SEMMELWEIS EGYETEM

DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2121.

KÁDÁR BÉLA

Mikroorganizmusok és anyagaik hatásainak molekuláris, celluláris és organizmus szintű vizsgálata

című program

Programvezető: Dr. Nagy Károly, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Szabó Dóra, egyetemi tanár

Colistin-rezisztencia vizsgálata Gram-negatív baktériumokban

Doktori értekezés

Dr. Kádár Béla

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Szabó Dóra, D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Kónya József, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Sipeki Szabolcs, Ph.D., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Cseh Károly, D.Sc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Pálos Gábor, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Sinkó János, Ph.D., főorvos

Budapest
2017

TARTALOMJEGYZÉK

I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 3
II. BEVEZETÉS 5
1. Multidrug-rezisztencia a Gram-negatív baktériumokban 5
1.1. Rezisztenciamechanizmusok 5
1.1.1. β-laktám rezisztencia 5
1.1.2. Aminoglikozid-rezisztencia 6
1.1.3. Fluorokinolon-rezisztencia 7
2. Polymyxinek 7
2.1. Általános jellemzés 7
2.2. Természetes polymyxinek 9
2.2.1. Kémiai szerkezet 9
2.2.2. Antimikrobiális tulajdonságok 11
2.2.2.1. Hatásmechanizmus 11
2.2.2.2. Hatásspektrum 12
2.2.2.3. Gyógyszerkészítmények 12
2.2.2.4. Farmakodinámia 13
2.2.2.5. Toxicitás 13
2.2.2.6. Farmakokinetika 15
2.2.2.6.1. Szérumszintmérés 15
2.2.2.6.2. Adagolás 15
2.2.2.6.3. Szöveti eloszlás és kiürülés 17
2.2.2.7. Kombinációs terápiás lehetőségek 17
2.3. Szintetikus és szemiszintetikus polymyxinszármazékok 19
2.3.1. Nonapeptid-származékok 19
2.3.2. Módosított lipid-végláncú származékok 19
2.3.3. Három pozitív töltést tartalmazó származékok 19
2.3.4. Deacilált származékok 21
2.3.5. Antimikrobiális peptidek mint polymyxinanalógok 21
2.4. Colistin-rezisztencia 22
2.4.1. A colistin-rezisztencia molekuláris mechanizmusai 23
2.4.1.1. 4-amino-4-dezoxi-L-arabinóz addíció 24
2.4.1.2. Foszfoetanolamin-addíció 25
2.4.1.3. *mgrB* inaktiváció 25
2.4.1.4. Az *mcr* gének 26
2.4.2. A rezisztenciamechanizmusok molekuláris szabályozása 27
III. CÉLKITŰZÉSEK 30
IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK 31
1. Baktériumtörzsek 31
2. Antibiotikum-érzékenység meghatározás 31
3. Checkerboard analízis 32
4. Laktoferrinnel, protaminnal és lizozimmel szembeni érzékenység 33
5. Colistin-rezisztencia gének vizsgálata PCR-ral 33
6. Génexpresszió vizsgálata RT-qPCR-ral 35
7. Külső membrán fehérjék izolálása 36

8. Külső membrán fehérjék egydimenziós gélelektroforézise (1-DE) 37
9. Külső membrán fehérjék analízise Microchippel 37
10. Külső membrán fehérjék kétdimenziós gélelektroforézise (2-DE) 38
11. Gélen belüli emésztés 39
12. MALDI-TOF/MS tömegspektrometria 39
V. EREDMÉNYEK 40
1. Antibiotikum-érzékenység 40
2. A checkerboard analízis eredményei 42
3. Laktoferrinnel, protaminnal és lizozimmel szembeni érzékenység 43
4. Colistin-rezisztencia gének vizsgálata PCR-ral 45
5. Génexpresszió vizsgálata RT-qPCR-ral 45
6. Külső membrán fehérjék egydimenziós gélelektroforézise 46
7. Külső membrán fehérjék analízise Microchippel 48
8. A külső membrán fehérjék analízise MALDI-TOF tömegspektrometriával 50
VI. MEGBESZÉLÉS 51
VII. ÚJ EREDMÉNYEK 56
VIII. ÖSSZEFOGLALÁS 57
IX. SUMMARY 58
X. IRODALOMJEGYZÉK 59
XI. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK 80
1. Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények 80
2. Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények 80
XII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 82
XIII. PUBLIKÁCIÓK LENYOMATAI 83

I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AAC	aminoglycoside acetyltransferase (aminoglikozid-acetiltranszferáz)
AME	aminoglycoside modifying enzyme (aminoglikozid-módosító enzim)
ANT	aminoglycoside nucleotidyltransferase (aminoglikozid-nukleotidiltranszferáz)
APH	aminoglycoside phosphotransferase (aminoglikozid-foszfotranszferáz)
CAP	cationic antimicrobial peptide (kationos antimikrobiális peptid)
CFU	colony-forming unit (telepképző egység)
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (kolamidopropil-dimetilammonio-propánszulfonát)
CHCA	α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (α-ciano-4-hidroxifahéjsav)
CMS	colistimethate sodium, colistin methanesulphonate sodium (colistimetát-nátrium, colistin-metánszulfonát–nátrium)
Dab	diaminobutyric acid (diaminovajsav)
Dap	L-α,β-diaminopropionic acid (L-α,β-diaminopropionsav)
DNS	dezoxiribonukleinsav
DPS	DNA starvation/stationary phase protection protein (DNS stacioner fázis protektív fehérje)
ESBL	extended-spectrum β-lactamase (kiterjesztett spektrumú β-laktamáz)
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Antibiotikum-érzékenységi Vizsgálatok Európai Bizottsága)
FCL	feed-forward connector loop (előrecsatolásos kapcsolóhuroknak)
FIC	fractional inhibitory concentration (frakcionális gátló koncentráció)
HPLC	high-performance liquid chromatography (nagy teljesítményű folyadékkromatográfia)
IEF	isoelectric focusing (izoelektromos fókuszálás)
IPG	immobilized pH gradient (immobilizált pH gradiens)

KPC	*Klebsiella pneumoniae* carbapenemáz
LC–MS/MS	liquid chromatography–tandem mass spectrometry (folyadékkromatográfia–tandem tömegspektrometria)
LPS	lipopolysaccharide (lipopoliszacharid)
MALDI-TOF/MS	matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight / mass spectrometry (mátrix-asszisztált lézer deszorpciós/ionizációs – repülési idő tömegspektrometria)
MBL	metallo-β-lactamase (metallo-β-laktamáz)
MDR	multidrug-resistance/-resistant (multidrug-rezisztencia/-rezisztens)
MHB	Mueller-Hinton broth (Mueller-Hinton tápleves)
MIC	minimal inhibitory concentration (minimális gátló koncentráció)
NE	nemzetközi egység
OMP	outer membrane protein (külső membrán fehérje)
PBS	phosphate buffered saline (foszfát-puffer)
PCR	polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)
PDR	pandrug- resistance/-resistant (pándrug-rezisztencia/-rezisztens)
PMB	polymyxin B
PMQR	plasmid-mediated quinolone resistance (plazmid-mediálta kinolon-rezisztencia)
RNS	ribonukleinsav
rRNS	riboszomális ribonukleinsav
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction (reverz transzkripciós polimeráz láncreakció)
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis)
TLC	thin-layer chromatography (vékonyréteg-kromatográfia)
Tris	*tris*(hydroxymethyl)aminomethane (tris-hidroximetil-aminometán)
tRNS	transzfer (szállító) ribonukleinsav
ttkg	testtömegkilogramm
UDP	uridine diphosphate (uridin-difoszfát)
XDR	extensive drug-resistance/ extensively drug-resistant (extenzív drug-rezisztencia/extenzíven drug-rezisztens)

II. BEVEZETÉS

1. Multidrug-rezisztencia a Gram-negatív baktériumokban

1.1. Rezisztenciamechanizmusok

Az antibiotikum-rezisztens kórokozók világszerte egyre nagyobb egészségügyi problémát jelentenek. 2012 előtt nem volt egységes terminológia a Gram-pozitív és Gram-negatív kórokozó baktériumok antibiotikum-rezisztenciája mértékének kifejezésére, ezért addig a *Mycobacterium tuberculosis* esetében használt szakkifejezéseket használták. 2012 óta multidrug-rezisztensnek (MDR) akkor tekintünk egy mikrobát, ha az ellene empirikusan használt antibiotikum-csoportok közül minimum háromnak legalább egy-egy vegyületére nem érzékeny. Extenzív drug-rezisztencia (XDR) esetén a mikroba maximum két antibiotikum-csoport vegyületeire érzékeny. A pánrezisztens (PDR) törzsek az ellenük empirikusan használt összes antibiotikumra rezisztensek [1, 2].

Az utóbbi években egyre gyakoribbá váltak az MDR és XDR Gram-negatív kórokozók okozta, jellemzően nozokomiális fertőzések. A figyelem középpontjában a nem-fermentáló Gram-negatív baktériumok (*Acinetobacter* fajok, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophonomonas maltophilia*) és az *Enterobacteriaceae* család tagjai (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, valamint *Proteus*, *Enterobacter*, *Citrobacter* fajok) vannak. Ezen baktériumok az utóbbi években egyre nagyobb mértékben váltak rezisztenssé a különböző antibiotikum-családokkal szemben [3, 4].

1.1.1. β-laktám rezisztencia

A β-laktámokkal szembeni rezisztencia alapja a β-laktamáz termelés. Az ún. kiterjesztett spektrumú β-laktamázok (extended-spectrum β-lactamase, ESBL) bontják a penicillineket és a cephalosporinokat. Ilyen enzimeket kimutattak a nem-fermentáló Gram-negatív baktériumokból és a bélbaktériumokból is [5-8].

Az *Enterobacteriaceae* család egyes tagjai termelhetnek speciális β-laktamázokat, AmpC-cephalosporinázokat, amelyek képesek bontani a széles spektrumú 3. és 4. generációs cephalosporinokat, viszont nem gátolhatók β-laktamáz gátlókkal [9].

Az ESBL-termelő baktériumok ellen alkalmazott carbapenem antibiotikumokkal szemben a baktériumok bontóenzimekkel (carbapenemázokkal, metallo-β-laktamázokkal) vagy efflux pumpákkal alakítanak ki rezisztenciát. A carbapenemázok típusos képviselői a *Klebsiella pneumoniae* carbapanemázok (KPC-k), amelyeket először a névadó fajban mutatták ki, majd más bélbaktériumokban is [10, 11].

A KPC-termelő *K. pneumoniae* törzsek az utóbbi időben egyre nagyobb számban felelősek súlyos nozokomiális infekciókért Magyarországon és világszerte. Metallo-β-laktamázokat (MBL) az *Enterobacteriaceae* család tagjai mellett az *Acinetobacter baumannii* és a *P. aeruginosa* is termelhetnek [12-14].

Az efflux pumpák a Gram-negatív baktériumok külső membránjában lévő transzportfehérjék, melyek segítségével a mikrobák antibiotikumokat tudnak a citoplazmából kipumpálni aktív transzporttal. Mint antibiotikum-rezisztencia mechanizmus elsősorban a *P. aeruginosá*ra és az *Acinetobacter* fajokra jellemző [15].

1.1.2. Aminoglikozid-rezisztencia

Az aminoglikozid-rezisztencia hátterében elsősorban a gyógyszermolekulák enzimatikus módosítása áll, ún. aminoglikozid-módosító enzimek (aminoglycoside modifying enzymes, AMEs) segítségével. Ezek az enzimek az aminoglikozidok szabad hidroxil- (–OH) vagy aminocsoportjait ($–NH_2$) szubsztituálják különféle funkciós csoportokkal, ezzel inaktiválva őket. A szubsztituens funkciós csoportok kémiai hovatartozása alapján megkülönböztetünk acetiltranszferázokat (AAC), nukleotidiltranszferázokat (ANT) és foszfotranszferázokat (APH). Ilyen enzimeket a bélbaktériumok, a *P. aeruginosa* és az *A. baumannii* is termelnek [16].

1.1.3. Fluorokinolon-rezisztencia

Fluorokinolon-rezisztenciát több mechanizmus is kialakíthat. Az egyik a célfehérjék – bakteriális DNS-giráz és topoizomeráz IV – alegységeit kódoló gének mutációi, melyek következtében az antibiotikumok kisebb affinitással kötődnek hozzájuk. A Gram-negatív baktériumokban a DNS-giráz érzékenyebb a fluorokinolonokra, mint a másik enzim, így mutációs eredetű rezisztenciát elsősorban a GyrA alegység génjének (*gyrA*) szekvenciaváltozása tud előidézni [17].

A fluorokinolonokkal szembeni rezisztenciában szintén közrejátszhatnak az efflux pumpák, mind a nem-fermentáló Gram-negatív baktériumoknál, mind a bélbaktériumoknál [18, 19].

Az *Enterobacteriaceae* család tagjainál 1998-ban fedezték fel az ún. plazmid-mediálta kinolon-rezisztencia (plasmid-mediated quinolone resistance, PMQR) mechanizmusokat. Ezek a plazmidon kódolt fehérjék alacsony szintű („low-level”) kinolon-rezisztenciát alakítanak ki, miközben emelik a hordozó törzsek mutációs frekvenciáját, ezáltal magas szintű rezisztencia kialakulását segíthetik elő. Továbbá a PMQR géneket hordozó plazmidokon gyakran találni ESBL- vagy MBL-géneket is [20-22].

Eddig háromféle PMQR mechanizmust írtak le: (i) a Qnr fehérjéket, amelyek a DNS-girázhoz és topoizomeráz IV-hez kötődve gátolják a fluorokinolonok hozzájuk kapcsolódását, (ii) az AAC(6')-Ib nevű aminoglikozid *N*-acetiltranszferáz egyik bifunkcionáls variánsát (AAC(6')-Ib-cr), amelynek bizonyos fluorokinolonok (norfloxacin, ciprofloxacin) is szubsztrátjai, (iii) valamint fluorokinolon-specifikus efflux pumpákat (OqxAB és QepAB) [23-25].

2. Polymyxinek

2.1. Általános jellemzés

A polymyxin antibiotikumokat az 1940-es évek végén fedezték fel. A *Paenibacillus polymyxa* – akkoriban *Bacillus aerosporus*, később *Bacillus polymyxa* – Gram-pozitív talajbaktérium különböző törzsei által termelt antimikrobiális anyagok

közül elsőként az aerosporint izolálták, melyet később polymyxin B-nek neveztek el. Az 1950-es évek közepéig még öt különböző vegyületet írtak le, polymyxin A-t, C-t, D-t, E-t és a colistint, azonban utóbbiról kiderült, hogy azonos a polymyxin E-vel. Az 1950-es évek után még számos természetes eredetű polymyxint sikerült izolálni különböző szaprofita baktériumokból [26-30].

A bioszintetikus polymyxinek pentakationos polipeptidek. Tíz aminosavból állnak; a különböző molekulák aminosav-sorrendje eltérő lehet, szerkezeti felépítésük azonban megegyezik. Két fő részből állnak: egy heptapeptid-gyűrűből, illetve egy lineáris tripeptidből. A két rész között egy amid-kötés található, amely a C-terminális aminosavat kapcsolja össze a 4. aminosav (általában diaminovajsav, angolul diaminobutyric acid, röviden Dab) szabad aminocsoportjával. A tripeptid komponens N-terminális részéhez változó szénlánc-hosszúságú zsírsavmaradék kapcsolódik. Tartalmaznak hidrofób és kationos aminosavakat, melyek közül néhányhoz pozitív töltésű aminocsoportok kapcsolódhatnak. A polymyxineket az emberi proteolítikus enzimek képtelenek elbontani, mivel egyrészt nem DNS által kódolt proteinek, másrészt tartalmazhatnak D-konfigurációjú aminosavakat. Ennek ellenére léteznek bakteriális enzimek, melyek képesek bontani ezeket a peptideket, pl. a colistináz, amit egy colistintermelő törzsből, a *Bacillus polymyxa* var. colistinus Koyamából izoláltak. A polymyxinek átlagos molekulatömege 1 kDa [31-33].

A polymyxinek szintéziséről az 1980-as évekig viszonylag keveset tudtak. Komura és Kurahashi 1980-ban írták le a szintézisükért felelős nonriboszomális peptid szintetázokat. Ezek moduláris szerkezetű multienzim komplexek, amelyek RNS-templát nélkül és nem csak a riboszomális rendszer által használt húszféle aminosavból képesek fehérjéket létrehozni. 2009-ben Choi és munkatársai azonosítottak egy géncsoportot, mely feltehetően a polymyxin A szintéziséért felelős fehérjéket kódolja a *P. polymyxa* E681-es törzsben. A baktérium genomjának szekvenálása és analízise eredményeképpen találtak egy potenciális polymyxin-szintetáz clustert, mely öt nyílt leolvasási keretből állt: *pmxA*, *pmxB*, *pmxC*, *pmxD* és *pmxE*. További vizsgálatok arra utaltak, hogy a *pmxC* és *pmxD* membrántranszporter fehérjék génjei, míg a többi gén a szintetázokat kódolja [34-37].

2.2. Természetes polymyxinek

2.2.1. Kémiai szerkezet

A természetes, bioszintetikus polymyxinek egymástól aminosav-sorrendjükben és N-terminális zsírsavmaradékaikban különböznek. Az napjainkig azonosított vegyületek közül kettő bizonyult alkalmasnak klinikai használatra, a polymyxin B (PMB) és a polymyxin E, más néven colistin. A két molekula mindössze egy aminosavban különbözik egymástól: a polymyxin B 6. aminosava (a heptapeptid-gyűrű rész 3. egysége) egy D-fenilalanin (D-Phe), míg a colistinben ugyanazon a helyen egy D-leucin (D-Leu) található [38-40].

A polymyxin B és a colistin valójában nem önálló molekulák, hanem mindkettő különböző molekulák keveréke. A polymyxin B fő komponensei a polymyxin B_1 és B_2, valamint kis mennyiségben a polymyxin B_{3-8}. A colistin két fő összetevője a colistin A és B (polymyxin E_1 és E_2), illetve ezeken kívül a polymyxin E_{3-8}. Az egyes alkotóelemek N-terminális zsírsavmaradékaikban különböznek: az 1-es típusú molekulák végén 6-metiloktanoil van, a 2-es típusúakén 6-metilheptanoil, a 3-asokén pedig oktanoil. Az említett antimikrobiális anyagok aminosav-szekvenciája az 1. táblázatban látható [41-43].

A polymyxin A-nak, C-nek és D-nek is van antibiotikus tulajdonsága, azonban magas fokú toxicitásuk miatt klinikai használatra alkalmatlannak bizonyultak [27].

Nem kizárólag *P. polymyxa* törzsek szintetizálnak polymyxineket. A polymyxin M-et, más néven mattacint először orosz kutatók írták le, majd 2003-ban azonosították az előállító baktériumot, a *Paenibacillus kobensis* M-et. A mattacin a polymyxin A–E-hez hasonlóan egy nonriboszomálisan szintetizált dekapeptid. Aminosav-szekvenciája az 1. táblázatban látható. Az N-terminális aminosavhoz kapcsolódó zsírsavmaradék egy 6-metiloktanoil. A 6-os pozícióban lévő aminosav a colistinhez hasonlóan D-Leu [30, 44, 45].

1. Táblázat: Bioszintetikus polymyxinek aminosav-sorrendje és N-terminális zsírsavmaradékai

Név	Aminosav-sorrend	Hivatkozás
polymyxin B_1	MOA – Dab^+ – Thr – Dab^+ – cy[Dab – Dab^+ – D-Phe – Leu – Dab^+ – Dab^+ – Thr]	[40, 43]
polymyxin B_2	MHA – Dab^+ – Thr – Dab^+ – cy[Dab – Dab^+ – D-Phe – Leu – Dab^+ – Dab^+ – Thr]	[40, 43]
polymyxin B_3	OA – Dab^+ – Thr – Dab^+ – cy[Dab – Dab^+ – D-Phe – Leu – Dab^+ – Dab^+ – Thr]	[40, 43]
polymyxin E_1	MOA – Dab^+ – Thr – Dab^+ – cy[Dab – Dab^+ – D-Leu – Leu – Dab^+ – Dab^+ – Thr]	[42, 46]
polymyxin E_2	MHA – Dab^+ – Thr – Dab^+ – cy[Dab – Dab^+ – D-Leu – Leu – Dab^+ – Dab^+ – Thr]	[42, 46]
polymyxin E_3	OA – Dab^+ – Thr – Dab^+ – cy[Dab – Dab^+ – D-Leu – Leu – Dab^+ – Dab^+ – Thr]	[42, 46]
polymyxin D_1	MOA – Dab^+ – Thr – D-Ser – cy[Dab – Dab^+ – D-Leu – Thr – Dab^+ – Dab^+ – Thr]	[47]
polymyxin M	MOA – Dab^+ – Thr – Dab^+ – cy[Dab – Dab^+ – D-Leu – Thr – Dab^+ – Dab^+ – Thr]	[45]
polymyxin S_1	MOA – Dab^+ – Thr – D-Ser – cy[Dab – Dab^+ – D-Phe – Thr – Dab^+ – Dab^+ – Thr]	[28]
polymyxin T_1	MOA – Dab^+ – Thr – Dab^+ – cy[Dab – Dab^+ – D-Phe – Leu– Dab^+ – Dab^+ – Leu]	[29]

Rövidítések:

cy - a gyűrűs molekularész szögletes zárójellel jelölve

Dab - diaminovajsav; Leu - leucin; Phe - fenilalanin; Ser - szerin; Thr - treonin

MHA - 6-metilheptanoil; MOA - 6-metiloktanoil; OA - oktanoil

$^+$: pozitív töltésű szabad α- vagy γ-aminocsoport

2.2.2. Antimikrobiális tulajdonságok

2.2.2.1. Hatásmechanizmus

A polymyxinek molekuláris célpontja a Gram-negatív baktériumok külső membránja, valamint sejtmembránja. A polikationos antibiotikum-molekulák kötődnek a külső membrán negatív töltésű molekuláihoz, és detergensként megbontják a membrán integritását. Ez strukturális változásokhoz, majd legvégül a sejtmembrán károsodásához vezet. A detergens hatás a polymyxinek amfipatikus tulajdonságára vezethető vissza: a peptid rész nagyrészt hidrofil – kivéve a polymyxin B D-Phe^{6}–L-Leu^{7}, illetve a colistin D-Leu^{6}–L-Leu^{7} aminosav-párja –, míg az N-terminális zsírsav-maradék hidrofób [33, 39, 48].

Az antimikrobiális hatás másik fontos eleme az elektrosztatikus kölcsönhatás, ami a kationos polymyxin molekula és a külső membrán fő komponense, az anionos lipopoliszacharid között alakul ki. A kölcsönhatás következtében a membránban átrendeződnek a töltések, a membránt nyugalmi állapotban stabilizáló kalcium- és magnéziumionok (Ca^{2+}, Mg^{2+}) elmozdulnak helyükről. Az elektrosztatikus kölcsönhatás közel viszi a polymyxinek zsíracil-láncát a külső membránhoz. A zsírsav-maradék és gyűrűs molekularész hidrofób aminosavai (D-Phe^{6}–L-Leu^{7} és D-Leu^{6}–L-Leu^{7}) meggyengítik az LPS-molekulák lipid A részei által alkotott lipidréteget. A hidrofób aminosav-párok beékelődnek a külső membránba, és hidrofób kémiai kölcsönhatásokkal komplexet képeznek az LPS-molekulákkal, ami először a külső membrán kiterjedéséhez, legvégül pedig a felbomlásához vezet. A külső membrán dezintegrációja után hasonló folyamat játszódik le a sejtmembránban is. A sejtmembrán károsodása miatt megnő a permeabilitás, a baktériumsejtek elvesztik tartalmukat és sejtalkotóikat, sejtlízis következik be [49, 50].

A külső membrán és a sejtmembrán lízise mellett a polymyxineknek egy másik, klinikai szempontból is jelentős hatása is van. A polymyxinek pozitív töltésű dekapeptidek, melyek az LPS-molekulák megkötésével semlegesítik a lipid A toxikus hatását. Feltehetően erre vezethető vissza, hogy a polymyxin B, a colistin és nonapeptid-származékaik gátolják a limfociták LPS-indukálta osztódását és az endotoxin neutrofil granulocitákra gyakorolt hatását [51-53].

A polymyxinek az endotoxin kiváltotta transzkripciós faktor aktivitást is képesek gátolni a perifériás mononukleáris sejtekben. A polymyxin B *in vitro* gátolja a nukleáris faktor κB (NF-κB) aktivitását, amely proinflammatorikus citokinek génjeinek is fontos transzkripciós faktora [54].

2.2.2.2. Hatásspektrum

A természetes polymyxinek szelektív antibiotikumok, szinte kizárólag Gram-negatív baktériumokra hatnak. Az *Enterobacteriaceae* család nagy része (*E. coli*, *Klebsiella* és *Enterobacter* nemzetségek) és néhány nem-fermentáló Gram-negatív baktérium, pl. a *P. aeruginosa* és az *Acinetobacter* fajok érzékenyek rájuk. A *Haemophilus*, *Salmonella*, *Shigella* és *Pasteurella* nemzetségek mérsékelten érzékenyek. A *Brucella*, *Neisseria*, *Proteus*, *Providencia* nemzetségek, a *Burkholderia cepacia*, a *S. marcescens* és a *Moraxella catarrhalis* fajok természetes rezisztenciával rendelkeznek a polymyxinekkel szemben [39, 48, 55].

A polymyxin M a többi bioszintetikus polymyxintől eltérően Gram-pozitív baktériumokra is hat [45].

2.2.2.3. Gyógyszerkészítmények

A bioszintetikus polymyxinek közül a klinikai gyakorlatban jelenleg a polymyxin B-t és a colistint használják.

A colistint két formában alkalmazzák: colistin-szulfátként, illetve colistimetát-nátriumként (angolul colistimethate sodium vagy colistin methanesulphonate sodium, CMS). A colistin-szulfát egy ionos vegyület, melyet egy colistin molekula és egy szulfátcsoport (SO_4^{2-}) alkot. Ezt a vegyületet helyileg (szemcseppként, fülcseppként, krémekben és hintőporokban) vagy orálisan alkalmazzák, de inhalációs módon is adható [56].

A CMS a colistin szulfometilált származéka. A colistin molekula öt Dab aminosavának szabad aminocsoportjait szulfometil-csoportokkal szubsztituálják, melyekhez elektrosztatikus kölcsönhatással Na^+ ionok kapcsolódnak. A CMS egy inaktív prodrog; *in vivo* és *in vitro* körülmények között is spontán hidrolízis révén alakul

át colistinné és egyéb szulfometilált származékokká. A CMS parenterálisan (intravénásan vagy intramuszkulárisan) és inhaláció útján is adagolható. A CMS kevésbé toxikus, mint a colistin-szulfát, azonban kevésbé hatékony is annál [57-59].

A polymyxin B-t kizárólag parenterálisan adagolják, polymyxin B-szulfát formájában [60].

2.2.2.4. Farmakodinámia

A colistin és a polymyxin B baktericid hatású antibiotikumok. Hatásuk koncentráció-dependens, a C_{max}/MIC hányadossal írható le, azaz antimikrobiális hatásuk attól függ, hogy szérum-csúcskoncentrációjuk hányszorosan haladja meg egy adott kórokozó rájuk vonatkoztatott MIC-értékét. Miután szérumkoncentrációjuk a MIC-érték alá esik, a csíraszám ismét gyors növekedésnek indul, tehát nincs posztantibiotikus hatásuk. A polymyxineknek vannak más, klinikai és terápiás szempontból egyelőre kiaknázatlan farmakológiai és biológiai hatásaik is. Serkentik a TNFα termelődését, de csökkentik néhány más citokinét. Beindítják az alternatív komplement-aktiválódási útvonalat, a hízósejtek degranulációját – ezáltal hisztamin-felszabadulást okoznak –, növelik az epitélsejtek membránjának vezetőképességét, valamint apoptózist indukálnak [33].

LPS-kötő képességüket kihasználandó Japánban immobilizált polymyxin B-szálakat tartalmazó hemoperfúziós készülékeket használtak endotoxin sokkban szenvedő betegek gyógyítására. Az eljárás jelentősen csökkentette a betegek mortalitását. Eredményessége ellenére a terápiának vannak nem kívánt mellékhatásai is, nevezetesen, hogy a rendszer megköti a terápia során használt antibiotikumokat is [61, 62].

2.2.2.5. Toxicitás

A polymyxinek használatakor figyelembe kell venni nefro- és neurotoxicitásukat. Toxicitásukért elsősorban sajátos kémiai szerkezetük felelős, nevezetesen D-konformációjú aminosavaik és aminocsoportokkal szubsztituált diaminovajsav-molekuláik. Az aminocsoportok szulfometilációja csökkenti a polymyxinek toxicitását,

azonban az antimikrobiális hatásukat is. Állatkísérletekben igazolták, hogy a D-aminosavak vesére gyakorolt toxikus hatása metioninnal és glutationnal megelőzhető [58, 63, 64].

A polymyxinek főként vesén át választódnak ki, ám nagy arányban reabszorbeálódnak a vesetubulusokban, majd a tubulussejtekben koncentrálódnak. Elsősorban a proximális tubulussejteket károsítják. Az akut tubuláris nekrózison kívül kialakulhat még hematuria, proteinuria, cilindruria, oliguria is [65, 66].

A CMS intravénás vagy intramuszkuláris beadása után észlelt leggyakoribb neurotoxikus tünet a paresztézia. Leírtak polymyxinterápia alatt fellépő neuromuszkuláris blokádot is. A neuronok és idegek gazdagok foszfolipidekben, a polymyxinek pedig a sejtmembránok lipidjeihez kötődnek, így képesek akadályozni a membránhoz kötött sejtműködéseket. A polymyxinek a neuromuszkuláris junkciók preszinaptikus részén hatnak; blokkolják az acetilkolin-felszabadulást, ezáltal képesek rontani a myasthenia gravisban és egyéb neuromuszkuláris betegségekben szenvedők állapotát. További mellékhatásként feljegyeztek ataxiát, vertigót, zavartságot, hallucinációkat, epilepsziás rohamot is [67-69].

Ritkán bőrtünetek is felléphetnek a kezelés során, pl. pruritus, kontakt dermatitis, makuláris kiütések és urticaria. E tüneteket a polymyxinek hízósejt- degranulációt okozó és hisztamin-felszabadító hatásának tulajdonítják [33, 70].

Az aeroszolizált colistin torokfájást, köhögést, bronchokonstrikciót és mellkasi szorításérzést okozhat. Ezek hátterében egyrészt közvetlen irritatív hatás, másrészt a hisztamin-felszabadítás állhat [71].

A felsorolt mellékhatások miatt néhány gyógyszer alkalmazása nem ajánlott polymyxinterápia alatt, mivel veszélyes gyógyszerinterakciók léphetnek fel. Egyes kurariform izomrelaxánsok és idegrendszerre ható gyógyszerek, pl. tubokurarin, szukcinilkolin, gallamin, decamethonium és nátrium-citrát polymyxinekkel együtt neuromuszkuláris blokád kialakulását indukálhatják. A potenciális additív toxikus hatások miatt nem javasolt együtt alkalmazni őket más neuro- illetve nefrotoxikus antibiotikumokkal, pl. aminoglikozidokkal sem [69, 72].

2006-ban Falagas és Kasiakou megjelentettek egy elemző tanulmányt, amely szerint a polymyxinek a korábban leírtaktól eltérően valószínűleg kevésbé toxikus vegyületek. A toxikus hatások első leírásai még az 1950-es években születtek, amikor

az alkalmazott polymyxindózisok a mai ajánlásoknál sokkal magasabbak voltak. A jelenkori terápiás adagolási protokollok, valamint a vesefunkció állandó monitorozásának lehetősége mérsékelheti a toxikus mellékhatásokat [69].

2.2.2.6. Farmakokinetika

2.2.2.6.1. Szérumszintmérés

A CMS vizes oldatokban spontán hidrolizálódik colistinné és más szulfometilált származékokká. Az emberi vérplazmában a farmakokinetikai vizsgálatok során a CMS, a CMS-származékok és a colistin szintjét vizsgálják.

A polymyxinek szérumszintjének mérésére ma használt analitikai módszerek a vékonyréteg-kromatográfia (thin-layer chromatography, TLC), a kapilláris elektroforézis, a nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (high-performance liquid chromatography, HPLC) és a folyadékkromatográfia–tandem tömegspektrometria (liquid chromatography–tandem mass spectrometry, LC–MS/MS). A TLC-t, a kapilláris elektroforézist és a HPLC-t a colistin- és polymyxin B komponensek szeparálására is használják [73-75].

A szérumból és egyéb biológiai mintákból történő polymyxinszint-meghatározáshoz leggyakrabban használt módszer a HPLC, illetve ennek módosított változatai. A HPLC alkalmazhatóságának egyetlen problémája eredetileg az volt, hogy a polymyxinek UV-sugárzás elnyelő képessége gyenge és nincs saját fluoreszcenciájuk, de pl. ortoftálaldehid és 2-merkaptoetanol segítségével létre lehet hozni fluoreszkáló származékaikat [76, 77].

2.2.2.6.2. Adagolás

A koncentráció-függő antimikrobiális aktivitás és a posztantibiotikus hatás hiánya miatt a polymyxinek állandó, magas szérumszintjét csak úgy lehet biztosítani, ha egész nap, szabályos időközönként, osztott dózisban alkalmazzák őket.

