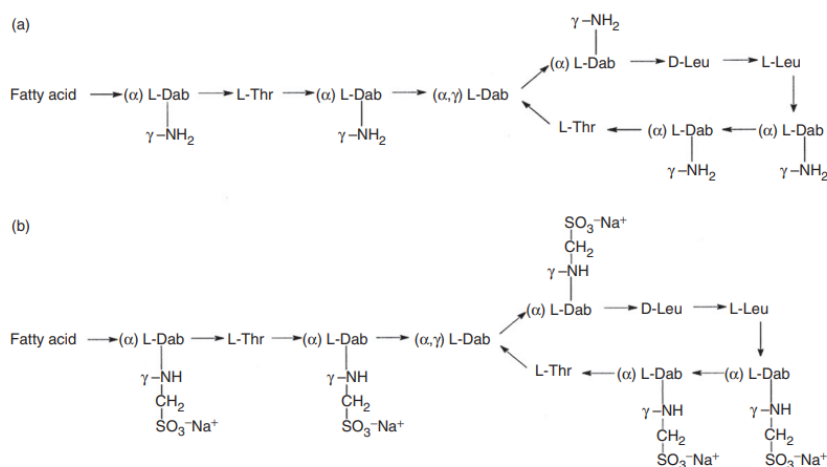
Kittinger i suradnici (2018) u svojem istraživanju proučavali su bakterije roda *Acinetobacter* izolirane iz Dunava. Iako nije uočena *A. baumannii* rezistentna na kolistin, pronađene su bakterije drugih vrsta roda *Acinetobacter* rezistentne na kolistin iz testiranja relativno malog volumena vode.

## **4. Antibiotik kolistin**

### **4. 1. Struktura kolistina**

Kolistin ili polimiksin E je antibiotik koji pripada skupini polimiksina koja je prvi put otkrivena 1947. godine u bakteriji *Paenibacillus polymyxa*. Skupinu polimiksina karakteriziraju ciklički polipeptidni antibiotici, a sačinjavaju je polimiksini A, B, C, D i E (Li i sur. 2005).

Kolistin je multikomponentni polipeptidni antibiotik molekularne mase 1750 Da (Li i sur. 2006a) koji u *P. polymixa* izoliranoj iz tla nastaje kao sekundarni metabolit neribosomalnih peptida (Koyama 1950). Njegovu kemijsku strukturu, koja je prikazana na Slici 1, čini ciklički heptapeptid s aciliranim tripeptidnim bočnim lancem na N-terminalnom kraju repa masne kiseline. Antibiotik kolistin je pri fiziološkom pH pozitivno nabijen te se sastoji od kolistina A (polimiksina E1) i kolistina B (polimiksina E2). Kolistin A u sastavu ima 6-metiloktansku kiselinu, a kolistin B 6-metilheptansku kiselinu (Li i sur. 2006a).



**Slika 1** Struktura kolistina (Li i sur. 2006a) (a) Strukture kolistina A i B; (b) Strukture kolistimetata A i B.

Masna kiselina (engl. *fatty acid*): 6-metiloktanska kiselina za kolistin A i 6-metilheptanska kiselina za kolistin B; Thr = treonin; Leu = leucin; Dab = α, γ - diaminobutanska kiselina; α i γ označavaju odgovarajuću amino skupinu uključenu u peptidnoj vezi.

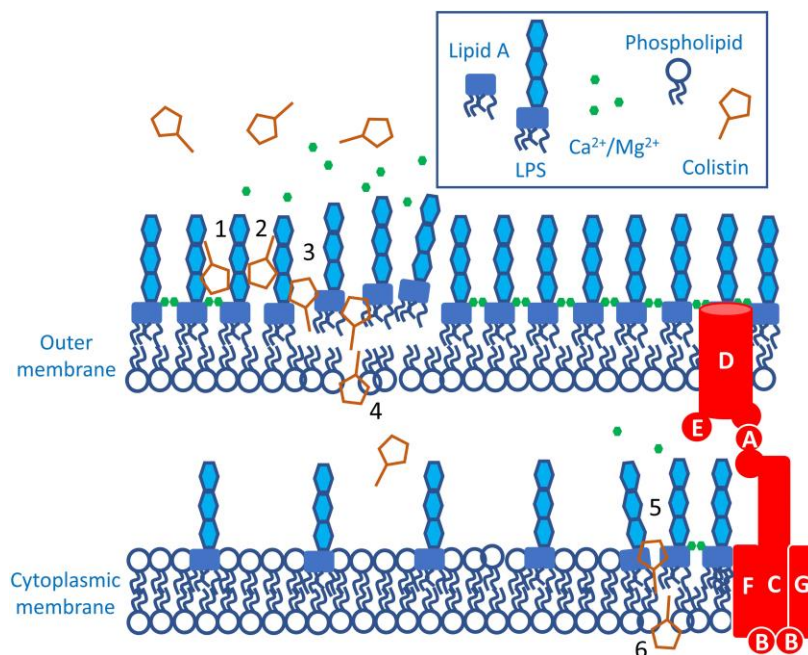
Kolistin sulfat i natrijev kolistimetat (natrijev kolistin metansulfonat, natrijev kolistin sulfometat) dvije su komercijalno dostupne forme kolistina. Kolistin sulfat uzima se oralno i lokalno, dok se natrijev kolistimetat koristi u parenteralnoj i aerosolnoj terapiji. Također, oba se oblika kolistina mogu primjenjivati inhalacijom. Kolistin se obično koristi kao sulfatna sol i tada je u kationskom obliku, dok je kolistimetat, koji se koristi kao natrijeva sol, polianion pri fiziološkom pH (Li i sur. 2006a).

## 4. 2. Mehanizam djelovanja kolistina

Gram-negativne bakterije imaju vanjsku membranu čija se zaštitna funkcija oslanja na prisutnost lipopolisaharida (engl. *lipopolysaccharide* – LPS) koji ograničavaju prodor hidrofobnih i/ili velikih antibiotika (Vidaillac i sur. 2012). Kolistin se kao polikation sa svojim pozitivno nabijenim Dab bočnim ograncima cikličkog heptapeptida elektrostatski veže za negativno nabijeni lipid A lipopolisaharida na vanjskoj membrani Gram-negativnih bakterija (Pristovsek i Kidric 1999) i kompetitivno istiskuje dvovalentne katione ( $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ ) iz fosfatnih skupina membranskih lipida koji inače djeluju kao stabilizatori membrane tvoreći elektrostatske mostove između pojedinačnih lipida A u vanjskom fosfolipidnom dvosloju vanjske membrane. Istiskivanje dvovalentnih kationa dovodi do poremećaja vanjske membrane i unosa polimiksina u periplazmu, potom do narušavanja integriteta vanjske i unutarnje membrane te naposljetku do istjecanja unutarstaničnog sadržaja i smrti bakterije (Falagas i Kasiakou 2005). Kolistinom inducirano istiskivanje dvovalentnih kationa ne ovisi o ulasku polimiksina u stanicu (Gales i sur. 2006) i sam proces može se inhibirati u prisutnosti velike koncentracije tih kationa u izvanstaničnom okolišu (Khadka i sur. 2018). Također, proces ubijanja bakterija kolistinom ne ovisi o metaboličkoj aktivnosti bakterija, što je mogući razlog sporom razvoju rezistencije (Li i sur. 2005).

Baktericidni učinak kolistina izuzetno je brz, međutim, iako postoji puno istraživanja o primarnoj interakciji između kolistina i lipida A LPS-a, naknadne faze u mehanizmu baktericidnog djelovanja kolistina nisu u potpunosti poznate (Ledger i sur. 2022).

Pretpostavlja se da kolistin prolazi kroz destabiliziranu vanjsku membranu putem procesa koji se naziva „samousmjeren unos“ (engl. *self-directed uptake*). U tom procesu interakcijom pozitivno nabijenog peptidnog prstena kolistina i LPS-a dolazi do destabilizacije i slabljenja vanjske membrane te se stvara prostor za ubacivanje acilnog lanca na N-terminalnom kraju masne kiseline kolistina u vanjski dvosloj vanjske membrane. Navedeni lipofilni dio kolistina interferira s hidrofobnim masnim kiselinama iz unutarnjeg dijela lipida A, što dovodi do daljnjeg oštećenja vanjskog dvosloja, odnosno vanjske membrane bakterijske stanice. Smanjenje integriteta vanjske bakterijske membrane omogućuje molekulama kolistina pristup citoplazmatskoj membrani čija je destabilizacija ključna za baktericidno djelovanje (Velkov i sur. 2010). Sabnis i suradnici (2021) u svojem istraživanju pokazali su da poremećaj citoplazmatske membrane posredovan kolistinom ovisi o uspješnom ostvarivanju interakcije između kolistina i LPS-a na vanjskoj membrani jer se od tamo prenosi do citoplazmatske membrane. Opisani mehanizam prikazan je na Slici 2.



**Slika 2** Trenutni model mehanizma djelovanja antibiotika kolistina u *Acinetobacter baumannii* (Ledger i sur. 2022).

Kationski prsten kolistina stupa u interakciju s lipidom A LPS-a (1), što dovodi do kompetitivnog istiskivanja dvovalentnih kationa i slabljenja vanjskog fosfolipidnog sloja vanjske membrane (2). Hidrofobni rep kolistina interferira s vanjskim dvoslojem i dodatno destabilizira vanjsku membranu (3). Kolistin zatim prolazi kroz vanjsku membranu putem samousmjerenog unosa i ulazi u periplazmu (4). Prije nego što ga Lpt sustav (crveno obojan) transportira natrag prema vanjskoj membrani, veže se na LPS u citoplazmatskoj membrani (5), što dovodi do poremećaja citoplazmatske membrane, curenja citoplazmatskog sadržaja i mogućih posljedičnih reakcija poput proizvodnje reaktivnih kisikovih radikala i lize stanice (6).

Oštećenje citoplazmatske membrane posredovano polimiksinom dovoljno je veliko da omogućí ulazak fluorescentne boje propidijeva jodida (Sabnis i sur. 2021) i izlazak malih molekula poput kalijevih iona, aminokiselina, uracila i proteina kao što je beta-galaktozidaza (Dixon i Chopra 1986). Doduše, nije poznato da li se navedene molekule oslobađaju zbog početne interakcije kolistina s LPS-om ili zbog kasnije lize s obzirom da nije jasan mehanizam kako interakcija polimiksina s LPS-om u citoplazmatskoj membrani dovodi do povećanja propusnosti membrane i do posljedične smrti bakterije. Premda



narušavanje integriteta membrane polimiksinom može uzrokovati lizu bakterijske stanice, liza stanice nije nužna za bakterijsku smrt (Sabnis i sur. 2021).

Postupno oštećenje vanjske i citoplazmatske membrane je najrašireniji model mehanizma djelovanja polimiksina, a osim navedenog modela, predloženi su i drugi. Jedan alternativni model je „vezikul-vezikul kontaktni put“ (engl. *vesicle-vesicle contact pathway*) u kojem se polimiksini prisutni u unutarnjem dvosloju vanjske membrane vežu na anionske fosfolipide u citoplazmatskoj membrani i tako stvaraju stabilne interakcije koje uzrokuju brze izmjene fosfolipida između dva dvosloja i strukturne promjene u membranama što dovodi do osmotske neravnoteže i konačno do litičke smrti stanice. Međutim, ovo ostaje pretpostavljen model jer mu nedostaju eksperimentalni dokazi izvan istraživanja sa sintetičkim membranskim vezikulama te isto tako u ovom modelu nije jasno kako bi se kontakt s membranom mogao dogoditi u bakterijskim stanicama s obzirom na prisutnost stanične stijenke (Cajal i sur. 1996; Kaye i sur. 2016). Sampson i suradnici (2012) predstavili su drugi alternativni mehanizam djelovanja kolistina koji pokazuje kako polimiksini induciraju brzu smrt stanice pomoću proizvodnje reaktivnih hidroksilnih radikala.

Osim brojnih dokaza koji potvrđuju da polimiksini uzrokuju oštećenje membrane (Khadka i sur. 2018), predloženi su i dodatni mehanizmi koji doprinose bakterijskoj smrti. Naime, utvrđeno je da kolistin i drugi polimiksini izravno inhibiraju enzimsku aktivnost respiratornog enzima NDH-2 u bakterijama *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* i *A. baumannii*, međutim koncentracije antibiotika potrebne za 50% inhibiciju NDH-2 su više od 50 puta veće od tipičnog MIC-a te je to još potrebno ispitati. Također, moguće je da oštećenje citoplazmatske membrane neizravno utječe na respiratorni kompleks, što može dovesti do sinergističke inhibitorne aktivnosti (Deris i sur. 2014).

### **4. 3. Uporaba kolistina**

Kolistin je dostupan za liječenje infekcija uzrokovanih Gram-negativnim bakterijama od 1959. godine (Ross i sur. 1959), ali je zbog njegove neuro- i nefrotoksičnosti njegova uporaba u ljudskoj medicini od 1970. do 2000. bila zamijenjena manje toksičnim tvarima (Biswas i sur. 2012). S druge strane, kolistin se već dugo koristi u veterinarskoj medicini kao faktor rasta, profilaksa i lijek za liječenje stoke tako da životinje doprinose širenju kolistin-rezistentnih sojeva (Poirel i sur. 2017).

Na temelju sve veće pojave rezistentnih bakterija te općih karakteristika kolistina poput njegove aktivnosti, kliničke uporabe, toksičnosti, farmakokinetičkih svojstava i kombinirane terapije s drugim antibioticima, kolistin se ubraja u antibiotike zadnje linije obrane protiv višestruko rezistentnih Gram-negativnih patogena (Biswas i sur. 2012) te se smatra jedinim aktivnim antibiotikom nakon što se  $\beta$ -laktamski, aminoglikozidni i kvinolonski antibiotici pokažu neuspješnim za MDR Gram-negativne bakterije kao što su *Pseudomonas aeruginosa*, *A. baumannii* i *K. pneumoniae* (Li i sur. 2005). Iako je kolistin učinkovit kada se uzima sam, često se pacijentima daje u kombinaciji s drugim antibioticima (Biswas i sur. 2012). Na primjer, Conrad i Galanos (1989) pokazali su sinergističko djelovanje hidrofilnih antibiotika, poput rifampicina, karbapenema, glikopeptida i tetraciklina, s kolistinom zbog njegovog narušavanja integriteta membrane bakterijske stanice.

Antibiotski spektar kolistina je dosta uzak i uglavnom se koristi za liječenje infekcija uzrokovanih Gram-negativnim bakterijama kao što su *Enterobacteriaceae* (Li i sur. 2006b), *P. aeruginosa* i *A. baumannii* (Catchpole i sur. 1997). Također je aktivan protiv bakterija *Haemophilus influenzae*, *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Klebsiella* spp., *Legionella pneumophila*, *Aeromonas* spp., *Citrobacter* spp. i *Bordetella pertussis*, dok bakterije roda *Campylobacter* variraju u osjetljivosti na kolistin (Biswas i sur. 2012).

S druge strane, Gram-pozitivne i anaerobne bakterije te mikoplazme nisu pokazale nikakvu reakciju na polimiksine (Poriel i sur. 2017), a neke od bakterijskih vrsta prirodno rezistentnih na kolistin jesu *Neisseria* spp., *Providencia* spp., *Moraxella catarrhalis*, *Helicobacter pylori*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*, *Edwardsiella tarda*, *Chromobacterium* i *Brucella* spp. kao i izolati povezani s cističnom fibrozom *Inquilinus*, *Pandoraea* i *Burkholderia* spp. (Biswas i sur. 2012).

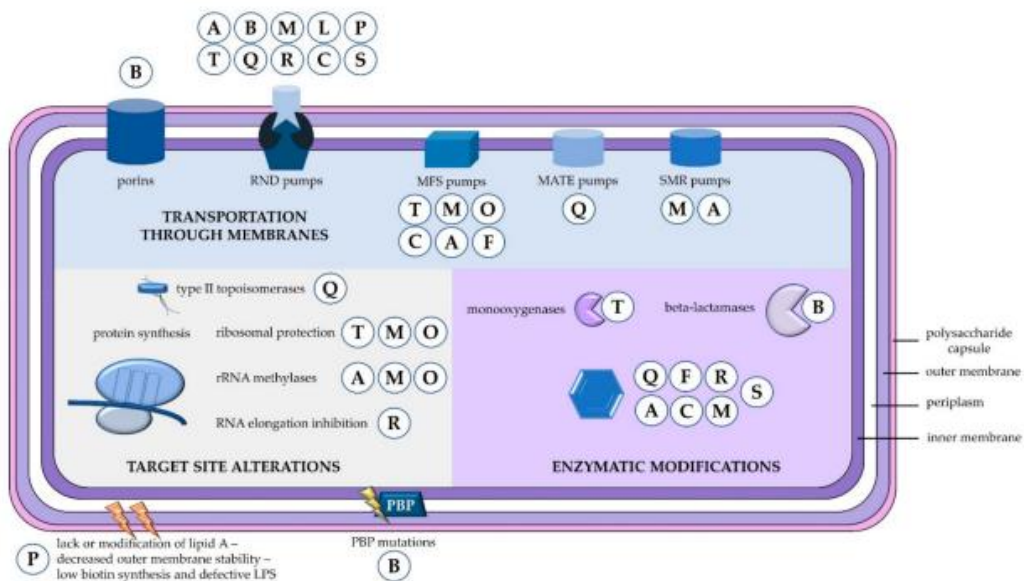
## **5. Mehanizmi rezistencije *Acinetobacter baumannii* na kolistin**

### **5. 1. Opći mehanizmi rezistencije u *Acinetobacter baumannii***

Mehanizmi bakterijske obrane od antibiotika mogu se podijeliti u tri kategorije koje su vidljive na Slici 3. Prvo, rezistencija se može postići promjenom propusnosti vanjske membrane ili ubrzanim izbacivanjem antibiotika iz stanice pomoću efluks pumpi jer se tako antibiotiku onemogućava pristup ciljnom mjestu. Drugo, genskom mutacijom ili posttranslacijskom modifikacijom ciljnog mjesta, dolazi do

promjene u molekularnoj strukturi, što onemogućuje vezanje antibiotika na njegovo mjesto vezanja i treće, bakterijske stanice mogu pomoću svojih enzima modificirati antibiotike (najčešće adenilacijom, acetilacijom ili fosforilacijom) i tako ih inaktivirati. Kombinacijom nekoliko mehanizama postiže se rezistencija na više vrsta antibiotika (MDR) (Blair i sur. 2015).

Bakterije roda *Acinetobacter* mogu se brzo adaptirati na okolišne uvjete i postati rezistentne na širok spektar antibiotika zbog svoje impresivne genetske plastičnosti koja omogućuje brze genetske mutacije, preuređivanja i ugradnju mobilnih genetskih elemenata. Dodatno, *A. baumannii* može formirati biofilmove i tako produljiti svoj opstanak na medicinskim uređajima poput respiratora na odjelima intenzivne njege (Pakharukova i sur. 2018).



**Slika 3:** Mehanizmi antibiotske rezistencije u *Acinetobacter baumannii* (Kyriakidis i sur. 2021).

Antibiotska rezistencija postiže se trima glavnim mehanizmima: kontrolom transporta antibiotika kroz membrane (redukcijom propusnosti porina ili povećanjem efluksa), modifikacijom ciljnih mjesta vezanja antibiotika i enzimskom inaktivacijom antibiotika. A = aminoglikozidi; B =  $\beta$ -laktami; C = kloramfenikol; F = fosfomicin; L = linkozamidi; M = makrolidi; MATE = „*multidrug and toxic compound extrusion*“; MFS = „*major facilitator superfamily*“; O = oksazolidinoni; P = polimiksini; PBP = penicilin vezajući proteini (engl. *penicilin binding protein*); Q = fluorokinoloni; R = rimfamici; RND = „*resistance-nodulation-division*“; S = diaminopirimidini i sulfonamidi; SMR = „*small multidrug resistance family*“; T = tetraciklini.

## 5. 2. Mehanizmi rezistencije na kolistin u *Acinetobacter baumannii*

Mehanizmi rezistencije na kolistin u *A. baumannii* uključuju gene koji se nalaze na bakterijskom kromosomu i gene koji se nalaze na plazmidu, a dva glavna mehanizma odgovorna za bakterijsku rezistentnost na kolistin jesu modifikacija LPS-a i potpuni gubitak LPS-a, ciljne mete kolistina (Velkov i sur. 2010).

### 5. 2. 1. Rezistencija na kolistin posredovana kromosomskim genima

Budući da je vanjska membrana Gram-negativne *A. baumannii* mjesto djelovanja kolistina, molekularne promjene vanjske membrane mogu smanjiti osjetljivost i baktericidni učinak kolistina na bakterijske stanicu (Moffatt i sur. 2010). Mehanizmi rezistencije na kolistin u *A. baumannii* posredovani mutacijama i/ili promjenom ekspresije gena na bakterijskom kromosomu uključuju (1) promjenu ciljnog mjesta kolistina na lipopolisaharidima modifikacijom lipida A LPS-a dodavanjem fosfoetanolamina; (2) potpuni gubitak lipopolisaharida uzrokovan mutacijama u genima uključenih u sintezu lipida A i LPS-a; (3) promjenu propusnosti i asimetrije vanjske membrane; (4) promjene u metabolizmu osmoprotektivnih aminokiselina; (5) pojačani efluks; (6) i otpuštanje vezikula u izvanstanični okoliš (Lima i sur. 2018; Hood i sur. 2013; Lin i sur. 2017; Park i sur. 2021).

#### 5. 2. 1. 1. Modifikacija lipida A lipopolisaharida

Modifikacija lipida A lipopolisaharida pomoću genskih produkata *pmrCAB* operona, modulatora površinskog naboja vanjske membrane, smatra se najčešćom genskom modifikacijom u *A. baumannii* rezistentnim na polimiksine (Jeannot i sur. 2017). *PmrCAB* operon u *A. baumannii* kodira za dvokomponentni regulatorni sustav PmrAB (geni *pmrA* i *pmrB*) koji kontrolira ekspresiju *pmrC* gena za fosfoetanolamin transferazu (Arroyo i sur. 2011). Dodatak fosfoetanolaminske skupine na mjesto 4'-fosfatne skupine hepta-aciliranog oblika lipida A pomoću fosfoetanolamin transferaze, rezultira uklanjanjem negativnih naboja lipida A što snižava afinitet LPS-a prema polimiksinima i smanjuje njihovo elektrostatsko vezanje. Mutacije u dvokomponentnom sustavu PmrAB induciraju prekomjernu ekspresiju *pmrC* gena, a posljedica toga je prekomjerno dodavanje fosfoetanolamina lipidu A čime se smanjuje

njegov pozitivni naboj i afinitet prema kolistinu, a formira se manje negativan sloj lipopolisaharida što smanjuje osjetljivost bakterije na pozitivno nabijeni kolistin (Park i sur. 2011).