A polymyxinek nem szívódnak fel a gasztrointesztinális rendszerből, szisztémás infekciókban intravénásan adagolják őket. A CMS-t és a polymyxin B-szulfátot

központi idegrendszeri fertőzésben intrathecalisan vagy intraventrikulárisan juttatják be, mivel rosszul penetrálnak a vér-agy gáton (az intravénásan beadott gyógyszernek csak kb. 5%-a jut át rajta). A lágyagyhártya gyulladása esetén ez akár 25–26%-ra is nőhet, mivel meningitisben megnő a vér-agy gát permeabilitása [48, 78-80].

A CMS felnőttek szisztémás fertőzései esetén adott átlagos dózisa széles határok között változik, mivel a kereskedelmi forgalomban kapható készítmények eltérő mennyiségű hatóanyagot tartalmaznak. Általában 240–720 mg közötti napi dózist alkalmaznak, ami 3–9 millió nemzetközi egységnek (NE) felel meg. A teljes napi dózist 2–4 adagban kapja meg a beteg [81].

Bár igény régóta van rá, mindezidáig nem történt meg a különböző gyógyszerkészítmények egységes címkézése és eltérő dozírozási ajánlásaik összehangolása [82, 83].

Légúti fertőzések kezelésére a colistint aeroszolizált formában is alkalmazzák. Általában CMS-t használnak, mert a colistin-szulfáthoz képest ritkábban okoz mellékhatásokat, bár kevésbé hatékony is annál. Az inhalációs colistin szokásos dózisa 40 ttkg alatt 40 mg (500.000 NE) 12 óránként, míg efölött kétszer ennyi, ugyanolyan időközönként. Súlyos tüdőinfekciókban a dózis 160 mg-ra emelhető (2.000.000 NE), 8 óránkénti adagolással [71, 84].

A polymyxin B szabvány dózisa 1,5–2,5 mg/kg/nap, avagy 15.000–25.000 NE/kg/nap (1 mg = 10.000 NE), amelyet két adagra osztva adnak be [85].

A polymyxinek legújabb potenciális adagolási módja a liposzomális út. A liposzómákról tudjuk, hogy képesek javítani az antibiotikumok hatását, miközben mérséklik az esetleges mellékhatásokat [86, 87].

Történtek kísérletek a polymyxinek liposzomális adagolásával kapcsolatban. A liposzómába csomagolt polymyxin B antimikrobiális hatása jobbnak bizonyult a hagyományos intravénásan adagoltéhoz képest. A liposzomális colistin-szulfátot egerekbe juttatva azt tapasztalták, hogy a parenterálisan adagolt gyógyszerhez képest semmiféle vesekárosodást nem okozott [88-90].

2.2.2.6.3. Szöveti eloszlás és kiürülés

Amfipatikus karakterüknek köszönhetően a polymyxinek a többsejtű élőlények sejtmembránjaihoz is képesek kötődni. Még az 1970-es években igazolták, hogy a colistin erősen kötődik a máj, vese, agy, szív és vázizmok sejtjeihez. A szövetekben megkötött colistin kiürülési ideje több mint 5 nap lehet. A szulfometilált colistinszármazékoknak azonban kisebb az affinitásuk a biológiai membránokhoz [91, 92].

A natív colistin és polymyxin B elsődlegesen a vesén át ürülnek, de nagy részben reabszorbeálódnak a vesetubulusok proximális területén [66].

A szulfometilált colistinszármazékok sokkal kisebb mértékben szívódnak vissza a vesében. Ezt Couet és munkatársai is megerősítették, akik először végeztek colistinnel kapcsolatos farmakokinetikai vizsgálatot egészséges önkénteseken. 1–1 millió NE CMS beadása után 24 órával analizálták az alanyok vizeletének CMS- és colistintartalmát. A CMS-nek kb. 60%-a változatlan formában ürült a vizelettel. A colistin és a CMS renális clearance-értéke között azonban szignifikáns különbség mutatkozott (1,9 ml/min, illetve 103 ml/min), ami egyértelműen igazolta, hogy a natív colistin vegyület legnagyobb része visszaszívódik a vesén át [93-95].

2.2.2.7. Kombinációs terápiás lehetőségek

A polymyxineket többnyire monoterápiában alkalmazzák, tekintve, hogy a multirezisztens Gram-negatív kórokozók a klinikai gyakorlatban leginkább használt antibiotikumokkal – β-laktámok, aminoglikozidok, fluorokinolonok – szemben ellenállóak. Ugyanakkor egy ideje tudjuk, hogy pl. szubinhibitoros koncentrációban a polymyxinek képesek szenzitizálni a baktériumokat más antimikrobiális szerekkel szemben, illetve kísérletekkel igazolódott, hogy polymyxintartalmú kombinációkkal olyan baktériumok is kezelhetők, amelyek külön-külön rezisztensek a kombinációkat alkotó molekulákkal szemben [96].

A polymyxineket más antibiotikumokkal kombinációban alkalmazni nem újkeletű gondolat. 1976-ban sulfamethoxazol, trimethoprim és polymyxin B hármas kombinációját alkalmazták sikerrel nozokomiális, multirezisztens *S. marcescens* törzsek

ellen. A kombináció hatékonyságát *in vitro* checkerboard módszerrel ellenőrizték, és bizonyították a három ágens szinergizmusát. 1977-ben a polymyxin B és rifampicin kombinációjának szinergista hatását igazolták nozokomiális infekciókból származó multirezisztens *S. marcescens* törzsekkel szemben, bár a törzsek külön-külön a két antibiotikumra mérsékelten érzékenyek illetve rezisztensek voltak [97, 98].

Számos kutatás foglalkozik a carbapenem-rezisztens bélbaktériumok ellen alkalmazható antibiotikum-kombinációkkal. A polymyxinek és a rifampicin *in vitro* szinergista hatását több kísérletben sikerült bizonyítani colistin-érzékeny és -rezisztens törzsekkel szemben is, valamint kiderült, hogy a colistin–rifampicin kombinációnál számolni lehet a polymyxinekre normál körülmények között nem jellemző posztantibiotikus hatással. Szintén figyelemre méltó, hogy carbapenemáz-termelő, colistin-rezisztens *K. pneumoniae* törzsekkel szemben a colistin–imipenem és colistin–meropenem kombinációk több kísérlet alapján szinergista hatást fejtenek ki [99-101].

A tetracyclinek (doxycyclin, tigecyclin) szinergizmusát polymyxin B-vel és colistinnel *in vitro* kimutatták multirezisztens *K. pneumoniae*, *E. coli* és *Enterobacter* fajoknál, de a colistin–tigecyclin kombináció *in vivo* is hatékonynak bizonyult a felsorolt baktériumok okozta fertőzések állatkísérletes modelljeiben. A tetracyclinek polymyxinekkel való szinergizmusát klinikai körülmények között is kimutatták, például pánrezisztens *K. pneumoniae* által okozott véráramfertőzésben [102-104].

A multirezisztens *A. baumannii*, *P. aeruginosa* és *S. maltophilia* törzsekkel kapcsolatban szintén felmerült a polymyxintartalmú kombinációk lehetséges alkalmazása. A colistin és rifampicin szinergista hatását több kísérletben igazolták ezeknél a fajoknál is [105-107].

A rifampicint tartalmazó kombinációknál megfigyelt Gram-negatív ellenes hatás azért is figyelemre méltó, mivel az *Enterobacteriaceae* család tagjai, valamint az *Acinetobacter* és *Pseudomonas* nemzetségek fajai természetes rezisztenciával rendelkeznek a rifampicinnel szemben [108].

2.3. Szintetikus és szemiszintetikus polymyxinszármazékok

2.3.1. Nonapeptid-származékok

A polymyxinek legegyszerűbb származékai az ún. nonapeptid formájuk. Bár a polymyxinek rezisztensek az emlősök proteázaira, bizonyos enzimek képesek hidrolizálni őket. A colistin nonapeptid az N^{α}-zsíracil–α,γ-Dab enzimatikus lehasítása révén keletkezik a colistinből. Ugyanilyen módon jön létre a polymyxin B nonapeptid [109-111].

A polymyxin B nonapeptidnek nincs saját antimikrobiális aktivitása, viszont növeli a Gram-negatív baktériumok érzékenységét más antibiotikumokkal szemben. Mind a polymyxin B nonapeptid, mind a colistin nonapeptid rendelkezik endotoxin-kötő aktivitással, azonban kevésbé nephro- és neurotoxikusak, mint alapvegyületeik [53, 96, 112].

2.3.2. Módosított lipid-végláncú származékok

Az N-terminális lipidlánc hossza befolyásolja az antimikrobiális hatást. A közepes szénláncú zsírsavmaradékokat (pl. oktanoil, C_8) hordozó polymyxinek antibiotikus aktivitása a legoptimálisabb, míg a hosszú szénlánccal (pl. mirisztoil, C_{14}), illetve rövid szénlánccal (pl. acetil, C_2) rendelkezők kevésbé hatékonyak [113].

A polymyxin B és colistin N^{α}-ciklohexilbutanoil-, N^{α}-4-bifenilacetil- és N^{α}-1-adamantánacetil-analógjainak antimikrobiális aktivitása hasonló az alapvegyületekéhez *E. coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium és *P. aeruginosa* ellen, viszont LPS-kötő aktivitásuk jobb [114].

2.3.3. Három pozitív töltést tartalmazó származékok

Vaara és munkatársai vizsgálták azokat az új polymyxinszármazékokat, amelyeknek az eredeti öt helyett csak három pozitív töltésük van. A molekulák közül néhány hatékony antimikrobiális vegyületnek bizonyult, míg mások szenzitizáló hatásúak voltak. Néhány származék aminosav-sorrendje a 2. táblázatban látható.

2. Táblázat: Három pozitív töltést hordozó polymyxinszármazékok aminosav-sorrendje

Név	Aminosav-sorrend	Hivatkozás
NAB735	OA – Dab^+ – Dab^+ – Dab^+ – cy[Abu – Abu – D-Phe – Leu – Abu – Abu – Thr]	[115]
NAB739	OA – Thr – D-Ser – cy[PMB]	[115]
NAB740	DA – Thr – D-Ser – cy[PMB]	[115]
NAB741	AC – Thr – D-Ser – cy[PMB]	[115]
NAB7061	OA – Thr – Abu – cy[PMB]	[115]

Rövidítések:

cy[PMB] = cy[Dab – Dab^+ – D-Phe – Leu – Dab^+ – Dab^+ – Thr]

Abu - aminovajsav; Dab - diaminovajsav; Leu - leucin; Phe - fenilalanin; Ser - szerin; Thr - treonin

AC - acetil; DA - dekanoil; OA - oktanoil

$^+$: pozitív töltésű szabad α- vagy γ-aminocsoport

A NAB739 jelű vegyületnek a természetes polymyxinektől eltérően e molekula lineáris peptid részének nincs pozitív töltése. *E. coli* ellen ugyanolyan hatást mutat, mint a polymyxin B, szubinhibitoros koncentrációban pedig növeli *A. baumannii* törzsek érzékenységét több különböző antibiotikum ellen. A NAB740 származék N-terminális zsírsavmaradékától eltekintve egyezik a NAB739-cel, és jelentős *Pseudomonas*-ellenes hatása van. A NAB741 szintén csak N-terminális zsírsavmaradékában különbözik a NAB739-től. Saját antibiotikus hatása nincs, viszont képes szenzitizálni a baktériumokat más antibiotikumokkal szemben. A NAB7061-nek a NAB741-hez hasonlóan szintén csak szenzitizáló hatása van [40, 116, 117].

Az imént felsorolt származékok kizárólag lineáris peptidkomponensükben és bizonyos esetekben acilcsoportjukban különböztek egymástól, azonban ezek a különbségek meglehetősen eltérő antimikrobiális hatásokat eredményeztek [116, 118].

A három pozitív töltés elhelyezkedése lényeges a vegyületek antimikrobiális hatása szempontjából. A NAB735 polymyxin B származékban a gyűrű rész diaminovajsav molekuláit aminovajsavra cserélték, a lineáris peptid részt diaminovajsav molekulákból építették fel, lipid-véglánccként oktanoil került rá. Így az összes pozitív töltés a lineáris molekularészre került. A vegyületnek egyáltalán nincs saját antimikrobiális hatása, ami alátámasztja azon megfigyeléseket, miszerint a gyűrűs rész

pozitív töltései fontosabb szerepet játszanak az antibakteriális hatásban, mint a lineáris molekularészleté [115].

2.3.4. Deacilált származékok

A lipid-végláncától megfosztott polymyxin B-ről (des-FA-PMB) kimutatták, hogy antimikrobiális hatása van *E. coli*, *S.* Typhimurium és *P. aeruginosa* ellen. Számos deacilált polymyxin B–analógot szintetizáltak és vizsgáltak. A [Dap^1]-PMB, a [Ser^1]-PMB, a [Dap^1-Ser^2-Dap^3]-PMB(1-10), a [Ser^2-Dap^3]-PMB(2-10), a [Ser^3]-PMB(3-10) és a [Dap^3]-PMB(3-10) specifikus, *P. aeruginosa* ellenes hatással rendelkeznek. A guanil-szubsztituált származékok *E. coli*, *S.* Typhimurium és *P. aeruginosa* ellen is hatékonyak. Az aminosav-sorrendek a 3. táblázatban láthatók [119, 120].

3. Táblázat: Deacilált polymyxinszármazékok aminosav-sorrendje

Név	Aminosav-sorrend	Hivatkozás
[Dap^1]-PMB	Dap – Thr – Dab^+ – cy[PMB]	[120]
[Ser^1]-PMB	Ser – Thr – Dab^+ – cy[PMB]	[120]
[Dap^1-Ser^2-Dap^3]-PMB(1-10)	Dap – Ser – Dap – cy[PMB]	[120]
[Ser^2-Dap^3]-PMB(2-10)	Ser – Dap – cy[PMB]	[120]
[Dap^3]-PMB(3-10)	Dap – cy[PMB]	[120]
[Ser^3]-PMB(3-10)	Ser – cy[PMB]	[120]
guanil-[Dab^1-Thr^2-Dab^3]-PMB(1-10)	guanil – Dab^+ – Thr – Dab^+ – cy[PMB]	[120]
guanil-[Thr^2-Dab^3]-PMB(2-10)	guanil – Thr – Dab^+ – cy[PMB]	[120]
Rövidítések: cy[PMB] = cy[Dab – Dab^+ – D-Phe – Leu – Dab^+ – Dab^+ – Thr] Dab - diaminovajsav; Dap - L-α,β-diaminopropionsav; Leu - leucin; Phe - fenilalanin; Ser - szerin; Thr - treonin $^+$: pozitív töltésű szabad α- vagy γ-aminocsoport		

2.3.5. Antimikrobiális peptidek mint polymyxinanalógok

Számos állatfaj termel ún. antimikrobiális peptideket, melyek a veleszületett immunrendszer elemeiként vesznek részt a szervezet védelmében. Ezen peptidek egy részét kationos antimikrobiális peptideknek nevezik (cationic antimicrobial peptide,

CAP), mivel számos pozitív töltést hordoznak, melynek következtében amfipatikus karakterűek. Ezek a peptidek mind szerkezet, mind hatásmechanizmus szempontjából hasonlítanak a polymyxinekre [121].

A CAP-k másodlagos szerkezete α-helikális vagy β-redőzött. Hatásukat a bakteriális membránokon fejtik ki: (i) a Gram-pozitív baktériumok sejtmembránján csatornákat hoznak létre, amely végül ozmotikus lízishez vezet, (ii) a Gram-negatív mikrobák esetében előbb pozitív töltéseik révén elektrosztatikus kölcsönhatásba lépnek a külső membrán anionos lipopoliszacharid-rétegével, majd pórusokat hoznak létre a sejtmembránon. Specifikus molekuláris célpontjuk illetve célfehérjéjük nincs, ebből a szempontból is hasonlítanak a polymyxinekre. Változó hatásspektrumuk potenciális antibiotikumokként, illetve új antibiotikumok kiindulási anyagaiként tartják őket számon, bár gyakorlati felhasználásuknak gátat szab fehérje mivoltukból adódó immunogenitásuk, valamint az, hogy eukarióta sejtmembránokat is károsítanak. *In vitro* kísérletek alapján néhány antimikrobiális peptid hagyományos, kemoszintetikus antibiotikumokkal kombinációban hatékony lehet Gram-negatív baktériumok ellen [122-125].

2.4. Colistin-rezisztencia

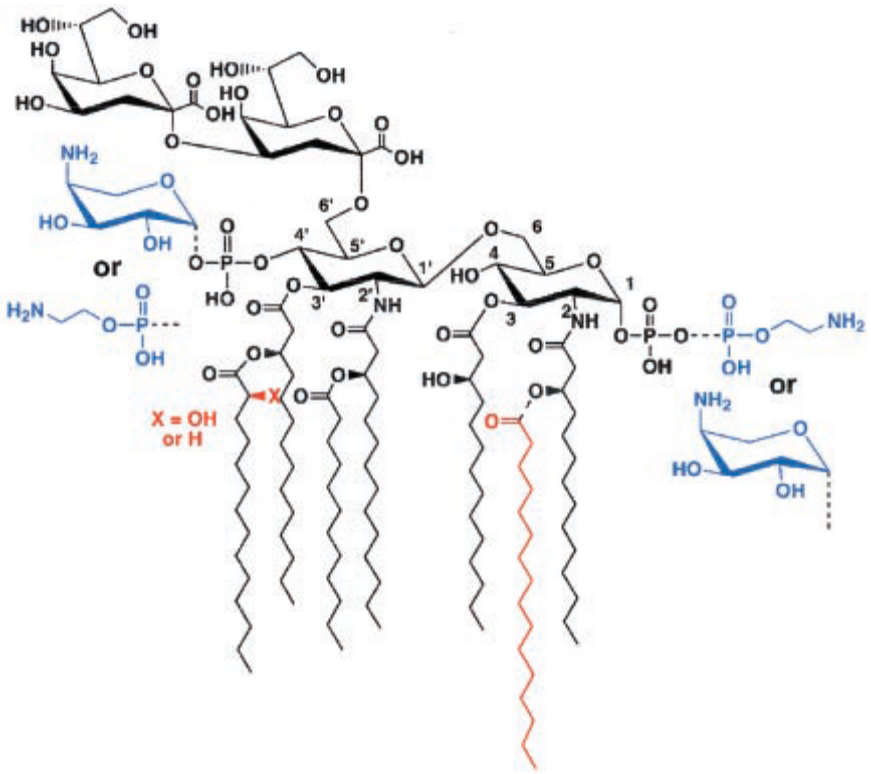
A múltban a polymyxinekkel szembeni szerzett rezisztencia ritkaság volt, mert nem voltak mindennapos használatban. Amióta azonban a multirezisztens Gram-negatív kórokozók miatt újra alkalmazzák őket, világszerte jelennek meg colistin-rezisztens törzsek. A colistinnel és egyúttal sok más antibiotikummal szemben is rezisztens *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* és *A. baumannii* törzsek manapság komoly egészségügyi problémát jelentenek. Tekintve, hogy a két klinikai használatban lévő molekula közül a colistint vizsgálták gyakrabban, a szakirodalomban a „colistin-rezisztencia” kifejezés az elterjedtebb [126-130].

A ma már szintén jelentős nozokomiális patogénekként számon tartott *Proteus* és *Providencia* fajok, valamint a *S. marcescens* természetes rezisztenciával bírnak a polymyxinekkel szemben [48, 131].

2.4.1. A colistin-rezisztencia molekuláris mechanizmusai

A Gram-negatív baktériumok polymyxinekkel szembeni szerzett rezisztenciájának fő mechanizmusa az LPS módosítása, mely során a baktériumok különböző molekulák segítségével megváltoztatják annak kémiai és elektrosztatikus tulajdonságait [132].

A mikrobák által leggyakrabban használt két molekula a foszfoetanolamin és a 4-amino-4-dezoxi-L-arabinóz (L-Ara4N). A baktériumok enzimatikus úton kapcsolják a ligandokat az LPS lipid A részének szabad foszfátcsoportjaihoz, ezzel növelve a külső membrán nettó pozitív töltését, ami elektrosztatikus taszítóhatáshoz vezet a polikationos antimikrobiális szerekkel, pl. polymyxinekkel és kationos antimikrobiális peptidekkel szemben (1. ábra) [132].

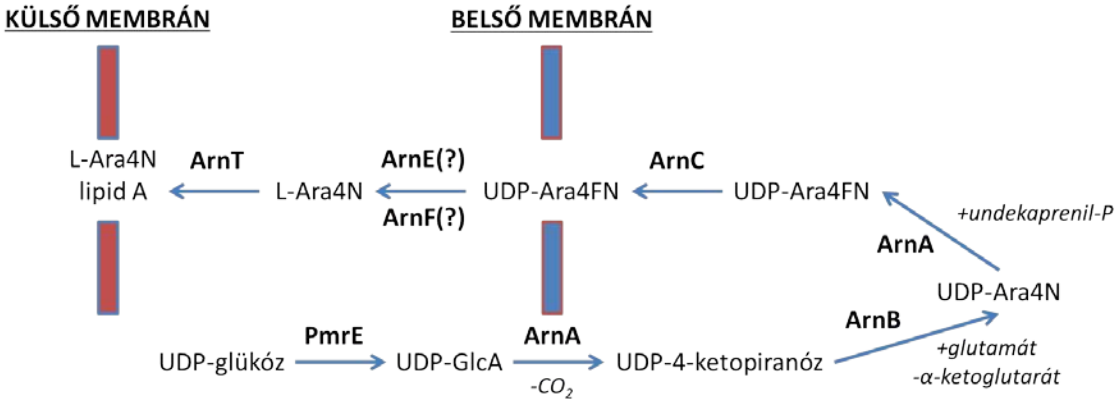


1. Ábra: A lipid A molekula foszfoetanolamin-,
illetve 4-amino-4-dezoxi-L-arabinóz addíciója [133]

2.4.1.1. 4-amino-4-dezoxi-L-arabinóz addíció

A 4-amino-4-dezoxi-L-arabinóz (L-Ara4N) bioszintéziséért egy ún. colistin-rezisztencia operon felelős, az *arn*, korábbi nevén *pmr*. Az operont az *arnBCADTEF* – régi nevükön *pmrHFIJKLM* – gének alkotják. A géneket kimutatták az *Enterobacteriaceae* család fajaiban, pl. a *S.* Typhimuriumban, a *K. pneumoniae*-ben és az *E. coli*ban, de hasonló szerepű géneket azonosítottak a *P. aeruginosá*ban és a *B. cepaciá*ban is [134-136].

Az *arn* operon génjei által kódolt fehérjéket a 2000-es években írták le. Ezen enzimcsoport működésének első lépése egy UDP-glükóz molekula dehidrogenációja UDP-glukuronsavvá (UDP-GlcA); a reakciót az UDP-glükóz dehidrogenáz aktivitású PmrE fehérje katalizálja. Második lépésként az ArnA (ex PmrI) bifunkciós enzim dekarboxiláz aktivitású doménje az UDP-glukuronsavból UDP-4-ketopiranózt hoz létre. Harmadik lépésben az UDP-4-ketopiranózt az ArnB (ex PmrH) nevű UDP-Ara4N−oxoglutarát aminotranszferáz UDP-4-amino-4-dezoxi-L-arabinózzá (UDP-Ara4N) alakítja. A negyedik lépést az ArnA enzim formiltranszferáz aktivitású doménje katalizálja, az UDP-Ara4N-ből UDP-4-dezoxi-4-formamido-L-arabinózt (UDP-Ara4FN) hoz létre. Az UDP-Ara4FN sejtmembránhoz történő transzportját az ArnC (ex PmrF) enzim végzi. A sejtmembrán és a külső membrán közti periplazmatikus térben az UDP-Ara4FN deformiláción esik át, valamint UDP-csoportját is elveszíti. Az így létrejövő L-Ara4N a külső membránhoz transzportálódik, feltehetően az ArnE (ex PmrM) és ArnF (ex PmrL) fehérjék közreműködésével. Az L-Ara4N lipid A-hoz kapcsolását az ArnT (ex PmrK) nevű Ara4N-transzferáz enzim végzi. A leírt folyamat a 2. ábrán látható [133, 137-139].



2. Ábra: Az L-Ara4N bioszintézise és a lipid A-hoz kapcsolása [140]

2.4.1.2. Foszfoetanolamin-addíció

2004-ben Lee és munkatársai írták le a lipid A foszfoetanolamin-addícióját, mint a colistin-rezisztencia egyik módját. A *S.* Typhimurium egyik membránfehérjéjét a *pmrC* gén termékeként azonosították. A PmrC fehérje egy foszfoetanolamin-transzferáz, és az LPS lipid A részének szabad foszfátcsoportjaihoz kapcsol foszfoetanolamin-molekulákat. A *S.* Typhimurium PmrC proteinjének aminosav-sorrendje homológ a *Neisseria* fajok LptA fehérjéinek szekvenciájával. A Neisseriákban ezek a fehérjék szintén az LPS foszfoetanolamin-addíciójában játszanak szerepet, ami azért figyelemre méltó, mivel a *Neisseria* nemzetség természetes rezisztenciát mutat polymyxinekkel szemben. A foszfoetanolamin-addíció az LPS core részén is megvalósulhat, a CptA enzim működése révén [141-143].

2.4.1.3. *mgrB* inaktiváció

Az MgrB egy rövid, 47 aminosavból álló fehérje a bélbaktériumok külső membránjában. Feltételezett funkciója a PhoP-PhoQ rendszerre gyakorolt negatív visszacsatolás a PhoQ kináz-aktivitásának gátlása révén. Génjének inaktivációja colistin-rezisztenciához vezet. *Klebsiella* fajokban az *mgrB* gén inzerciós, misszensz vagy nonszensz mutációja, illetve komplett delécióját jelentős tényezőnek bizonyult a polymyxinekkel szembeni rezisztencia kialakulásában [144-146].

2.4.1.4. Az *mcr* gének

Egy 2014–2015-ben Kínában végzett rutin surveillance vizsgálat során haszonállatokból izolált kommenzális *E. coli* törzsek között nagy számban találtak colistin-rezisztenseket. A törzseket tartalmazó mintákat 2011–2014-ig gyűjtötték sertésfeldolgozó-telepekről, kis- és nagykereskedelmi baromfi- és sertéshúsból, valamint kórházakból. A rezisztencia hátterében egy plazmid-közvetítette rezisztenciagént, az *mcr-1*-et azonosítottak, amely egy foszfoetanolamin-transzferázt kódol. A gént a vágóhídi állatokból gyűjtött *E. coli* izolátumok 20,6%-ánál, az élelmiszerből izoláltak 14,9%-ánál és a kórházakból származók 1,4%-ánál mutatták ki. Megtalálták továbbá kórházi *K. pneumoniae* izolátumok 0,7%-ában is. A hordozó pHNSHP45 plazmidot az *E. coli* SHP45-ös törzsről mesterséges transzferrel sikeresen vitték át colistin-érzékeny *E. coli, K. pneumoniae* és *P. aeruginosa* törzsekre. A konjugációt követően 8–16-szoros növekedést észleltek a colistin és 4–8-szorosat polymyxin B MIC értékében a vad típushoz képest. Az *mcr-1*-től mesterségesen megfosztott kísérleti törzs *in vivo* vizsgálat során szignifikánsan csökkent túlélést mutatott colistin jelenlétében a vad típushoz képest [147].

A gén első leírását követően számos országban sikerült kimutatni Gram-negatív mikroorganizmusokból, többek között Nagy-Britanniában, Franciaországban, Németországban, Hollandiában, Svájcban, Spanyolországban, Tunéziában, valamint kelet- és délkelet-ázsiai országokban. A hordozó mikrobák főleg haszonállatok székletéből és húsából izolált *E. coli* és *S.* Typhimurium törzsek voltak [148-154].

2016 júniusának végéig már 32 országban mutatták ki az *mcr-1*-et emberekből, haszonállatokból, élelmiszerből illetve a környezetből [155].

Dániában ESBL- és AmpC-termelő *E. coli* törzsekben találták meg a gént, melyek között volt európai országokból importált csirkehúsból izolált és emberi véráramfertőzésből származó is. Más országokban végzett vizsgálatok során is megfigyelték, hogy a baktériumok az *mcr-1* mellett gyakran hordoztak egyéb antibiotikumok (β-laktámok, aminoglikozidok, fluorokinolonok, tetracyclin, trimethoprim-sulfamethoxazol, stb.) elleni, plazmidon kódolt rezisztenciagéneket [151, 156-159].

Bizonyos adatok arra utalnak, hogy az *mcr-1* már évekkel ezelőtt megjelent és elterjedt. Egy, az első leírás után három hónappal készített összegző tanulmány alapján a korábban leírtakon kívül elmondható: (i) a gén már 2005-ben izolált baktériumokban is kimutatható, valamint (ii) emberi fertőzések mintáiban megtalálták pl. Kanadában, Kínában, Nagy-Britanniában, Németországban, Svájcban, Hollandiában és Svédországban [160-162].

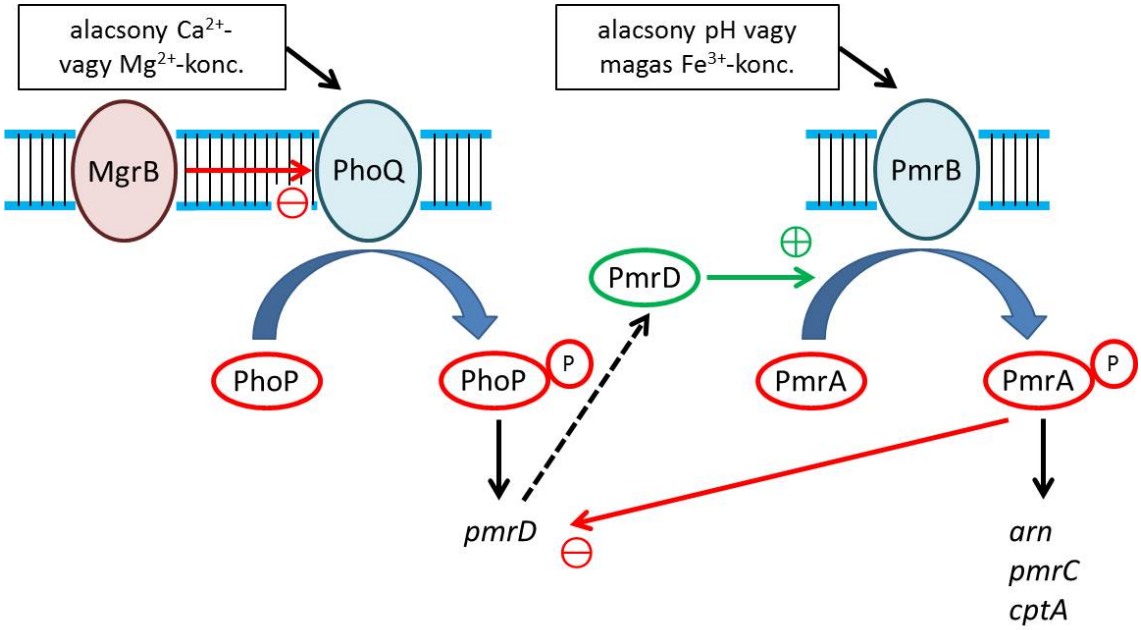
2017 júliusáig az *mcr-1*-nek hat variánsát azonosították, valamint két új *mcr* gént is leírtak 2016 júniusában és 2017 júniusában. Az *mcr-2* gént belga kutatók identifikálták szarvasmarhák és sertések székletéből származó *E. coli* izolátumokban. A gén 76,75%-os szekvenciaegyezést mutat az *mcr-1*-gyel, és feltételezhetően *Moraxella* fajokból származik. Az *mcr-3*-at Kínában írták le, sertésekből izolált *E. coli* törzsekben. Nukleotidszekvenciája 45%-ban egyezik az *mcr-1*-gyel, 47%-ban pedig az *mcr-2*-vel [163-166].

2.4.2. A rezisztenciamechanizmusok molekuláris szabályozása

Az *arn* operon génjei és a *pmrC* gén expresszióját két fehérjepár szabályozza – a PmrA-PmrB közvetlen regulátora az említett géneknek, a PhoP-PhoQ pedig az előbbi páros működését fokozza [140].

A PmrB egy sejtmembránhoz kötött szenzor-kináz, amelyet többek között a magas Fe^{3+}-koncentráció illetve a savas pH (pH 5,5) aktivál *S. enterica*ban és *P. aeruginosá*ban. Az aktív kináz foszforilálja, ezáltal aktiválja a PmrA transzkripciós regulátor fehérjét, amely az *arn* operon génjeinek átíródását, valamint *S. enterica*ban a *pmrC* és *cptA* gének expresszióját indítja el [142, 167, 168].

A PhoQ szintén egy sejtmembránhoz kötött szenzor-kináz, amelyet pl. a savas pH és az alacsony Ca^{2+}- és Mg^{2+}-koncentráció aktivál. Az aktivált kináz a PhoP regulátoros fehérjét foszforilálja, ami a *pmrD* gén transzkripciós aktivátora. A PmrD egy ún. protektív fehérje, amely megakadályozza, hogy a foszfatázok defoszforilálják az aktivált PmrA-t, így meghosszabbítva annak aktív állapotát. A PmrA transzkripciós fehérje represszálja a *pmrD* gént, ily módon negatív visszacsatolást valósítva meg a szabályozókörben (3. ábra) [135, 169-171].



3. Ábra: A PhoP-PhoQ és PmrA-PmrB szabályozórendszerek kapcsolata [140]

A *S. enterica* PhoQ fehérjéjéről kimutatták, hogy antimikrobiális peptidek is képesek aktiválni. Mivel ezeknek a peptideknek a polymyxinekéhez hasonló a hatásmechanizmusa, ezért lehetséges, hogy a colistin-rezisztenciáért felelős szabályozómechanizmusok eredetileg a gerinces állatok által termelt antimikrobiális peptidekkel szembeni védekezésül fejlődtek ki [172, 173].