Najčešće mutacije u kliničkim kolistin-rezistentnim izolatima uočene su u *pmrB* genu, ali su isto tako zamijećene mutacije u genima *pmrA* i *pmrC* (Arroyo i sur. 2011). Modifikacija lipida A, mutacijom u dvokomponentnom sustavu PmrAB, ima relativno nizak biološki trošak, posebno s obzirom na virulenciju bakterije *A. baumannii*. Osim toga, kolistin-rezistentan *pmrB* mutant i divlji tip *A. baumannii* pokazali su jednaku osjetljivost na amikacin, piperacilin/tazobaktam, ciprofloksacin, azitromicin, cefepim, gentamicin, minociklin, tigeciklin, ampicilin i teikoplanin (Wand i sur. 2015).

Sun i suradnici (2020) pokazali su da mutacije u *miaA* genu, koji kodira za posttranskripcijski regulator i RNA modifikacijski enzim tRNA dimetilalil difosfat transferazu, djeluju sinergistički s mutacijama u *pmrA* stvarajući vrlo rezistentne fenotipove na kolistin unatoč minimalnom povećanju MIC-a kolistina. MiaA isto tako utječe na rast i virulenciju stanica. U istraživanju Marceau i suradnika (2004) delecija *miaA* gena u *Yersinia pseudotuberculosis* uzrokovala je smanjenu ekspresiju *phoP* gena koji kodira za dvokomponentni sustav PhoPQ bitan za modifikaciju lipida A. Inače, povećana regulacija PhoPQ sustava povećava modifikaciju lipida A, odnosno rezistenciju na kolistin. Budući da dvokomponentni sustav PhoPQ nije prisutan u *A. baumannii*, Sun i suradnici predlažu da bi neki drugi za sada nepoznati gen(i), regulirani s *miaA*, mogao (mogli) pridonijeti u bakterijskoj rezistenciji na kolistin.

Gerson i suradnici (2019) pronašli su mutacije u *pmrC* genu, paraloge *eptA* genu (*eptA-1* i *eptA-2*) iz *E. coli* koji kodira za fosfoetanolamin transferazu, povezane s povećanom ekspresijom i rezistencijom na kolistin, a u nekim kliničkim izolatima *A. baumannii* rezistenciji na kolistin doprinijela je insercija IS*Aba1* sekvence koja je aktivirala susjedni *eptA* gen (Trebosc i sur. 2019). Nadalje, Deveson i suradnici (2018) otkrili su da je u *hns* genu, koji kodira za transkripciji regulator iz H-NS porodice, došlo do insercije IS*Aba125* sekvence što je uzrokovalo inaktivaciju *hns* gena, promjenu ekspresije više od 150 gena, uključujući *eptA*, te kolistin-rezistentan fenotip.

Dvokomponentni sustav PmrAB može dovesti do rezistencije na polimiksine povećanjem transkripcije NaxD deacetilaze s obzirom da je *naxD* reguliran transkripcijskim faktorom PmrA. NaxD deacitilira acetil-glukozaminsku kiselinu čime nastaje glukozaminska skupina koja se veže na fosfatnu skupinu lipida A i na taj način mijenja lokalni naboj vanjske membrane što smanjuje afinitet vezanja kolistina (Chin i sur. 2015).

### 5. 2. 1. 2. Potpuni gubitak lipopolisaharida

Rezistencija na polimiksine u *A. baumannii* također je povezana s potpunim gubitkom lipopolisaharida zbog inaktivacije gena koji kodiraju za aciltransferaze bitne u biosintezi lipida A – *lpxA*, *lpxC* i *lpxD*. Budući da se tako gubi ciljno mjesto vezanja kolistina, ne dolazi do njegove interakcije s LPS-om što dovodi do vrlo visokih vrijednosti MIC-a kolistina (Moffatt i sur. 2010). Potpuni gubitak LPS-a može biti posljedica inaktivacije bilo kojeg od gena *lpxA*, *lpxC* i *lpxD*, a mogu se inaktivirati spontaninim mutacijama ili umetanjem prijenosnih elementa kao što su *ISAbal1* (Hua i sur. 2017), *ISX03* i *ISAbal11*, koji mogu biti svojstveni genomu *A. baumannii* ili genomu drugih vrsta (Hua i sur. 2017; Moffatt i sur. 2011). Najčešće spontane mutacije koje inaktiviraju *lpxA*, *lpxC* i *lpxD* gene jesu delecije, točkaste mutacije i insercije. U kliničkim izolatima u *lpxC* i *lpxD* najčešće su uočene supstitucijske mutacije (Lean i sur. 2014), a u *lpxA* se ističu insercije (pozicija 732) i delecije (pozicija 776) koje mijenjaju veličinu primarnih sekvenci proteina, čineći ih enzimski neaktivnim i nesposobnim za sintezu lipida A (Selasi i sur. 2015).

Suprotno mutacijama u dvokomponentnom regulatornom sustavu PmrAB, gubitak LPS-a ima visoku biološku cijenu tako da mali broj kolistin-rezistentnih izolata s *lpx* mutacijama zapravo preživljava, što ograničava širenje takvih bakterija u kliničkim sredinama. Beceiro i suradnici (2014) pokazali su da je brzina rasta mutanata tijekom eksponencijalne faze znatno niža u odnosu na divlji tip *A. baumannii*, a u istraživanju Mu i suradnika (2016) sojevi s induciranom rezistencijom na kolistin imali su manju biomasu na kraju 16 h rasta u Mueller-Hintonovom bujonu. Nadalje, bakterijskim stanicama također se smanjila sposobnost prianjanja i stvaranja biofilma (Dafopoulou i sur. 2015) te vijabilnost (Beceiro i sur. 2014; Wand i sur. 2015), a gubitak LPS-a povećao je osjetljivost *A. baumannii* na druge antibiotike kao što su teikoplanin, cefepim, azitromicin, amikacin, gentamicin, piperacilin/tazobaktam, meropenem, ciprofloksacin, rifampicin i vankomicin, kojima se MIC znatno smanjio (Moffatt i sur. 2010; Wand i sur. 2015; García-Quintanilla i sur. 2015).

### 5. 2. 1. 3. Promjene propusnosti i asimetrije vanjske membrane

Gen *lpsB* kodira za glikoziltransferazu odgovornu za sintezu strukturnog prstena LPS-a koji je povezan s manjom fluidnošću i većom osmotskom rezistencijom vanjske membrane (Kabanov i Prokhorenko 2010) te tako doprinosi zaštiti *A. baumannii* od kationskih antimikrobnih peptida (Luke i sur. 2010). Na taj način mutacije, koje uzrokuju prekomjernu ekspresiju *lpsB* gena, doprinose većoj

antibiotskoj rezistenciji i virulenciji *A. baumannii*, a gubitak funkcije LpsB destabilizira vanjsku membranu i povećava osjetljivost *A. baumannii* na kolistin i druge kationske antimikrobne peptide (Hood i sur. 2013). Lean i suradnici (2014) su u osam kolistin-rezistentnih kliničkih izolata pronašli supstitucijsku mutaciju histidina u tirozin na poziciji 181 u LpsB-u, dok su Dafopoulou i suradnici (2015) otkrili da je prerano dodavanje stop kodona u *lpsB* također povezano s visokom rezistencijom na kolistin kao i sa smanjenom sposobnošću stvaranja biofilma.

LptD protein iz Lpt sustava odgovoran je inserciju lipopolisaharida u vanjsku membranu. Eksperimentalno uklanjanje LptD-a, odnosno LPS translokaze, dovodi do umjerene rezistencije na kolistin, niske virulencije i povećane osjetljivosti na nepolimiksinske antibiotike. Akumulacija dijelova LPS-a u bakterijskoj stanici  $\Delta$ *lptD* sojeva poremećuje stabilnost membrane i posljedično smanjuje vijabilnost *A. baumannii* (Bojkovic i sur. 2015).

Kod bakterije *A. baumannii*, ATP-vezujući transportni sustav Vps/ VacJ sudjeluje u održavanju lipidne asimetrije vanjske membrane tako što osigurava liposaharidima položaj na vanjskoj strani, a fosfolipidima na unutarnjoj (Malinverni i Silhavy 2009). Nhu i sur. (2016) pokazali su da je jedna mutacija u VacJ lipoproteinu na vanjskoj membrani (R166N) uzrokovala vrlo rezistentan fenotip na kolistin što ukazuje da gubitak asimetrije vanjske membrane isto tako utječe na smanjenu osjetljivost na kolistin. Budući da je VacJ bitan za virulenciju kod drugih Gram-negativnih bakterija te je odgovoran za rezistentna svojstva kod nekih bakterija na pojedine antibiotike, moguće je da ima posebnu ulogu u vijabilnosti *A. baumannii*, stoga se mutacija u *vacJ* genu mora još posebno istražiti (Lima i sur. 2018).

PldA fosfolipaza zadužena je za uklanjanje fosfolipida iz vanjskog sloja vanjske membrane, a kako bi zadržala asimetriju stanice, njezina je aktivnost povećana u bakterijskim stanicama s destabiliziranom membranom. Također, cink ovisna peptidaza A (ZndP), koja je kodirana uzvodno od *pldA*, ima ključnu ulogu u doradi vanjske membrane tako da se pretpostavlja da *pldA* i *zndP* imaju ulogu prilikom stjecanja rezistencije na kolistin (Nhu i sur. 2016). U istom istraživanju, sekvencioniranjem cijelog genoma kolistin-rezistentnog izolata *A. baumannii*, pronađene su mutacije u *pheS*, koji kodira za alfa podjedinicu fenilalanin-tRNA ligaze, i u konzerviranom hipotetskom proteinu, za koje se također smatra da su pridonijeli kolistinskoj rezistenciji.

Biotin je važan kofaktor u metabolizmu lipida budući da je acetil-CoA karboksilaza aktivna samo kada se veže na biotin. Naime, acetil-CoA karboksilaza katalizira reakciju pretvorbe acetil-CoA u malonil-CoA, što je korak koji ograničava brzinu sinteze masnih kiselina, te tako biotin doprinosi sintezi LPS-a ovisno o njegovoj dozi (Whitfield i Trent 2014). Više koncentracije biotina uzrokuju povećanu proizvodnju

lipida A pa na taj način povećavaju osjetljivost na kolistin. S druge strane, uklanjanjem gena koji kodiraju za ovaj kofaktor, smanjuje se osjetljivost *A. baumannii* na kolistin (Hood i sur. 2013). Hood i suradnici (2013) u svojem su istraživanju pokazali da se delecijom *A1S\_0807* lokusa, koji sadrži gene odgovorne za sintezu biotina, značajno smanjuje osjetljivost *A. baumannii* na kolistin i da se delecije u *lpsB* genu za glikoziltransferazu, koja je također uključena u sintezu biotina, povezuju s rezistencijom na kolistin.

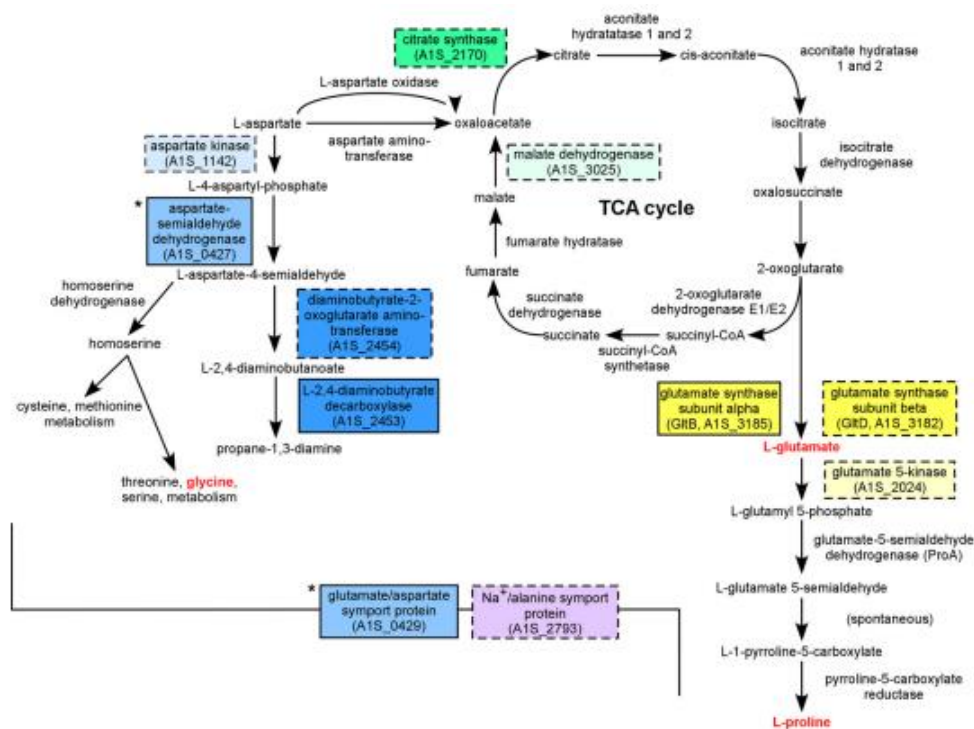
Nadalje, Mu i suradnici (2016) pronašli su mutacije u još četiri gena, *A1S\_1983*, *hepA*, *A1S\_3026* i *rsfS*, za koje su pretpostavili da bi mogli imati ulogu prilikom stjecanja rezistencije na kolistin u *A. baumannii*. Gen *A1S\_1983* kodira za membranski eksportni protein te njegova mutacija utječe na integritet membrane, dok ostali geni kodiraju za proteine koji pomažu pri bakterijskoj prilagodbi na okoliš, proizvodnji egzopolisaharida i formiranju biofilma. HepA (*A1S\_2462*) je ATP-ovisna helikaza koja kao transkripcijski regulator aktivira transkripciju u uvjetima stresa. *A1S\_3026* kodira za protein iz porodice ribonukleaza T2, a mutacija u tom genu ograničava mobilnost *A. baumannii* i njezinu sposobnost za kolonizaciju nežive površine (Jacobs i sur. 2014). RsfS (*A1S\_0570*) je ribosomski faktor utišavanja koji pomaže *A. baumannii* pri prilagodbi na spore uvjete rasta (Hauser i sur. 2012). Svakako se uloga ovih gena u razvoju bakterijske rezistencije na kolistin još treba dodatno istražiti i potvrditi.

#### **5. 2. 1. 4. Promjene u metabolizmu osmoprotektivnih aminokiselina**

Kolistin i drugi polimiksini negativno utječu na stabilnost bakterijske membrane i membransku propusnost te naposljetku često dovode stanicu do osmotske lize (Oh i sur. 1998). Kako bi se bakterijska stanica brže oporavila od osmotskog stresa, ona u svojem genomu sadrži gene čiji su produkti uključeni u procese koji ju štite tijekom takvog stanja (lokusi u *A. baumannii*: *A1S\_3185*, *A1S\_1142*, *A1S\_1143*, *A1S\_2793*, *A1S\_2454*, *A1S\_2023*, *A1S\_2024*, *A1S\_3035*). Tako su neke aminokiseline poput prolina, glicina i aspartata neophodne za održavanje osmotske ravnoteže otopljenih tvari u prokariotskim stanicama. One sudjeluju kao neutralni osmoliti te mogu djelovati i zaštitnički sprječavajući pogrešno smatanje proteina (Yancey 2005).



Bakterijska stanica izložena kolistinu doživljava osmotsku neravnotežu i stres koji se mogu ublažiti sintezom osmolita i ekspresijom proteaza. Iz tog razloga kvantitativne razlike ovih aminokiselina utječu na bakterijsku osjetljivost na spojeve, poput polimiksina, koji induciraju takvo stanje. Na taj način, povećanje sinteze ili smanjenje katabolizma osmoprotektivnih aminokiselina čini bakterijske stanice manje osjetljivima na lizu izazvanu kolistinom jer suprotno, kada se ti sustavi inaktiviraju, *A. baumannii* je osjetljivija na kolistin. Metabolički putevi povezani s osmoprotektivnim aminokiselinama u *A. baumannii* prikazani su na Slici 4 (Hood i sur. 2013).



**Slika 4** Metabolički putevi povezani s osmoprotektivnim aminokiselinama u *Acinetobacter baumannii* (Hood i sur. 2013).

Obojani pravokutnici ukazuju na enzime/transportere čiji su geni/operoni poremećeni insercijom transpozona rezultirajući kolistin-osjetljivim mutantima; pravokutnici s isprekidanim obrubom označavaju direktno poremećene gene transpozonskom insercijom te neposredno poremećene nizvodne gene u slučaju unutargenske intericije; pravokutnici s istom bojom prikazuju gene iz istog operona; a zvjezdice ukazuju na gene iz operona koji se nalaze uzvodno od insercijskog mjesta transpozona. Crveno su označena imena osmoprotektivnih aminokiselina.

### 5. 2. 1. 5. Efluks pumpe

Efluks pumpe omogućuju izbacivanje antimikrobnih sredstava i drugih toksičnih tvari (npr. boje i deterdžente) iz stanice te ulazak drugih molekula u stanicu kroz polupropusnu vanjsku membranu (Hooper 2005). Aktivni transport efluks pumpi nije primarni mehanizam bakterijske obrane od antibiotika jer ne ostvaruje visoku rezistenciju na antibiotike, već pojačani efluks antibiotika smanjuje njihovo nakupljanje unutar bakterijske stanice i tako povećava minimalnu inhibitornu koncentraciju antibiotika što omogućava bakterijama bolju rezistenciju u kombinaciji s ostalim mehanizmima. Osim toga, efluks pumpe u MDR bakterija imaju ulogu u bakterijskoj patogenosti te im pomažu pri preživljavanju u njihovoj ekološkoj niši (Pidcock 2006). Međutim, koje su točno uloge efluks sustava u rezistenciji *A. baumannii* na kolistin, kako ti sustavi djeluju i koji su njihovi učinci, jesu pitanja na koje još treba odgovoriti kako bi se dobila cijela slika rezistentnih mehanizama na kolistin u *A. baumannii* (Lin i sur. 2017).

Efluks pumpe Gram-negativnih bakterija pokrivaju cijelu dvomembransku ovojnica, a općenito se sastoje od tri komponente: transportera na unutarnjoj membrani, periplazmatskih proteina i kanala na vanjskoj membrani (Tikhonova i sur. 2009).

Četiri kategorije efluks pumpi povezane su s antibiotskom rezistencijom u *A. baumannii*, a to su pumpe iz porodica RND (engl. *resistance - nodulation – (cell) division*), MF (engl. *major facilitator*), MATE (engl. *multidrug and toxic compound extrusion*) i SMR (engl. *small multidrug resistance*) (Coyne i sur. 2011).

Najbolje opisana efluks pumpa u *A. baumannii* je AdeABC (engl. *Acinetobacter drug efflux*), kodirana *adeABC* operonom, koja pripada RND porodici, čija je povećana ekspresija često uočena prilikom izloženosti polimiksinima (Magnet i sur. 2001). Osim AdeABC, i druge pumpe iz RND porodice efluks pumpi, poput AdeDE (Chau i sur. 2004), AdeFGH (Coyne i sur. 2010) i AdeIJK (Damier-Piolle i sur. 2008), doprinose rezistenciji MDR sojeva *A. baumannii* koje su kodirane redom s *adeDE*, *adeFGH* i *adeIJK* operonima. U istraživanju Machada i suradnika (2018) prilikom izlaganja *A. baumannii* kolistinu došlo je do prekomjerne ekspresije gena *adeB*, *adeG*, *adeJ*, *craA*, *amvA*, *abeM* i *abeS*, koji kodiraju za efluks pumpe. Iz toga proizlazi da aktivnost efluks pumpi doprinosi heterorezistentnosti na kolistin u kliničkom izolatu MDR *A. baumannii*. U istom istraživanju proučavao se sinergistički odnos inhibitora efluks pumpi i osjetljivosti bakterije na kolistin te je pokazano da se korištenjem inhibitora efluks pumpi može smanjiti rezistentnost *A. baumannii* na kolistin, makar nije uočen izravan odnos učinka inhibitora na vrijednost MIC-a kolistina i ekspresije gena za efluks pumpe. Ovi rezultati upućuju da bi se takvi

inhibitori mogli koristiti kao adjuvansi u liječenju kolistin-rezistentnih kliničkih izolata *A. baumannii* (Ni i sur. 2016).

Paul i suradnici (2019) pokazali su da se prekomjerno eksprimirana RND efluks pumpa MexAB-OprM povezuje se s nedostatkom osjetljivosti na većinu antibiotika, što uključuje čak i kolistin kada je jako eksprimirana.

Efluks pumpa iz MF porodice ErmAB doprinijela je MDR rezistenciji u nekoliko *Enterobacteriaceae*. Sojevi *E. coli*, koji imaju plazmid s *emrA* i *emrB* genima, pokazali su povećanu rezistenciju na antimikrobne deterdžente (Lomovskaya i Lewis 1992). Postoji mogućnost da je ovaj sustav uključen u rezistenciji na kolistin budući da kolistin ima amfipatska svojstva te se ponaša slično drugim biološkim deterdžentima. Genomskom analizom *A. baumannii* otkrivena je prisutnost *emrA*-like (lokus *A1S\_1773*) i *emrB*-like (lokus *A1S\_1772*) gena koji kodiraju za ErmAB efluks pumpu. Uklanjanjem *emrB*-like sekvence povećala se osjetljivost *A. baumannii* na kolistin te je gubitak *emrAB* povezan s lošijim preživljavanjem bakterije. S druge strane, u sojevima *A. baumannii* u kojima je laboratorijski izazvana rezistencija na kolistin, uočena je povećana ekspresija *emrB*-like gena. Danas se EmrAB transporter povezuje s prilagodbom na osmotski stres i s rezistencijom na kolistin u *A. baumannii* (Lin i sur. 2017).

Također je gubitak i smanjenje OmpW porina prijavljen kao mogući mehanizam rezistencije na kolistin kod mutanta *A. baumannii* (Lee i sur. 2011).

Kod *Pseudomonas putida* gen *ttg2C* kodira za efluks pumpu, ABC transporter, uključenu u toleranciji na toluen (Roma-Rodrigues i sur. 2010). U radu Nhu i suradnika (2016) supstitucija asparagina s metioninom na poziciji 104 u Ttg2C uzrokovala je visoku rezistenciju na kolistin u *A. baumannii* u kojoj je rezistencija na kolistin izazvana *in vitro*. Iz tog proizlazi da *ttg2C* potencijalno može kodirati druge transportere i promovirati efluks polimiksina, no potrebno je još istražiti jesu li polimiksini uistinu supstrati tog efluks sustava.