A szabályozófehérjék génjei több Gram-negatív baktériumban megtalálhatóak, azonban szerepük az egyes fajokban eltérő. A szabályozórendszerek fent részletezett működését a *S.* Typhimuriumnál figyelték meg és írták le. A PhoP és PhoQ fehérjék megtalálhatóak az *E. coli*ban is, ahol szintén a *pmrD* expresszióját szabályozzák, azonban nincsenek hatással a PmrA-PmrB-rendszerre. Colistin-rezisztens *K. pneumoniae* CG43 törzsnél a *pmrA*, *phoP* és *pmrD* gének deléciója külön-külön egyaránt a polymyxinekkel szembeni érzékenység növekedését eredményezi. *K. pneumoniae*ben az *mgrB* gén inaktivációja a PhoP akadálytalan foszforilációjához vezet. Ez egyrészt a PhoP-PmrD-PmrA útvonalon okozza az *arn* operon up-regulációját, másrészt ebben a fajban a PhoP közvetlenül is képes aktiválni az *arn* operont. Utóbbi jelenséget előrecsatolásos kapcsolóhuroknak (feed-forward connector loop, FCL) nevezik. A PmrD *Klebsiella* fajokban is a foszforilált PmrA-t stabilizálja, azonban az ő PmrA-juk nem represszálja a *pmrD*-t. Az *mgrB* colistin-rezisztenciában

játszott kulcsszerepét bizonyítja, hogy inaktivációja nagyobb mértékű rezisztenciát eredményez, mint a fehérjepár-rendszerek mutációi [145, 174-177].

*P. aeruginosá*ban a két szabályozórendszer hasonlóan működik, mint *S.* Typhimuriumban. A szabályozófehérjék génjeinek overexpressziója, illetve mutációi egyaránt hozzájárulnak a colistin-rezisztencia kifejlődéséhez. A közelmúltban igazolták, hogy legalább két másik szabályozó fehérjepárnak, a ParR-ParS-nek és a CprR-CprS-nek is szerepe van az *arn* operon aktiválásában. A CprS és ParS szenzor fehérjék működését nem a magnéziumion-koncentráció befolyásolja, hanem különböző antimikrobiális peptidek aktiválják őket [178-181].

Az *A. baumannii*nak nincs sem PhoP-PhoQ szabályozórendszere, sem *arn* operonja, tehát nem tud L-Ara4N-t szintetizálni, azonban a colistin-rezisztens törzsekben gyakori a *pmrA* és a *pmrB* gének mutációja, valamint a baktérium rendelkezik a foszfoetanolamin-transzferázt kódoló *pmrC* génnel. A kutatások alapján több meghatározó genetikai változás szükséges a faj colistin-rezisztenciájának kialakulásához: (i) a *pmrA* és *pmrB* gének up-regulációja, (ii) legalább egy aminosavcseréhez vezető mutáció a *pmrB* génben, (iii) a *pmrC* gén expressziója [182-185].

III. CÉLKITŰZÉSEK

Tudományos munkánk során a napjainkban komoly kihívást jelentő, multirezisztens, nozokomiális infekciókat okozó Gram-negatív baktériumok colistin-rezisztenciáját vizsgáltuk.

A colistin-rezisztens törzsekkel kapcsolatos vizsgálati céljaink az alábbiak voltak:

- Meghatározni a törzsek érzékenységét különböző antibiotikumokkal szemben.
- A colistin-rezisztens törzsek ellen *in vitro* hatékony, szinergista kölcsönhatású antibiotikum-kombinációk keresése, mivel irodalmi adatok alapján a kombinációs kezelés akkor is hatásos lehet multi- és colistin-rezisztens baktériumok ellen, ha azok az egyes antibiotikumokra külön-külön rezisztensek.
- Megvizsgálni a colistin-rezisztens törzsek érzékenységét laktoferrinnel, lizozimmel és protaminnal szemben, mivel ezek a kationos antimikrobiális peptidek szerkezetükben és hatásmechanizmusukban hasonlóak a polymyxinekhez.
- PCR-ral azonosítani a colistin-rezisztencia kialakulásában szerepet játszó gének (*phoP*, *phoQ*, *pmrA*, *pmrD*, *mgrB*, *mcr-1*) jelenlétét, majd reverz transzkripciós PCR-ral meghatározni a jelenlévő gének expresszióját.
- A colistin-érzékeny és -rezisztens törzsek külső membrán fehérjéinek összetételének elemzése, mivel a colistin a colistin-rezisztencia fenotípusosan a külső membrán molekuláris és strukturális változásaiban nyilvánul meg.

IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Baktériumtörzsek

Vizsgálataink során klinikai mintákból izolált *K. pneumoniae* és *Enterobacter asburiae* törzsekkel dolgoztunk, valamint az antibiotikum-érzékenységi vizsgálatok során kontrollként a *K. pneumoniae* ATCC 700603-as törzset használtuk [186].

A nyolc vizsgált *K. pneumoniae* törzs az ST258 klónba tartozó, multirezisztens, KPC-2 enzimtermelő törzs volt, amelyeket 2008–2009-ben, az első magyarországi colistin-rezisztens *K. pneumoniae* járvány során azonosítottak. A két *E. asburiae* törzs sporadikus esetekből származott [14].

2. Antibiotikum-érzékenység meghatározás

A törzsek antibiotikum-érzékenységét mikrodilúciós módszerrel és E-teszttel (bioMérieux Hungária Kft., Budapest, Magyarország) határoztuk meg. A mikrodilúció során az alábbi antibiotikumokat vizsgáltuk: ceftazidim (Fresenius Kabi Hungary Kft., Budapest, Magyarország), cefotaxim (Sanofi-Aventis Magyarország Zrt., Budapest, Magyarország), ceftriaxon (Teva Gyógyszergyár Zrt., Budapest, Magyarország), imipenem (Fresenius Kabi Hungary), ertapenem (MSD Pharma Hungary Kft., Budapest, Magyarország), amikacin (Lisapharma S.p.A., Erba, Olaszország), tobramycin (Teva), ciprofloxacin (Fresenius Kabi Hungary), levofloxacin (Teva), moxifloxacin (Bayer Hungária Kft., Budapest, Magyarország), rifampicin (Sigma-Aldrich Kft., Budapest, Magyarország), polymyxin B (Sigma-Aldrich) és colistin (Sigma-Aldrich). E-teszttel a colistin-érzékeny törzseken belüli heterorezisztens szubpopulációkat akartuk elkülöníteni. A MIC-értékek interpretációjánál a European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) akkor hatályos ajánlásait tekintettük irányadónak.

A vizsgálati mintákat az alábbi módon készítettük elő: 0,5 McFarland szabványnak megfelelő mennyiségű baktériumot (1,5 x 10^8 CFU/ml) 5 ml Mueller-Hinton (MH) táplevesben (Mueller-Hinton broth, MHB, Becton Dickinson Hungary

Kft., Környe, Magyarország) szuszpendáltunk, majd 18 órán át 37°C-on inkubáltuk. Az inkubáció után az oldatból 100 µl baktériumszuszpenziót 900 µl MHB-ben oldottuk fel, majd az eljárást kétszer ismételtük, mindig az új 1 ml-es oldatokat használva törzsoldatként. A harmadik 1 ml-es oldatból 500 µl-t feloldottunk 4500 µl MHB-ben, ezzel létrehozva a vizsgálati mintát.

96 lyukú mikrotitrátor lemezek minden lyukába 100–100 µl MHB-t mértünk. Az első oszlopokba 100 µl 1024 µg/ml koncentrációjú antibiotikum-oldatot adagoltunk. Innen kiindulva vízszintesen tovafutó felező hígítási sort készítettünk, majd minden lyukba 100–100 µl baktériumszuszpenziót fecskendeztünk. A pozitív kontroll 100 µl MHB és 100 µl baktériumszuszpenzió elegye, a negatív kontroll 200 µl baktériummentes tápleves volt.

3. Checkerboard analízis

Az antibiotikumok kombinációinak hatékonyságát checkerboard módszerrel vizsgáltuk. Az egyes antimikrobiális szerek legalacsonyabb MIC-értékeit felhasználva FIC-indexeket (frakcionális gátló koncentráció index) számoltunk az alábbi képlet alapján: $\Sigma FICI = FICI_A + FICI_B$, ahol $FICI_A = MIC_A(c) / MIC_A(a)$, illetve $FICI_B = MIC_B(c) / MIC_B(a)$ [187].

Az 'A' és 'B' betűk jelölik a kombinációban használt antibiotikumokat, míg az (a) és (c) jelölések azt fejezik ki, hogy az értéket önállóan (a = "alone") vagy kombinációban (c = "combination") mértük. A FIC-indexek összegei alapján soroltuk be a két antibiotikum között fennálló kölcsönhatást (4. táblázat) [187].

4. Táblázat: FIC-indexek és a hozzájuk tartozó kölcsönhatás jellege

ΣFICI	**Kölcsönhatás**
$\leq 0{,}5$	szinergizmus
$0{,}5 < \Sigma FICI < 1$	részleges szinergizmus
1	addíció
$1 < \Sigma FICI \leq 4$	indifferencia
> 4	antagonizmus

A 11-es és 12-es *K. pneumoniae* törzsek esetében az alábbi antibiotikumok különféle párosításait használtuk: ceftazidim, imipenem, tobramycin, ciprofloxacin, colistin, polymyxin B és rifampicin.

A colistin-rezisztens *E. asburiae* törzsek a bélbaktériumok ellen hatásos antimikrobiális szerekkel – 3. generációs cephalosporinok, carbapenemek, fluorokinolonok – szemben érzékenyek voltak, ezért velük nem végeztünk checkerboard analízist.

4. Laktoferrinnel, protaminnal és lizozimmel szembeni érzékenység

A baktériumokat 37°C-on 5 ml Luria-Bertani (LB) táplevesben (Becton Dickinson) tenyésztettük, majd az exponenciális fázisban 5000 rpm-mel, 5°C-on 15 percig centrifugáltuk az oldatot. Ezután 2,1 x 10^5 CFU/ml baktériumoldatot készítettünk 1%-os foszfátpufferben (phosphate buffered saline, PBS) (Sigma-Aldrich). Az ezen oldatból készített 10 µl baktériumszuszpenzióhoz egyenként 50 mg/ml protamint (Sigma-Aldrich), 50 mg/ml lizozimet (Sigma-Aldrich) illetve 50 mg/ml laktoferrint (Sigma-Aldrich) adtunk 200–200 µl össztérfogatban. A protaminos és lizozimes oldatokat 37°C-on 60 percig, a laktoferrines oldatot pedig 37°C-on 3 órán keresztül inkubáltuk. Ezután 100–100 µl-t oltottunk ki LB-agar lemezre, majd 37°C-on 18 órán át történő tenyésztés után meghatároztuk a százalékos csíraszámváltozást [188].

5. Colistin-rezisztencia gének vizsgálata PCR-ral

A baktériumtörzsek MH-agarról vett 2-3 telepét 500 µl desztillált vízben szuszpendáltuk. Az inokulumokat 5 percre 100°C-os vízfürdőbe helyeztük, majd 13.000 rpm-mel, 20°C-on 15 percig ultracentrifugáltuk. A *phoP*, *phoQ*, *pmrA*, *pmrB* és *pmrD* gének amplifikációjához az oligonukleotidokat az MWG Eurofins Primer Design programjával terveztük, az *mcr-1* és *mgrB* gének vizsgálatához a primereket korábbi publikációk alapján gyárttattuk (5. táblázat). A forward és reverse primerekből egyaránt 10–10 pmol/µl-es munkaoldatokat készítettünk. Az amplifikációhoz 1 unit/µl-es koncentrációjú Taq DNS-polimerázt (REDTaq® DNA Polymerase, Sigma-Aldrich)

használtunk. 25 µl-es reakcióelegyeket állítottunk össze az alábbiak szerint: 13 µl *Taq* DNS-polimeráz, 8 µl desztillált víz, 2 µl DNS-minta, 0,5–0,5 µl forward illetve reverse primer. Az amplifikációt 30 cikluson keresztül végeztük a következő beállításokkal: 1 perc denaturáció 95°C-on, 1 perc primerkötődés 50°C-on (*phoP*, *phoQ*, *pmrA*, *pmrB*, *pmrD*, *mgrB*) illetve 52°C-on (*mcr-1*), 1 perc elongáció 72°C-on. A végső elongációt 6 percig végeztük 72°C-on, a reakciót 4°C-on állítottuk le.

A PCR amplikonokat 1,5% agaróz gélben kétdimenziós gélelektroforézissel szeparáltuk, a géltömböket SYBR® Green I. nukleinsav-gélfesték oldatban (TS Labor Kft., Budapest, Magyarország) inkubáltuk 1 órán át, majd UV-fény mellett leolvastuk.

A *pmrB* és *mgrB* amplikonok nukleotidszekvenciájának meghatározását a BIOMI Kft. (Gödöllő, Magyarország) végezte. A kapott eredményeket az NCBI GenBank adatbázis alapján elemeztük [147].

5. Táblázat: A PCR során vizsgált gének primerei és ezek nukleotidsorrendje

Gén		Primerek nukleotidsorrendje	Referencia
phoP	***phoP01***	fwd: 5'-CGCACTTTTCTGCTGAGAC-3' rev: 5'-TTTGCTGACCACTTTGCC-3'	Munkánk során terveztük.
	phoP02	fwd: 5'-ATTACGTCACCAAGCCTTTC-3' rev: 5'-AGCAGTTTACCCCTCTCATC-3'	Munkánk során terveztük.
phoQ	***phoQ01***	fwd: 5'-CAAAGATTCCCTGATGCTCC-3' rev: 5'-GCCAGCACGTAGATAAACC-3'	Munkánk során terveztük.
	phoQ02	fwd: 5'-TGGCAATCAACCTCTACCC-3' rev: 5'-ACCTCCACAAACTCCAGAC-3'	Munkánk során terveztük.
	phoQ03	fwd: 5'-TGACCTCCGCTCTCAACAAG-3' rev: 5'-TGACCTGCCATTTTCCATCC-3'	Munkánk során terveztük.
pmrA	***pmrA01***	fwd: 5'-CAAGATAATCTGTTCTCCACCC-3' rev: 5'-CCAGCATATAGCCAAAACCC-3'	Munkánk során terveztük.
	pmrA02	fwd: 5'-GCATAATAACCAGGGCGATAAC-3' rev: 5'-AGATTGAGACGGGAAACCAG-3'	Munkánk során terveztük.
pmrB	***pmrB01***	fwd: 5'-TGAAATCCTCTACAACGACATC-3' rev: 5'-AAAAAGACTGTCCGACGC-3'	Munkánk során terveztük.
	pmrB02	fwd: 5'-TTCCCGTCTCAATCTGACC-3' rev: 5'-GCCCATGCAAAAAATCAACTTC-3'	Munkánk során terveztük.
pmrD		fwd: 5'-GCAAATAGTGGCGGAACAG-3' rev: 5'-AAGATATAGATGGAGTGGTGGG-3'	Munkánk során terveztük.
mcr-1		fwd: 5'-CGGTCAGTCCGTTTGTTC-3' rev: 5'-CTTGGTCGGTCTGTAGGG-3'	[147]
mgrB		fwd: 5'-AAGGCGTTCATTCTACCACC-3' rev: 5'-TTAAGAAGGCCGTGCTATCC-3'	[189]

6. Génexpresszió vizsgálata RT-qPCR-ral

A baktériumok teljes RNS-tartalmát RNeasy Mini Kittel (QIAGEN, Hilden, Németország) kivontuk, majd RNáz-mentes DNázzal (QIAGEN) kezeltük 37°C-on 30 percig. A reverz transzkripciós PCR reakciót a LightCycler RNA Master SYBR® Green I. kittel (Roche Applied Science, Penzberg, Németország) végeztük. Az amplifikációhoz az 6. táblázatban felsorolt oligonukleotidokat használtuk, melyek közül a *phoP*, *pmrD* és *arn* gének vizsgálatához használt oligonukleotidokat az MWG

Eurofins Primer Design programjával terveztük. A *phoP*, *pmrD* és *arn* gének ciklusonkénti hozamértékeit (cycle threshold, CT) az *rpoB* és *rrsE* housekeeping gének hozamértékeihez viszonyítva kalkuláltuk. Így mindegyik vizsgált törzsben az *rpoB* és *rrsE* gének expressziós értékeit kontrollként használva normalizáltuk a relatív expressziós értékeket a *phoP*, *pmrD* és *arn* gének esetén, az alábbi képlet szerint: $2^{-\Delta\Delta CT}$, ahol $\Delta\Delta CT = (CT - CT_{rpoB})_{\text{vizsgált törzs}} - (CT - CT_{rpoB})_{\text{kontroll törzs}}$ [190].

6. Táblázat: Az RT-qPCR során vizsgált gének primerei és ezek nukleotidsorrendje

Gén	Primerek nukleotidsorrendje	Referencia
rpoB	fwd: 5'-AAGGCGAATCCAGCTTGTTCAGC-3' rev: 5'-TGACGTTGCATGTTCGCACCCATCA-3'	[191]
rrsE	fwd: 5'-TTGACGTTACCCGCAGAAGAA-3' rev: 5'-GCTTGCACCCTCCGTATTACC-3'	[192]
phoP	fwd: 5'-GCGTCACCACCTCAAAGTTC-3' rev: 5'-AAACCGTCTTCATCCGGCAG-3'	Munkánk során terveztük.
pmrD	fwd: 5'-AGTACAGGACAACGCTTCGG-3' rev: 5'-GGAGTGAGTTTATCCCCTTCCC-3'	Munkánk során terveztük.
arnT	fwd: 5'-ATAATCGGCGACAGGATAGC-3' rev: 5'-CAGTATCGGTCAGTGGCTGT-3'	Munkánk során terveztük.

7. Külső membrán fehérjék izolálása

A törzseket 500 ml MHB-ben (Oxoid Ltd., Basingstoke, Egyesült Királyság) szuszpendáltuk, majd egy éjszakán át 37 °C-on inkubáltuk. A tenyészeteket lecentrifugáltuk (6000 g, 20 perc, 4 °C), majd az üledéket fiziológiás sóoldatban reszuszpendáltuk. A centrifugálás-reszuszpendálást még egyszer ismételtük. Az üledéket ezután feloldottuk 15 ml 20 mM-os Tris-HCl (pH = 7,5) oldatban, majd ezt jégbe helyeztük. A lehűtött mintán 2x2 percig 500 W-os ultrahangos feltárást végeztünk (MSE Soniprep 150 Ultrasonic Disintegrator, MSE Ltd., London, Egyesült Királyság). Ezt követően a mintákat ismét lecentrifugáltuk (6000 g, 20 perc, 4 °C), majd a felülúszót ultracentrifugáltuk (100.000 g, 60 perc, 4 °C). A keletkezett üledéket 5 ml 0,5%-os nátrium-laurilszarkozin oldatban (Sigma-Aldrich) feloldottuk, és 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően az előzővel egyező paraméterekkel ismét

ultracentrifugálást végeztünk. Ezáltal a szarkozinban oldhatatlan külső membrán fehérjék (outer membrane protein, OMP) az üledékben maradtak [193].

8. Külső membrán fehérjék egydimenziós gélelektroforézise (1-DE)

4%-os „stacking” gélt és 8%-os szeparálógélt használtunk. 8 µl OMP-mintához 8 µl Lämmli-oldatot adtunk [1 M-os Tris (pH = 6,8), 50%-os glicerin, 10%-os nátrium-dodecil-szulfát (sodium dodecyl sulfate, SDS), β-merkaptoetanol, brómfenolkék, desztillált víz (Bio-Rad Magyarország Kft., Budapest, Magyarország)], majd az így nyert keveréket 5 percig 100°C-on melegítettük. Lehűtés után 12–12 µl mintát mértünk a gél zsebeibe. Az elektroforézist 1 órán keresztül 120 V-on végeztük Bio-Rad Mini Protean 3 rendszerben, 14,4 g glicint, 3 g Trist, 1 g SDS-t és 1 liter desztillált vizet tartalmazó futtatópufferben. Ezután a géleket egy éjszakánt át inkubáltuk festőoldatban [1 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 450 ml metanol, 450 ml desztillált víz, 100 ml tömény ecetsav (Bio-Rad)]. Ezt követően a géleket differenciálóoldatba helyeztük: 100 ml metanol, 800 ml desztillált víz, 100 ml tömény ecetsav.

9. Külső membrán fehérjék analízise Microchippel

Mindegyik vizsgált törzs külső membrán fehérjéit kivontuk és elektroforetikus futtatást végeztünk az Agilent 2100 Bioanalyzer System Microchipben (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), amelyben dióda lézer detektálja a fluoreszcens jelet – az excitációt 630 nm-es hullámhosszon, az emissziót pedig 650 nm-en.

Az egyes törzsek külső membrán fehérjéinek fluoreszcens megjelölését az alábbiak szerint végeztük: a fehérjék kivonása után tízszeresére hígítottuk őket standard labeling bufferben, majd 5 µl oldathoz 0,5 µl fluoreszcens festék/ dimetil-szulfoxid oldatot adtunk és 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A le nem kötődött fluoreszcens festéket 0,5 µl etanolaminnal vontuk ki. A jelölt mintákat 24 µl desztillált víz hozzáadásával ötszörösére hígítottuk, majd 5 percig 100°C-on inkubáltuk. Centrifugálás után a felülúszót microchipben elektroforetikusan analizáltuk: a microchip csatornáit gélmátrixszal való feltöltése után 6–6 µl-nyi mintát mértünk a mintatároló

wellekbe. Az injektálást 80 másodpercig 1000 V-on, a szeparálást pedig 60 másodpercig 1000 V-on végeztük, a hőmérsékletetn konstansan 30°C-on tartva.

10. Külső membrán fehérjék kétdimenziós gélelektroforézise (2-DE)

A baktériumtörzsek külső membrán fehérjéit kétdimenziós gélelektroforézissel szeparáltuk töltés és tömeg alapján. 100 µg külső membrán fehérje mintához 2-DE mintapuffert adtunk: 8 M-os urea, 2%-os CHAPS (3-[(3-kolamidopropil)-dimetilammónium]-1-propánszulfonát), 50 mM-os ditiotreitol, 0,2%-os Bio-Lyte® 3/10 Ampholyte, brómfenolkék (Bio-Rad). A végtérfogat 125 µl lett. Az oldatot immobilizált pH gradiens (immobilized pH gradient, IPG) stripekre vittük fel (7 cm, pH 3–10) (Bio-Rad), melyeket aztán a rehidrációhoz egy éjszakán át inkubáltunk.

Ezt követően a külső membrán fehérjéket izoelektromos fókuszálással, töltés alapján szeparáltuk izoelektromos fókuszáló cellában (isoelectric focusing cell, IEF cell) (Bio-Rad), az alábbi programmal: (i) 250 V - 2 óra - linear, (ii) 500 V - 2 óra - linear, (iii) 4000 V - 10.000 Vh - rapid. Izoelektomos fókuszálás után a stripeket 2x10 percig mostuk ekvilibrációs pufferben: 6 M urea, 2%-os SDS, 20%-os glicerin, brómfenolkék, 2%-os ditiotreitol (Bio-Rad). A második mosást 2,5%-os jódacetamid pufferrel (Bio-Rad) végeztük ditiotreitol helyett.

Ezután a stripekre felvitt külső membrán fehérjéket tömeg alapján szeparáltuk: a futtatást 12%-os, 8x6 cm-es SDS poliakrilamid gélben (Bio-Rad) végeztük, előbb 20 percig 80 V-on, majd a futtatás végéig 120 V-on. Következő lépésként a géleket Coomassie Brilliant Blue R-250-nel festettük, kontrollként Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ protein marker létrát (Bio-Rad) használtunk. A gélek letapogatását Pharos FX laser scannerrel (Bio-Rad) végeztük. A külső membrán fehérjék további azonosításához és analíziséhez a gélek vizsgálandó részét kimetszettük.

11. Gélen belüli emésztés

A fehérjesávokat tartalmazó gélrészleteket kimetszettük, majd kisebb darabokra vágtuk. A Coomassie Brilliant Blue festéket és az SDS-t 100 mM-os ammónium-bikarbonáttal (Bio-Rad) távolítottuk el, majd a géldarabokat acetonitrillel (Sigma-Aldrich) dehidráltuk. A diszulfidhidakat 10 mM-os ditiotreitollal redukáltuk, majd a szabad szulfhidrilcsoportokat 55 mM-os jódacetamid-oldattal (Bio-Rad) alkiláltuk. A módosított fehérjéket gélen belül emésztettük side-chain-protected tripszinnel (Promega, Madison, WI, USA), 50 mM-os ammónium-bikarbonát oldatban, 37°C-on, egy éjszakán át. Az emésztett peptideket 5%-os hangyasavoldattal (Sigma-Aldrich) kivontuk a gélből, acetonitril és víz 2:1 arányú elegyében. Az extrahált peptideket kiszárítottuk, majd 5 μl 0,1%-os trifluorecetsav oldatban reszuszpendáltuk [194, 195].

12. MALDI-TOF/MS tömegspektrometria

A tömegspektrometriás vizsgálatot Autoflex II MALDI-TOF/MS módszerrel (Bruker Daltonics, Bréma, Németország) végeztük. Az emésztett peptideket 8 mg CHCA (α-ciano-4-hidroxifahéjsav, Bruker Daltonics) valamint 1 ml 50%-os acetonitril és 0,1%-os trifluorecetsav (Scharlau Chemie, Barcelona, Spanyolország) elegyében oldottuk. Egy-egy μl mátrixot és mintát helyeztünk rozsdamentes acélra szárazcsepp módszerrel.

A tömegspektrumokat pozitív módban mértük pulzáló ionizáció mellett [l = 337 nm; nitrogén lézer (MNL 106 PD)], 50 Hz-es maximális pulzációfrekvencián, pozitív reflektron módban, a késleltetett extrakciót 120 ns-re állítva. A gyorsítófeszültséget +19 kV-ra, a reflektronfeszültséget pedig +20 kV-ra állítottuk.

Az egyes mintákban lévő peptideket 1000 lövés alapján határoztuk meg, az adatok feldolgozásához a flexAnalysis szoftvercsomag 3.1-es verzióját használtuk (Bruker Daltonics). Az analízist Sequence Editor szoftverrel (Bruker Daltonics) végeztük, az alábbi kritériumokkal: (i) minden ciszteint jódacetamiddal kezeltünk, (ii) megengedtük a monoizotópos tömeget, (iii) legfeljebb két kihagyott hasítási pont volt.

A fehérjék azonosítása a MASCOT algoritmus (http://www.matrixscience.com) és a Swiss-Prot adatbázis (Swiss Institute of Bioinformatics, Genf, Svájc) alapján történt, az alábbi két változót figyelembe véve: (i) a karbamidometil-cisztein fix módosulat, (ii) a metionin-oxidáció megengedett. A mass accuracy-t MS-módban 150 ppm-nek, MS/MS-módban 0,8 Da-nak tekintettük. Csak azokat a fehérjéket vettük figyelembe, amelyek szekvenciája legalább kétszeri egyezést mutatott [194, 196].

V. EREDMÉNYEK

1. Antibiotikum-érzékenység

Az ST258-as klónba tartozó *K. pneumoniae* törzsek mind rezisztensek voltak 3. generációs cephalosporinokkal, ertapenemmel, tobramycinnel, fluorokinolonokkal és rifampicinnel szemben. A 11-es számú törzs kivételével mind rezisztensek voltak a polymyxinekre is. Az egyes törzsek különböző antibiotikumokkal szembeni MIC-értékei a 7. táblázatban vannak feltüntetve.

A sporadikus esetekből izolált *E. asburiae* törzsek érzékenyek voltak 3. generációs cephalosporinokra, carbapenemekre, fluorokinolonokra és amikacinra. A colistin-érzékeny törzsön belül E-teszttel egy colistin-heterorezisztens szubpopulációt különítettünk el, ezt 0821/H-nak jelöltük (8. táblázat).

7. Táblázat: A vizsgált *K. pneumoniae* törzsek MIC-értékei

Antibiotikumok	**MIC (µg/ml)**										
	EUCAST breakpoints	***K. pneumoniae* ATCC 700603**	***K. pneumoniae* 11**	***K. pneumoniae* 12**	***K. pneumoniae* 97**	***K. pneumoniae* 105**	***K. pneumoniae* 132**	***K. pneumoniae* 153**	***K. pneumoniae* 160**	***K. pneumoniae* 167**	***K. pneumoniae* 168**
ampicillin	**8**	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
ceftazidim	**4**	64	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
cefotaxim	**2**	16	128	128	32	32-64	32	64	32	32	128
ceftriaxon	**2**	8	256	256	128	128	128	128-256	64-128	128	256
ertapenem	**1**	<0,125	32	64	8-16	16	8-16	16	16-32	16	32
imipenem	**8**	<0,125	256	256	4	4-8	2-4	4	4	4	16
amikacin	**16**	2	32	32	2	2	2	2	16	16	2
tobramycin	**4**	4	32	16	16	16	8-16	16	16	16	16
ciprofloxacin	**1**	0.5	128	128	128	128	128	128	128	128	128
levofloxacin	**2**	1	64	64	64	64	64	64	64	64	64
moxifloxacin	**1**	2	64	64	64	64	64	64	64	64	64
polymyxin B	**-**	2	<0,125	128	32	16	16-32	8-16	16	32	64-128
colistin	**2**	1	<0,125	256	32	32	32-64	32	32-64	32-64	256
rifampicin	**-**	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256

8. Táblázat: A vizsgált *E. asburiae* törzsek MIC-értékei

Antibiotikumok	**MIC (µg/ml)**				
	EUCAST breakpoints	***K. pneumoniae* ATCC 700603**	***E. asburiae* 0821**	***E. asburiae* 0821/H**	***E. asburiae* 148**
ampicillin	**8**	>256	256	256	32
ceftazidim	**4**	64	0,25	1	<0,125
cefotaxim	**2**	16	0,5	1	<0,125
ceftriaxon	**2**	8	0,5	1	<0,125
ertapenem	**1**	<0,125	<0,125	<0,125	<0,125
imipenem	**8**	<0,125	0,5	0,5-1	0,25-0,5
amikacin	**16**	2	0,5	0,5	0,5-1
tobramycin	**4**	4	0,25	<0,125	0,5
ciprofloxacin	**1**	0,5	<0,125	<0,125	<0,125
levofloxacin	**2**	1	<0,125	<0,125	<0,125
moxifloxacin	**1**	2	<0,125	<0,125	<0,125
polymyxin B	**-**	2	0,125	>256	64-128
colistin	**2**	1	0,125	>256	256
rifampicin	**-**	>256	>256	>256	>256

2. A checkerboard analízis eredményei

Annak ellenére, hogy mindkettő az ST258-as klónba tartozott, a 11-es és 12-es *K. pneumoniae* törzseknél megfigyelt antibiotikum-kölcsönhatások sok szempontból különböztek (9–10. táblázat). A 11-es számú törzs esetében tiszta szinergizmust csak az imipenem–tobramycin kettősnél észleltünk, részleges szinergizmust a rifampicin, ciprofloxacin, imipenem és ceftazidim különböző kombinációinál figyeltünk meg.

A 12-es, colistin-rezisztens törzzsel szemben szinergizmust észleltünk az 4 µg/ml imipenem és 1 µg/ml rifampicin, 1 µg/ml imipenem és 2 µg/ml tobramycin, valamint 1 µg/ml imipenem és 2 µg/ml ciprofloxacin között. 16 µg/ml-es koncentrációjú ciprofloxacin szinergista kölcsönhatást mutatott 2 µg/ml colistinnel és 1 µg/ml polymyxin B-vel, bár megjegyzendő, hogy ezt a ciprofloxacin-szintet nem lehet elérni a szérumban. Az 1 µg/ml koncentrációjú rifampicin szinergista volt még 0,25 µg/ml colistinnel és 0,25 µg/ml polymyxin B-vel.