### **5. 2. 1. 6. Otpuštanje vezikula u izvanstanični okoliš**

Polimiksin B i kolistin (polimiksin E) dijele sličnu primarnu sekvencu s jedinom razlikom na poziciji 6 u kojoj je D-Phe u polimiksinu B zamijenjen s D-Leu u kolistinu. Zbog slične kemijske strukture mehanizmi rezistencije na polimiksin B isti su kao za kolistin (Kwa i sur. 2007).

Osim promjena u staničnoj membrani, postoje dokazi da bakterije mogu preživjeti izloženost polimiksinu B otpuštanjem izvanstaničnih vezikula. Proizvodnja vezikula povezana je s raznim fiziološkim funkcijama kao što su međustanična komunikacija, rezistencija na antibiotike, stvaranje biofilma te izlučivanje faktora virulencije (Florez i sur. 2017). Takve vezikule u izvanstaničnom okolišu mogu smanjiti učinkovitost antibiotika i drugih baktericidnih sredstava, što predstavlja ozbiljnu prijetnju prilikom liječenja bakterijskih infekcija (Koeppen i sur. 2016). Gram-negativne bakterije u svoj okoliš oslobađaju vezikule promjera 20-400 nm koje se sastoje od fosfolipida, proteina vanjske membrane, LPS-a ili lipooligosaharida, periplazmatskih proteina i komponenata stanične stijenke, ali se još ne zna točan mehanizam pakiranja citosolnih molekula u same vezikule (Roier i sur. 2016).

Park i sur. (2021) pokazali su da je povećanje regulacije *pmr* operona i smanjenje proteina u vanjskoj membrani (OmpA, OmpW i BamE) povezano s prekomjernom proizvodnjom izvanstaničnih vezikula koja onda potiče pojačano stvaranje biofilma. Smatra se da otpušteni vezikuli *A. baumannii* služe kao mamci koji hvataju pozitivno nabijene molekule polimiksina B u izvanstaničnom okolišu, što onemogućava vezanje polimiksina B na ciljno mjesto štiteći membrane bakterijskih stanica. Oslobođeni vezikuli *A. baumannii* također su pokazali zaštitni učinak protiv polimiksina B i na druge vrste unutar bakterijske zajednice. Međutim, cijeli mehanizam obrane *A. baumannii* od polimiksina B putem vezikula još nije u potpunosti poznat i ne postoji istraživanje koje bi moglo potvrditi ovaj mehanizam za kolistin.

## 5. 2. 2. Rezistencija na kolistin posredovana plazmidnim genima

Izvorno su se svi geni odgovorni za rezistenciju *A. baumannii* na kolistin nalazili na bakterijskom kromosomu što je ograničavalo njihovu brzu distribuciju i diseminaciju (Moffatt i sur. 2010). Onda je 2015. godine iz *E. coli* životinjskog, ljudskog i okolišnog podrijetla u Kini identificiran plazmidni gen nazvan *mcr-1* (engl. *mobile colistin resistance – mcr*) (Liu i sur. 2016). Do danas je identificirano 10 varijanti *mcr* gena, od *mcr-1* do *mcr-10*, u gotovo svim uobičajenim patogenima izoliranih iz različitih izvora, uključujući hranu, životinje, farme, ljude i okoliš (voda i tlo) (Hadjadj i sur 2017).

Svi su *mcr* geni homologni i kodiraju za fosfoetanolamin transferazu te na sličan način omogućavaju bakterijama rezistenciju na kolistin (Jeannot i sur. 2017). Strukturno gledajući, N-terminalna regija enzima, kodirana s *mcr*, umeće se u unutarnju membranu, dok se njegova C-terminalna domena nastavlja u periplazmatski prostor. To omogućuje dodavanje fosfoetanolamina, nastalog cijepanjem fosfatidiletanolamina, na lipid A LPS-a vanjske membrane Gram-negativnih bakterija, što

uzrokuje pad ukupnog negativnog naboja LPS-a i porast bakterijske rezistencije na kolistin (Poirel i sur. 2017).

Značajno je da se plazmidi s *mcr* genima horizontalnim prijenosom mogu širiti između istih i različitih bakterijskih vrsta i rodova koje nastanjuju životinje, ljude i okoliš (Anyanwu i sur. 2020). Ovi kolistin-rezistentni geni već su pronađeni u raznim bakterijskim vrstama poput *Escherichia coli* te rodovima *Klebsiella*, *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* i *Raulotella* (Sun i sur. 2018). Raznolikost plazmida s *mcr* genima opisana je u *Enterobacteriaceae* na različitim kontinentima što pokazuje veliki potencijal za širenje ovog gena (Hood i sur. 2013).

Do sada su u *A. baumannii* izolirani plazmidi s *mcr-1* (Hameed i sur. 2019) i *mcr-4.3* genima (Ma i sur. 2019), te su Al-Kadmy i suradnici (2020) izolirali plazmide i s *mcr-2* te *mcr-3* genima, ali je upitna ispravnost tih nalaza. Svakako, zbog brze diseminacije horizontalnim prijenosom, pitanje je vremena kada će se i drugi *mcr* uočiti u ovoj bakterijskoj vrsti, stoga je potrebna kontrola širenja *mcr* gena kako bi se polimiksini i dalje mogli koristiti za liječenje infekcija uzrokovanih s MDR *A. baumannii* (Jeannot i sur. 2017).

Geni *mcr* predstavljaju veliku opasnost globalnom javnom zdravlju budući da su prisutni u cijelome svijetu, da imaju širok spektar domaćina te da se nalaze na plazmidu pa se horizontalnim prijenosom mogu brzo širiti među patogenim bakterijama i na taj način učiniti kolistin, antibiotik posljednje linije obrane, terapijski neupotrebljivim (Hadjadj i sur. 2017)

### **5. 3. Mehanizmi rezistencije na kolistin u *Acinetobacter baumannii* izdvojenih iz otpadnih voda**

#### **5. 3. 1. Mehanizmi rezistencije slični onima u kliničkih izolata**

Općenito se mali broj studija bavi proučavanjem mehanizama rezistencije na kolistin u izolatima *A. baumannii* iz otpadnih voda.

U svojem istraživanju Jovcic i suradnici (2020) proučavali su mehanizme rezistencije na kolistin u sedam PDR izolata *A. baumannii* izdvojenih iz aktivnog mulja i efluenta iz postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda u Zagrebu u koja ulaze netretirane bolničke otpadne vode. Proučavali su ekspresiju gena

povezanih s kolistinskom rezistencijom: gene koji kodiraju za dvokomponentni sustav PmrAB (*pmrA* i *pmrB*), gen za fosfoetanolamin transferazu EptA (*eptA*, homologni gen *pmrC*) i gene koji sudjeluju u biosintezi lipopolisaharida (*lpxA*, *lpxC* i *lpxD*). Najčešće mutacijske promjene povezane s rezistencijom na kolistin otkrivene su u proteinu PmrB. Pronađene su mutacije u regiji za histidin kinazu u PmrB (R263S i L267W) za koje se smatra da imaju ulogu u rezistenciji na kolistin, budući da su opisane u mnogo prethodnih istraživanja (Nhu i sur. 2016), za razliku od detektirane supstitucije glutamina u prolin na poziciji 309 u PmrB koja je prvi put uočena u okolišnom izolatu. Analizom genoma također su uočene varijacije nukleotida koje su uzrokovale promjene aminokiselina u LpxC (N286D), LpxD (E117K) i EptA (F166L, I228V, R348K, A370S i K531T) (Jovicic i sur. 2020). Transkripcijska analiza gena u svim izolatima pokazala je povišenu ekspresiju *eptA* mRNA što potencijalno upućuje da *eptA* ima glavnu ulogu u rezistenciji na kolistin putem modifikacije lipida A (Gerson i sur. 2019). Osim toga, u svim se izolatima smanjila ekspresija gena bitnih za biosintezu LPS-a, *lpxA* i *lpxD*, što se smatra dodatnim mehanizmom rezistencije na kolistin (Cafiso i sur. 2019). Ekspresija *pmrAB* se u izolatima s mutacijom R263S u PmrB povećala, a u izolatima s mutacijama L267W i Q309P u PmrB se smanjila uspoređujući s ekspresijom u izolatima osjetljivim na kolistin.

Khedher i suradnici (2020) napravili su masivnu bioinformatičku analizu bakterijskih genoma izoliranih iz različitih okoliša, uključujući i vodene okoliše poput voda sa životinjskih farmi, efluenta iz postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda u Kini, južnoj Africi, Italiji i Njemačkoj, rijeka, jezera i mora, površinskih urbanih voda, bolničkih otpadnih voda u Kini, bunarskih voda u ruralnim dijelovima Kine i voda iz akvakultura u Kini. U svojem istraživanju pronašli su da je vodeni okoliš glavni rezervoar *mcr* gena i da gotovo svi opisani *mcr* geni (od *mcr-1* do *mcr-9*) potječu od bakterija iz okoliša, posebice iz voda. Zaključili su da sveprisutnost *mcr* gena u bakterijama izoliranih iz voda vjerojatno sugerira drugu ulogu ovih enzima budući da je malo vjerojatno da je kolistin u vodenom okolišu jedini uzrok raširenosti *mcr* gena. Khedher i suradnici (2020) pretpostavljaju da modifikacija LPS-a produktima *mcr* gena, fosfoetanolamin transferazama, ima ulogu u obrambenom mehanizmu bakterija od bakteriofaga u vodenom okolišu i također od kationskih antimikrobnih peptida (cAMP-a) kojeg luče kralježnjaci i beskralježnjaci, ali navedenu hipotezu svakako treba dodatno istražiti.

Hembach i suradnici (2017) izolirali su *mcr-1* gen iz nepročišćene vode nakon mehaničke separacije u sedam postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda u Njemačkoj u koja ulaze ruralne i urbane otpadne vode uključujući one s farmi, iz bolnica, kućanstava i industrija. Isto tako izolirali su *mcr-1* gen iz pročišćene vode iz istih postrojenja što upućuje da ti geni nisu bili eliminirani prilikom pročišćavanja, a

putem površinskih i podzemnih voda ti se geni mogu dalje rasprostraniti po poljoprivrednim područjima i akvakulturama.

Khedher i suradnici (2020) identificirali su *mcr* gene u *Acinetobacter* spp., ali kao ni Jovic i suradnici (2020) i Hembach i suradnici (2017) nisu pronašli *mcr* gene u izolata bakterije *A. baumannii* izdvojenih iz voda. Međutim, zbog sveprisutnosti *mcr* gena i *A. baumannii* u vodenom okolišu, nedovoljno pročišćenih otpadnih voda te povoljnih uvjeta za horizontalan prijenos u otpadnim vodama, pitanje je vremena kada će kolistin-osjetljivi izolati *A. baumannii* iz vodenih okoliša steći te gene i postati rezistentni na kolistin.

### **5. 3. 2. Unakrsna rezistencija**

Jovic i suradnici (2020) su u svojem istraživanju izolirali kolistin rezistentne *A. baumannii* iz aktivnog mulja i pročišćene vode iz postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda u Zagrebu u koja ulaze netretirane bolničke otpadne vode, iako u pacijenata zagrebačkih bolnica nisu pronađeni kolistin rezistentni izolati. To upućuje da se rezistencija na kolistin razvila u otpadnim vodama pod utjecajem drugih onečišćivača (Verlicchi 2018). Naime, u otpadnim vodama prisutne su pozitivno nabijene molekule, kao što je i kolistin, koje također mogu izazvati promjene bakterijskih lipopolisaharida, što uzrokuje fenotip rezistentan na kolistin. Budući da su kationski surfaktanti česti u sastavu deterdženata, omekšivača, regeneratora za kosu i dezinficijensa, vjeruje se da bi oni mogli biti odgovorni za razvoj unakrsne rezistencije na kolistin, ali ta se hipoteza još treba potvrditi (Ivankovic i Hrenovic 2010).