9. Táblázat: A 11-es *K. pneumoniae* törzs ellen tesztelt antibiotikumok önálló és kombinációban mért MIC-értékei, valamint FIC-indexei

***K. pneumoniae* 11**					
Antibiotikum-kombinációk	MIC (µg/ml)				FICI
	1. $AB_{magában}$	2. $AB_{magában}$	1. $AB_{kombinációban}$	2. $AB_{kombinációban}$	
colistin - ceftazidim	0,125	256	0,25	1	2,004
colistin - ciprofloxacin	0,125	128	0,25	1	2,008
colistin - imipenem	0,125	8	0,25	1	2,125
colistin - rifampicin	0,125	256	0,25	1	2,004
polymyxin B - ceftazidim	0,125	256	0,25	1	2,004
polymyxin B - ciprofloxacin	0,125	128	0,25	1	2,008
polymyxin B - imipenem	0,125	8	0,25	1	2,125
polymyxin B - rifampicin	0,125	256	0,25	1	2,004
rifampicin - ciprofloxacin	256	128	0,25	64	0,501
rifampicin - imipenem	256	8	4	4	0,516
imipenem - ciprofloxacin	8	128	4	1	0,508
imipenem - tobramycin	8	32	1	4	0,250
ceftazidim - ciprofloxacin	256	128	0,25	64	0,501
ceftazidim - tobramycin	256	32	1	16	0,504
tobramycin - ciprofloxacin	32	128	32	1	1,008

10. Táblázat: A 12-es *K. pneumoniae* törzs ellen tesztelt antibiotikumok önálló és kombinációban mért MIC-értékei, valamint FIC-indexei

K. pneumoniae 12					
Antibiotikum-kombinációk	MIC (μg/ml)				FICI
	1. $AB_{magában}$	2. $AB_{magában}$	1. $AB_{kombinációban}$	2. $AB_{kombinációban}$	
colistin - ceftazidim	256	256	64	2	0,258
colistin - ciprofloxacin	256	128	2	16	0,133
colistin - imipenem	256	8	32	8	1,125
colistin - rifampicin	256	256	0,25	1	0,005
polymyxin B - ceftazidim	128	256	64	1	0,504
polymyxin B - ciprofloxacin	128	128	1	16	0,133
polymyxin B - imipenem	128	8	2	4	0,516
polymyxin B - rifampicin	128	256	0,25	1	0,006
rifampicin - ciprofloxacin	256	128	64	64	0,750
rifampicin - imipenem	256	8	1	4	0,504
imipenem - ciprofloxacin	8	128	1	2	0,141
imipenem - tobramycin	8	32	1	2	0,188
ceftazidim - ciprofloxacin	256	128	256	64	1,500
ceftazidim - tobramycin	256	32	0,25	16	0,501
tobramycin - ciprofloxacin	32	128	16	1	0,508

3. Laktoferrinnel, protaminnal és lizozimmel szembeni érzékenység

A baktériumtörzsek érzékenységét három antibakteriális peptiddel szemben vizsgáltuk: lizozim, laktoferrin és protamin.

A *K. pneumoniae* törzsek rezisztensnek bizonyultak laktoferrinnel szemben – a kezelés után nem tapasztaltunk csökkenést a telepképző egységek számában. A protamin 97%-os csökkenést okozott a colistin-érzékeny *K. pneumoniae* törzs telepképző egységeinek számában, a colistin-rezisztens törzsé azonban csak 40%-kal csökkent. A lizozim 100%-os baktericid hatást mutatott a colistin-érzékeny törzzsel szemben, és a colistin-rezisztens esetében is számmottevő, bár kisebb mértékű hatást detektáltunk. Az eredményeket a 11. táblázatban tüntettük fel.

Az *E. asburiae* törzsek vizsgálata során a protamin nem okozott szignifikáns változást a telepképző egységek számában egyik törzsnél sem. A colistin-rezisztens törzseknél viszont magas szintű toleranciát észleltünk laktoferrinnel és lizozimmel szemben (12. táblázat).

11. Táblázat: CFU-változás *K. pneumoniae* törzseknél szérum, liquor, laktoferrin, lizozim és protamin hatására (Col É = colistin-érzékeny; Col R = colistin-rezisztens)

		K. pneumoniae **Col É**	***K. pneumoniae*** **Col R**
Kezdő csíraszám (CFU/ml)		$2{,}1 \times 10^5$ (100%)	$2{,}1 \times 10^5$ (100%)
Csíraszámváltozás	**Szérum (patkány)**	$2{,}52 \times 10^4$ (-88%)	$2{,}1 \times 10^4$ (-90%)
	Liquor (patkány)	$6{,}3 \times 10^3$ (-97%)	$3{,}15 \times 10^4$ (-85%)
	Protamin (50 mg/ml)	$6{,}3 \times 10^3$ (-97%)	$1{,}26 \times 10^5$ (-40%)
	Laktoferrin (50 mg/ml)	$2{,}1 \times 10^5$ (0%)	$2{,}1 \times 10^5$ (0%)
	Lizozim (50 mg/ml)	0 (-100%)	$2{,}73 \times 10^4$ (-87%)

12. Táblázat: CFU-változás *E. asburiae* törzseknél laktoferrin, lizozim és protamin hatására (Col É = colistin-érzékeny; Col R = colistin-rezisztens)

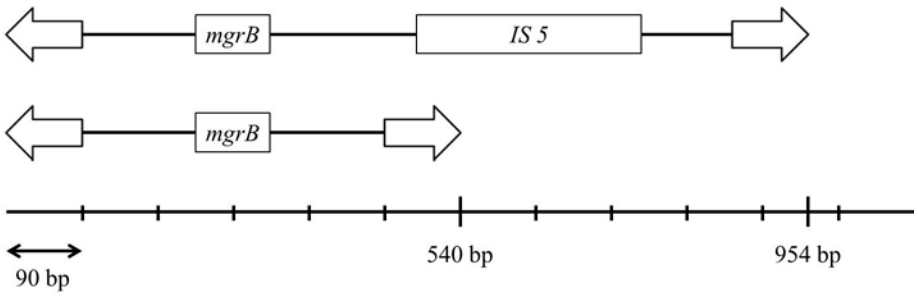
		E. asb **0821** **Col É**	***E. asb*** **0821/H** **Col R**	***E. asb*** **148** **Col R**
Kezdő csíraszám (CFU/ml)		$2{,}1 \times 10^5$ (100%)	$2{,}1 \times 10^5$ (100%)	$2{,}1 \times 10^5$ (100%)
Csíraszámváltozás	**Protamin (50 mg/ml)**	$1{,}995 \times 10^5$ (-5%)	$2{,}1 \times 10^5$ (0%)	$2{,}1 \times 10^5$ (0%)
	Laktoferrin (50 mg/ml)	$2{,}1 \times 10^5$ (0%)	$2{,}919 \times 10^5$ (+39%)	$2{,}373 \times 10^5$ (+13%)
	Lizozim (50 mg/ml)	$2{,}184 \times 10^5$ (+4%)	$2{,}646 \times 10^5$ (+26%)	$2{,}163 \times 10^5$ (+3%)

4. Colistin-rezisztencia gének vizsgálata PCR-ral

A *phoP*, *phoQ*, *pmrA*, *pmrB* és *pmrD* jelenlétét sikerült igazolnunk a colistin-érzékeny és colistin-rezisztens *K. pneumoniae* törzsekben is, azonban az *mcr-1*-et egyik colistin-rezisztens törzsben sem sikerült kimutatnunk.

A *K. pneumoniae* törzsekből egyaránt sikerült kimutatni az *mgrB* gént. A colistin-érzékeny törzsből egy 954 bázispár hosszúságú amplikont sikerült detektálnunk, amelynek szekvenciaanalízise során egy új, eddig le nem írt MgrB variánst kódoló génszakaszt, valamint egy 5-ös típusú inzerciós szekvenciát (insertion sequence 5, *IS5*) azonosítottunk. A colistin-rezisztens törzsekből egységesen 540 bázispár hosszúságú amplikonokat mutattunk ki, amelyekből hiányzott az *IS5*, az MgrB-t kódoló génszakasz pedig egy, az összes törzsben azonos szekvenciájú variánst kódolt (4. ábra).

Sem a colistin-érzékeny, sem a colistin-rezisztens törzsekben nem találtunk módosulást a PmrB fehérje szekvenciájában.

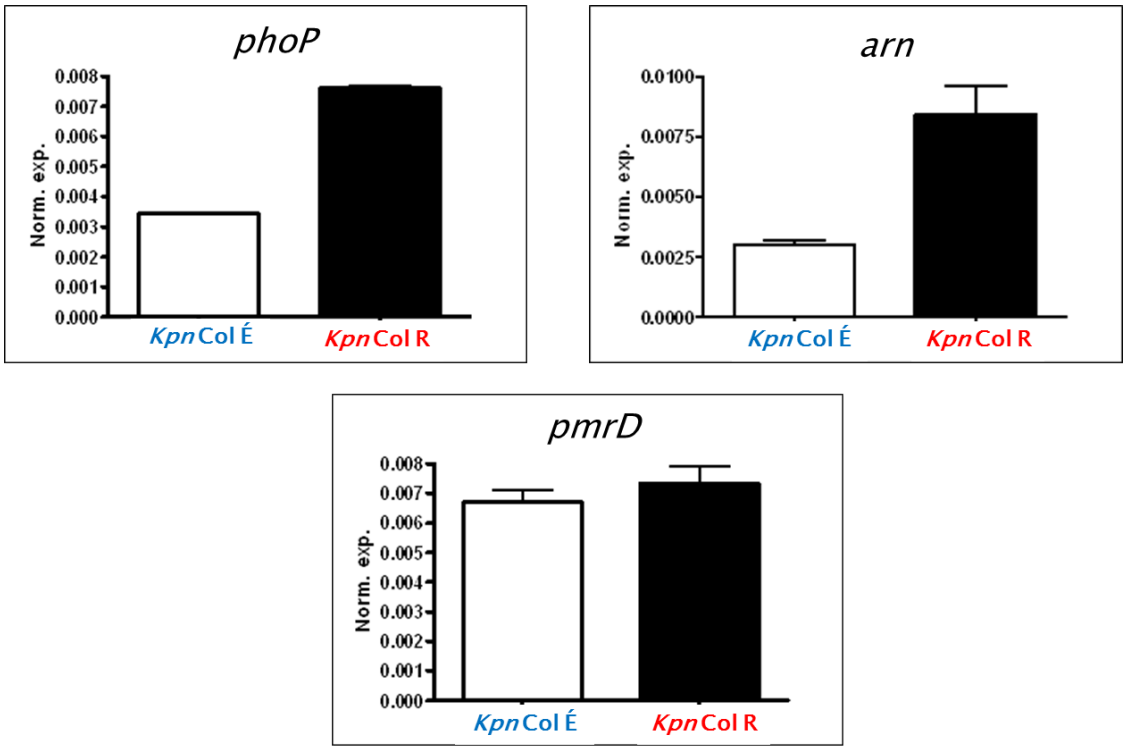


4. Ábra:

A *K. pneumoniae* törzsekből izolált *mgrB* gének hossza (felső amplikon: colistin-érzékeny *K. pneumoniae* törzs; alsó amplikon: colistin-rezisztens *K. pneumoniae* törzs)

5. Génexpresszió vizsgálata RT-qPCR-ral

A PhoP-PmrD-*arn* szabályozó rendszer colistin-rezisztenciában játszott szerepét sikerült igazolnunk a vizsgált colistin-rezisztens *K. pneumoniae* törzsekben. A *phoP* és *arn* gén fokozott expresszióját azonosítottuk (5. ábra).

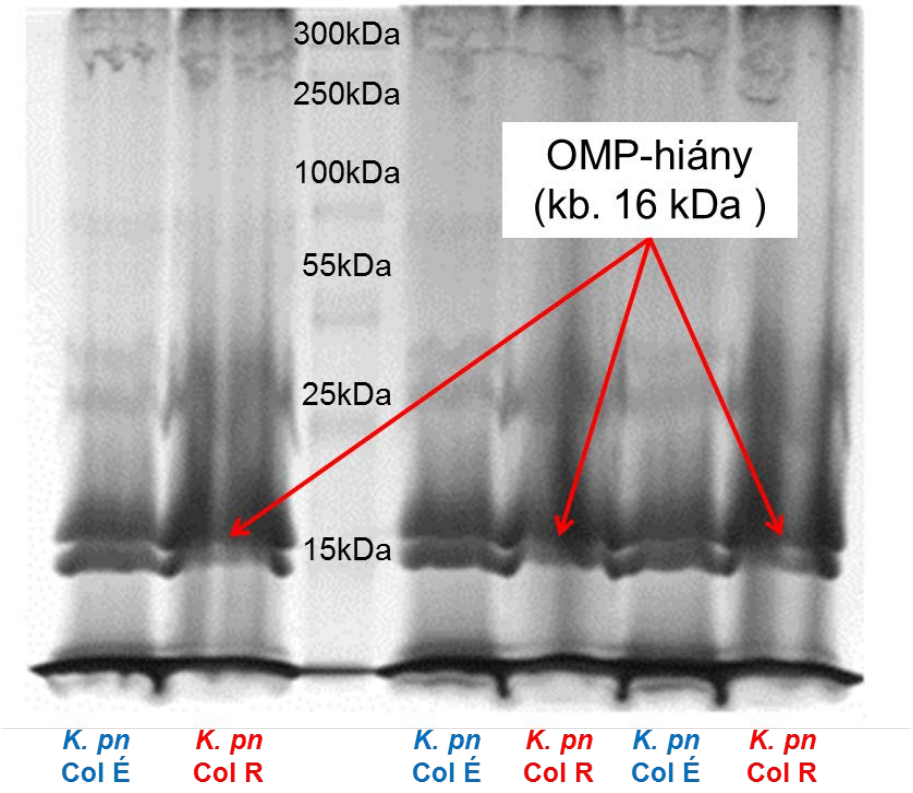


5. Ábra: *K. pneumoniae* colistin-rezisztencia gének relatív génexpressziója

(*Kpn* Col É = colistin-érzékeny *K. pneumoniae*; *Kpn* Col R = colistin-rezisztens *K. pneumoniae*)

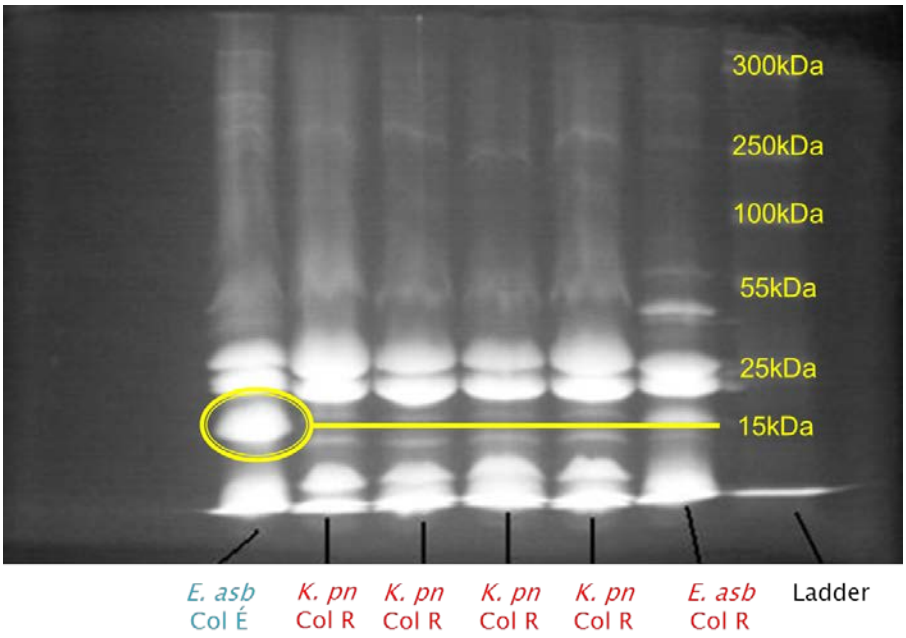
6. Külső membrán fehérjék egydimenziós gélelektroforézise

A külső membrán fehérjék SDS-PAGE gélelektroforézise során a colistin-rezisztens *K. pneumoniae* és *E. asburiae* törzseknél egyaránt egy kb. 15–16 kDa nagyságú proteinfrakció hiányát detektáltuk (6–7. ábra).



6. Ábra: *K. pneumoniae* külső membrán fehérjék egydimenziós gélelektroforézise

(*K. pn* Col É = colistin-érzékeny *K. pneumoniae*; *K. pn* Col R = colistin-rezisztens *K. pneumoniae*)



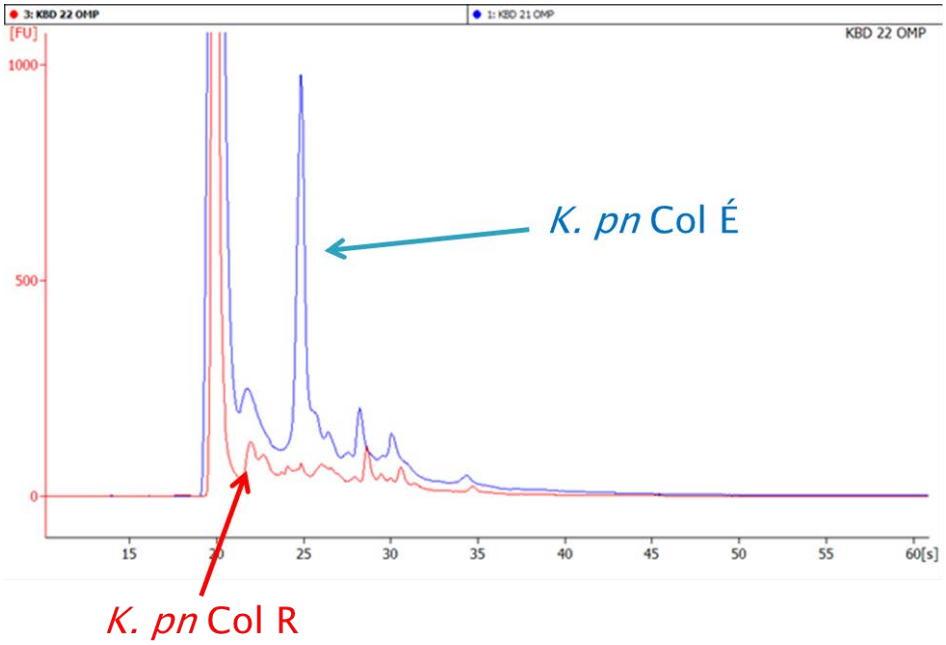
7. Ábra: *E. asburiae* külső membrán fehérjék egydimenziós gélelektroforézise

(*K. pn* Col R = colistin-rezisztens *K. pneumoniae*;

E. asb Col É = colistin-érzékeny *E. asburiae*; *E. asb* Col R = colistin-rezisztens *E. asburiae*)

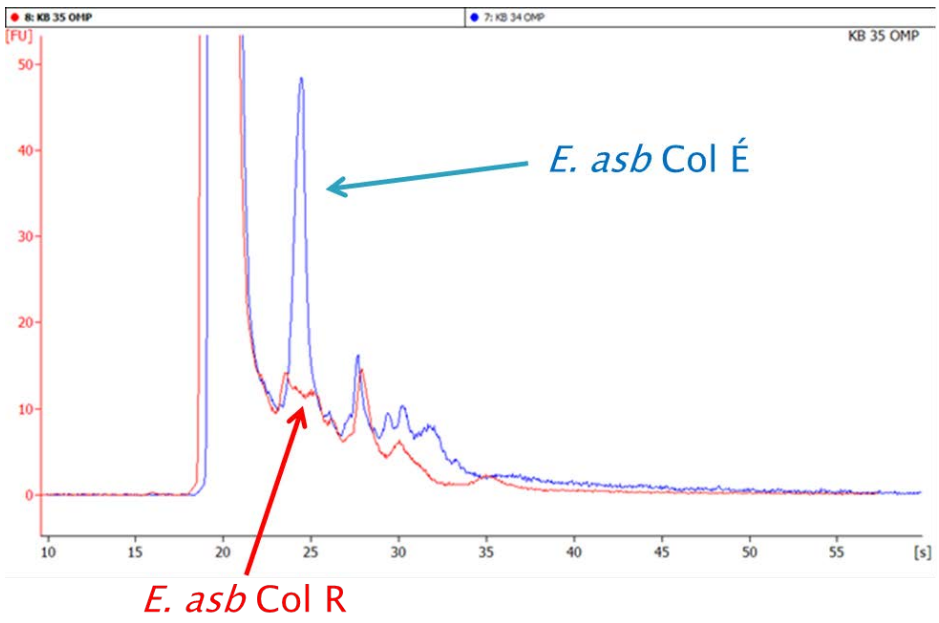
7. Külső membrán fehérjék analízise Microchippel

A külső membrán fehérje vizsgálatok során az egyes baktériumok fluoreszcensen megjelölt külső membrán fehérjéit microchipben (Agilent 2100 Bioanalyzer System) futtatva, a colistin-rezisztens *K. pneumoniae* és *E. asburiae* törzseknél egy fehérjefrakció-hiányt sikerült detektálni a futás 20–25. másodpercében (8–9. ábra).



8. Ábra: *K. pneumoniae* külső membrán fehérjék Microchipben történő analízise

(*K. pn* Col É = colistin-érzékeny *K. pneumoniae*; *K. pn* Col R = colistin-rezisztens *K. pneumoniae*)



9. Ábra: *E. asburiae* külső membrán fehérjék Microchipben történő analízise

(*E. asb* Col É = colistin-érzékeny *E. asburiae*; *E. asb* Col R = colistin-rezisztens *E. asburiae*)

8. A külső membrán fehérjék analízise MALDI-TOF tömegspektrometriával

A külső membrán fehérjéket kétdimenziós gélelektroforézissel szeparáltuk töltés és tömeg alapján, majd a különbséget adó fehérjefrakciókat MALDI-TOF tömegspektrometriával identifikáltuk.

A colistin-érzékeny *K. pneumoniae* törzsben nagy mennyiségben találtunk DNA starvation/stationary phase protection proteineket (Dps) és a LysM domain/BON családba tartozó fehérjéket, míg ezek a fehérjék a colistin-rezisztens törzsnél hiányoztak. A colistin-érzékeny *E. asburiae* törzsben az OmpC és OmpW külső membrán fehérjék jelen voltak, de a colistin-rezisztensekből hiányoztak, ugyanakkor helyettük OmpA-t és OmpX-et azonosítottunk.

VI. MEGBESZÉLÉS

A colistin-rezisztens, KPC-2 termelő *K. pneumoniae* törzseken végzett kísérleteink megerősítik a korábbi leírásokat a kombinációs antibiotikum-terápia jelentőségéről a monoterápiához képest. [197, 198].

Az általunk vizsgált antibiotikum-kombinációk közül szinergista kölcsönhatást figyeltünk meg a rifampicin–colistin, rifampicin–polymyxin B, imipenem–rifampicin, imipenem–tobramycin és imipenem–ciprofloxacin kombinációknál. A ciprofloxacin–colistin és ciprofloxacin–polymyxin B kombinációk, bár szintén szinergizmust mutattak, terápiás szempontból megvalósíthatatlanok, mivel 16 µg/ml-es ciprofloxacin-koncentrációt nem lehet elérni a vérszérumban [199].

A polymyxinek és a rifampicin *in vitro* szinergista kölcsönhatását az *Enterobacteriaceae* család tagjaival szemben több kísérletben leírták már, colistin-érzékeny és -rezisztens törzsekkel szemben is. *In vivo* vizsgálatokat ennek ellenére csak olyan törzseken végeztek eddig, melyek carbapenem-rezisztensek, de colistin-érzékenyek [99-101, 200].

A carbapenemek és a rifampicin kombinációinak szinergista hatására is vannak irodalmi adatok; a mi vizsgálatunkban a colistin-érzékeny törzzsel szemben részleges szinergizmust, a colistin-rezisztenssel szemben pedig szinergizmust észleltünk. Ez arra utal, hogy a fent említett kombinációk polymyxinek nélkül is hatékonyak lehetnek, bár a doripenem és colistin kombinációját sikerrel alkalmazták *in vitro* körülmények között carbapenem- és colistin-rezisztens *K. pneumoniae* törzsek ellen is [201-204].

Bár a colistin-érzékeny és -rezisztens *K. pneumoniae* törzs egyaránt rezisztens volt ceftazidimmel és tobramycinnel szemben, a két antibiotikum kombinációja részleges szinergista hatású volt ellenük. Ráadásul a kombinációban mért MIC-értékeik a terápiás körülmények között elérhető szérumkoncentrációk tartományában voltak, amely felveti a terápiás alkalmazhatóság lehetőségét. Ugyanez igaz az imipenem és tobramycin kombinációjára, melyek szinergistaként hatottak mindkét törzsre [199].

A colistin-érzékeny *E. asburiae* törzsön belül jelenlévő heterorezisztens szubpopuláció detektálása korrelál az elmúlt évek nemzetközi tapasztalataival. Lizozim-toleranciával összefüggő colistin-heterorezisztenciát írtak már le *Enterobacter cloacae*-

nál. A kationos antimikrobiális peptidek a polymyxinekhez hasonlóan kötődnek a Gram-negatív baktériumok külső membránjához kapcsolódó PhoP-PhoQ fehérjepároshoz, melynek fontos szerepe van a colistin-rezisztencia kialakulásában. A *K. pneumoniae* és *E. asburiae* törzsek a colistin-rezisztenciát korábbi expozíció nélkül alakították ki, amely felveti kereszttolerancia/-rezisztencia lehetőségét. Az emberi antimikrobiális peptidekkel (pl. laktoferrin, lizozim) szembeni tolerancia közrejátszhat a colistin-rezisztencia kialakulásában. Ez a jelenség valószínűleg visszafelé is érvényes – a colistin-rezisztencia következtében a baktériumok toleránssá válhatnak a gazdaszervezet antimikrobiális peptidjeivel szemben [168, 170, 205-209].

A colistin-rezisztenciáért felelős kromoszomális gének közül PCR-ral sikerült igazolni a *phoP*, *phoQ*, *pmrA*, *pmrB*, *pmrD* és *mgrB* gének jelenlétét a *K. pneumoniae* törzsekben, azonban a 2015 novemberében leírt *mcr-1* plazmidon kódolt rezisztenciagén a *Klebsiella* és *Enterobacter* törzsekben sem volt kimutatható. Bár korábban leírták a PmrB aminosav-szekvenciájának módosulását, mint a szerzett colistin-rezisztencia egyik tényezőjét, a colistin-rezisztens *K. pneumoniae* törzseink PmrB fehérjéje vad típusú volt. A colistin-érzékeny és -rezisztens *K. pneumoniae* törzseink MgrB fehérjéje egyaránt eltért a vad típustól, a rezisztens törzsek *mgrB* génje mellől azonban hiányzott egy, az érzékenyben jelenlévő *IS5* nukleotidszakasz. Utóbbi azért figyelemre méltó, mivel az inzerciós szekvenciák általában az *mgrB* génbe épülve, annak inaktiválása révén váltanak ki colistin-rezisztenciát. A PhoP-PhoQ és a PmrA-PmrB rendszerek szerepe a polymyxinekkel és kationos antimikrobiális peptidekkel szembeni rezisztenciában régóta ismert, a géneket és homológjaikat kimutatták bélbaktériumokból és Gram-negatív nem-fermentáló pálcákból is. Az *mcr-1* gén elterjedéséről hetente érkeznek frissítések: Délkelet-Ázsiából, Észak-Afrikából, Latin- és Észak-Amerikából, valamint számos európai országból származó baktériumban igazolták a jelenlétét. Ezidáig Magyarországon sem állatból, sem emberből származó mintában nem találták meg a gént [140, 162, 189, 210, 211].

A PhoPQ és *arn* rendszerek colistin-rezisztenciát kialakító szerepét a vizsgált baktériumtörzsekben RT-qPCR-ral sikerült igazolni. Bár a PmrD kapcsolófehérjét kódoló gén expressziójában nem volt szignifikáns különbség a colistin-érzékeny és -rezisztens *K. pneumoniae* törzsek között, a colistin-rezisztens törzsekben az *arn* és *phoP* gének jelentős overexpresszióját detektáltuk. Az eredmény azért jelentős, mivel a gének

expressziójában tapasztalt különbségeket colistinexpozíció nélkül mértük. Korábbi kísérletek során a rezisztenciagének expressziója csak colistin jelenlétében fokozódott colistin-rezisztens *K. pneumoniae* törzsekben, míg antibiotikum hiányában az érzékeny és rezisztens törzsek génexpressziójában nem volt szignifikáns eltérés. Ezzel ellentétben *P. aeruginosa* törzsek vizsgálatakor hasonló eredményt tapasztaltak, azaz a rezisztenciagének colistinexpozíció hiányában is overexpresszálódtak. A jelenség hátterében egyrészt az állhat, hogy a bélbaktériumokban és a Gram-negatív nem-fermentáló pálcákban a PhoPQ és PmrAB rendszerek szerepe eltérő, másrészt a rezisztencia kialakulásában még egy fajon belül is különböző molekuláris mechanizmusok játszhatnak szerepet [212-214].

A colistin-rezisztens *K. pneumoniae* és *E. asburiae* törzsek külső membrán fehérjéinek gélelektroforézise során is a 15-16 kDa-os fehérjefrakció hiányát detektáltuk. A *K. pneumoniae* esetében a hiányzó proteinek DNA starvation/stationary phase protection proteinek (Dps) és a LysM domain/BON családba tartozó fehérjék voltak.

A Dps-eket és homológjaikat több baktériumcsaládban megtalálták, fő funkciójuk minden fajban a baktériumsejtek védelme az osztódás stacioner fázisában. Nem-specifikus módon kötődnek a bakteriális kromoszómához egy rendezett, stabil Dps-DNS komplexet hozva létre, amelyben a DNS megfelelően kondenzált és védett a különböző károsító hatásoktól. Megkötik az intracelluláris Fe^{2+} ionokat, melyeket ferroxidáz aktivitásukkal Fe^{3+} ionokká oxidálnak (megelőzve a Fenton-reakciót), majd eltárolják őket. Eközben csökkentik a reaktív oxigén szabadgyökök mennyiségét a sejtekben: $2\ Fe^{2+} + H_2O_2 + 2\ H^+ = 2\ Fe^{3+} + 2\ H_2O$. A Dps-ek rendkívül fontosak a baktériumsejtek túlélése szempontjából, mivel megvédik őket az oxidatív és acidikus stressztől, ferritin-szerű működésükkel szabályozzák a sejten belül vasanyagcserét, valamint stabilizálják és megóvják a DNS-t [215, 216].

A LysM és BON domének számos mikrobiális fehérjében megtalálható, evolúciósan konzervált szakaszok. E proteinek elsősorban a sejtmembrán-integritás fenntartásáért felelős struktúrfehérjék és enzimek, amelyek szintén a stacioner fázisban mutathatók ki legnagyobb mennyiségben. A LysM-domén specifikusan a peptidoglikán egyik alkotóeleméhez, az *N*-acetilglükózaminhoz kötődik. Tekintve, hogy a colistin-rezisztencia a sejtfal molekuláris szerkezetváltozásain alapul, érthető az integritásért

felelős fehérjék expressziójában tapasztalt változás, bár háttere még nem tisztázott [217, 218].

Milyen szelekciós előnyt jelenthet két, a baktérium túlélése szempontjából ennyire fontos fehérjecsoport elvesztése? Colistin-rezisztens *A. baumannii* izolátumon végzett proteomikai analízis azt mutatta, hogy a rezisztencia megszerzése enzimek és szabályozófehérjék csökkent expressziójával, azaz jelentős biológiai fitness-vesztéssel járt. Az ilyen fitness-vesztés korlátozná a törzsek túlélését, nem alakulhatnának ki colistin-rezisztens kórokozók okozta járványok. Azonban az elmúlt években jelentett, colistin-rezisztens *K. pneumoniae* törzsek okozta járványok arra utalnak, hogy ezek a törzsek nem csak túlélnek, hanem komoly terápiás kihívást okozva terjednek is [219-222].

Az OmpC és homológjai (Omp36, OmpK36) a bélbaktériumok külső membránjában található, porin típusú transzportfehérjék. Többféle molekula sejtbe irányuló transzportját végzik, köztük antibiotikumokét (pl. cephalosporinok, carbapenemek, fluorokinolonok). Elvesztése vagy csökkent expressziója *E. coli*ban és *Enterobacter* fajokban antibiotikum-rezisztenciához vezet (főként carbapenemek és más β-laktámok ellen), valamint csökkent érzékenységhez a szérum antimikrobiális aktivitásával szemben [223, 224].

Az OmpW-nek és OmpX-nek *E. coli*ban a vasanyagcsere szabályozásában van szerepe – vashiányos állapotban az *ompW* expressziója csökken, az *ompX*-é fokozódik. Az OmpW termelődése colistin-rezisztens *A. baumannii*ban is csökken [219, 225].

Az OmpA egy többfunkciós külső membrán fehérje – a külső membrán integritásának fenntartásán kívül *E. coli*ban a szérumrezisztenciáért, *Cronobacter sakazakii*ban (korábban *Enterobacter sakazakii*) az OmpX-szel együtt a bélhámsejtek bazolaterális inváziójáért, *K. pneumoniae*-ben pedig az antimikrobiális peptidek elleni rezisztenciáért felelős [226-228].

Az OmpX szerkezetileg az OmpA-ra hasonlító fehérje. Multirezisztens *Enterobacter aerogenes* törzsekben jelentős túltermelődését tapasztalták több fő porin, pl. az OmpF és Omp36 szintézisének egyidejű csökkenése, valamint az LPS szerkezetváltozása mellett. Az *ompX* expresszióját a környezet ozmolaritásának növekedése, valamint a MarA (multiple antibiotic resistance) transzkripciós regulátor

fokozza. Az *ompX* up- és az *omp36* down-regulációja együtt a külső membrán áteresztő-képességének csökkenése irányába hat [229-232].

Az *Enterobacter* fajok OmpC-jének csökkent termelődése antibiotikum- és szérumrezisztenciához vezet, de az *E. asburiae* törzseink csak colistin-rezisztensek, valamint lizozim- és laktoferrin-toleránsak voltak. Az OmpW csökkent termelődését leírták már colistin-rezisztenciában, de csak *Acinetobacter* fajoknál. Mivel az *Enterobacter* nemzetség colistin-rezisztencia mechanizmusait még nem vizsgálták részletesen, nem tudjuk, hogy az OmpC és OmpW csökkent termelődésének pontosan mi a szerepe benne. Az OmpA antimikrobiális peptid toleranciában játszott szerepét leírták már bélbaktériumoknál, az OmpX túltermelődése pedig a korábbi adatok alapján összefüggésbe hozható a külső membrán szerkezetváltozásaival, valamint magyarázhatja az OmpC-vesztést. Tekintve, hogy az eddig megismert rezisztenciamechanizmusok is bonyolult módon szabályozottak, a későbbi kutatások fényt deríthetnek a fehérjék pontos szerepére.