## 6. Zaključak

*A. baumannii* uzrokuje bolničke infekcije koje predstavljaju globalni problem zbog rezistencije ove bakterije na većinu antibiotika i posljedično visoke stope smrtnosti. Rezistencija *A. baumannii* na širok spektar antibiotika oživjela je klinički interes za kolistin kao antibiotik zadnje linije obrane. Međutim, već su prijavljeni rezistentni sojevi i na ovaj antibiotik. Budući da se *A. baumannii* prilagođava različitim okolišima, njezina je prisutnost zabilježena i u otpadnim vodama koje omogućuju bakterijama dobre uvjete za horizontalni prijenos gena između bakterija istih i različitih vrsta, što naposljetku olakšava širenje gena antibiotske rezistencije i povećava udio bakterija rezistentnih na antibiotike u cijelom ekosustavu. Iako postoje istraživanja o mehanizmima rezistencije na kolistin u kliničkih izolata *A. baumannii*, postoji manjak informacija o mehanizmima u izolata iz otpadnih voda. U *A. baumannii* iz otpadnih voda pronađene su mutacije koje su karakteristične za kliničke izolate rezistentne na kolistin, a to su mutacije u *pmrCAB* operonu i u *lpxA*, *lpxC* i *lpxD* genima koje redom uzrokuju modifikaciju lipopolisaharida, odnosno potpuni gubitak lipopolisaharida vanjske membrane. Osim mehanizama rezistencije posredovanih kromosomskim genima, u vodenom okolišu pronađeni su plazmidni *mcr* geni koji nose rezistenciju na kolistin. Iako nisu detektirani u *A. baumannii*, njihova raširenost u drugim *Acinetobacter* sp. i bakterijskim vrstama u vodenom okolišu čini vodeni okoliš rezervoarom tih gena. Zbog velike prisutnosti *mcr* gena u vodenom okolišu, pretpostavlja se da rezistencija na kolistin nije glavna uloga tih gena, već da imaju ulogu u obrani bakterija od bakteriofaga u vodenom okolišu i od kationskih antimikrobnih peptida kralježnjaka i beskrležnjaka. Također, u bolničkim otpadnim vodama pronađeni su kolistin rezistentni izolati premda nisu uočeni u pripadajućim bolnicama, pa se smatra da su bakterije razvile rezistentnost u otpadnim vodama pod utjecajem drugih pozitivno nabijenih onečišćivača iz okoliša, odnosno da je došlo do razvoja unakrsne rezistencije na kolistin. S obzirom da vodeni okoliš predstavlja optimalne uvjete za horizontalni prijenos gena, rezistencija na kolistin se preko *mcr* gena lako može proširiti ekosustavom čime se povećava stopa rezistencije. Na taj se način gubi terapijski učinak kolistina za liječenje infekcija uzrokovanih s MDR *A. baumannii* čija prisutnost u prirodnom okolišu predstavlja prijetnju javnom zdravlju. Iz tog je razloga bitno ograničiti uporabu kolistina te proširiti znanje o mehanizmima rezistencije na kolistin u izolata iz otpadnih voda kako bi se preveniralo i nadziralo nastajanje i širenje takvih izolata na globalnoj razini te razumjela njihova sudbina među ljudima, životinjama i okolišem. Isto tako, detaljnije razumijevanje mehanizama rezistencije može pomoći u poboljšanju strategija prilikom liječenja u budućnosti kako bi se smanjio razvoj bakterijske rezistencije na kolistin, a sve u svrhu produljenja vijeka trajanja kolistina kao antibiotika zadnje linije obrane.



## 7. Literatura

- Al-Kadmy I. M. S., Ibrahim S. A., Al-Saryi N., Aziz S. N., Besinis A., Hetta H. F. (2020): Prevalence of genes involved in colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*: first report from Iraq. *Microbical. Drug Resist.* 26 (6): 616–622.
- Aminov R.I. (2011): Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Front. Microbiol.* 2: 158.
- Antunes L. C. S., Visca P., Towner K. J. (2014): *Acinetobacter baumannii*: Evolution of a global pathogen. *Pathog. Dis.* 71: 292–301.
- Anyanwu M. U., Jaja I. F., Nwobi O. C. (2020): Occurrence and characteristics of mobile colistin resistance (*mcr*) gene-containing isolates from the environment: a review. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 17 (3): 1028.
- Arroyo L. A., Herrera C. M., Fernandez L., Hankins J. V., Trent M. S., Hancock R. E. (2011): The *pmrCAB* operon mediates polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC17978 and clinical isolates through phosphoethanolamine modification of lipid A. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55: 3743–3751.
- Baran G., Erbay A., Bodur H., Ongürü P., Akinci E., Balaban N., Cevik M. A. (2008): Risk factors for nosocomial imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Int. J. Infect. Dis.* 12: 16–21.
- Baumann P. (1968): Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. *J. Bacteriol.* 96: 39–42.
- Beceiro A., Moreno A., Fernández N., Vallejo J. A., Aranda J., Adler B., Harper M., Boyce J. D., Bou G. (2014): Biological cost of different mechanisms of colistin resistance and their impact on virulence in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58: 518–526.
- Berendonk T. U., Manaia C. M., Merlin C., Fatta-Kassinos D., Cytryn E., et. al. (2015): Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nat. Rev. Microbiol.* 13 (5): 310-317.
- Berglund B. (2015): Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. *Infect. Ecol. Epidemiology.* 5 (1): 28564.
- Bergogne-Berezin E., Towner K. J. (1996): *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin. Microbiol. Rev.* 9 (2): 148-165.

- Bhatt P., Mathur N., Singh A., Pareek H., Bhatnagar P. (2020): Evaluation of factors influencing the environmental spread of pathogens by wastewater treatment plants. *Water Air Soil Pollut.* 231 (8): 1-14.
- Biswas S., Brunel J. M., Dubus J. C., Reynaud-Gaubert M., Rolain J. M. (2012): Colistin: An update on the antibiotic of the 21st century. *Expert Rev. Anti-infect. Ther.* 10: 917-934.
- Blair J. M. A., Webber M. A., Baylay A. J., Ogbolu D. O., Piddock L. J. V. (2015): Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 13: 42–51.
- Bojkovic J., Richie D. L., Six D. A., Rath C. M., Sawyer W. S., Hu Q., Dean C. R. (2015): Characterization of an *Acinetobacter baumannii* *lptD* deletion strain: permeability defects and response to inhibition of lipopolysaccharide and fatty acid biosynthesis. *J. Bacteriol.* 198: 731–741.
- Bouvet P. J., Grimont P. A. (1987): Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 138: 569–578.
- Burger J. (2002): Consumption patterns and why people fish. *Environ Res.* 90 (2): 125–135.
- Cafiso V., Stracquadiano S., Lo Verde F., Gabriele G., Mezzatesta M. L., et al. (2019): Colistin resistant *A. baumannii*: genomic and transcriptomic traits acquired under colistin therapy. *Front. Microbiol.* 9: 3195.
- Cajal Y., Rogers J., Berg O. G., Jain M. K. (1996): Intermembrane molecular contacts by polymyxin B mediate exchange of phospholipids. *Biochemistry.* 35: 299–308.
- Catchpole C. R., Andrews J. M., Brenwald N., Wise R. (1997): A reassessment of the in vitro activity of colistin sulphomethate sodium. *J. Antimicrob. Chemother.* 39 (2): 255–260.
- Chau S. L., Chu Y. W., Houang E. T. (2004): Novel resistancenodulation-cell division efflux system AdeDE in *Acinetobacter* genomic DNA group 3. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 4054– 4055.
- Chin C. Y., Gregg K. A., Napier B. A., Ernst R. K., Weiss D. S. (2015): A PmrB-regulated deacetylase required for lipid A modification and polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59 (12): 7911-7914.
- Christou A., Agüera A., Bayona J. M., Cytryn E., Fotopoulos V., et al. (2017): The potential implications of reclaimed wastewater reuse for irrigation on the agricultural environment: the knowns and

unknowns of the fate of antibiotics and antibiotic resistant bacteria and resistance genes – a review. *Water Res.* 123: 448-467.

Conrad R. S., Galanos C. (1989): Fatty acid alterations and polymyxin B binding by lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa* adapted to polymyxin B resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33 (10): 1724–1728.

Cosgaya C., Marí-Almirall M., Van Assche A., Fernández-Orth D., Mosqueda N., et al. (2016): *Acinetobacter dijksboorniae* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex mainly recovered from clinical samples in different countries. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66: 4105–4111.

Coyne S., Courvalin P., Périchon B. (2011): Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55: 947–953.

Coyne S., Rosenfeld N., Lambert T., Courvalin P., Perichon B. (2010): Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 4389–4393.

Dafopoulou K., Xavier B. B., Hotterbeekx A., Janssens L., Lammens C., Dé E., Goossens H., Tsakris A., Malhotra-Kumar S., Pournaras S. (2015): Colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains with deficient biofilm formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60: 1892–1895.

Damier-Piolle L., Magnet S., Bremont S., Lambert T., Courvalin P. (2008): AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 557–562.

De Oliveira D. M., Forde B. M., Kidd T. J., Harris P. N., Schembri M. A., et. al. (2020): Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* 33 (3): e00181-19.

Dekic S., Klobucar G., Ivankovic T., Zanella D., Vucic M., Bourdineaud J. P., Hrenovic J. (2018): Emerging human pathogen *Acinetobacter baumannii* in the natural aquatic environment: a public health risk?. *Int. J. Environ. Res.* 28 (3): 315-322.

Deris Z. Z., Akter J., Sivanesan S., Roberts K. D., Thompson P. E., et. al. (2014): A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity. *J. Antibiot.* 67 (2): 147-151.

- Deveson Lucas D., Crane B., Wright A., Han M. L., Moffatt J., et al. (2018): Emergence of high-level colistin resistance in an *Acinetobacter baumannii* clinical isolate mediated by inactivation of the global regulator H-NS. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62 (7): e02442-17.
- Dijkshoorn L., Nemec A., Seifert H. (2007): An increasing threat in hospitals: Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 939–951.
- Dixon R.A., Chopra I. (1986): Leakage of periplasmic proteins from *Escherichia coli* mediated by polymyxin B nonapeptide. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 781–788.
- Djordjevic Z. M., Folic M. M., Folic N. D., Gajovic N., Gajovic O., Jankovic S. M. (2016): Risk factors for hospital infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Infect. Dev. Ctries.* 10: 1073–1080.
- Evans B. A., Amyes S. G. B. (2014): OXA  $\beta$ -lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 27: 241–263.
- Eze E. C., El Zowalaty M. E., Pillay M. (2021): Antibiotic resistance and biofilm formation of *Acinetobacter baumannii* isolated from high-risk effluent water in tertiary hospitals in South Africa. *JGAR.* 27: 82-90.
- Falagas M. E., Kasiakou S. K. (2005): Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Clin. Infect. Dis.* 40 (9): 1333–1341.
- Ferreira A. E., Marchetti D. P., De Oliveira L. M., Gusatti C. S., Fuentesfria D. B., Corção G. (2011): Presence of OXA-23-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in wastewater from hospitals in southern Brazil. *Microb. Drug Resist.* 17 (2): 221-227.
- Florez C., Raab J. E., Cooke A. C., Schertzer J. W. (2017): Membrane distribution of the *Pseudomonas* quinolone signal modulates outer membrane vesicle production in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio.* 8: e01034-17.
- Fukuta Y., Muder R. R., Agha M. E., Clarke L. G., Wagener M. M., Hensler A. M., Doi Y. (2013): Risk factors for acquisition of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among cancer patients. *Am. J. Infect. Control.* 41: 1249–1252.
- Gales A. C., Jones R. N., Sader H.S. (2006): Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001–2004). *Clin. Microbiol. Infect.* 12 (4): 315–321.