VII. ÚJ EREDMÉNYEK

Kísérleteink során az alábbi új eredményekre, megállapításokra jutottunk:

- *Klebsiella pneumoniae* törzsek
  - az ST258 klón hajlamos colistin-rezisztenciát kialakítani
  - a polymyxinek és a rifampicin, valamint az imipenem rifampicinnel, tobramycinnel és ciprofloxacinnal alkotott kombinációi *in vitro* antibakteriális hátásúak a colistin-rezisztens törzsekkel szemben
  - a colistin-rezisztens törzsekben tolerancia alakul ki antimikrobiális peptidekkel szemben
  - a colistin-rezisztens törzsek overexpresszálják a *phoP*, *pmrD* és *arn* géneket
  - az ST258 klónban MgrB variánsokat azonosítottunk
  - a colistin-rezisztens törzsekben megváltozik a külső membrán fehérjék összetétele (LysM/BON család fehérjéi és DNA starvation proteinek elvesztése)
- *Enterobacter asburiae* törzsek
  - egyes *E. asburiae* törzsek colistin-rezisztenssé képesek válni β-laktám-, aminoglikozid- és fluorokinolon-érzékenységük megőrzése mellett
  - a colistin-rezisztens törzsekben tolerancia alakul ki antimikrobiális peptidekkel szemben
  - a colistin-rezisztens törzsekben megváltozik a külső membrán fehérjék összetétele (OmpC és OmpW hiánya, valamint OmpA és OmpX jelenléte)

VIII. ÖSSZEFOGLALÁS

Új támadáspontú antibiotikumokból kevés van, a már ismert vegyületcsaládok új tagjaiból néhány már klinikai használatban van, számos másiknak a vizsgálatai pedig jelenleg is zajlanak. Korábban elfeledett antibiotikumok (fosfomycin, colistin, stb.) kerülnek elő, vagy éppen olyanok, amelyeket az adott baktériumok ellen sohasem használták (pl. rifampicin a multirezisztens és colistin-rezisztens bélbaktériumok ellen). Ezek új terápiás megoldások és protokollok, új gyógyszerek kiindulási alapjai lehetnek.

Ahol viszont az anyagi források nem teszik lehetővé a legújabb gyógyszerek alkalmazását, ott a megfelelő és hatékony infekciókontroll, illetve a józan antibiotikum-felhasználási politika kiemelten lényeges.

Az utóbbi években megjelentek olyan multirezisztens baktériumtörzsek, amelyek már a „végső mentsvár” antibiotikumokkal, pl. polymyxinekkel szemben is rezisztensek. Emiatt külön figyelmet kell szentelni az ilyen törzsek okozta infekciók lehetséges terápiás megoldásaira. Az antibiotikum-kombinációk a saját és irodalmi adatok alapján működőképesek lehetnek ezen baktériumok ellen, még ha az egyes antibiotikumokra külön-külön rezisztensek is.

A polymyxinekkel szembeni rezisztencia mechanizmusainak (pl. a külső membán enzimatikus módosítása, a külső membrán fehérjék összetételének megváltozása) megértése fontos a potenciális új támadáspontok azonosítása miatt, valamint a baktériumok és az emberi szervezet védekezőeszközei kölcsönhatásainak felderítése szempontjából is (pl. kationos antimikrobiális peptidek iránti tolerancia és colistin-rezisztencia).

„Én távolabbra láthattam, de csak azért, mert óriások vállán álltam.”

(*Sir Isaac Newton*)

IX. SUMMARY

There are few antibiotics acting on new molecular targets. However, some new agents of the known antibiotic families are already in clinical usage, others are currently in different stages of testing. Forgotten antibiotics (e.g. fosfomycin, colistin) re-emerge and certain antimicrobials are applied against bacteria that previously had not been treated with them (e.g. use of rifampin against multiresistant and colistin-resistant enterobacteria). These can be the starting points of new therapeutic options, protocols, and drugs.

Nonetheless, if financial resources do not allow the use of the newest medicines, adequate and efficient infection control, as well as rational hospital antibiotic policy is of high priority.

Recently such multiresistant bacterial strains have appeared that are resistant to the „last resort" antibiotics, e.g. polymyxins. Because of this it is highly important to consider the possible therapeutic options of infections caused by these strains. According to our results and literary data, antibiotic combinations could be effective against these strains, even if the bacteria are resistant to the separate antibiotics.

Understanding the mechanisms of resistance to polymyxins (e.g. enzymatic modification of cell wall, reassortment of outer membrane proteins) is essential not only because of the identification of potentially new molecular targets, but in terms of exploration of interactions between bacteria and the human body's defense systems (e.g. tolerance to cationic antimicrobial peptides and consecutive colistin-resistance), as well.

„If I have seen further than others, it is by standing upon the shoulders of giants."
(*Sir Isaac Newton*)

X. IRODALOMJEGYZÉK

[1] Falagas ME, Karageorgopoulos DE. (2008) Pandrug resistance (PDR), extensive drug resistance (XDR), and multidrug resistance (MDR) among Gram-negative bacilli: need for international harmonization in terminology. Clin Infect Dis, 46(7): 1121-1122; author reply 1122.

[2] Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. (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.

[3] Souli M, Galani I, Giamarellou H. (2008) Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. Euro Surveill, 13(47).

[4] Karaiskos I, Giamarellou H. (2014) Multidrug-resistant and extensively drug-resistant Gram-negative pathogens: current and emerging therapeutic approaches. Expert Opin Pharmacother, 15(10): 1351-1370.

[5] Bradford PA. (2001) Extended-spectrum β-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev, 14(4): 933-951, table of contents.

[6] Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. (2003) Ambler class A extended-spectrum β-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. Antimicrob Agents Chemother, 47(8): 2385-2392.

[7] Choi SH, Lee JE, Park SJ, Kim MN, Choo EJ, Kwak YG, Jeong JY, Woo JH, Kim NJ, Kim YS. (2007) Prevalence, microbiology, and clinical characteristics of extended-spectrum β-lactamase-producing *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, and *Morganella morganii* in Korea. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 26(8): 557-561.

[8] Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. (2007) Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother, 51(10): 3471-3484.

[9] Jacoby GA. (2009) AmpC β-lactamases. Clin Microbiol Rev, 22(1): 161-182, Table of Contents.

[10] Paterson DL. (2006) Resistance in Gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. Am J Infect Control, 34(5 Suppl 1): S20-28; discussion S64-73.

[11] Queenan AM, Bush K. (2007) Carbapenemases: the versatile β-lactamases. Clin Microbiol Rev, 20(3): 440-458, table of contents.

[12] Nordmann P, Poirel L. (2002) Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. Clin Microbiol Infect, 8(6): 321-331.

[13] Hirsch EB, Tam VH. (2010) Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. J Antimicrob Chemother, 65(6): 1119-1125.

[14] Tóth Á, Damjanova I, Puskás E, Jánvári L, Farkas M, Dobák A, Böröcz K, Pászti J. (2010) Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone in Hungary. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 29(7): 765-769.

[15] Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picão RC, Gales AC. (2010) Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. Expert Rev Anti-Infect Ther, 8(1): 71-93.

[16] Ramirez MS, Tolmasky ME. (2010) Aminoglycoside modifying enzymes. Drug Resist Updat, 13(6): 151-171.

[17] Jacoby GA. (2005) Mechanisms of resistance to quinolones. Clin Infect Dis, 41 Suppl 2: S120-126.

[18] Dunham SA, McPherson CJ, Miller AA. (2010) The relative contribution of efflux and target gene mutations to fluoroquinolone resistance in recent clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 29(3): 279-288.

[19] Han JH, Nachamkin I, Tolomeo P, Mao X, Bilker WB, Lautenbach E. (2012) Risk factors for efflux pump overexpression in fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli*. J Infect Dis, 206(10): 1597-1603.

[20] Jacoby GA, Strahilevitz J, Hooper DC. (2014) Plasmid-mediated quinolone resistance. Microbiol Spectr, 2(5).

[21] Aschbacher R, Doumith M, Livermore DM, Larcher C, Woodford N. (2008) Linkage of acquired quinolone resistance (*qnrS1*) and metallo-β-lactamase ($bla_{\text{VIM-1}}$) genes in multiple species of *Enterobacteriaceae* from Bolzano, Italy. J Antimicrob Chemother, 61(3): 515-523.

[22] Szabó D, Kocsis B, Rókusz L, Szentandrássy J, Katona K, Kristóf K, Nagy K. (2008) First detection of plasmid-mediated, quinolone resistance determinants *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* and *aac(6')-Ib-cr* in extended-spectrum β-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in Budapest, Hungary. J Antimicrob Chemother, 62(3): 630-632.

[23] Jacoby G, Cattoir V, Hooper D, Martínez-Martínez L, Nordmann P, Pascual A, Poirel L, Wang M. (2008) *qnr* gene nomenclature. Antimicrob Agents Chemother, 52(7): 2297-2299.

[24] Vetting MW, Park CH, Hegde SS, Jacoby GA, Hooper DC, Blanchard JS. (2008) Mechanistic and structural analysis of aminoglycoside *N*-acetyltransferase AAC(6')-Ib

and its bifunctional, fluoroquinolone-active AAC(6')-Ib-cr variant. Biochemistry, 47(37): 9825-9835.

[25] Kim HB, Wang M, Park CH, Kim EC, Jacoby GA, Hooper DC. (2009) *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. Antimicrob Agents Chemother, 53(8): 3582-3584.

[26] Ainsworth GC, Brown AM, Brownlee G. (1947) Aerosporin, an antibiotic produced by *Bacillus aerosporus* Greer. Nature, 159(4060): 263.

[27] Brownlee G, Bushby SR, Short EI. (1949) Comparative biological studies of polymyxin A and polymyxin D. Ann N Y Acad Sci, 51(Art. 5): 891-896.

[28] Shoji J, Kato T, Hinoo H. (1977) The structure of polymyxin S_1 (Studies on antibiotics from the genus *Bacillus*. XXI). J Antibiot (Tokyo), 30(12): 1035-1041.

[29] Shoji J, Kato T, Hinoo H. (1977) The structure of polymyxin T_1 (Studies on antibiotics from the genus *Bacillus*. XXII). J Antibiot (Tokyo), 30(12): 1042-1048.

[30] Trakhanova MN, Zinchenko AA, Bairamashvili DI, Makarova RA, Samoilova LN, Miroshnikov AI. (1988) [Structural and functional investigation of polymyxins. Isolation and properties of individual components of polymyxin M]. Antibiot Khimioter, 33(4): 262-266.

[31] Storm DR, Rosenthal KS, Swanson PE. (1977) Polymyxin and related peptide antibiotics. Annu Rev Biochem, 46: 723-763.

[32] Ito-Kagawa M, Koyama Y. (1980) Selective cleavage of a peptide antibiotic, colistin by colistinase. J Antibiot (Tokyo), 33(12): 1551-1555.

[33] Van Bambeke F, Lambert DM, Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM. Cyclic polypeptides (polymyxins/colistins). In: Cohen J, Powderly WG (szerk.) Infectious Diseases. Mosby-Elsevier, Edinburgh, 2004: 1730.

[34] Kleinkauf H, Gevers W. (1969) Nonribosomal polypeptide synthesis: the biosynthesis of a cyclic peptide antibiotic, gramicidin S. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 34: 805-813.

[35] Kleinkauf H, Von Döhren H. (1996) A nonribosomal system of peptide biosynthesis. Eur J Biochem, 236(2): 335-351.

[36] Komura S, Kurahashi K. (1980) Biosynthesis of polymyxin E. III. Total synthesis of polymyxin E by a cell-free enzyme system. Biochem Biophys Res Commun, 95(3): 1145-1151.

[37] Choi SK, Park SY, Kim R, Kim SB, Lee CH, Kim JF, Park SH. (2009) Identification of a polymyxin synthetase gene cluster of *Paenibacillus polymyxa* and heterologous expression of the gene in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 191(10): 3350-3358.

[38] Jawetz E, Coleman VR. (1949) Laboratory and clinical observations on aerosporin (polymyxin B). J Lab Clin Med, 34(6): 751-760.

[39] Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J. (2008) Polymyxins revisited. Clin Microbiol Rev, 21(3): 449-465.

[40] Vaara M. (2010) Polymyxins and their novel derivatives. Curr Opin Microbiol, 13(5): 574-581.

[41] Kalász H, Horváth C. (1981) Preparative-scale separation of polymyxins with an analytical high-performance liquid chromatography system by using displacement chromatography. J Chromatogr A, 215(0): 295-302.

[42] Orwa JA, Govaerts C, Busson R, Roets E, Van Schepdael A, Hoogmartens J. (2001) Isolation and structural characterization of colistin components. J Antibiot (Tokyo), 54(7): 595-599.

[43] Orwa JA, Govaerts C, Busson R, Roets E, Van Schepdael A, Hoogmartens J. (2001) Isolation and structural characterization of polymyxin B components. J Chromatogr A, 912(2): 369-373.

[44] Silaev AB, Trifonova ZP, Maevskaya SN, Vasil'eva NM, Katrukha GS. (1975) The structure of the antibiotic polymyxin M. Chem Nat Compd, 9(2): 278-279.

[45] Martin NI, Hu H, Moake MM, Churey JJ, Whittal R, Worobo RW, Vederas JC. (2003) Isolation, structural characterization, and properties of mattacin (polymyxin M), a cyclic peptide antibiotic produced by *Paenibacillus kobensis* M. J Biol Chem, 278(15): 13124-13132.

[46] Ikai Y, Oka H, Hayakawa J, Kawamura N, Mayumi T, Suzuki M, Harada K. (1998) Total structures of colistin minor components. J Antibiot (Tokyo), 51(5): 492-498.

[47] Hayashi K, Suketa Y, Tsukamoto K, Suzuki T. (1966) Chemical structure of polymyxin D_1. Experientia, 22(6): 354-355.

[48] Falagas ME, Kasiakou SK. (2005) Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. Clin Infect Dis, 40(9): 1333-1341.

[49] Newton BA. (1956) The properties and mode of action of the polymyxins. Bacteriol Rev, 20(1): 14-27.

[50] Groisman EA, Kayser J, Soncini FC. (1997) Regulation of polymyxin resistance and adaptation to low-Mg^{2+} environments. J Bacteriol, 179(22): 7040-7045.

[51] Rifkind D. (1967) Prevention by polymyxin B of endotoxin lethality in mice. J Bacteriol, 93(4): 1463-1464.

[52] Bannatyne RM, Harnett NM, Lee KY, Biggar WD. (1977) Inhibition of the biologic effects of endotoxin on neutrophils by polymyxin B sulfate. J Infect Dis, 136(4): 469-474.

[53] Warren HS, Kania SA, Siber GR. (1985) Binding and neutralization of bacterial lipopolysaccharide by colistin nonapeptide. Antimicrob Agents Chemother, 28(1): 107-112.

[54] Tsuzuki H, Tani T, Ueyama H, Kodama M. (2001) Lipopolysaccharide: neutralization by polymyxin B shuts down the signaling pathway of nuclear factor κB in peripheral blood mononuclear cells, even during activation. J Surg Res, 100(1): 127-134.

[55] Kucers A, Crowe S, Grayson ML, Hoy J. Polymyxins. In: Kucers A, Crowe S, Grayson ML, Hoy J (szerk.) The Use of Antibiotics. Butterworth-Heinemann, Oxford, 1997: 667–675.

[56] Li J, Nation RL, Milne RW, Turnidge JD, Coulthard K. (2005) Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. Int J Antimicrob Agents, 25(1): 11-25.

[57] Schwartz BS, Warren MR, Barkley FA, Landis L. (1959) Microbiological and pharmacological studies of colistin sulfate and sodium colistinmethanesulfonate. Antibiot Annu, 7: 41-60.

[58] Barnett M, Bushby SR, Wilkinson S. (1964) Sodium sulphomethyl derivatives of polymyxins. Br J Pharmacol Chemother, 23: 552-574.

[59] Li J, Milne RW, Nation RL, Turnidge JD, Coulthard K. (2003) Stability of colistin and colistin methanesulfonate in aqueous media and plasma as determined by high-performance liquid chromatography. Antimicrob Agents Chemother, 47(4): 1364-1370.

[60] Zavascki AP, Goldani LZ, Li J, Nation RL. (2007) Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. J Antimicrob Chemother, 60(6): 1206-1215.

[61] Mitaka C, Tomita M. (2011) Polymyxin B-immobilized fiber column hemoperfusion therapy for septic shock. Shock, 36(4): 332-338.

[62] Shimokawa K, Takakuwa R, Taya K, Wada Y, Yamazaki N, Murata M, Hirata K, Masuno T, Yokota H, Ishii F. (2012) Adsorption of various antimicrobial agents to endotoxin removal polymyxin-B immobilized fiber (Toraymyxin®). Colloids Surf B Biointerfaces, 90: 58-61.

[63] Brownlee G, Short EI. (1948) Antagonism by amino-acids of renal tubule damaging substances present in aerosporin preparations. Biochem J, 42(4): liii.

[64] Short EI. (1952) Mechanism of methionine protection against the nephrotoxicity of polymyxin A. Br J Pharmacol Chemother, 7(2): 248-254.

[65] Hoeprich PD. (1970) The polymyxins. Med Clin North Am, 54(5): 1257-1265.

[66] Zavascki AP, Goldani LZ, Cao G, Superti SV, Lutz L, Barth AL, Ramos F, Boniatti MM, Nation RL, Li J. (2008) Pharmacokinetics of intravenous polymyxin B in critically ill patients. Clin Infect Dis, 47(10): 1298-1304.

[67] Koch-Weser J, Sidel VW, Federman EB, Kanarek P, Finer DC, Eaton AE. (1970) Adverse effects of sodium colistimethate. Manifestations and specific reaction rates during 317 courses of therapy. Ann Intern Med, 72(6): 857-868.

[68] Singh YN, Marshall IG, Harvey AL. (1982) Pre- and postjunctional blocking effects of aminoglycoside, polymyxin, tetracycline and lincosamide antibiotics. Br J Anaesth, 54(12): 1295-1306.

[69] Falagas ME, Kasiakou SK. (2006) Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. Crit Care, 10(1): R27.

[70] Inoue A, Shoji A. (1995) Allergic contact dermatitis from colistin. Contact Dermatitis, 33(3): 200.

[71] Michalopoulos A, Papadakis E. (2010) Inhaled anti-infective agents: emphasis on colistin. Infection, 38(2): 81-88.

[72] de Gouw NE, Crul JF, Vandermeersch E, Mulier JP, van Egmond J, Van Aken H. (1993) Interaction of antibiotics on pipecuronium-induced neuromuscular blockade. J Clin Anesth, 5(3): 212-215.

[73] Kristensen HK, Hansen SH. (1993) Separation of polymxins by micellar electrokinetic capillary chromatography. J Chromatogr A, 628(2): 309-315.

[74] Li J, Milne RW, Nation RL, Turnidge JD, Smeaton TC, Coulthard K. (2003) Use of high-performance liquid chromatography to study the pharmacokinetics of colistin sulfate in rats following intravenous administration. Antimicrob Agents Chemother, 47(5): 1766-1770.

[75] Ma Z, Wang J, Gerber JP, Milne RW. (2008) Determination of colistin in human plasma, urine and other biological samples using LC-MS/MS. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 862(1-2): 205-212.

[76] Decolin D, Leroy P, Nicolas A, Archimbault P. (1997) Hyphenated liquid chromatographic method for the determination of colistin residues in bovine tissues. J Chromatogr Sci, 35(12): 557-564.

[77] Le Brun PP, de Graaf AI, Vinks AA. (2000) High-performance liquid chromatographic method for the determination of colistin in serum. Ther Drug Monit, 22(5): 589-593.

[78] Jiménez-Mejías ME, Pichardo-Guerrero C, Márquez-Rivas FJ, Martín-Lozano D, Prados T, Pachón J. (2002) Cerebrospinal fluid penetration and

pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters of intravenously administered colistin in a case of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* meningitis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 21(3): 212-214.

[79] Markantonis SL, Markou N, Fousteri M, Sakellaridis N, Karatzas S, Alamanos I, Dimopoulou E, Baltopoulos G. (2009) Penetration of colistin into cerebrospinal fluid. Antimicrob Agents Chemother, 53(11): 4907-4910.

[80] Khawcharoenporn T, Apisarnthanarak A, Mundy LM. (2010) Intrathecal colistin for drug-resistant *Acinetobacter baumannii* central nervous system infection: a case series and systematic review. Clin Microbiol Infect, 16(7): 888-894.

[81] Yahav D, Farbman L, Leibovici L, Paul M. (2012) Colistin: new lessons on an old antibiotic. Clin Microbiol Infect, 18(1): 18-29.

[82] Falagas ME, Kasiakou SK. (2006) Use of international units when dosing colistin will help decrease confusion related to various formulations of the drug around the world. Antimicrob Agents Chemother, 50(6): 2274-2275.

[83] Li J, Nation RL, Turnidge JD. (2006) Defining the dosage units for colistin methanesulfonate: urgent need for international harmonization. Antimicrob Agents Chemother, 50(12): 4231; author reply 4231-4232.

[84] Falagas ME, Siempos II, Rafailidis PI, Korbila IP, Ioannidou E, Michalopoulos A. (2009) Inhaled colistin as monotherapy for multidrug-resistant Gram (−) nosocomial pneumonia: A case series. Respir Med, 103(5): 707-713.

[85] Gupta S, Govil D, Kakar PN, Prakash O, Arora D, Das S, Govil P, Malhotra A. (2009) Colistin and polymyxin B: a re-emergence. Indian J Crit Care Med, 13(2): 49-53.

[86] Mehta RT. (1996) Liposome encapsulation of clofazimine reduces toxicity *in vitro* and *in vivo* and improves therapeutic efficacy in the beige mouse model of disseminated *Mycobacterium avium-M. intracellulare* complex infection. Antimicrob Agents Chemother, 40(8): 1893-1902.

[87] Takemoto K, Yamamoto Y, Ueda Y, Sumita Y, Yoshida K, Niki Y. (2004) Comparative studies on the efficacy of AmBisome and Fungizone in a mouse model of disseminated aspergillosis. J Antimicrob Chemother, 53(2): 311-317.

[88] Anderson M, Omri A. (2004) The effect of different lipid components on the *in vitro* stability and release kinetics of liposome formulations. Drug Deliv, 11(1): 33-39.

[89] Alipour M, Halwani M, Omri A, Suntres ZE. (2008) Antimicrobial effectiveness of liposomal polymyxin B against resistant Gram-negative bacterial strains. Int J Pharm, 355(1-2): 293-298.

[90] Wang D, Kong L, Wang J, He X, Li X, Xiao Y. (2009) Polymyxin E sulfate-loaded liposome for intravenous use: preparation, lyophilization, and toxicity assessment in vivo. PDA J Pharm Sci Technol, 63(2): 159-167.

[91] Kunin CM, Bugg A. (1971) Binding of polymyxin antibiotics to tissues: the major determinant of distribution and persistence in the body. J Infect Dis, 124(4): 394-400.

[92] Craig WA, Kunin CM. (1976) Significance of serum protein and tissue binding of antimicrobial agents. Annu Rev Med, 27: 287-300.

[93] Li J, Milne RW, Nation RL, Turnidge JD, Smeaton TC, Coulthard K. (2004) Pharmacokinetics of colistin methanesulphonate and colistin in rats following an intravenous dose of colistin methanesulphonate. J Antimicrob Chemother, 53(5): 837-840.

[94] Couet W, Grégoire N, Gobin P, Saulnier PJ, Frasca D, Marchand S, Mimoz O. (2011) Pharmacokinetics of colistin and colistimethate sodium after a single 80-mg intravenous dose of CMS in young healthy volunteers. Clin Pharmacol Ther, 89(6): 875-879.

[95] Ma Z, Wang J, Nation RL, Li J, Turnidge JD, Coulthard K, Milne RW. (2009) Renal disposition of colistin in the isolated perfused rat kidney. Antimicrob Agents Chemother, 53(7): 2857-2864.

[96] Viljanen P, Vaara M. (1984) Susceptibility of Gram-negative bacteria to polymyxin B nonapeptide. Antimicrob Agents Chemother, 25(6): 701-705.

[97] Thomas FE, Jr., Leonard JM, Alford RH. (1976) Sulfamethoxazole-trimethoprim-polymyxin therapy of serious multiply drug-resistant *Serratia* infections. Antimicrob Agents Chemother, 9(2): 201-207.

[98] Ostenson RC, Fields BT, Nolan CM. (1977) Polymyxin B and rifampin: new regimen for multiresistant *Serratia marcescens* infections. Antimicrob Agents Chemother, 12(6): 655-659.

[99] Elemam A, Rahimian J, Doymaz M. (2010) *In vitro* evaluation of antibiotic synergy for polymyxin B-resistant carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. J Clin Microbiol, 48(10): 3558-3562.

[100] Tascini C, Tagliaferri E, Giani T, Leonildi A, Flammini S, Casini B, Lewis R, Ferranti S, Rossolini GM, Menichetti F. (2013) Synergistic Activity of Colistin plus Rifampin against Colistin-Resistant KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother, 57(8): 3990-3993.

[101] Gaibani P, Lombardo D, Lewis RE, Mercuri M, Bonora S, Landini MP, Ambretti S. (2014) *In vitro* activity and post-antibiotic effects of colistin in combination with other antimicrobials against colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates. J Antimicrob Chemother, 69(7): 1856-1865.

[102] Pournaras S, Vrioni G, Neou E, Dendrinos J, Dimitroulia E, Poulou A, Tsakris A. (2011) Activity of tigecycline alone and in combination with colistin and meropenem against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Enterobacteriaceae* strains by time-kill assay. Int J Antimicrob Agents, 37(3): 244-247.

[103] Betts JW, Phee LM, Hornsey M, Woodford N, Wareham DW. (2014) *In Vitro* and *In Vivo* Activities of Tigecycline-Colistin Combination Therapies against Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. Antimicrob Agents Chemother, 58(6): 3541-3546.

[104] Humphries RM, Kelesidis T, Dien Bard J, Ward KW, Bhattacharya D, Lewinski MA. (2010) Successful treatment of pan-resistant *Klebsiella pneumoniae* pneumonia and bacteraemia with a combination of high-dose tigecycline and colistin. J Med Microbiol, 59(Pt 11): 1383-1386.

[105] Aoki N, Tateda K, Kikuchi Y, Kimura S, Miyazaki C, Ishii Y, Tanabe Y, Gejyo F, Yamaguchi K. (2009) Efficacy of colistin combination therapy in a mouse model of pneumonia caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother, 63(3): 534-542.

[106] Durante-Mangoni E, Signoriello G, Andini R, Mattei A, De Cristoforo M, Murino P, Bassetti M, Malacarne P, Petrosillo N, Galdieri N, Mocavero P, Corcione A, Viscoli C, Zarrilli R, Gallo C, Utili R. (2013) Colistin and Rifampicin Compared With Colistin Alone for the Treatment of Serious Infections Due to Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*: A Multicenter, Randomized Clinical Trial. Clin Infect Dis, 57(3): 349-358.

[107] Betts JW, Phee LM, Woodford N, Wareham DW. (2014) Activity of colistin in combination with tigecycline or rifampicin against multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 33(9): 1565-1572.

[108] Leclercq R, Cantón R, Brown DF, Giske CG, Heisig P, MacGowan AP, Mouton JW, Nordmann P, Rodloff AC, Rossolini GM, Soussy CJ, Steinbakk M, Winstanley TG, Kahlmeter G. (2013) EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. Clin Microbiol Infect, 19(2): 141-160.

[109] Chihara S, Ito A, Yahata M. (1974) Chemical synthesis and characterization of *N*-fatty acyl mono-aminoacyl derivatives of colistin nonapeptide. Agric Biol Chem, 38(10): 1767-1777.

[110] Chihara S, Ito A, Yahata M. (1974) Chemical synthesis, isolation and characterization of α-*N*-fatty acyl colistin nonapeptide with special reference to the correlation between antimicrobial activity and carbon number of fatty acyl moiety. Agric Biol Chem, 38(3): 521-529.

[111] Vaara M, Vaara T. (1983) Polycations sensitize enteric bacteria to antibiotics. Antimicrob Agents Chemother, 24(1): 107-113.

[112] Danner RL, Joiner KA, Rubin M, Patterson WH, Johnson N, Ayers KM, Parrillo JE. (1989) Purification, toxicity, and antiendotoxin activity of polymyxin B nonapeptide. Antimicrob Agents Chemother, 33(9): 1428-1434.

[113] Okimura K, Ohki K, Sato Y, Ohnishi K, Uchida Y, Sakura N. (2007) Chemical conversion of natural polymyxin B and colistin to their N-terminal derivatives. Bull Chem Soc Jpn, 80(3): 543-552.

[114] Okimura K, Ohki K, Sato Y, Ohnishi K, Sakura N. (2007) Semi-synthesis of polymyxin B (2-10) and colistin (2-10) analogs employing the Trichloroethoxycarbonyl (Troc) group for side chain protection of α,γ-diaminobutyric acid residues. Chem Pharm Bull (Tokyo), 55(12): 1724-1730.

[115] Vaara M, Vaara T. (2010) Structure-activity studies on novel polymyxin derivatives that carry only three positive charges. Peptides, 31(12): 2318-2321.

[116] Vaara M, Fox J, Loidl G, Siikanen O, Apajalahti J, Hansen F, Frimodt-Møller N, Nagai J, Takano M, Vaara T. (2008) Novel polymyxin derivatives carrying only three positive charges are effective antibacterial agents. Antimicrob Agents Chemother, 52(9): 3229-3236.

[117] Vaara M, Siikanen O, Apajalahti J, Fox J, Frimodt-Møller N, He H, Poudyal A, Li J, Nation RL, Vaara T. (2010) A novel polymyxin derivative that lacks the fatty acid tail and carries only three positive charges has strong synergism with agents excluded by the intact outer membrane. Antimicrob Agents Chemother, 54(8): 3341-3346.

[118] Vaara M, Siikanen O, Apajalahti J, Frimodt-Møller N, Vaara T. (2010) Susceptibility of carbapenemase-producing strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* to the direct antibacterial activity of NAB739 and to the synergistic activity of NAB7061 with rifampicin and clarithromycin. J Antimicrob Chemother, 65(5): 942-945.

[119] Katsuma N, Sato Y, Ohki K, Okimura K, Ohnishi K, Sakura N. (2009) Development of des-fatty acyl-polymyxin B decapeptide analogs with *Pseudomonas aeruginosa*-specific antimicrobial activity. Chem Pharm Bull (Tokyo), 57(4): 332-336.

[120] Sato Y, Shindo M, Sakura N, Uchida Y, Kato I. (2011) Novel des-fatty acyl-polymyxin B derivatives with *Pseudomonas aeruginosa*-specific antimicrobial activity. Chem Pharm Bull (Tokyo), 59(5): 597-602.

[121] Hancock REW. (1997) Antibacterial peptides and the outer membranes of Gram-negative bacilli. J Med Microbiol, 46(1): 1-3.

[122] Bechinger B. (1997) Structure and functions of channel-forming peptides: magainins, cecropins, melittin and alamethicin. J Membr Biol, 156(3): 197-211.

[123] Hancock REW, Lehrer R. (1998) Cationic peptides: a new source of antibiotics. Trends Biotechnol, 16(2): 82-88.

[124] Perron GG, Zasloff M, Bell G. (2006) Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide. Proc Biol Sci, 273(1583): 251-256.

[125] Conlon JM, Sonnevend A, Pal T, Vila-Farres X. (2012) Efficacy of six frog skin-derived antimicrobial peptides against colistin-resistant strains of the *Acinetobacter baumannii* group. Int J Antimicrob Agents, 39(4): 317-320.

[126] Urban C, Tiruvury H, Mariano N, Colon-Urban R, Rahal JJ. (2011) Polymyxin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother, 55(1): 388-389.

[127] Marchaim D, Chopra T, Pogue JM, Perez F, Hujer AM, Rudin S, Endimiani A, Navon-Venezia S, Hothi J, Slim J, Blunden C, Shango M, Lephart PR, Salimnia H, Reid D, Moshos J, Hafeez W, Bheemreddy S, Chen TY, Dhar S, Bonomo RA, Kaye KS. (2011) Outbreak of colistin-resistant, carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in metropolitan Detroit, Michigan. Antimicrob Agents Chemother, 55(2): 593-599.

[128] Kontopidou F, Plachouras D, Papadomichelakis E, Koukos G, Galani I, Poulakou G, Dimopoulos G, Antoniadou A, Armaganidis A, Giamarellou H. (2011) Colonization and infection by colistin-resistant Gram-negative bacteria in a cohort of critically ill patients. Clin Microbiol Infect, 17(11): E9-E11.

[129] Chen SD, Hu FP, Zhang XL, Xu XG, Liu Y, Zhu DM, Wang HH. (2011) Independent emergence of colistin-resistant *Enterobacteriaceae* clinical isolates without colistin treatment. J Clin Microbiol, 49(11): 4022-4023.

[130] Cai Y, Chai D, Wang R, Liang B, Bai N. (2012) Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. J Antimicrob Chemother, 67(7): 1607-1615.

[131] Sud IJ, Feingold DS. (1970) Mechanism of polymyxin B resistance in *Proteus mirabilis*. J Bacteriol, 104(1): 289-294.

[132] Kline T, Trent MS, Stead CM, Lee MS, Sousa MC, Felise HB, Nguyen HV, Miller SI. (2008) Synthesis of and evaluation of lipid A modification by 4-substituted 4-deoxy arabinose analogs as potential inhibitors of bacterial polymyxin resistance. Bioorg Med Chem Lett, 18(4): 1507-1510.

[133] Trent MS, Ribeiro AA, Lin S, Cotter RJ, Raetz CR. (2001) An inner membrane enzyme in *Salmonella* and *Escherichia coli* that transfers 4-amino-4-deoxy-L-arabinose to lipid A: induction on polymyxin-resistant mutants and role of a novel lipid-linked donor. J Biol Chem, 276(46): 43122-43131.

[134] Reeves PR, Hobbs M, Valvano MA, Skurnik M, Whitfield C, Coplin D, Kido N, Klena J, Maskell D, Raetz CR, Rick PD. (1996) Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. Trends Microbiol, 4(12): 495-503.

[135] Gunn JS, Miller SI. (1996) PhoP-PhoQ activates transcription of *pmrAB*, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella* Typhimurium antimicrobial peptide resistance. J Bacteriol, 178(23): 6857-6864.

[136] Breazeale SD, Ribeiro AA, McClerren AL, Raetz CR. (2005) A formyltransferase required for polymyxin resistance in *Escherichia coli* and the modification of lipid A with 4-amino-4-deoxy-L-arabinose. Identification and function of UDP-4-deoxy-4-formamido-L-arabinose. J Biol Chem, 280(14): 14154-14167.

[137] Gatzeva-Topalova PZ, May AP, Sousa MC. (2005) Crystal structure and mechanism of the *Escherichia coli* ArnA (PmrI) transformylase domain. An enzyme for lipid A modification with 4-amino-4-deoxy-L-arabinose and polymyxin resistance. Biochemistry, 44(14): 5328-5338.

[138] Gatzeva-Topalova PZ, May AP, Sousa MC. (2005) Structure and mechanism of ArnA: conformational change implies ordered dehydrogenase mechanism in key enzyme for polymyxin resistance. Structure, 13(6): 929-942.

[139] Yan A, Guan Z, Raetz CR. (2007) An undecaprenyl phosphate-aminoarabinose flippase required for polymyxin resistance in *Escherichia coli*. J Biol Chem, 282(49): 36077-36089.

[140] Falagas ME, Rafailidis PI, Matthaiou DK. (2010) Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. Drug Resist Updat, 13(4-5): 132-138.

[141] Mackinnon FG, Cox AD, Plested JS, Tang CM, Makepeace K, Coull PA, Wright JC, Chalmers R, Hood DW, Richards JC, Moxon ER. (2002) Identification of a gene (*lpt-3*) required for the addition of phosphoethanolamine to the lipopolysaccharide inner core of *Neisseria meningitidis* and its role in mediating susceptibility to bactericidal killing and opsonophagocytosis. Mol Microbiol, 43(4): 931-943.

[142] Lee H, Hsu FF, Turk J, Groisman EA. (2004) The PmrA-regulated *pmrC* gene mediates phosphoethanolamine modification of lipid A and polymyxin resistance in *Salmonella enterica*. J Bacteriol, 186(13): 4124-4133.

[143] Tamayo R, Choudhury B, Septer A, Merighi M, Carlson R, Gunn JS. (2005) Identification of *cptA*, a PmrA-regulated locus required for phosphoethanolamine modification of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lipopolysaccharide core. J Bacteriol, 187(10): 3391-3399.

[144] Cannatelli A, D'Andrea MM, Giani T, Di Pilato V, Arena F, Ambretti S, Gaibani P, Rossolini GM. (2013) *In Vivo* Emergence of Colistin Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Producing KPC-Type Carbapenemases Mediated by Insertional Inactivation of the PhoQ/PhoP *mgrB* Regulator. Antimicrob Agents Chemother, 57(11): 5521-5526.

[145] Olaitan AO, Diene SM, Kempf M, Berrazeg M, Bakour S, Gupta SK, Thongmalayvong B, Akkhavong K, Somphavong S, Paboriboune P, Chaisiri K,

Komalamisra C, Adelowo OO, Fagade OE, Banjo OA, Oke AJ, Adler A, Assous MV, Morand S, Raoult D, Rolain JM. (2014) Worldwide emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from healthy humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to inactivation of the PhoP/PhoQ regulator *mgrB*: an epidemiological and molecular study. Int J Antimicrob Agents, 44(6): 500-507.

[146] Poirel L, Jayol A, Bontron S, Villegas MV, Özdamar M, Türkoglu S, Nordmann P. (2015) The *mgrB* gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother, 70(1): 75-80.

[147] Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J. (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(2): 161-168.

[148] Godbole G, Woodford N, Larkin L. (2015) First Detection of Plasmid-Mediated Colistin Resistance (*mcr-1* gene) in Food and Human Isolates in England and Wales, UK. Public Health England: Serial number 2015/2090.

[149] Perrin-Guyomard A, Bruneau M, Houée P, Deleurme K, Legrandois P, Poirier C, Soumet C, Sanders P. (2016) Prevalence of *mcr-1* in commensal *Escherichia coli* from French livestock, 2007 to 2014. Euro Surveill, 21(6).

[150] Poirel L, Kieffer N, Liassine N, Thanh D, Nordmann P. (2016) Plasmid-mediated carbapenem and colistin resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli*. Lancet Infect Dis, 16(3): 281-281.

[151] Falgenhauer L, Waezsada SE, Yao YC, Imirzalioglu C, Käsbohrer A, Roesler U, Michael GB, Schwarz S, Werner G, Kreienbrock L, Chakraborty T, Consortium R. (2016) Colistin resistance gene *mcr-1* in extended-spectrum β-lactamase-producing and carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Germany. Lancet Infect Dis, 16(3): 282-283.

[152] Malhotra-Kumar S, Xavier BB, Das AJ, Lammens C, Hoang HTT, Pham NT, Goossens H. (2016) Colistin-resistant *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* isolated from food animals in Hanoi, Vietnam. Lancet Infect Dis, 16(3): 286-287.

[153] Kluytmans-van den Bergh MF, Huizinga P, Bonten MJ, Bos M, De Bruyne K, Friedrich AW, Rossen JW, Savelkoul PH, Kluytmans JA. (2016) Presence of *mcr-1*-positive *Enterobacteriaceae* in retail chicken meat but not in humans in the Netherlands since 2009. Euro Surveill, 21(9).

[154] Quesada A, Ugarte-Ruiz M, Iglesias MR, Porrero MC, Martínez R, Florez-Cuadrado D, Campos MJ, García M, Píriz S, Sáez JL, Domínguez L. (2016) Detection of plasmid mediated colistin resistance (MCR-1) in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine in Spain. Res Vet Sci, 105: 134-135.

[155] European Centre for Disease Prevention and Control. Plasmid-mediated colistin resistance in *Enterobacteriaceae*. Stockholm: ECDC; 2016.

[156] Hasman H, Hammerum AM, Hansen F, Hendriksen RS, Olesen B, Agersø Y, Zankari E, Leekitcharoenphon P, Stegger M, Kaas RS, Cavaco LM, Hansen DS, Aarestrup FM, Skov RL. (2015) Detection of *mcr-1* encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark 2015. Euro Surveill, 20(49).

[157] Malhotra-Kumar S, Xavier BB, Das AJ, Lammens C, Butaye P, Goossens H. (2016) Colistin resistance gene *mcr-1* harboured on a multidrug resistant plasmid. Lancet Infect Dis, 16(3): 283-284.

[158] Yao X, Doi YH, Zeng L, Lv LC, Liu JH. (2016) Carbapenem-resistant and colistin-resistant *Escherichia coli* co-producing NDM-9 and MCR-1. Lancet Infect Dis, 16(3): 288-289.

[159] Zurfluh K, Poirel L, Nordmann P, Nüesch-Inderbinen M, Hächler H, Stephan R. (2016) Occurrence of the Plasmid-Borne *mcr-1* Colistin Resistance Gene in Extended-Spectrum-β-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in River Water and Imported Vegetable Samples in Switzerland. Antimicrob Agents Chemother, 60(4): 2594-2595.

[160] Tse H, Yuen KY. (2016) Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. Lancet Infect Dis, 16(2): 145-146.

[161] Grami R, Mansour W, Mehri W, Bouallègue O, Boujaâfar N, Madec JY, Haenni M. (2016) Impact of food animal trade on the spread of *mcr-1*-mediated colistin resistance, Tunisia, July 2015. Euro Surveill, 21(8).

[162] Skov RL, Monnet DL. (2016) Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. Euro Surveill, 21(9).

[163] Xavier BB, Lammens C, Ruhal R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, Malhotra-Kumar S. (2016) Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. Euro Surveill, 21(27).

[164] Di Pilato V, Arena F, Tascini C, Cannatelli A, Henrici De Angelis L, Fortunato S, Giani T, Menichetti F, Rossolini GM. (2016) *mcr-1.2*, a New mcr Variant Carried on a Transferable Plasmid from a Colistin-Resistant KPC Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strain of Sequence Type 512. Antimicrob Agents Chemother, 60(9): 5612-5615.

[165] Lu X, Hu Y, Luo M, Zhou H, Wang X, Du Y, Li Z, Xu J, Zhu B, Xu X, Kan B. (2017) MCR-1.6, a New MCR Variant Carried by an IncP Plasmid in a Colistin-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Isolate from a Healthy Individual. Antimicrob Agents Chemother, 61(5).

[166] Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, Zhang R, Walsh TR, Shen J, Wang Y. (2017) Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. MBio, 8(3).

[167] McPhee JB, Lewenza S, Hancock REW. (2003) Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol, 50(1): 205-217.

[168] Gunn JS. (2008) The *Salmonella* PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. Trends Microbiol, 16(6): 284-290.

[169] Kato A, Latifi T, Groisman EA. (2003) Closing the loop: the PmrA/PmrB two-component system negatively controls expression of its posttranscriptional activator PmrD. Proc Natl Acad Sci U S A, 100(8): 4706-4711.

[170] Moskowitz SM, Ernst RK, Miller SI. (2004) PmrAB, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A. J Bacteriol, 186(2): 575-579.

[171] Fu W, Yang F, Kang X, Zhang X, Li Y, Xia B, Jin C. (2007) First structure of the polymyxin resistance proteins. Biochem Biophys Res Commun, 361(4): 1033-1037.

[172] Bader MW, Sanowar S, Daley ME, Schneider AR, Cho U, Xu W, Klevit RE, Le Moual H, Miller SI. (2005) Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase. Cell, 122(3): 461-472.

[173] Shprung T, Peleg A, Rosenfeld Y, Trieu-Cuot P, Shai Y. (2012) Effect of PhoP-PhoQ activation by broad repertoire of antimicrobial peptides on bacterial resistance. J Biol Chem, 287(7): 4544-4551.

[174] Gunn JS, Lim KB, Krueger J, Kim K, Guo L, Hackett M, Miller SI. (1998) PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. Mol Microbiol, 27(6): 1171-1182.

[175] Winfield MD, Groisman EA. (2004) Phenotypic differences between *Salmonella* and *Escherichia coli* resulting from the disparate regulation of homologous genes. Proc Natl Acad Sci U S A, 101(49): 17162-17167.

[176] Mitrophanov AY, Jewett MW, Hadley TJ, Groisman EA. (2008) Evolution and dynamics of regulatory architectures controlling polymyxin B resistance in enteric bacteria. PLoS Genet, 4(10): e1000233.

[177] Cheng HY, Chen YF, Peng HL. (2010) Molecular characterization of the PhoPQ-PmrD-PmrAB mediated pathway regulating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* CG43. J Biomed Sci, 17: 60.

[178] Schurek KN, Sampaio JLM, Kiffer CRV, Sinto S, Mendes CMF, Hancock REW. (2009) Involvement of *pmrAB* and *phoPQ* in polymyxin B adaptation and inducible resistance in non-cystic fibrosis clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother, 53(10): 4345-4351.

[179] Barrow K, Kwon DH. (2009) Alterations in two-component regulatory systems of *phoPQ* and *pmrAB* are associated with polymyxin B resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother, 53(12): 5150-5154.

[180] Fernández L, Gooderham WJ, Bains M, McPhee JB, Wiegand I, Hancock REW. (2010) Adaptive resistance to the "last hope" antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS. Antimicrob Agents Chemother, 54(8): 3372-3382.

[181] Fernández L, Jenssen H, Bains M, Wiegand I, Gooderham WJ, Hancock REW. (2012) The two-component system CprRS senses cationic peptides and triggers adaptive resistance in *Pseudomonas aeruginosa* independently of ParRS. Antimicrob Agents Chemother, 56(12): 6212-6222.

[182] Adams MD, Nickel GC, Bajaksouzian S, Lavender H, Murthy AR, Jacobs MR, Bonomo RA. (2009) Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system. Antimicrob Agents Chemother, 53(9): 3628-3634.

[183] Beceiro A, Llobet E, Aranda J, Bengoechea JA, Doumith M, Hornsey M, Dhanji H, Chart H, Bou G, Livermore DM, Woodford N. (2011) Phosphoethanolamine modification of lipid A in colistin-resistant variants of *Acinetobacter baumannii* mediated by the *pmrAB* two-component regulatory system. Antimicrob Agents Chemother, 55(7): 3370-3379.

[184] Park YK, Choi JY, Shin D, Ko KS. (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.

[185] Arroyo LA, Herrera CM, Fernández L, Hankins JV, Trent MS, Hancock REW. (2011) The *pmrCAB* operon mediates polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 and clinical isolates through phosphoethanolamine modification of lipid A. Antimicrob Agents Chemother, 55(8): 3743-3751.

[186] Rasheed JK, Anderson GJ, Yigit H, Queenan AM, Doménech-Sánchez A, Swenson JM, Biddle JW, Ferraro MJ, Jacoby GA, Tenover FC. (2000) Characterization of the extended-spectrum β-lactamase reference strain, *Klebsiella pneumoniae* K6 (ATCC 700603), which produces the novel enzyme SHV-18. Antimicrob Agents Chemother, 44(9): 2382-2388.

[187] Krogstad DJ, Moellering RC. Antimicrobial Combinations. In: Lorian V (szerk.) Antibiotics in Laboratory Medicine. Williams & Wilkins, Baltimore, 1986: 537-595.

[188] Campos MA, Vargas MA, Regueiro V, Llompart CM, Albertí S, Bengoechea JA. (2004) Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. Infect Immun, 72(12): 7107-7114.

[189] Cannatelli A, Giani T, D'Andrea MM, Di Pilato V, Arena F, Conte V, Tryfinopoulou K, Vatopoulos A, Rossolini GM. (2014) MgrB Inactivation Is a Common Mechanism of Colistin Resistance in KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* of Clinical Origin. Antimicrob Agents Chemother, 58(10): 5696-5703.

[190] Bialek-Davenet S, Marcon E, Leflon-Guibout V, Lavigne JP, Bert F, Moreau R, Nicolas-Chanoine MH. (2011) *In vitro* selection of *ramR* and *soxR* mutants overexpressing efflux systems by fluoroquinolones as well as cefoxitin in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother, 55(6): 2795-2802.

[191] Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. (2009) Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. J Antimicrob Chemother, 63(4): 659-667.

[192] Ruzin A, Immermann FW, Bradford PA. (2008) Real-time PCR and statistical analyses of *acrAB* and *ramA* expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother, 52(9): 3430-3432.

[193] Baik SC, Kim KM, Song SM, Kim DS, Jun JS, Lee SG, Song JY, Park JU, Kang HL, Lee WK, Cho MJ, Youn HS, Ko GH, Rhee KH. (2004) Proteomic analysis of the sarcosine-insoluble outer membrane fraction of *Helicobacter pylori* strain 26695. J Bacteriol, 186(4): 949-955.

[194] Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. (2006) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. Nat Protoc, 1(6): 2856-2860.

[195] Markó L, Szigeti N, Szabó Z, Böddi K, Takátsy A, Ludány A, Kõszegi T, Molnár GA, Wittmann I. (2010) Potential urinary biomarkers of disease activity in Crohn's disease. Scand J Gastroenterol, 45(12): 1440-1448.

[196] Böddi K, Takátsy A, Szabó S, Markó L, Márk L, Wittmann I, Ohmacht R, Montskó G, Vallant RM, Ringer T, Bakry R, Huck CW, Bonn GK, Szabó Z. (2009) Use of fullerene-, octadecyl-, and triaconthyl silica for solid phase extraction of tryptic peptides obtained from unmodified and *in vitro* glycated human serum albumin and fibrinogen. J Sep Sci, 32(2): 295-308.

[197] Qureshi ZA, Paterson DL, Potoski BA, Kilayko MC, Sandovsky G, Sordillo E, Polsky B, Adams-Haduch JM, Doi Y. (2012) Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens. Antimicrob Agents Chemother, 56(4): 2108-2113.

[198] Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, Trecarichi EM, Tumietto F, Marchese A, Spanu T, Ambretti S, Ginocchio F, Cristini F, Losito AR, Tedeschi S, Cauda R, Bassetti M. (2012) Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. Clin Infect Dis, 55(7): 943-950.

[199] Gilbert DN, Chambers HF, Eliopoulos GM, Saag MS (szerk.) The Sanford Guide To Antimicrobial Therapy. Antimicrobial Therapy, Inc., Sperryville, 2015.

[200] Gomez E, Sanchez M, Gul Z, Urban C, Mariano N, Eng RH, Huang DB, Chiang T. (2011) Polymyxin Combination Therapy and the Use of Serum Bactericidal Titers in the Management of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Infections: A Report of 3 Cases. Case Report Med, 2011: 659769.

[201] Urban C, Mariano N, Rahal JJ. (2010) *In vitro* double and triple bactericidal activities of doripenem, polymyxin B, and rifampin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother, 54(6): 2732-2734.

[202] Pankey GA, Ashcraft DS. (2011) Detection of synergy using the combination of polymyxin B with either meropenem or rifampin against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. Diagn Microbiol Infect Dis, 70(4): 561-564.

[203] Jernigan MG, Press EG, Nguyen MH, Clancy CJ, Shields RK. (2012) The combination of doripenem and colistin is bactericidal and synergistic against colistin-resistant, carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother, 56(6): 3395-3398.

[204] Lee GC, Burgess DS. (2013) Polymyxins and Doripenem Combination Against KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. J Clin Med Res, 5(2): 97-100.

[205] Li J, Rayner CR, Nation RL, Owen RJ, Spelman D, Tan KE, Liolios L. (2006) Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother, 50(9): 2946-2950.

[206] Meletis G, Tzampaz E, Sianou E, Tzavaras I, Sofianou D. (2011) Colistin heteroresistance in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother, 66(4): 946-947.

[207] Jayol A, Nordmann P, Brink A, Poirel L. (2015) Heteroresistance to Colistin in *Klebsiella pneumoniae* Associated with Alterations in the PhoPQ Regulatory System. Antimicrob Agents Chemother, 59(5): 2780-2784.

[208] Napier BA, Burd EM, Satola SW, Cagle SM, Ray SM, McGann P, Pohl J, Lesho EP, Weiss DS. (2013) Clinical Use of Colistin Induces Cross-Resistance to Host Antimicrobials in *Acinetobacter baumannii*. MBio, 4(3).

[209] Napier BA, Band V, Burd EM, Weiss DS. (2014) Colistin Heteroresistance in *Enterobacter cloacae* Is Associated with Cross-Resistance to the Host Antimicrobial Lysozyme. Antimicrob Agents Chemother, 58(9): 5594-5597.

[210] Jayol A, Poirel L, Brink A, Villegas MV, Yilmaz M, Nordmann P. (2014) Resistance to Colistin Associated with a Single Amino Acid Change in Protein PmrB among *Klebsiella pneumoniae* Isolates of Worldwide Origin. Antimicrob Agents Chemother, 58(8): 4762-4766.

[211] Fernandes MR, Moura Q, Sartori L, Silva KC, Cunha MP, Esposito F, Lopes R, Otutumi LK, Gonçalves DD, Dropa M, Matté MH, Monte DF, Landgraf M, Francisco GR, Bueno MF, de Oliveira Garcia D, Knöbl T, Moreno AM, Lincopan N. (2016) Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. Euro Surveill, 21(17).

[212] Owusu-Anim D, Kwon DH. (2012) Differential Role of Two-Component Regulatory Systems (*phoPQ* and *pmrAB*) in Polymyxin B Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*. Adv Microbiol, 2(1).

[213] Lee JY, Ko KS. (2014) Mutations and expression of PmrAB and PhoPQ related with colistin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Diagn Microbiol Infect Dis, 78(3): 271-276.

[214] Kim SY, Choi HJ, Ko KS. (2014) Differential Expression of Two-Component Systems, *pmrAB* and *phoPQ*, with Different Growth phases of *Klebsiella pneumoniae* in the Presence or Absence of Colistin. Curr Microbiol, 69(1): 37-41.

[215] Zhao G, Ceci P, Ilari A, Giangiacomo L, Laue TM, Chiancone E, Chasteen ND. (2002) Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells. A ferritin-like DNA-binding protein of *Escherichia coli*. J Biol Chem, 277(31): 27689-27696.

[216] Karas VO, Westerlaken I, Meyer AS. (2015) The DNA-Binding Protein from Starved Cells (Dps) Utilizes Dual Functions To Defend Cells against Multiple Stresses. J Bacteriol, 197(19): 3206-3215.

[217] Yeats C, Bateman A. (2003) The BON domain: a putative membrane-binding domain. Trends Biochem Sci, 28(7): 352-355.

[218] Visweswaran GR, Leenhouts K, van Roosmalen M, Kok J, Buist G. (2014) Exploiting the peptidoglycan-binding motif, LysM, for medical and industrial applications. Appl Microbiol Biotechnol, 98(10): 4331-4345.

[219] Fernández-Reyes M, Rodríguez-Falcón M, Chiva C, Pachón J, Andreu D, Rivas L. (2009) The cost of resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii*: A proteomic perspective. Proteomics, 9(6): 1632-1645.

[220] Mezzatesta ML, Gona F, Caio C, Petrolito V, Sciortino D, Sciacca A, Santangelo C, Stefani S. (2011) Outbreak of KPC-3-producing, and colistin-resistant, *Klebsiella*

pneumoniae infections in two Sicilian hospitals. Clin Microbiol Infect, 17(9): 1444-1447.

[221] Giani T, Arena F, Vaggelli G, Conte V, Chiarelli A, Henrici De Angelis L, Fornaini R, Grazzini M, Niccolini F, Pecile P, Rossolini GM. (2015) Large Nosocomial Outbreak of Colistin-Resistant, Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Traced to Clonal Expansion of an *mgrB* Deletion Mutant. J Clin Microbiol, 53(10): 3341-3344.

[222] Weterings V, Zhou K, Rossen JW, van Stenis D, Thewessen E, Kluytmans J, Veenemans J. (2015) An outbreak of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the Netherlands (July to December 2013), with inter-institutional spread. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 34(8): 1647-1655.

[223] Yigit H, Anderson GJ, Biddle JW, Steward CD, Rasheed JK, Valera LL, McGowan JE, Jr., Tenover FC. (2002) Carbapenem resistance in a clinical isolate of *Enterobacter aerogenes* is associated with decreased expression of OmpF and OmpC porin analogs. Antimicrob Agents Chemother, 46(12): 3817-3822.

[224] Liu YF, Yan JJ, Lei HY, Teng CH, Wang MC, Tseng CC, Wu JJ. (2012) Loss of outer membrane protein C in *Escherichia coli* contributes to both antibiotic resistance and escaping antibody-dependent bactericidal activity. Infect Immun, 80(5): 1815-1822.

[225] Lin XM, Wu LN, Li H, Wang SY, Peng XX. (2008) Downregulation of Tsx and OmpW and upregulation of OmpX are required for iron homeostasis in *Escherichia coli*. J Proteome Res, 7(3): 1235-1243.

[226] Wang Y. (2002) The function of OmpA in *Escherichia coli*. Biochem Biophys Res Commun, 292(2): 396-401.

[227] Kim K, Kim KP, Choi J, Lim JA, Lee J, Hwang S, Ryu S. (2010) Outer membrane proteins A (OmpA) and X (OmpX) are essential for basolateral invasion of *Cronobacter sakazakii*. Appl Environ Microbiol, 76(15): 5188-5198.

[228] Llobet E, March C, Giménez P, Bengoechea JA. (2009) *Klebsiella pneumoniae* OmpA confers resistance to antimicrobial peptides. Antimicrob Agents Chemother, 53(1): 298-302.

[229] Stoorvogel J, van Bussel MJ, van de Klundert JA. (1991) Biological characterization of an *Enterobacter cloacae* outer membrane protein (OmpX). J Bacteriol, 173(1): 161-167.

[230] Gayet S, Chollet R, Molle G, Pagès JM, Chevalier J. (2003) Modification of outer membrane protein profile and evidence suggesting an active drug pump in *Enterobacter aerogenes* clinical strains. Antimicrob Agents Chemother, 47(5): 1555-1559.

[231] Dupont M, Dé E, Chollet R, Chevalier J, Pagès JM. (2004) *Enterobacter aerogenes* OmpX, a cation-selective channel mar- and osmo-regulated. FEBS Lett, 569(1-3): 27-30.

[232] Barbosa TM, Levy SB. (2000) Differential Expression of over 60 Chromosomal Genes in *Escherichia coli* by Constitutive Expression of MarA. J Bacteriol, 182(12): 3467-3474.

XI. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK

1. Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények

[1] **Kádár B**, Kocsis B, Tóth Á, Damjanova I, Szász M, Kristóf K, Nagy K, Szabó D. (2013) Synergistic antibiotic combinations for colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Acta Microbiol Immunol Hung, 60(2): 201-209., **IF: 0,780**

[2] **Kádár B**, Kocsis B, Kristóf K, Tóth Á, Szabó D. (2015) Effect of antimicrobial peptides on colistin-susceptible and colistin-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter asburiae*. Acta Microbiol Immunol Hung, 62(4): 501-508., **IF: 0,568**

[3] Kocsis B, **Kádár B**, Tóth Á, Fullár A, Szabó D. (2017) MgrB variants in colistin-susceptible and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST258. J Microbiol Immunol Infect, 50(5): 735-736., **IF: 2,973**

[4] **Kádár B**, Kocsis B, Tóth Á, Kristóf K, Felső P, Kocsis B, Böddi K, Szabó D. (2017) Colistin resistance associated with outer membrane protein change in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter asburiae*. Acta Microbiol Immunol Hung, 64(2): 217-227., **IF: 0,921***

2. Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények

[1] Somoskövi Á, Carlyn C, Dormandy J, **Kádár B**, Németh B, Bártfai Z, Saffinger M. (2009) Tumort utánzó mediastinalis terime húgyhólyagrákban szenvedő betegben *Mycobacterium bovis* Calmette-Guerin immunterápiát követően. Tüdőgyógyászat, 3(2): 18-21.

[2] Németh B, **Kádár B**, Dumitru D, Kádár L, Bártfai Z. (2009) Az életminőség vizsgálata asthma bronchiale-ban. Tüdőgyógyászat, 3(3): 3-9.

[3] **Kádár B**, Németh B, Fekete B, Agócs L, Elek J, Fillinger JA, Lantos Á, Bártfai Z. (2009) Műtéti úton eltávolított pulmonalis aspergilloma fiatal cachexiás betegben. Tüdőgyógyászat, 3(4): 24-30.

[4] **Kádár B**, Szász M, Kristóf K, Pesti N, Krizsán G, Szentandrássy J, Rókusz L, Nagy K, Szabó D. (2010) *In vitro* activity of clarithromycin in combination with other antimicrobial agents against biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* strains. Acta

Microbiol Immunol Hung, 57(3): 235-245., **IF: 0,625** (Kádár B és Szász M megosztott első szerzők)

[5] **Kádár B**, Kocsis B, Nagy K, Szabó D. (2013) The renaissance of polymyxins. Curr Med Chem, 20(30): 3759-3773., **IF: 3,715**

[6] Szabó BG, Lénárt KS, **Kádár B**, Gombos A, Dezsényi B, Szanka J, Bobek I, Prinz G. (2015) [Thousand faces of *Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus) infections]. Orv Hetil, 156(44): 1769-1777., **IF: 0,291**

[7] Szabó BG, **Kádár B**, Lénárt KS, Dezsényi B, Kunovszki P, Fried K, Kamotsay K, Nikolova R, Prinz G. (2016) Use of intravenous tigecycline in patients with severe *Clostridium difficile* infection: a retrospective observational cohort study. Clin Microbiol Infect, 22(12): 990-995., **IF: 5,292**

XII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom a kutatásaim során nyújtott töretlen támogatásért, iránymutatásért és segítségnyújtásért Dr. Kocsis Bélának és Dr. Szabó Dórának, a kísérletekben való segítségéért Dr. Szász Máténak, továbbá Dr. Kristóf Katalinnak, Dr. Tóth Ákosnak és Dr. Nagy Károly Professzor Úrnak. A külső membrán fehérje vizsgálatokban nyújtott segítségéért Böddi Katalinnak a Pécsi Tudományegyetem Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetéből.

XIII. PUBLIKÁCIÓK LENYOMATAI

Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 60 (2), pp. 201–209 (2013)
DOI: 10.1556/AMicr.60.2013.2.10

SYNERGISTIC ANTIBIOTIC COMBINATIONS FOR COLISTIN-RESISTANT *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

BÉLA KÁDÁR[1], BÉLA KOCSIS[1], ÁKOS TÓTH[2], IVELINA DAMJANOVA[2], MÁTÉ SZÁSZ[1], KATALIN KRISTÓF[3], KÁROLY NAGY[1] and DÓRA SZABÓ[1]*

[1]Institue of Medical Microbiology, Semmelweis University, Budapest, Hungary
[2]National Center for Epidemiology, Budapest, Hungary
[3]Institute of Laboratory Medicine, Diagnostic Laboratory of Clinical Microbiology, Semmelweis University, Budapest, Hungary

(Received: 20 March 2013; accepted: 13 April 2013)

In this study antibiotic combinations for multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains were investigated. The study included a colistin-susceptible and a colistin-resistant KPC-2 producing *K. pneumoniae* ST258 strains isolated in 2008 and 2009 during an outbreak in Hungary. Antibiotic combinations were analyzed by checkerboard technique and fractional inhibitory concentration indices were calculated. The following antibiotics were tested: ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone, ampicillin, imipenem, ertapenem, amikacin, tobramycin, ciprofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, rifampicin, polymyxin B and colistin. Combinations including 0.25 μg/ml colistin plus 1 μg/ml rifampicin, 0.25 μg/ml polymyxin B plus 1 μg/ml rifampicin, 1 μg/ml imipenem plus 2 μg/ml tobramycin, were found synergistic.

These *in vitro* synergistic combinations suggest potential therapeutical options against infections caused by KPC-2 producing, multidrug-resistant *K. pneumoniae* ST258.

Keywords: colistin, *Klebsiella pneumoniae,* multidrug-resistance, synergism

Introduction

Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates are being frequently identified in nosocomial infections and they represent a significant healthcare problem [1, 2]. Therapeutical options against the emerging multidrug-resistant Gram-negative pathogens are limited, and sometimes only the previously disre-

* Corresponding author; E-mail: szabdor@net.sote.hu

1217-8950/$20.00 © 2013 Akadémiai Kiadó, Budapest

garded polymyxins, including polymyxin B and polymyxin E (colistin), are the last resort antibiotics against them [3–5]. Nonetheless, the emergence of colistin-resistant *Enterobacteriaceae* strains, as reported in several countries, became a major healthcare problem, as well [6–10]. The polymyxin-resistance of Gram-negative bacteria is based on the modification of lipopolysaccharide (LPS), notably, the 4-amino-4-deoxy-L-arabinose and phosphoethanolamine addition to the LPS increases the net charge of lipid A, lowering the affinity to positively charged polymyxins [11, 12].

Treatment of multidrug-resistant, carbapenemase-producing, but colistin-susceptible *K. pneumoniae* infections is a great challenge. Therapeutical regimens involving antibiotic combinations were proved to be superior to monotherapy both *in vivo* and *in vitro* [13–15] . The main antibiotics administered against these *K. pneumoniae* strains are aminoglycosides, tigecycline, polymyxins, and even carbapenems can be effective in combination with the aforementioned agents [16]. However, treatment of multidrug-resistant and colistin-resistant *K. pneumoniae* is also challenging, and due to their relative novelty, we have few experiences in their therapy. *In vitro* data show that colistin combined with vancomycin, trimethoprim or trimethoprim-sulfamethoxazole is synergistic against colistin-resistant *K. pneumoniae* [17].

In an outbreak of KPC-2 producing *K. pneumoniae* ST258, the first colistin-resistant strains were detected in Hungary, although during the outbreak the healthcare institution did not involve polymyxins in the antibiotic treatment [18]. The aim of our study was to analyze the effectivity of different antibiotic combinations against colistin-resistant and colistin-susceptible multidrug-resistant *K. pneumoniae* strains.

Materials and Methods

Bacterial strains

The study included two KPC-2 producing *K. pneumoniae* ST258 strains, one of them is colistin-susceptible and the other is colistin-resistant, isolated in 2008 and 2009 during an outbreak in Hungary. The two strains were isolated from upper respiratory tract and wound infections [18].

Antibiotic susceptibility

The minimal inhibitory concentration (MIC) values of tested antibiotics were determined by microdilution method using Mueller-Hinton (MH) (Becton Dickinson) broth. The following agents were investigated: ceftazidime (Fresenius Kabi), cefotaxime (Sanofi Aventis), ceftriaxone (TEVA), ampicillin (Sandoz), imipenem (Fresenius Kabi), ertapenem (MSD), amikacin (Lisapharma S.p.A.), tobramycin (TEVA), ciprofloxacin (Fresenius Kabi), levofloxacin (TEVA), moxifloxacin (Bayer Pharma AG), rifampicin (Sigma-Aldrich), polymyxin B (Sigma-Aldrich) and colistin (Sigma-Aldrich). MIC values were interpreted according to EUCAST documents [19].