- García-Quintanilla M., Carretero-Ledesma M., Moreno-Martínez P., Martín-Peña R., Pachón J., McConnell M. J. (2015): Lipopolysaccharide loss produces partial colistin dependence and collateral sensitivity to azithromycin, rifampicin and vancomycin in *Acinetobacter baumannii*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 46: 696–702.
- Gennari M., Stegagno F. (1985): Isolation and characterisation of *Acinetobacter calcoaceticus* from fresh, frozen and stored fish products. *Microbio. Alim. Nutrit.* 3: 247-259.
- Gennari M., Stegagno F. (1986): Isolation and characterisation of *Acinetobacter calcoaceticus* from raw, washed and frozen vegetables. *Arch. Vet. Ital.* 37: 131-137.
- Gennari M., Parini M., Volpon D., Serio M. (1992): Isolation and characterization by conventional methods and genetic transformations of *Psychrobacter* and *Acinetobacter* from fresh and spoiled meat, milk and cheese. *Intl. J. Food Microbiol.* 15 (1-2): 61-75.
- Gerner-Smidt P. (1992): Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2680–2685.
- Gerson S., Betts J. W., Lucaßen K., Nodari C. S., Wille J., et al. (2019): Investigation of novel *pmrB* and *eptA* mutations in isogenic *Acinetobacter baumannii* isolates associated with colistin resistance and increased virulence in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* 63 (3): e01586-18.
- Girlich D., Poirel L., Nordmann P. (2010): First isolation of the *blaOXA-23* carbapenemase gene from an environmental *Acinetobacter baumannii* isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 578–579.
- Hadjadj L., Riziki T., Zhu Y., Li J., Diene S. M., Rolain J. M. (2017): Study of *mcr-1* gene-mediated colistin resistance in *Enterobacteriaceae* isolated from humans and animals in different countries. *Genes.* 8 (12): 394.
- Hameed F., Khan M. A., Muhammad H., Sarwar T., Bilal H., Rehman T. U. (2019): Plasmid-mediated *mcr-1* gene in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: first report from Pakistan. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 52.
- Hauser R., Pech M., Kijek J., Yamamoto H., Titz B., et al. (2012): RsfA (YbeB) proteins are conserved ribosomal silencing factors. *PLoS Genet.* 8: e1002815.
- Hembach N., Schmid F., Alexander J., Hiller C., Rogall E. T., Schwartz T. (2017): Occurrence of the *mcr-1* colistin resistance gene and other clinically relevant antibiotic resistance genes in microbial

populations at different municipal wastewater treatment plants in Germany. *Front. Microbiol.* 8: 1282.

Higgins P. G., Hrenovic J., Seifert H., Dekic S. (2018): Characterization of *Acinetobacter baumannii* from water and sludge line of secondary wastewater treatment plant. *Water Res.* 140: 261-267.

Hood M. I., Becker K. W., Roux C. M., Dunman P. M., Skaar E. P. (2013): Genetic determinants of intrinsic colistin tolerance in *Acinetobacter baumannii*. *Infect. Immun.* 81: 542–551.

Hooper D. C. (2005): Efflux pumps and nosocomial antibiotic resistance: a primer for hospital epidemiologists. *Clin. Infect. Dis.* 40: 1811–1817.

Hrenovic J., Goic-Barisic I., Kazazic S., Kovacic A., Ganjto M., Tonkic M. (2016): Carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in a municipal wastewater treatment plant, Croatia. *Eurosurveill.* 21: 21–30.

Hua X., Liu L., Fang Y., Shi Q., Li X., et al. (2017): Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* MDR-ZJ06 revealed by a multiomics approach. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7: 45.

Hubeny J., Korzeniewska E., Buta-Hubeny M., Zieliński W., Rolbiecki D., Harnisz M. (2022): Characterization of carbapenem resistance in environmental samples and *Acinetobacter* spp. isolates from wastewater and river water in Poland. *Sci. Total Environ.* 822: 153437.

Hussein N. H., Al-Kadmy I. M. S., Taha B. M., Hussein J. D. (2021): Mobilized colistin resistance (*mcr*) genes from 1 to 10: a comprehensive review. *Mol. Biol. Rep.* 48: 2897–2907.

Ivankovic T., Hrenovic J. (2010): Surfactants in the environment. *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.* 61: 95–110.

Jacobs A. C., Blanchard C. E., Catherman S. C., Dunman P. M., Murata Y. (2014): An ribonuclease T2 family protein modulates *Acinetobacter baumannii* abiotic surface colonization. *PloS one.* 9 (1): e85729.

Jeannot K., Bolard A., Plésiat P. (2017): Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 49: 526–35.

Jovcic B., Novovic K., Dekic S., Hrenovic, J. (2021): Colistin resistance in environmental isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Microb. Drug Resist.* 27 (3): 328-336.

- Kabanov D. S., Prokhorenko I. R. (2010): Structural analysis of lipopolysaccharides from Gram-negative bacteria. *Biochemistry (Mosc)*. 75: 383–404.
- Karakonstantis S., Kritsotakis E. I., Gikas A. (2020): Treatment options for *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *A. baumannii* co-resistant to carbapenems, aminoglycosides, polymyxins and tigecycline: An approach based on the mechanisms of resistance to carbapenems. *Infection*. 48: 835–851.
- Kasiakou S. K., Michalopoulos A., Soteriades E. S., Samonis G., Sermaidis G. J., Falagas M. E. (2005): Combination therapy with intravenous colistin for management of infections due to multidrug-resistant Gram-negative bacteria in patients without cystic fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother*. 49 (8): 3136-3146.
- Kaye K. S., Pogue J. M., Tran T. B., Nation R. L., Li J. (2016): Agents of last resort: polymyxin resistance. *Infect. Dis. Clin. North Am*. 30: 391–414.
- Khadka N. K., Aryal C. M., Pan J. (2018): Lipopolysaccharide-dependent membrane permeation and lipid clustering caused by cyclic lipopeptide colistin. *ACS Omega*. 3: 17828–17834.
- Khedher M. B., Baron S. A., Riziki T., Ruimy R., Raoult D., Diene S. M., Rolain J. M. (2020): Massive analysis of 64,628 bacterial genomes to decipher water reservoir and origin of mobile colistin resistance genes: is there another role for these enzymes?. *Sci. Rep*. 10 (1): 1-10.
- Kittinger C., Kirschner A., Lipp M., Baumert R., Mascher F., Farnleitner A. H., Zarfel G. E. (2018): Antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. isolates from the river Danube: susceptibility stays high. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 15 (1): 52.
- Koeppen K., Hampton T. H., Jarek M., Scharfe M., Gerber S. A., Mielcarz D. W., Demers E. G., Dolben E. L., Hammond J. H., Hogan D. A., Stanton B. A. (2016): A novel mechanism of host-pathogen interaction through sRNA in bacterial outer membrane vesicles. *PLOS Pathogens*. 12: e1005672.
- Koyama Y. (1950): A new antibiotic 'colistin' produced by spore-forming soil bacteria. *J. Antibiot*. 3: 457–458.
- Kwa A., Kasiakou S. K., Tam V. H., Falagas M. E. (2007): Polymyxin B: similarities to and differences from colistin (polymyxin E). *ERATCK*. 5 (5): 811-821.
- Kyriakidis I., Vasileiou E., Pana Z. D., Tragiannidis A. (2021): *Acinetobacter baumannii* antibiotic resistance mechanisms. *Pathogens*. 10 (3): 373.

- Larsson D. J., Andremont A., Bengtsson-Palme J., Brandt K. K., de Roda Husman A. M., et al. (2018): Critical knowledge gaps and research needs related to the environmental dimensions of antibiotic resistance. *Environ. Int.* 117: 132-138.
- Lean S. S., Suhaili Z., Ismail S., Rahman N. I. A., Othman N., et al. (2014): Prevalence and genetic characterization of carbapenem-and polymyxin-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from a tertiary hospital in Terengganu, Malaysia. *ISRN microbiology*. 2014: 1-9.
- Ledger E. V., Sabnis A., Edwards A. M. (2022): Polymyxin and lipopeptide antibiotics: membrane-targeting drugs of last resort. *Microbiology*. 168 (2): 001136.
- Lee H. Y., Hsu S. Y., Hsu J. F., Chen C. L., Wang Y. H., Chiu C. H. (2018): Risk factors and molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* bacteremia in neonates. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 51: 367–376.
- Lee K., Yong D., Jeong S. H., Chong Y. (2011): Multidrug-resistant *Acinetobacter* spp.: increasingly problematic nosocomial pathogens. *Yonsei Med. J.* 52: 879-91.
- Leonard A. F., Zhang L., Balfour A. J., Garside R., Gaze W. H. (2015): Human recreational exposure to antibiotic resistant bacteria in coastal bathing waters. *Environ. Int.* 82: 92-100.
- Li J., Nation R. L., Milne R. W., Turnidge J. D., Coulthard K. (2005): Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 25 (1): 11–25.
- Li J., Nation R. L., Turnidge J. D., Milne R. W., Coulthard K., Rayner C. R., Paterson D. L. (2006a): Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet Infect. Dis.* 6 (9): 589-601.
- Li J., Rayner C. R., Nation R. L., Owen R. J., Spelman D., Tan K. E., Liolios L. (2006b): Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50 (9): 2946-2950.
- Lima W. G., Alves M. C., Cruz W. S., Paiva M. C. (2018): Chromosomally encoded and plasmid-mediated polymyxins resistance in *Acinetobacter baumannii*: A huge public health threat. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* 37: 1009–1019.
- Lin M. F., Lin Y. Y., Lan C. Y. (2017): Contribution of EmrAB efflux pumps to colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J. Microbiol.* 55: 130–136.



- Liu Y.Y., Wang Y., Walsh T.R., Yi L.X., Zhang R., et al. (2016): 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.* 16: 161–168.
- Lomovskaya O., Lewis K. (1992): *emr*, an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 8938–8942.
- Luke N. R., Sauberan S. L., Russo T. A., Beanan J. M., Olson R., Loehfelm T. W., Cox A. D., Michael F., Vinogradov E. V., Campagnari A. A. (2010): Identification and characterization of a glycosyltransferase involved in *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharide core biosynthesis. *Infect. Immun.* 78: 2017–2023.
- Ma F., Shen C., Zheng X., Liu Y., Chen H., et al. (2019): Identification of a novel plasmid carrying *mcr-4.3* in an *Acinetobacter baumannii* strain in China. *Antimicrob. Agents Chemother.* 63 (6): e00133-19.
- Machado D., Antunes J., Simões A., Perdigão J., Couto I., et al. (2018): Contribution of efflux to colistin heteroresistance in a multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolate. *J. Med. Microbiol.* 67 (6): 740-749.
- Magiorakos A. P., Srinivasan A., Carey R. B., Carmeli Y., Falagas M. E., et al. (2012): Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18 (3): 268-281.
- Magnet S., Courvalin P., Lambert T. (2001): Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 3375–3380.
- Malinverni J. C., Silhavy T. J. (2009): An ABC transport system that maintains lipid asymmetry in the Gram-negative outer membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106: 8009–8014.
- Marceau M., Sebbane F., Ewann F., Collyn F., Lindner B., Campos M. A., Bengoechea J. A., Simonet M. (2004): The *pmrF* polymyxin-resistance operon of *Yersinia pseudotuberculosis* is upregulated by the PhoP-PhoQ two-component system but not by PmrA-PmrB, and is not required for virulence. *Microbiology.* 150: 3947–3957.
- Martínez J.L. (2009): Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ. Pollut.* 157: 2893–2902.