Checkerboard analysis

Antibiotic combinations were analyzed by checkerboard technique. In each combination, fractional inhibitory concentration indices (FICIs) were calculated from the lowest MIC values, after the following formula [20]:

$FICI_A = MIC_A(c) / MIC_A(a)$

$FICI_B = MIC_B(c) / MIC_B(a)$

$\Sigma FICI = FICI_A + FICI_B$

Subscripts A and B denote the antibiotics of the combinations, whereas parentheses (a) and (c) mean the activity measurements alone and in combination, respectively. The summation of both FICIs define the effects of antimicrobial agent combinations as synergistic ($\Sigma FICI \leq 0.5$), partially synergistic ($0.5 < \Sigma FICI < 1$), additive ($\Sigma FICI = 1$), indifferent ($1 < \Sigma FICI \leq 4$), or antagonistic ($\Sigma FICI > 4$) [20].

Results

The two investigated KPC-2 producing *K. pneumoniae* strains were resistant to aminoglycosides, 3rd generation cephalosporins, carbapenems, fluoroquinolones and rifampicin, as interpreted according to the latest EUCAST documents (Table I). The tested antibiotic combinations, and the calculated FICIs from the lowest MIC values are shown in Table II. In the antibiotic combinations, we took into consideration the peak serum concentrations during antibiotic treatment and the EUCAST clinical breakpoints [19, 21].

Table I

MIC-values, peak serum concentrations and EUCAST breakpoints of tested antibiotics

Antibiotics	MIC (μg/ml)		Peak serum concentrations (μg/ml) [21]	EUCAST breakpoints (μg/ml) [19]
	K. pneumoniae "11" colistin-susceptible	*K. pneumoniae* "12" colistin-resistant		
Ceftazidime	>256	>256	60	≤1
Cefotaxime	128	128	100	≤1
Ceftriaxone	256	256	150	≤1
Ertapenem	32	64	154	≤0.5
Imipenem	8	8	40	≤2
Amikacin	32	32	15–64	≤8
Tobramycin	32	32	4–24	≤2
Ciprofloxacin	128	128	1.8–4.6	≤0.5
Levofloxacin	64	64	5.7–8.6	≤1
Moxifloxacin	64	64	4.5	≤0.5
Polymyxin B	<0.125	128	1–8	not available
Colistin	<0.125	256	5–7.5	≤2
Rifampicin	>256	>256	4–32	not available

The two tested *K. pneumoniae* strains were detected as KPC-2 producers conferring resistance to carbapenems, although imipenem in 4 μg/ml concentration was found synergistic in combination with 1 μg/ml rifampicin, while 1 μg/ml imipenem was synergistic with 2 μg/ml tobramycin or with 2 μg/ml ciprofloxacin. The 16 μg/ml ciprofloxacin was synergistic with 2 μg/ml colistin and 1 μg/ml polymyxin B, although this ciprofloxacin level cannot be achieved in the serum. Rifampicin in 1 μg/ml concentration was found synergistic with 0.25 μg/ml colistin, or with 0.25 μg/ml polymyxin B, or with 4 μg/ml imipenem, although *Enterobacteriaceae* strains possess intrinsic resistance to rifampicin, as stated by EUCAST Expert Rules [22]. Furthermore, colistin-resistance could be reduced with combinations of 0.25 μg/ml colistin plus 1 μg/ml rifampicin, or 0.25 μg/ml polymyxin B plus 1 μg/ml rifampicin, or 2 μg/ml polymyxin B plus 4 μg/ml imipenem. Fluoroquinolone resistance could be decreased as ciprofloxacin MIC value was 2 μg/ml in combination with 1 μg/ml imipenem.

Discussion

Our findings on the colistin-susceptible *K. pneumoniae* strain are consistent with the previously reported superiority of combination therapy [23]. We confirmed that combinations that include carbapenems – imipenem plus tobramycin,

Table II

MIC-values of the individual antibiotics and FIC-indices of antibiotic combinations tested on the colistin-susceptible and colistin-resistant *K. pneumonia* strains

Combinations	*K. pneumoniae* "11" colistin-susceptible					*K. pneumoniae* "12" colistin-resistant				
	MIC (μg/ml)				FICI	MIC (μg/ml)				FICI
	1. AB_{alone}	2. AB_{alone}	1. $AB_{combination}$	2. $AB_{combination}$		1. AB_{alone}	2. AB_{alone}	1. $AB_{combination}$	2. $AB_{combination}$	
COL-CIP	0.125	128	0.25	1	2.008	256	128	2	16	0.133
PMB-CIP	0.125	128	0.25	1	2.008	128	128	1	16	0.133
COL-CAZ	0.125	256	0.25	1	2.004	256	256	64	2	0.258
PMB-CAZ	0.125	256	0.25	1	2.004	128	256	64	1	0.504
COL-IPM	0.125	8	0.25	1	2.125	256	8	32	8	1.125
PMB-IPM	0.125	8	0.25	1	2.125	128	8	2	4	0.516
COL-RA	0.125	256	0.25	1	2.004	256	256	0.25	1	0.005
PMB-RA	0.125	256	0.25	1	2.004	128	256	0.25	1	0.006
RA-IPM	256	8	4	4	0.516	256	8	1	4	0.504
RA-CIP	256	128	0.25	64	0.501	256	128	64	64	0.750
IPM-TOB	8	32	1	4	0.250	8	32	1	2	0.188
IPM-CIP	8	128	4	1	0.508	8	128	1	2	0.141
CAZ-TOB	256	32	1	16	0.504	256	32	0.25	16	0.501
CAZ-CIP	256	128	0.25	64	0.501	256	128	256	64	1.500
TOB-CIP	32	128	32	1	1.008	32	128	16	1	0.508

Legend: AB = antibiotic, CAZ = ceftazidime, CIP = ciprofloxacin, COL = colistin, IPM = imipenem, PMB = polymyxin B, RA = rifampicin, TOB = tobramycin

imipenem plus ciprofloxacin – can be effective against multidrug-resistant *K. pneumoniae,* despite their carbapanemase-production.

However, our *in vitro* investigation found new synergistic and partially synergistic antibiotic combinations for both colistin-susceptible and colistin-resistant *K. pneumoniae* strains.

A combination of imipenem plus rifampicin was found partially synergistic against the multidrug-resistant but colistin-susceptible strain, and the same combination was synergistic against the colistin-resistant strain. Rifampicin was previously reported to be effective in combination with doripenem and colistin against multidrug-resistant Gram-negative bacteria [24, 25]. Our results indicate that rifampicin plus carbapenem combinations can be efficient without polymyxins.

Interestingly, a combination of ceftazidime and tobramycin was synergistic against both strains, even though the strains were ceftazidime- and tobramycin-resistant. Notably, their MIC values measured in combination were in the therapeutically achievable serum concentration ranges, as Table I shows [21].

Colistin and polymyxin B were synergistic in combination with rifampicin against the colistin-resistant *K. pneumoniae* strain, with their MIC values measured in combination being in the achievable serum concentration ranges. Synergism between rifampicin and polymyxins was previously reported in many cases against *Enterobacteriaceae* and non-fermentative Gram-negative bacteria [26–28]. According to our knowledge, this combination was never tested *in vivo* against colistin-resistant isolates, only against multidrug-resistant, but colistin-susceptible ones [24, 25]. Our results confirm previous findings of *in vitro* studies conducted on colistin-resistant strains [29].

Remarkably, we found that polymyxin B and imipenem were synergistic against our colistin-resistant isolate, although it was a KPC-2 producer and had an MIC value of 128 μg/ml against polymyxin B.

Among our analyzed antibiotic combinations 1 μg/ml imipenem plus 2 μg/ml tobramycin was synergistic in concentrations below the EUCAST breakpoints, and 0.25 μg/ml colistin plus 1 μg/ml rifampicin, 0.25 μg/ml polymyxin B plus 1 μg/ml rifampicin were also found synergistic, suggesting these combinations can be used against colistin-resistant *K. pneumoniae* ST258 strains.

References

1. Boucher, H.W., Talbot, G.H., Bradley, J.S., Edwards, J.E., Gilbert, D., Rice, L.B., Scheld, M., Spellberg, B., Bartlett, J.: Bad bugs, no drugs: No ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis **48**, 1–12 (2009).
2. Hirsch, E.B., Tam, V.H.: Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): An emerging cause of multidrug-resistant infection. J Antimicrob Chemother **65**, 1119–1125 (2010).
3. Zavascki, A.P., Goldani, L.Z., Li, J., Nation, R.L.: Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: A critical review. J Antimicrob Chemother **60**, 1206–1215 (2007).
4. Falagas, M.E., Rafailidis, P.I., Ioannidou, E., Alexiou, V.G., Matthaiou, D.K., Karageorgopoulos, D.E., Kapaskelis, A., Nikita, D., Michalopoulos, A.: Colistin therapy for microbiologically documented multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections: A retrospective cohort study of 258 patients. Int J Antimicrob Agents **35**, 194–199 (2010).
5. Bergen, P.J., Landersdorfer, C.B., Lee, H.J., Li, J., Nation, R.L.: 'Old' antibiotics for emerging multidrug-resistant bacteria. Curr Opin Infect Dis **25**, 626–633 (2012).
6. Kontopoulou, K., Protonotariou, E., Vasilakos, K., Kriti, M., Koteli, A., Antoniadou, E., Sofianou, D.: Hospital outbreak caused by *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 β-lactamase resistant to colistin. J Hosp Infect **76**, 70–73 (2010).
7. Urban, C., Tiruvury, H., Mariano, N., Colon-Urban, R., Rahal, J.J.: Polymyxin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli.* Antimicrob Agents Chemother **55**, 388–389 (2011).
8. Marchaim, D., Chopra, T., Pogue, J.M., Perez, F., Hujer, A.M., Rudin, S., Endimiani, A., Navon-Venezia, S., Hothi, J., Slim, J., Blunden, C., Shango, M., Lephart, P.R., Salimnia, H., Reid, D., Moshos, J., Hafeez, W., Bheemreddy, S., Chen, T.Y., Dhar, S., Bonomo, R.A., Kaye, K.S.: Outbreak of colistin-resistant, carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in metropolitan Detroit, Michigan. Antimicrob Agents Chemother **55**, 593–599 (2011).
9. Mammina, C., Bonura, C., Di Bernardo, F., Aleo, A., Fasciana, T., Sodano, C., Saporito, M.A., Verde, M.S., Tetamo, R., Palma, D.M.: Ongoing spread of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in different wards of an acute general hospital, Italy, June to December 2011. Euro Surveill **17** (2012).
10. Capone, A., Giannella, M., Fortini, D., Giordano, A., Meledandri, M., Ballardini, M., Venditti, M., Bordi, E., Capozzi, D., Balice, M.P., Tarasi, A., Parisi, G., Lappa, A., Carattoli, A., Petrosillo, N.: High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection accounts for an excess of mortality. Clin Microbiol Infect **19**, E23–E30 (2013).
11. Falagas, M.E., Rafailidis, P.I., Matthaiou, D.K.: Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. Drug Resist Updat **13**, 132–138 (2010).
12. Kline, T., Trent, M.S., Stead, C.M., Lee, M.S., Sousa, M.C., Felise, H.B., Nguyen, H.V., Miller, S.I.: Synthesis of and evaluation of lipid A modification by 4-substituted 4-deoxy arabinose analogs as potential inhibitors of bacterial polymyxin resistance. Bioorg Med Chem Lett **18**, 1507–1510 (2008).
13. Pournaras, S., Vrioni, G., Neou, E., Dendrinos, J., Dimitroulia, E., Poulou, A., Tsakris, A.: Activity of tigecycline alone and in combination with colistin and meropenem against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing Enterobacteriaceae strains by time-kill assay. Int J Antimicrob Agents **37**, 244–247 (2011).

14. Zarkotou, O., Pournaras, S., Tselioti, P., Dragoumanos, V., Pitiriga, V., Ranellou, K., Prekates, A., Themeli-Digalaki, K., Tsakris, A.: Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. Clin Microbiol Infect **17**, 1798–1803 (2011).
15. Qureshi, Z.A., Paterson, D.L., Potoski, B.A., Kilayko, M.C., Sandovsky, G., Sordillo, E., Polsky, B., Adams-Haduch, J.M., Doi, Y.: Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae:* Superiority of combination antimicrobial regimens. Antimicrob Agents Chemother **56**, 2108–2113 (2012).
16. Lee, G.C., Burgess, D.S.: Treatment of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) infections: A review of published case series and case reports. Ann Clin Microbiol Antimicrob **11**, 32 (2012).
17. Vidaillac, C., Benichou, L., Duval, R.E.: In vitro synergy of colistin combinations against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa,* and *Klebsiella pneumoniae* isolates. Antimicrob Agents Chemother **56**, 4856–4861 (2012).
18. Tóth, Á., Damjanova, I., Puskás, E., Jánvári, L., Farkas, M., Dobák, A., Böröcz, K., Pászti, J.: Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone in Hungary. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **29**, 765–769 (2010).
19. European Committee on antimicrobial susceptibility testing (Eucast) documents. Document version 3.0 2013-01-01. http://eucast.org/clinical_breakpoints.
20. Krogstad, D.J., Moellering, R.C.: Antimicrobial Combinations. In: Lorian, V. (ed.): Antibiotics in Laboratory Medicine, 2nd Edition. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986, pp. 537–595.
21. The Sanford Guide To Antimicrobial Therapy, 42nd Edition. Sperryville: Antimicrobial Therapy, Inc., 2012.
22. Leclercq, R., Cantón, R., Brown, D.F., Giske, C.G., Heisig, P., Macgowan, A.P., Mouton, J.W., Nordmann, P., Rodloff, A.C., Rossolini, G.M., Soussy, C.J., Steinbakk, M., Winstanley, T.G., Kahlmeter, G.: EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. Clin Microbiol Infect **19**, 1141–160 (2013).
23. Tumbarello, M., Viale, P., Viscoli, C., Trecarichi, E.M., Tumietto, F., Marchese, A., Spanu, T., Ambretti, S., Ginocchio, F., Cristini, F., Losito, A.R., Tedeschi, S., Cauda, R., Bassetti, M.: Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae:* Importance of combination therapy. Clin Infect Dis **55**, 943–950 (2012).
24. Urban, C., Mariano, N., Rahal, J.J.: In vitro double and triple bactericidal activities of doripenem, polymyxin B, and rifampin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae,* and *Escherichia coli.* Antimicrob Agents Chemother **54**, 2732–2734 (2010).
25. Gomez, E., Sanchez, M., Gul, Z., Urban, C., Mariano, N., Eng, R.H., Huang, D.B., Chiang, T.: Polymyxin combination therapy and the use of serum bactericidal titers in the management of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: A report of 3 cases. Case Report Med 2011, 659–669 (2011).
26. Ostenson, R.C., Fields, B.T., Nolan, C.M.: Polymyxin B and rifampin: New regimen for multiresistant *Serratia marcescens* infections. Antimicrob Agents Chemother **12**, 655–659 (1977).
27. Giamarellos-Bourboulis, E.J., Karnesis, L., Giamarellou, H.: Synergy of colistin with rifampin and trimethoprim/sulfamethoxazole on multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia*. Diagn Microbiol Infect Dis **44**, 259–263 (2002).

28. Timurkaynak, F., Can, F., Azap, O.K., Demirbilek, M., Arslan, H., Karaman, S.O.: In vitro activities of non-traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. Int J Antimicrob Agents **27**, 224–228 (2006).
29. Elemam, A., Rahimian, J., Doymaz, M.: In vitro evaluation of antibiotic synergy for polymyxin B-resistant carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. J Clin Microbiol **48**, 3558–3562 (2010).

Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 62 (4), pp. 501–508 (2015)
DOI: 10.1556/030.62.2015.4.12

EFFECT OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES ON COLISTIN-SUSCEPTIBLE AND COLISTIN-RESISTANT STRAINS OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* AND *ENTEROBACTER ASBURIAE*

BÉLA KÁDÁR[1], BÉLA KOCSIS[1], KATALIN KRISTOF[2], ÁKOS TÓTH[3, 4] and DÓRA SZABÓ[1]*

[1]Institute of Medical Microbiology, Semmelweis University, Budapest, Hungary
[2]Institute of Laboratory Medicine, Diagnostic Laboratory of Clinical Microbiology, Budapest, Hungary
[3]National Center for Epidemiology, Budapest, Hungary
[4]European Program for Public Health Microbiology Training (EUPHEM), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Stockholm, Sweden

(Received: 26 October 2015; accepted: 3 November 2015)

In this study susceptibility to different antimicrobial peptides was investigated on colistin-susceptible and colistin-resistant identical pulsotype strains of KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 as well as colistin-susceptible and colistin-resistant *Enterobacter asburiae* strains isolated from clinical samples. In our test, bacteria were exposed to 50 mg/ml lactoferrin, lysozyme and protamine – cationic antimicrobial peptides belonging to innate immune system and having structural similarity to polymyxins – in separate reactions. After 18 hours incubation of colonies were counted. 40% of colistin-resistant *K. pneumoniae* strains and 97% of colistin-susceptible counterpart strains were lysed by protamine whereas 87% and 100% colony forming unit decrease by lysozyme was seen, respectively. In the case of colistin-resistant *E. asburiae* strains 1 $\log_{10}$ cell count increase were observed after treatment with lysozyme and 1.56 $\log_{10}$ after lactoferrin exposure compared to the initial number whereas the colistin-susceptible showed no relevant cell count increase. Our findings suggest that acquired colistin-resistance in Enterobacteriaceae is associated with tolerance against antimicrobial peptides.

Keywords: antibiotic-resistance, antimicrobial peptides, colistin, Enterobacteriaceae

*Corresponding author; E-mail: szabo.dora@med.semmelweis-univ.hu

1217-8950/$20.00 © 2015 Akadémiai Kiadó, Budapest

Introduction

Antimicrobial peptides and proteins are mainly cationic (i.e. rich in lysine and arginine residues), amphipathic polymers usually comprised of 12–45 amino acids, and they are part of the innate immune system of plants and animals. However, there are certain antimicrobial peptides that possess dominantly neutral or negative charge, but their spectrum is narrower than the cationic ones [1–3]. Different studies found that their mode of action in Gram-positive bacteria is forming channels through the cytoplasmic membrane, causing structural disruption and finally, osmotic lysis. In Gram-negative microbes they initially interact with the lipopolysaccharide (LPS) of the outer membrane, leading to local membrane disruption, then carry on forming pores through the inner cytoplasmic membrane [4–6]. In this capacity the antimicrobial peptides produced by multicellular organisms are very similar to polymyxins (cationic decapeptides) synthetized by *Bacillus* and *Paenibacillus spp.* [7–10].

Multidrug-resistant Gram-negative bacteria are being often identified as causative agents in nosocomial infections, representing an increasing healthcare problem [11, 12]. These emerging multidrug-resistant pathogens set clinicians to constant challenges concerning the adequate therapy, and lately previously unheeded antibiotics such as polymyxins have been utilized against them [13–15].

Nonetheless, polymyxin-resistant Gram-negative pathogens are being reported in several countries in growing frequency [16–18]. The basis of polymyxin-resistance in Gram-negative bacteria is the modification of LPS molecules of the outer membrane in such ways that the otherwise net negative charge of this layer grows, making it more difficult for positively charged agents (polymyxins, cationic antimicrobial peptides) to attach to it [19, 20].

In recent years there were reports about colistin-resistant and colistin-heteroresistant Gram-negative bacteria that developed a certain cross-resistance, cross-tolerance against host (i.e. human) antimicrobial peptides [21, 22]. In our study we describe the aforementioned phenomenon of cross-tolerance in colistin-resistant *K. pneumoniae* and *E. asburiae* strains isolated in Hungary.

Materials and Methods

Bacterial strains

The study included *K. pneumoniae* and *E. asburiae* strains isolated in Hungary. The two identical pulsetype *Klebsiella* strains belonged to the international clone ST258 were KPC-2 producers: one was colistin-susceptible and the other

one was colistin-resistant. They were isolated during a Hungarian outbreak in 2008 and 2009, from upper respiratory tract and wound infections, respectively [23]. Three *E. asburiae* strains were isolated from sporadic cases of urinary tract infections and were identified by MALDI-TOF/MS.

Antibiotic susceptibility

The minimal inhibitory concentration (MIC) values of polymyxin B (Sigma-Aldrich) and colistin (Sigma-Aldrich) were determined by broth microdilution method using Mueller–Hinton broth (Becton Dickinson), and results were interpreted according to EUCAST documents [24].

Susceptibility to antimicrobial peptides

Each bacterial strain was incubated in 5 ml Luria–Bertani (LB) broth on 37 °C was centrifugated with 5000 G for 15 minutes on 5 °C in their exponential growth phase. Bacterium solutions of 2.1×10^5 CFU/ml were prepared in 1 wt/vol% tryptone phosphate-buffered saline (T-PBS) buffer. Ten µl inocula of each bacterium solution was distributed and complemented to 200 µl with protamine (Sigma-Aldrich), lysozyme (Sigma-Aldrich) and lactoferrin (Sigma-Aldrich), each with an end-concentration of 50 mg/ml. The mixtures containing lysozyme and protamine were incubated on 37 °C for 60 minutes, while the compounds with lactoferrin were incubated on 37 °C for 180 minutes. One hundred µl of each solution was inoculated on sterile LB agar plates, and was incubated on 37 °C for 18 hours, then colonies were calculated $\log_{10}$ CFU/ml. Colony numbers of bacteria treated with antimicrobial peptides were compared to that of "untreated" ones [25].

Results

One of the two KPC-2 producing *K. pneumoniae* strains was resistant to both polymyxin B and colistin, while the other one was susceptible to the two agents, as interpreted according to the latest EUCAST documents. One *E. asburiae* was susceptible to polymyxins, and two were resistant however, we have managed to detect a sub-strain of the *E. asburiae* 0821 which demonstrated high-degree colistin-heteroresistance with E-test (Table I).

Table I. MIC values of polymyxin B and colistin in the investigated strains

	MIC (μg/ml)	
	polymyxin B	colistin
EUCAST breakpoints	not determined	2
K. pneumoniae 11	<0.125	<0.125
K. pneumoniae 12	128	256
E. asburiae 0821	0.125	0.125
E. asburiae 0821/H	>256	>256
E. asburiae 148	64–128	256

Table II. Percentile changes of *K. pneumoniae* CFU decrease after treatment with different antimicrobial peptides

	After treatment with protamine (50 mg/ml)	After treatment with lactoferrin (50 mg/ml)	After treatment with lysozyme (50 mg/ml)
K. pneumoniae col S	97%	0%	100%
K. pneumoniae col R	40%	0%	87%
Difference	+57%	0%	+13%

Table III. *E. asburiae* CFU/ml differences after treatment with different antimicrobial peptides

	Initial	After treatment with protamine (50 mg/ml)	After treatment with lactoferrin (50 mg/ml)	After treatment with lysozyme (50 mg/ml)
E. asburiae 0821 col S	4.9 $\log_{10}$	4.69 $\log_{10}$	4.9 $\log_{10}$	5.11 $\log_{10}$
E. asburiae 0821/H col R	4 $\log_{10}$	4 $\log_{10}$	5.56 $\log_{10}$	5.04 $\log_{10}$
E. asburiae 148 col R	4.85 $\log_{10}$	4.85 $\log_{10}$	5.48 $\log_{10}$	5 $\log_{10}$

Lactoferrin did not demonstrate any effect on either *Klebsiella* strains as there was practically no change in the colony forming unit (CFU) after treatment with it. Protamine exposition caused a 97% decrease in CFU of the colistin-susceptible *K. pneumoniae* strain, while only 40% reduction was observed with the colistin-resistant strain. Lysozyme showed complete bactericidal effect on the colistin-susceptible isolate, and its effect on the colistin-resistant one was also relevant, but it resulted in an only 87% diminution of CFU. These results are shown on Table II.

The CFU/ml changes of the *E. asburiae* strains are listed in Table III. Exposure to protamine caused no relevant difference between the initial and post-expositional CFU. High-level tolerance to lactoferrin was observed in isolates 0821/H and 148. Lysozyme-tolerance was detected in isolates 0821/H and 148.

Discussion

Our findings on the appearance of colistin-heteroresistance within Gram-negative bacterial strains correlate with various studies of recent years [26–28]. Colistin-heteroresistance concomitant with resistance to lysozyme was also previously observed in *Enterobacter cloacae* species [22]. The treatment of these polymyxin-resistant enterobacteria is a great challenge, although some recent studies showed that antibiotic combinations involving e.g. polymyxins, rifampicin, carbapenems and aminoglycosides could be efficient [29].

Cationic antimicrobial peptides are known to bind to certain outer membrane proteins (OMP), which play integral part in the effects of polymyxin antibiotics, as well. In *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and other Gram-negative bacteria the outer membrane bound sensor kinase PhoQ is directly activated by antimicrobial peptides, succeeding in phosphorylation of transcription regulator PhoP, which activates a number of genes being important in virulence, taking part in modification of LPS molecules, and thus being responsible for developing resistance to antimicrobial peptides and polymyxins [30–34].

According to our knowledge, this is the first description of simultaneous resistance to polymyxin-type antibiotics and cationic antimicrobial peptides in Hungary.

Our study suggests that prior exposure to antimicrobial peptides can influence the development of resistance to polymyxins in bacteria. Furthermore, bacteria with resistance to polymyxins could also develop tolerance to antimicrobial peptides, which subsequently could influence the host defensive abilities in case of infections (especially in bloodstream infections), the therapeutical possibilities and choices, as well as the clinical outcomes.

Acknowledgement

This study was financially supported by the Hungarian Research Fund, OTKA K 108481.

Conflict of Interest

No conflict of interest.

References

1. Hancock, R. E. W.: Antibacterial peptides and the outer membranes of Gram-negative bacilli. J Med Microbiol **46,** 1–3 (1997).
2. Hancock, R. E. W.: Peptide antibiotics. Lancet **349,** 418–422 (1997).
3. Hancock, R. E. W., Lehrer, R.: Cationic peptides: A new source of antibiotics. Trends Biotechnol **16,** 82–88 (1998).
4. Falla, T. J., Karunaratne, D. N., Hancock, R. E. W.: Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. J Biol Chem **271,** 19298–19303 (1996).
5. Ludtke, S. J., He, K., Heller, W. T., Harroun, T. A., Yang, L., Huang, H. W.: Membrane pores induced by magainin. Biochemistry **35,** 13723–13728 (1996).
6. Bechinger, B.: Structure and functions of channel-forming peptides: Magainins, cecropins, melittin and alamethicin. J Membr Biol **156,** 197–211 (1997).
7. Ainsworth, G. C., Brown, A. M., Brownlee, G.: Aerosporin, an antibiotic produced by *Bacillus aerosporus* Greer. Nature **159,** 263 (1947).
8. Shoji, J., Kato, T., Hinoo, H.: The structure of polymyxin S_1 (Studies on antibiotics from the genus *Bacillus*. XXI). J Antibiot (Tokyo) **30,** 1035–1041 (1977).
9. Shoji, J., Kato, T., Hinoo, H.: The structure of polymyxin T_1 (Studies on antibiotics from the genus *Bacillus*. XXII). J Antibiot (Tokyo) **30,** 1042–1048 (1977).
10. Trakhanova, M. N., Zinchenko, A. A., Bairamashvili, D. I., Makarova, R. A., Samoilova, L. N., Miroshnikov, A. I.: [Structural and functional investigation of polymyxins. Isolation and properties of individual components of polymyxin M]. Antibiot Khimioter **33,** 262–266 (1988).
11. Souli, M., Galani, I., Giamarellou, H.: Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. Euro Surveill **13,** (2008).
12. Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards, J. E., Gilbert, D., Rice, L. B., Scheld, M., Spellberg, B., Bartlett, J.: Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis **48,** 1–12 (2009).
13. Zavascki, A. P., Goldani, L. Z., Li, J., Nation, R. L.: Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: A critical review. J Antimicrob Chemother **60,** 1206–1215 (2007).
14. Falagas, M. E., Rafailidis, P. I., Ioannidou, E., Alexiou, V. G., Matthaiou, D. K., Karageorgopoulos, D. E., Kapaskelis, A., Nikita, D., Michalopoulos, A.: Colistin therapy for microbiologically documented multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections: A retrospective cohort study of 258 patients. Int J Antimicrob Agents **35,** 194–199 (2010).
15. Bergen, P. J., Landersdorfer, C. B., Lee, H. J., Li, J., Nation, R. L.: 'Old' antibiotics for emerging multidrug-resistant bacteria. Curr Opin Infect Dis **25,** 626–633 (2012).
16. Urban, C., Tiruvury, H., Mariano, N., Colon-Urban, R., Rahal, J. J.: Polymyxin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother **55,** 388–389 (2011).

17. Marchaim, D., Chopra, T., Pogue, J. M., Perez, F., Hujer, A. M., Rudin, S., Endimiani, A., Navon-Venezia, S., Hothi, J., Slim, J., Blunden, C., Shango, M., Lephart, P. R., Salimnia, H., Reid, D., Moshos, J., Hafeez, W., Bheemreddy, S., Chen, T. Y., Dhar, S., Bonomo, R. A., Kaye, K. S.: Outbreak of colistin-resistant, carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in metropolitan Detroit, Michigan. Antimicrob Agents Chemother **55,** 593–599 (2011).
18. Mammina, C., Bonura, C., Di Bernardo, F., Aleo, A., Fasciana, T., Sodano, C., Saporito, M. A., Verde, M. S., Tetamo, R., Palma, D. M.: Ongoing spread of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in different wards of an acute general hospital, Italy, June to December 2011. Euro Surveill **17,** (2012).
19. Falagas, M. E., Rafailidis, P. I., Matthaiou, D. K.: Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. Drug Resist Updat **13,** 132–138 (2010).
20. Kline, T., Trent, M. S., Stead, C. M., Lee, M. S., Sousa, M. C., Felise, H. B., Nguyen, H. V., Miller, S. I.: Synthesis of and evaluation of lipid A modification by 4-substituted 4-deoxy arabinose analogs as potential inhibitors of bacterial polymyxin resistance. Bioorg Med Chem Lett **18,** 1507–1510 (2008).
21. Napier, B. A., Burd, E. M., Satola, S. W., Cagle, S. M., Ray, S. M., McGann, P., Pohl, J., Lesho, E. P., Weiss, D. S.: Clinical use of colistin induces cross-resistance to host antimicrobials in *Acinetobacter baumannii*. MBio **4,** (2013).
22. Napier, B. A., Band, V., Burd, E. M., Weiss, D. S.: Colistin heteroresistance in *Enterobacter cloacae* is associated with cross-resistance to the host antimicrobial lysozyme. Antimicrob Agents Chemother **58,** 5594–5597 (2014).
23. Tóth, Á., Damjanova, I., Puskás, E., Jánvári, L., Farkas, M., Dobák, A., Böröcz, K., Pászti, J.: Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone in Hungary. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **29,** 765–769 (2010).
24. European Committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST) documents. Document version 3.0, 2013-01-01, http://eucast.org/clinical_breakpoints.
25. Campos, M. A., Vargas, M. A., Regueiro, V., Llompart, C. M., Albertí, S., Bengoechea, J. A.: Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. Infect Immun **72,** 7107–7114 (2004).
26. Li, J., Rayner, C. R., Nation, R. L., Owen, R. J., Spelman, D., Tan, K. E., Liolios, L.: Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother **50,** 2946–2950 (2006).
27. Meletis, G., Tzampaz, E., Sianou, E., Tzavaras, I., Sofianou, D.: Colistin heteroresistance in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother **66,** 946–947 (2011).
28. Jayol, A., Nordmann, P., Brink, A., Poirel, L.: Heteroresistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* associated with alterations in the PhoPQ regulatory system. Antimicrob Agents Chemother **59,** 2780–2784 (2015).
29. Kádár, B., Kocsis, B., Tóth, Á., Damjanova, I., Szász, M., Kristóf, K., Nagy, K., Szabó, D.: Synergistic antibiotic combinations for colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Acta Microbiol Immunol Hung **60,** 201–209 (2013).
30. Gunn, J. S., Miller, S. I.: PhoP-PhoQ activates transcription of *pmrAB*, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. J Bacteriol **178,** 6857–6864 (1996).

31. Moskowitz, S. M., Ernst, R. K., Miller, S. I.: PmrAB, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A. J Bacteriol **186,** 575–579 (2004).
32. Bader, M. W., Sanowar, S., Daley, M. E., Schneider, A. R., Cho, U., Xu, W., Klevit, R. E., Le Moual, H., Miller, S. I.: Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase. Cell **122,** 461–472 (2005).
33. Gunn, J. S.: The *Salmonella* PmrAB regulon: Lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. Trends Microbiol **16,** 284–290 (2008).
34. Barrow, K., Kwon, D. H.: Alterations in two-component regulatory systems of *phoPQ* and *pmrAB* are associated with polymyxin B resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother **53,** 5150–5154 (2009).