- Martínez J. L., Coque T. M., Baquero F. (2015): What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. *Nat. Rev. Microbiol.* 13 (2): 116-123.
- McConnell M. J., Actis L., Pachón J. (2013): *Acinetobacter baumannii*: Human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol. Rev.* 37 (2): 130–155.
- Moffatt J. H., Harper M., Adler B., Nation R. L., Li J., Boyce J. D. (2011): Insertion sequence IS*Aba11* is involved in colistin resistance and loss of lipopolysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55 (6): 3022–3024.
- Moffatt J. H., Harper M., Harrison P., Hale J. D. F., Vinogradov E., et al. (2010): Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 4971–4977.
- Mu X., Wang N., Li X., Shi K., Zhou Z., Yu Y., Hua X. (2016): The effect of colistin resistance-associated mutations on the fitness of *Acinetobacter baumannii*. *Front. Microbiol.* 7: 1–8.
- Nemec A., Krizova L., Maixnerova M., Sedo O., Brisse S., Higgins P. G. (2015): *Acinetobacter seifertii* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex isolated from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65: 934–942.
- Nhu N. T. K., Riordan D. W., Nhu T. D. H., Thanh D. P., Thwaites G., Lan N. P. H., Wren B. W., Baker S., Stabler R. A. (2016): The induction and identification of novel colistin resistance mutations in *Acinetobacter baumannii* and their implications. *Sci. Rep.* 6: 1–10.
- Ni W., Li Y., Guan J., Zhao J., Cui J., et al. (2016): Effects of efflux pump inhibitors on colistin resistance in multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60: 3215–3218.
- Nordmann P., Poirel L. (2019): Epidemiology and diagnostics of carbapenem resistance in Gram-negative bacteria. *Clin. Infect. Dis.* 69: S521–S528.
- Oh J. T., Van Dyk T. K., Cajal Y., Dhurjati P. S., Sasser M., Jain M. K. (1998): Osmotic stress in viable *Escherichia coli* as the basis for the antibiotic response by polymyxin B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246: 619–623.
- Pakharukova N., Tuittila M., Paavilainen S., Malmi H., Parilova O., Teneberg S., Knight S. D., Zavalov A. V. (2018): Structural basis for *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 115: 5558–5563.

- Pal C., Bengtsson-Palme J., Kristiansson E., Larsson D. J. (2015): Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. *BMC Genom.* 16 (1): 1-14.
- Park J., Kim M., Shin B., Kang M., Yang J., et al. (2021): A novel decoy strategy for polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Elife.* 10: e66988.
- Park Y. K., Choi J. Y., Shin D., Ko K. S. (2011): Correlation between overexpression and amino acid substitution of the *pmrAB* locus and colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 37 (6): 525–530.
- Pärnänen K. M., Narciso-da-Rocha C., Kneis D., Berendonk T. U., Cacace D., et al. (2019): Antibiotic resistance in European wastewater treatment plants mirrors the pattern of clinical antibiotic resistance prevalence. *Sci. Adv.* 5 (3): eaau9124.
- Paul D., Mallick S., Das S., Saha S., Ghosh A.K., Mandal S.M. (2019): Colistin induced assortment of antimicrobial resistance in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* SD01. *Infect. Disord. Drug Targets.* 20: 501–505.
- Peleg A. Y., Seifert H., Paterson D. L. (2008): *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 21: 538–582.
- Piddock L. J. (2006): Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 4: 629–636.
- Poirel L., Jayol A., Nordmann P. (2017): Polymyxins: Antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clin. Microbiol. Rev.* 30: 557–596.
- Pristovsek P., Kidric J. (1999): Solution structure of polymyxins B and E and effect of binding to lipopolysaccharide: an NMR and molecular modeling study. *J. Med. Chem.* 42 (22): 4604-4613.
- Rizzo L., Manaia C., Merlin C., Schwartz T., Dagot C., et al. (2013): Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *Sci. Total Environ.* 447: 345-360.
- Roier S., Zingl F. G., Cakar F., Durakovic S., Kohl P., Eichmann T. O., Klug L., Gadermaier B., Weinzerl K., Prassl R., Lass A., Daum G., Reidl J., Feldman M. F., Schild S. (2016): A novel mechanism for the biogenesis of outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *Nat. Commun.* 7: 10515.

- Roma-Rodrigues C., Santos P. M., Benndorf D., Rapp E., Sá-Correia I. (2010): Response of *Pseudomonas putida* KT2440 to phenol at the level of membrane proteome. *J. Proteome*. 73: 1461–1478.
- Ross S., Puig J. R., Zaremba E. A. (1959): Colistin: some preliminary laboratory and clinical observations in specific gastroenteritis in infants and children. *Antibiot. Annu.* 7: 89–100.
- Sabnis A., Hagart K. L., Klöckner A., Becce M., Evans L. E., et al. (2021): Colistin kills bacteria by targeting lipopolysaccharide in the cytoplasmic membrane. *Elife*. 10: e65836.
- Sampson T. R., Liu X., Schroeder M. R., Kraft C. S., Burd E. M., Weiss D. S. (2012): Rapid killing of *Acinetobacter baumannii* by polymyxins is mediated by a hydroxyl radical death pathway. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56 (11): 5642-5649.
- Satlin M. J., Lewis J. S., Weinstein M. P., Patel J., Humphries R. M., et al. (2020): Clinical and Laboratory Standards Institute and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing position statements on polymyxin B and colistin clinical breakpoints. *Clin. Infect. Dis.* 71 (9): e523-e529.
- Selasi G. N., Nicholas A., Jeon H., Lee Y. C., Yoo J. R., Heo S. T., Lee J. C. (2015): Genetic basis of antimicrobial resistance and clonal dynamics of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* sequence type 191 in a Korean hospital. *Infect. Genet. Evol.* 36: 1–7.
- Seruga Music M., Hrenovic J., Goic-Barisic I., Hunjak B., Skoric D., Ivankovic T. (2017) Emission of extensively-drug resistant *Acinetobacter baumannii* from hospital settings to the natural environment. *J. Hosp. Infect.* 96: 323–327.
- Smets B. F., Rittmann B. E., Stahl D. A. (1990): The role of genes in biological processes. Part 2. *Environ. Sci. Technol.* 24: 162–9.
- Sun B., Liu H., Jiang Y., Shao L., Yang S., Chen D. (2020): New mutations involved in colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Msphere*. 5 (2): e00895-19.
- Sun J., Zhang H., Liu Y. H., Feng Y. (2018): Towards understanding MCR-like colistin resistance. *Trends Microbiol.* 26 (9): 794-808.
- Tikhonova E. B., Dastidar V., Rybenkov V. V., Zgurskaya H. I. (2009): Kinetic control of TolC recruitment by multidrug efflux complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106: 16416–16421.

- Trebosc V., Gartenmann S., Tötzl M., Lucchini V., Schellhorn B., et al. (2019): Dissecting colistin resistance mechanisms in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *MBio*. 10 (4): e01083-19.
- Turton J. F., Woodford N., Glover J., Yarde S., Kaufmann M. E., Pitt T. L. (2006): Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *blaOXA-51-like* carbapenemase gene intrinsic to this species. *J. Clin. Microbiol.* 44: 2974–2976.
- Velkov T., Thompson P. E., Nation R. L., Li J. (2010): Structure--activity relationships of polymyxin antibiotics. *J. Med. Chem.* 53 (5): 1898-1916.
- Verlicchi P. (2018): Hospital wastewaters: characteristics, management, treatment and environmental risks. Springer.
- Vidaillac C., Benichou L., Duval R. E. (2012): In vitro synergy of colistin combinations against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56: 4856-61.
- Vijayakumar S., Biswas I., Veeraraghavan B. (2019): Accurate identification of clinically important *Acinetobacter* spp.: An update. *Future Sci. OA.* 5: FSO395.
- Wand M. E., Bock L. J., Bonney L. C., Sutton J. M. (2015): Retention of virulence following adaptation to colistin in *Acinetobacter baumannii* reflects the mechanism of resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 70: 2209–2216.
- Warskow A. L., Juni E. (1972): Nutritional requirements of *Acinetobacter* strains isolated from soil, water, and sewage. *J. Bacteriol.* 112 (2): 1014-1016.
- Whitfield C., Trent M. S. (2014): Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* 83: 99–128.
- Yancey P. H. (2005): Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J. Exp. Biol.* 208: 2819 –2830.
- Yang C. H., Su P. W., Moi S. H., Chuang L. Y. (2019): Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: genotype-phenotype correlation. *Molecules.* 24 (10): 1849.
- Zhang C., Qiu S., Wang Y., Qi L., Hao R., et al. (2013): Higher isolation of NDM-1 producing *Acinetobacter baumannii* from the sewage of the hospitals in Beijing. *PLoS One.* 8: e64857.

World Health Organization (2017) *WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed* <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (pristupljeno 7. 4. 2022.).

World Health Organization (2020) *An update on the fight against antimicrobial resistance* <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/an-update-on-the-fight-against-antimicrobial-resistance> (pristupljeno 7. 4. 2022.).

## 8. Životopis

Moje ime je Andrea Kosier i rođena sam u Zagrebu, 1999. godine, gdje sam završila osnovnu školu i gimnaziju. Tijekom srednjoškolskog obrazovanja postigla sam velik uspjeh na državnom natjecanju iz matematike zbog kojega sam pozvana na Olimpijadu metropola u Moskvi te nagrađena stipendijom za izvrsnost. Nakon završetka srednje škole, 2018. godine, upisala sam preddiplomski sveučilišni studij Molekularne biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Za vrijeme studija uključila sam se kao volonter u brojne znanstveno-edukativne aktivnosti poput Noći biologije, petog Simpozija studenata bioloških usmjerenja (SiSB5) te Noći muzeja u Hrvatskom prirodoslovnom muzeju. U akademskoj godini 2020./2021. bila sam dio organizacijskog odbora šestog Simpozija studenata biološkog usmjerenja (SiSB6) u okviru Tima za planiranje, a velika uspješnost simpozija nagrađena je Rektorovom nagradom. Iste akademske godine vodila sam Mikrobiološku sekciju studentske udruge BIUS. Dodatno, aktivno sam sudjelovala na Simpoziju o invazivnim vrstama u Novom Sadu te pasivno na Studenskom kongresu o HIV-u. Laboratorijsku stručnu praksu radila sam u Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo u Službi za mikrobiologiju pod vodstvom dr. sc. Blaženke Hunjak te u Zavodu za molekularnu biologiju pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Ivančić Baće.

Osim akademske preokupacije, za vrijeme studija sudjelovala sam na Erasmus plus projektima o zaštiti okoliša, poduzetništvu, mentalnom zdravlju i plesu u Litvi, Poljskoj, Danskoj i Španjolskoj. U ljetu 2021. godine sudjelovala sam na projektu „On the path of solidarity“ na Sardiniji u okviru „European Solidarity Corps“ programa.

e-mail: akosier@stud.biol.pmf.hr