Journal of Microbiology, Immunology and Infection (2017) 50, 735–736

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.e-jmii.com

CORRESPONDENCE

MgrB variants in colistin-susceptible and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST258

KEYWORDS
Colistin resistance;
Klebsiella pneumoniae;
MgrB;
PmrB

Abstract Resistance determinants of a colistin susceptible and five colistin resistant *Klebsiella pneumoniae* ST258 from a Hungarian outbreak were investigated. A novel MgrB variant in colistin susceptible strain was found. Elevated *phoP* and *arn* gene expressions and wild-type PmrB in all colistin resistant *K. pneumoniae* were detected. All strains lacked *mcr-1*.
Copyright © 2016, Taiwan Society of Microbiology. Published by Elsevier Taiwan LLC. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

To the Editor,

Klebsiella pneumoniae is a frequently identified nosocomial Gram-negative pathogen and found to be resistant to multiple classes of antibiotics, including extended-spectrum cephalosporins, carbapenems, aminoglycosides, and fluoroquinolones. The emergence of colistin resistance in *K. pneumoniae* was reported in several countries and most frequently ST258 clone was identified.[1] The main mechanism of resistance to colistin in Gram-negative bacteria is explained by the modification of lipopolysaccharides, the target molecules of polymyxins. The PmrA/PmrB and PhoP/PhoQ two-component regulatory system confers resistance to polymyxin B, and insertional inactivation of *mgrB*-encoding regulator has also been associated with colistin resistance.[2] Furthermore, *ugd*, *eptB*, *pagL*, and *cdtA* genes were also detected as determinants in colistin resistance.[3] Recently, *mcr-1* a plasmid-mediated colistin resistance determinant was identified in *Escherichia coli* in animals and in humans in China.[4]

In Hungary, the first colistin-resistant *K. pneumoniae* strains were detected between 2008 and 2009 during an outbreak of a KPC-2 producing ST258 clone. Interestingly, during that outbreak no polymyxins were used in the hospital wards but at the beginning colistin-susceptible (minimum inhibitory concentration, MIC: 0.125 μg/mL) and later on colistin-resistant (MIC: 8–24 μg/mL) *K. pneumoniae* were identified. Pulsed-field gel electrophoresis found identical patterns for all strains and based on multi-locus sequence typing all belonged to ST258.[5] In our study five colistin-resistant and a susceptible KPC-2 producing *K. pneumoniae* ST258 were investigated; all tested strains were detected in the aforementioned outbreak.

Polymerase chain reaction (PCR) amplifications of *mgrB*, *pmrB*, and *mcr-1* resistant determinants were performed with specific primers and thermal profiles.[2,4] All PCR amplicons were sequenced and analyzed based on the NCBI Genbank database. The transcription levels of *phoP*, *pmrD*, and *arn* were determined, as total cellular RNA was extracted using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Reverse transcription PCR was carried out in a LightCycler (Roche Applied Science, Meylan, France). Oligonucleotide primers of this study were designed by online tools of Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany: phoP, forward GCGTCACCACCTCAAAGTTC and reverse AAACCGTCTTCATCCGGCAG; pmrD, forward AGTACAGGACAACGCTTCGG and reverse GGAGTGAGTTTATCCCCTTCC; and arnT, forward ATAATCGGCGACAGGATAGC and reverse CAGTATCGGTCAGTGGCTGT. Amplifications were performed in duplicate from two different RNA preparations. The cycle threshold (CT) values of the target genes were compared with CT values of *rpoB* housekeeping gene.

In our study *mgrB* and *IS5* were detected by PCR and sequencing. A 940-bp amplicon was amplified in the colistin-susceptible strain (Fig. 1), and a novel amino acid sequence of MgrB (MKKLRWVLLIVIIAGCLLLIRTFLNVMCDQDVQFFSGIC

http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2016.06.008
1684-1182/Copyright © 2016, Taiwan Society of Microbiology. Published by Elsevier Taiwan LLC. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

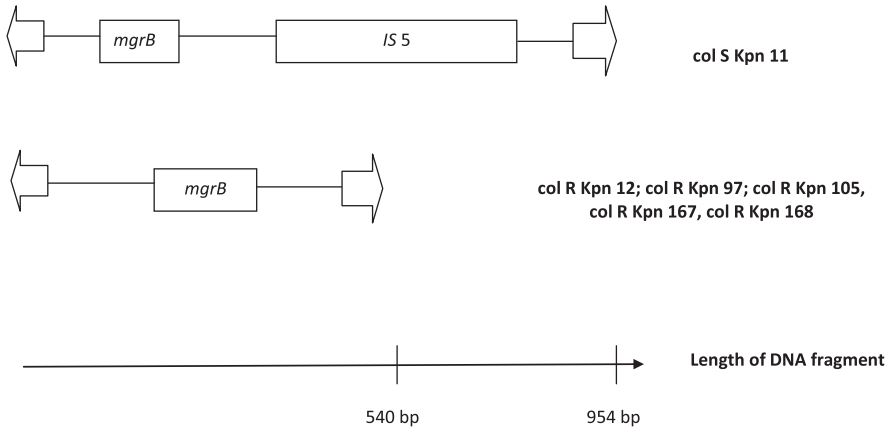


Figure 1. Nucleic acid sequence analysis of flanking regions of *mgrB* in tested strains. bp = base pair; col R Kpn = colistin resistant *Klebsiella pneumoniae*; col S Kpn = colistin susceptible *K. pneumoniae*; *IS*5 = insertion sequence 5.

TINKFIPW) was identified. By contrast, in each resistant *K. pneumoniae* the same set of primers amplified 540 bp DNA fragments, whereas these PCR amplicons were subjected to nucleic acid sequencing and a MgrB variant was uniformly present in all resistant strains (MKKLRWVLLI-VIIAGCLLLWTQMLNVMCDQDVQFFSGICTINKFIPW) and insertion sequence 5 (*IS*5) was abscent (Fig. 1). Amino acid substitution in PmrB was not found in colistin-susceptible strains and in all resistant strains PmrB remained wild-type. This is in contrast to Jayol et al,[2] who pointed out that T157P amino acid substitution is a factor of colistin resistance in *K. pneumoniae*. Overexpression of the *phoP-pmrD-arn* regulatory system was detected in the resistant *K. pneumoniae* strains. Relative gene expression rates of *phoP* and *arn* of colistin resistant strains were elevated compared with susceptible strains. A novel MgrB variant in colistin susceptible *K. pneumoniae* ST258 was detected and all tested strains in our study were negative for the *mcr-1* gene.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

Our study was financially supported by the Hungarian Research Fund, OTKA Grant number: K 108481.

References

1. Mammina C, Bonura C, Bernardo Di F, Aleo A, Fasciana T, Sodano C, et al. Ongoing spread of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in different wards of an acute general hospital, Italy, June to December 2011. *Euro Surveill* 2012;**17**:1—6. pii: 20248.
2. Jayol A, Poirel L, Brink A, Villegas MV, Yilmaz M, Nordmann P. Resistance to colistin associated with a single amino acid change in protein PmrB among *Klebsiella pneumoniae* isolates of worldwide origin. *Antimicrobial Agents Chemother* 2014;**58**:4762—6.
3. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol* 2014;**5**:1—18. 643.
4. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Inf Dis* 2016; **16**:161—8.
5. Tóth Á, Damjanova I, Puskás E, Jánvári L, Farkas M, Dobák A, et al. Emergence of a colistin-resistant KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone in Hungary. *Eur J Clin Microbiol Inf Dis* 2010;**29**:765—9.

Béla Kocsis*
Béla Kádár
Institute of Medical Microbiology, Semmelweis University, Budapest, Hungary

Ákos Tóth
National Center for Epidemiology, Budapest, Hungary

European Program for Public Health Microbiology Training (EUPHEM), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Stockholm, Sweden

Alexandra Fullár
First Department of Pathology and Experimental Cancer Research, Semmelweis University, Budapest, Hungary

Dóra Szabó
Institute of Medical Microbiology, Semmelweis University, Budapest, Hungary

*Corresponding author. Institute of Medical Microbiology, Semmelweis University, Budapest, Nagyvárad tér 4, 1089, Hungary.
E-mail address: kocsis.bela@med.semmelweis-univ.hu (B. Kocsis)

2 May 2016
Available online 29 July 2016

Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 64 (2), pp. 217–227 (2017)
DOI: 10.1556/030.64.2017.017
First published online June 19, 2017

COLISTIN RESISTANCE ASSOCIATED WITH OUTER MEMBRANE PROTEIN CHANGE IN *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* AND *ENTEROBACTER ASBURIAE*

BÉLA KÁDÁR[1]*, BÉLA KOCSIS[1], ÁKOS TÓTH[2,3], KATALIN KRISTÓF[4], PÉTER FELSŐ[5], BÉLA KOCSIS[5], KATALIN BÖDDI[6] and DÓRA SZABÓ[1]

[1]Institute of Medical Microbiology, Semmelweis University, Budapest, Hungary
[2]1st Department of Bacteriology, National Center for Epidemiology, Budapest, Hungary
[3]European Program for Public Health Microbiology Training (EUPHEM), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Stockholm, Sweden
[4]Diagnostic Laboratory of Clinical Microbiology, Institute of Laboratory Medicine, Semmelweis University, Budapest, Hungary
[5]Institute of Medical Microbiology and Immunology, University of Pécs, Pécs, Hungary
[6]Institute of Biochemistry and Medical Chemistry, University of Pécs, Pécs, Hungary

(Received: 30 April 2017; accepted: 16 May 2017)

In this study, outer membrane proteins (OMPs) of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter asburiae* were analyzed. One colistin-susceptible and three colistin-resistant *K. pneumoniae* sequence type 258 strains as well as one colistin-susceptible *E. asburiae* and its colistin-heteroresistant counterpart strain were involved in the study. OMP analysis of each strain was performed by microchip method. Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight/mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) investigation was carried out after separation of OMPs by two-dimensional gel electrophoresis and in-gel digestion. The MALDI-TOF/MS analysis of OMPs in the colistin-susceptible *K. pneumoniae* found 16 kDa proteins belonging to the LysM domain/BON superfamily, as well as DNA starvation proteins, whereas OmpX and OmpW were detected in the colistin-resistant counterpart strains. OmpC and OmpW were detected in the colistin-susceptible *E. asburiae*, whereas OmpA and OmpX were identified in the colistin-resistant counterpart. This study demonstrated that OMP differences were between colistin-susceptible and -resistant counterpart strains. The altered Gram-negative cell wall may contribute to acquired colistin resistance in Enterobacteriaceae.

Keywords: MALDI-TOF/MS, outer membrane protein, colistin resistance

*Corresponding author; E-mail: kadar.bela@gmail.com

1217-8950/$20.00 © 2017 Akadémiai Kiadó, Budapest

Introduction

Klebsiella pneumoniae and *Enterobacter* spp. are frequently identified nosocomial Gram-negative pathogens and both are found to be resistant to multiple classes of antibiotics, including extended-spectrum cephalosporins, carbapenems, aminoglycosides, and fluoroquinolones [1–3].

The emergence of colistin resistance in *K. pneumoniae* was reported in several countries, and the sequence type (ST) 258 clone was most frequently identified, although strains from numerous clones (ST14, ST15, ST70, ST101, ST273, ST512, and ST1271) were also detected as colistin-resistant ones. Colistin resistance also appeared in *Enterobacter* spp.; however, it has been detected less frequently [4–9].

The main mechanism of resistance to colistin in Gram-negative bacteria is explained by the modification of lipopolysaccharide (LPS), the target molecule of polymyxins. The addition of phosphoethanolamine and 4-deoxyaminoarabinose to the target molecule reduces its affinity to positively charged agents like polymyxins. The *pmrCAB* operon encodes the PmrC phosphoethanolamine transferase, the PmrA response regulator (also named as BasR), and the PmrB sensor kinase (also named as BasS), whereas the *arn* operon encodes the enzymes and transports proteins responsible for 4-deoxyaminoarabinose substitution [10–14].

The outer membrane bound two-component regulatory systems PmrA/PmrB and PhoP/PhoQ were identified as major contributing factors in resistance to polymyxins. The insertional inactivation of the *mgrB* gene encoding another outer membrane protein (OMP) regulating PhoQ/PhoP has also recently been associated with colistin resistance [15–17].

In Hungary, the first colistin-resistant *K. pneumoniae* strains were detected between 2008 and 2009 during an outbreak of a *K. pneumoniae* carbapenemase-2 (KPC-2) producing ST258 clone. Later, increasing number of acquired colistin-resistant Enterobacteriaceae clinical isolates was observed. The aim of this study was to analyze one colistin-susceptible and three colistin-resistant clinical *K. pneumoniae* ST258 strains originating from the first Hungarian outbreak. This study also involved one colistin-susceptible *Enterobacter asburiae* and its colistin-heteroresistant counterpart strain. The specific aim of this study was the analysis of OMPs [18].

Materials and Methods

Bacterial strains

Three colistin-resistant and one colistin-susceptible KPC-2 producing *K. pneumoniae* ST258 strains were included in this study. All investigated strains

were identified in 2008–2009 during an outbreak in Hungary. One *E. asburiae* strain identified from clinical urine sample and its colistin-heteroresistant counterpart were also analyzed [18].

Isolation of OMPs

The strains were inoculated into 500 ml Mueller–Hinton Broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) and were incubated in a shaker at 37 °C overnight. The cultures were centrifugalized (6,000*g*, 20 min, 4 °C), then the sediments were resuspended in physiological saline solution. The suspensions were again centrifugalized and this washing step was repeated once more. The sediments were subsequently taken into 15 ml 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) solution, then the bacterial cells in ice bath were disrupted with 500W ultrasound (MSE Soniprep 150 Ultrasonic Disintegrator, MSE Ltd., London, UK) twice for 2 min. Hereupon, the samples were again centrifugalized (6,000*g*, 20 min, 4 °C), and after that, the supernatants were poured off for ultracentrifugation (100,000*g*, 60 min, 4 °C). Thereafter, the sediments were resuspended in 5 ml 0.5% *N*-laurylsarcosine (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary) solution and incubated at room temperature for 30 min, and then they were again ultracentrifugalized with same parameters. Finally, the sarcosine-insoluble OMPs were located in the sediment [19].

OMP analysis by microchip (Agilent 2100 Bioanalyzer)

Electrophoresis in microchips was performed in the commercially available Agilent 2100 Bioanalyzer system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with a diode laser for fluorescence detection with 630 and 650 nm as excitation and emission wavelengths, respectively. OMP samples were diluted 10 times with standard labeling buffer. For the fluorescent labeling, 0.5 μL of fluorescent dye/dimethyl sulfoxide solution was added to 5 μL of diluted sample and incubated for 10 min at room temperature. The excess dye (i.e., the unbound dye) in the solutions of labeled OMPs was quenched by adding 0.5 μL of ethanolamine following the reaction time. The labeled samples were diluted five times by adding 24 μL of distilled water, then incubated at 100 °C for 5 min. The samples were centrifugalized and the supernatant was used for the electrophoretic analysis, where the microchip channels were hydrodynamically filled (with pressure) with the gel matrix, the sample wells were loaded with 6 μL of samples, and the respective wells were loaded with the destaining solution. The injection was made with 1,000 V for 80 s and the separation was continued at 1,000 V for 60 s. The sample components migrated toward the anode. The temperature was maintained at 30 °C.

Two-dimensional gel electrophoresis (2DE) of OMPs

OMPs of *K. pneumoniae* strains were separated by 2DE. A portion of 100 μg of the total protein content of the OMPs were supplemented with 2DE sample buffer 8 M urea (Bio-Rad, Budapest, Hungary), 2% CHAPS (Bio-Rad), 50 mM dithiothreitol (DTT) (Bio-Rad), 0.2% Biolyte 3/10 ampholytes (Bio-Rad), and a trace of bromophenol blue (Bio-Rad) to a total volume of 125 μl, then the immobilized pH gradient strips of length 7 cm, pH 3–10, (Bio-Rad) were incubated for rehydration overnight. Isoelectric focusing (IEF) of the OMPs was performed on an IEF cell (Bio-Rad) using the following program: 250 V, 2 h, linear, 500 V, 2 h, linear, 4,000 V, 10,000 Vh, rapid. After the IEF, the strips were equilibrated twice for 10 min in equilibration buffer containing 6 M urea, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 20% glycerol, a trace of bromophenol blue, and 2% DTT (Bio-Rad). During the second equilibration step, 2.5% IAA was used instead of DTT. After the equilibration, the strips were applied to the second dimension [12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), 8 × 6 cm (Bio-Rad)]. The separation of the proteins according to their masses was performed at 80 V for 20 min and 120 V until the end of the run. After the SDS-PAGE, the gels were stained with Coomassie blue R-250. Protein marker (ladder, Bio-Rad Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™, Bio-Rad) was used as a molecular standard. The gels were scanned on Pharos FX laser scanner (Bio-Rad). For the identification of the OMPs and the mass spectrometric analysis, the spots of interest were excised from the gels.

In-gel digestion

Protein bands were excised from gels and were cut to small pieces and digested using modified version of the protocol developed by Shevchenko et al. [20]. Coomassie blue and SDS were removed with 100 mM ammonium bicarbonate (Bio-Rad), then the gel slabs were dehydrated with acetonitrile (ACN). Disulfide bridges were reduced with 10 mM DTT (Bio-Rad), then the free sulfhydryl (SH) groups were alkylated with 55 mM iodacetamide solution (Bio-Rad). The modified proteins were in-gel digested with side-chain-protected trypsin (Promega, Madison, WI, USA) in 50 mM ammonium bicarbonate overnight at 37 °C. The digested peptides were extracted from the gel with 5% formic acid solution (Sigma-Aldrich) in a 2:1 mixture of ACN (Sigma-Aldrich) and water. The extracted peptides were evaporated to dryness and redissolved in 5 μL of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water before the mass spectrometric measurement [20, 21].

Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight/mass spectrometry (MALDI-TOF/MS)

Mass analysis was performed on an Autoflex II MALDI-TOF/MS instrument (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). During MS analysis of the digested proteins, 8 mg of α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) was dissolved in 1 mL of 50% ACN and 0.1% TFA (Scharlau Chemie, Barcelona, Spain) in water. In each case, 1 μL of the matrix was deposited on a stainless steel target together with 1 μL of the sample with dried droplet method.

All mass spectra were monitored in positive mode with pulsed ionization [$l = 337$ nm; nitrogen laser (MNL 106 PD)] with a maximum pulse rate of 50 Hz. Peptides of the digests were measured in positive reflectron mode using a delayed extraction of 120 ns. The accelerating voltage was set to +19 kV and the reflectron voltage was set to +20 kV. The spectra of peptides were the sum of 1,000 shots; external calibration has been implemented. Data processing was executed with flexAnalysis software packages (version: 3.1; Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Sequence Editor software (Bruker Daltonics) was used for the analysis with the following criteria: (i) all cysteines were supposed to be treated with iodoacetamide, (ii) monoisotopic masses were allowed, and (iii) the maximum number of missed cleavage sites was two [22, 23]. Data analysis was performed and protein identification was achieved using the MASCOT algorithm (http://www.matrixscience.com) and the Swiss-Prot entries database (Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Switzerland), where (i) carbamidomethyl cysteine as fixed modification and (ii) oxidation of methionine were allowed as variable modifications. Mass accuracy was considered within 150 ppm for MS and 0.8 Da for MS/MS. Only proteins with at least two matching sequences were considered [20, 24].

Results and Discussion

Our investigations regarding the colistin resistance mechanisms found OMP change in the colistin-resistant strains compared with the colistin-susceptible ones. The Agilent 2100 Bioanalyzer showed a distinct lack of protein fraction in the colistin-resistant *K. pneumoniae* and *E. asburiae* isolates during the runs of OMPs, whereas the same fraction was present in the colistin-susceptible ones (Figures 1 and 2).

Various OMPs were detected by MALDI-TOF/MS after 2DE separation of OMPs (Table I). In the colistin-susceptible *K. pneumoniae* strain, 15–16 kDa

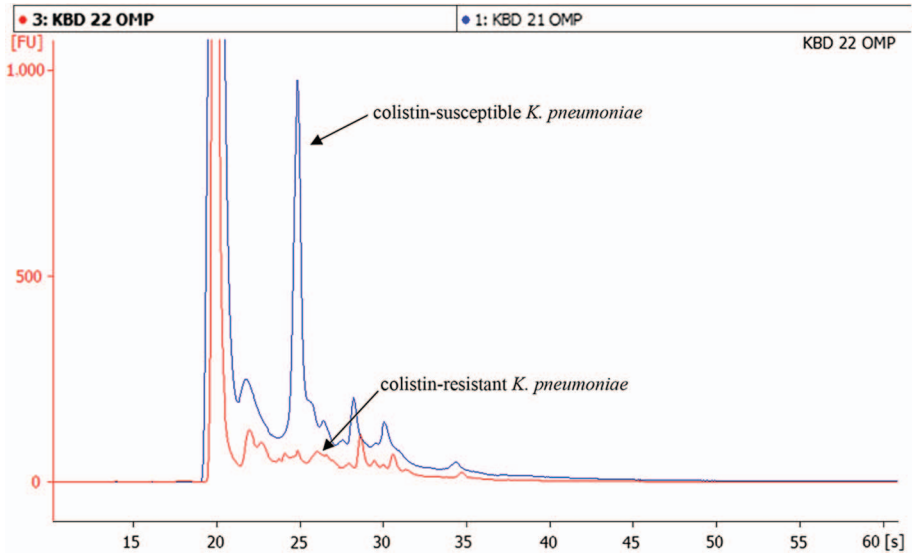


Figure 1. OMP analysis of colistin-susceptible and colistin-resistant *K. pneumoniae* strains (colistin-susceptible strain: blue line; colistin-resistant strain: red line)

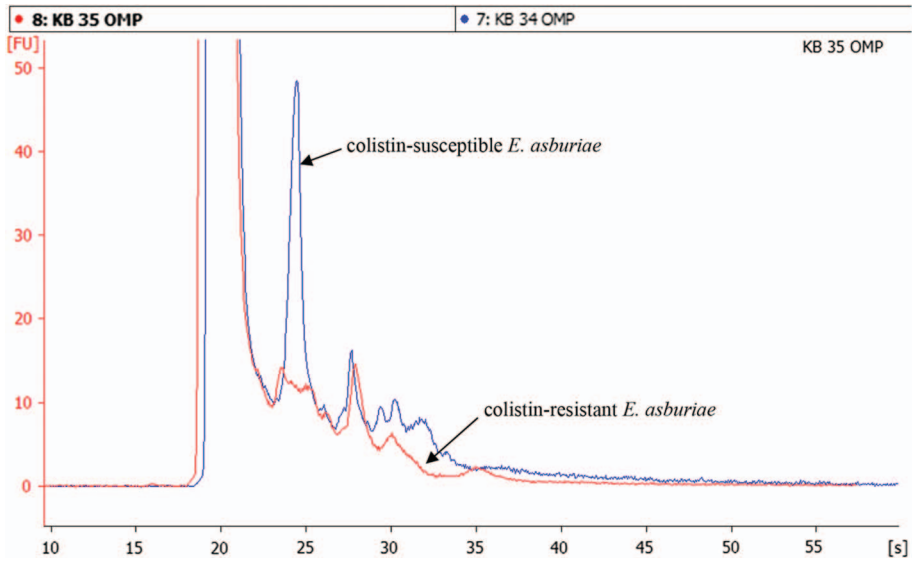


Figure 2. OMP analysis of colistin-susceptible *E. asburiae* strain and its heteroresistant counterpart (colistin-susceptible strain: blue line; colistin-resistant strain: red line)

Table I. OMPs detected in colistin-susceptible and colistin-resistant *K. pneumoniae* and *E. asburiae*

Strain	Protein	Protein ID	Molecular weight (Da)
col S *Kpn* 11	LysM BON superfamily	gi|152970277	15,899
	DNA starvation protein	gi|152969398	18,697
col R *Kpn* 12	OmpW	gi|152969802	24,321
col R *Kpn* 97	OmpW, colicin S4 rec; putative transport protein	A6T7W0	24,321
	OmpX	S5YR85	14,866
col R *Kpn* 105	OmpX	F0JWH6	18,680
	OmpW	G0GLV0	22,969
col S *Easb*	OmpC	K4YC30	40,459
	OmpW	G0GLV0	22,969
col R *Easb*	flagellin	V3HNK5	28,529
	OmpA	V3PJ21	37,748
	OmpX	V3E259	18,654

Note: col S *Kpn*: colistin-susceptible *K. pneumoniae*; col R *Kpn*: colistin-resistant *K. pneumoniae*; col S *Easb*: colistin-susceptible *E. asburiae*; col R *Easb*: colistin-resistant *E. asburiae*.

proteins of the LysM domain /BON superfamily and DNA starvation/stationary phase protection proteins were detected, whereas in the colistin-resistant counterpart strain, these proteins were absent, but OmpX (19 kDa) and OmpW (24 kDa) were present. In the colistin-susceptible *E. asburiae*, OmpC (40 kDa) and OmpW (23 kDa) were identified, whereas in the colistin-heteroresistant counterpart strain, OmpA (38 kDa) and OmpX (19 kDa) were detected.

DNA starvation proteins (Dps) were found in several bacteria, their main function being the protection of bacteria during the stationary phase of cell division. They bind to the bacterial chromosome in a non-specific way creating a stable, condensed DNA starvation/stationary phase protection protein (Dps-DNA) complex which is protected against harmful effects. Furthermore, they bind intracellular Fe^{2+} ions and oxidize them into Fe^{3+} ions, then store them indirectly decreasing the amount of intracellular reactive oxygen species [25, 26].

LysM and BON domains are the conserved sections found in many bacterial proteins. These are mainly structural proteins and enzymes responsible for maintaining cell membrane integrity, and they are present in the greatest amount during the stationary cell division phase. The LysM domain specifically binds to the *N*-acetylglucosamine molecules of peptidoglycan. As colistin resistance is based on molecular changes in the cell wall, the alterations in the expression of these structural proteins may contribute to its development [22, 27].

OmpC and its homologues (Omp36 and OmpK36) are porin-type transport proteins found in the outer membrane of *Enterobacteriaceae*. They are responsible for transporting several types of molecules into the cells, including antibiotics

(e.g., cephalosporins, carbapenems, and fluoroquinolones). Their loss or decreased expression leads to antibiotic resistance and diminished susceptibility to serum antimicrobial activity in *Escherichia coli* and *Enterobacter* spp. [23, 28].

OmpA is a multifunctional membrane protein: in addition to maintaining integrity of the outer membrane, it is responsible for serum resistance in *E. coli* and antimicrobial peptide resistance in *K. pneumoniae* [29, 30].

OmpX is a protein structurally similar to OmpA. Its overproduction was observed in multiresistant *Enterobacter aerogenes* strains with the simultaneous underproduction of OmpF and Omp36 porins, as well as structural changes of LPS. Upregulation of *ompX* and downregulation of *omp36* together cause the decrease of outer membrane permeability [31–33].

The reports of OmpA and OmpX contributing to antimicrobial peptide resistance and outer membrane structural changes in Enterobacteriaceae and underproduction of OmpC leading to serum resistance in *Enterobacter* spp. concur with our previous observation of colistin-resistant *E. asburiae* and *K. pneumoniae* strains being tolerant to antimicrobial peptides [34].

This study identified OMP change as a possible mechanism for colistin resistance in *K. pneumoniae* ST258 and *E. asburiae*. Protein assortment change in the outer membrane may contribute to the stability and integrity of cell wall, thus developing and maintaining colistin resistance. Further investigations are required to explore the potentially elaborate regulatory system and the exact roles of the different proteins.

Acknowledgements

This study was financially supported by the Hungarian Research Fund, Grant Number: OTKA K 108481. Investigations of MALDI-TOF/MS and 2D electrophoresis were financially supported by PTE ÁOK/KA-2013/5 KA research grant.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Paterson, D. L.: Resistance in Gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. Am J Infect Control **34**, S20–S28; discussion S64–S73 (2006).
2. Delgado-Valverde, M., Sojo-Dorado, J., Pascual, A., Rodríguez-Baño, J.: Clinical management of infections caused by multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. Ther Adv Infect Dis **1**, 49–69 (2013).

3. Bassetti, M., Peghin, M., Pecori, D.: The management of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. Curr Opin Infect Dis **29**, 583–594 (2016).
4. Antoniadou, A., Kontopidou, F., Poulakou, G., Koratzanis, E., Galani, I., Papadomichelakis, E., Kopterides, P., Souli, M., Armaganidis, A., Giamarellou, H.: Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: First report of a multiclonal cluster. J Antimicrob Chemother **59**, 786–790 (2007).
5. Marchaim, D., Chopra, T., Pogue, J. M., Perez, F., Hujer, A. M., Rudin, S., Endimiani, A., Navon-Venezia, S., Hothi, J., Slim, J., Blunden, C., Shango, M., Lephart, P. R., Salimnia, H., Reid, D., Moshos, J., Hafeez, W., Bheemreddy, S., Chen, T. Y., Dhar, S., Bonomo, R. A., Kaye, K. S.: Outbreak of colistin-resistant, carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in metropolitan Detroit, Michigan. Antimicrob Agents Chemother **55**, 593–599 (2011).
6. Bogdanovich, T., Adams-Haduch, J. M., Tian, G. B., Nguyen, M. H., Kwak, E. J., Muto, C. A., Doi, Y.: Colistin-resistant, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to the international epidemic clone ST258. Clin Infect Dis **53**, 373–376 (2011).
7. Mammina, C., Bonura, C., Di Bernardo, F., Aleo, A., Fasciana, T., Sodano, C., Saporito, M. A., Verde, M. S., Tetamo, R., Palma, D. M.: Ongoing spread of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in different wards of an acute general hospital, Italy, June to December 2011. Euro Surveill **17**, 20248 (2012).
8. Boo, T. W., O'Connell, N., Power, L., O'Connor, M., King, J., McGrath, E., Hill, R., Hopkins, K. L., Woodford, N.: First report of IMI-1-producing colistin-resistant *Enterobacter* clinical isolate in Ireland, March 2013. Euro Surveill **18**, 20548 (2013).
9. Huang, L., Wang, X., Feng, Y., Xie, Y., Xie, L., Zong, Z.: First identification of an IMI-1 carbapenemase-producing colistin-resistant *Enterobacter cloacae* in China. Ann Clin Microbiol Antimicrob **14**, 51 (2015).
10. Gunn, J. S., Miller, S. I.: PhoP-PhoQ activates transcription of *pmrAB*, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. J Bacteriol **178**, 6857–6864 (1996).
11. Breazeale, S. D., Ribeiro, A. A., McClerren, A. L., Raetz, C. R.: A formyltransferase required for polymyxin resistance in *Escherichia coli* and the modification of lipid A with 4-amino-4-deoxy-L-arabinose. Identification and function of UDP-4-deoxy-4-formamido-L-arabinose. J Biol Chem **280**, 14154–14167 (2005).
12. Kline, T., Trent, M. S., Stead, C. M., Lee, M. S., Sousa, M. C., Felise, H. B., Nguyen, H. V., Miller, S. I.: Synthesis of and evaluation of lipid A modification by 4-substituted 4-deoxy arabinose analogs as potential inhibitors of bacterial polymyxin resistance. Bioorg Med Chem Lett **18**, 1507–1510 (2008).
13. Gunn, J. S.: The *Salmonella* PmrAB regulon: Lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. Trends Microbiol **16**, 284–290 (2008).
14. Falagas, M. E., Rafailidis, P. I., Matthaiou, D. K.: Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. Drug Resist Updat **13**, 132–138 (2010).
15. Cheng, H. Y., Chen, Y. F., Peng, H. L.: Molecular characterization of the PhoPQ-PmrD-PmrAB mediated pathway regulating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* CG43. J Biomed Sci **17**, 60 (2010).
16. Cannatelli, A., D'Andrea, M. M., Giani, T., Di Pilato, V., Arena, F., Ambretti, S., Gaibani, P., Rossolini, G. M.: *In vivo* emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*

producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP *mgrB* regulator. Antimicrob Agents Chemother **57**, 5521–5526 (2013).
17. Kocsis, B., Kádár, B., Tóth, Á., Fullár, A., Szabó, D.: MgrB variants in colistin-susceptible and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST258. J Microbiol Immunol Infect (2016). doi:10.1016/j.jmii.2016.06.008 [Epub Ahead of Print].
18. Tóth, Á., Damjanova, I., Puskás, E., Jánvári, L., Farkas, M., Dobák, A., Böröcz, K., Pászti, J.: Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone in Hungary. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **29**, 765–769 (2010).
19. Baik, S. C., Kim, K. M., Song, S. M., Kim, D. S., Jun, J. S., Lee, S. G., Song, J. Y., Park, J. U., Kang, H. L., Lee, W. K., Cho, M. J., Youn, H. S., Ko, G. H., Rhee, K. H.: Proteomic analysis of the sarcosine-insoluble outer membrane fraction of *Helicobacter pylori* strain 26695. J Bacteriol **186**, 949–955 (2004).
20. Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V., Mann, M.: In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. Nat Protoc **1**, 2856–2860 (2006).
21. Markó, L., Szigeti, N., Szabó, Z., Böddi, K., Takátsy, A., Ludány, A., Kõszegi, T., Molnár, G. A., Wittmann, I.: Potential urinary biomarkers of disease activity in Crohn's disease. Scand J Gastroenterol **45**, 1440–1448 (2010).
22. Yeats, C., Bateman, A.: The BON domain: A putative membrane-binding domain. Trends Biochem Sci **28**, 352–355 (2003).
23. Yigit, H., Anderson, G. J., Biddle, J. W., Steward, C. D., Rasheed, J. K., Valera, L. L., McGowan, J. E., Jr., Tenover, F. C.: Carbapenem resistance in a clinical isolate of *Enterobacter aerogenes* is associated with decreased expression of OmpF and OmpC porin analogs. Antimicrob Agents Chemother **46**, 3817–3822 (2002).
24. Böddi, K., Takátsy, A., Szabó, S., Markó, L., Márk, L., Wittmann, I., Ohmacht, R., Montskó, G., Vallant, R. M., Ringer, T., Bakry, R., Huck, C. W., Bonn, G. K., Szabó, Z.: Use of fullerene-, octadecyl-, and triaconthyl silica for solid phase extraction of tryptic peptides obtained from unmodified and *in vitro* glycated human serum albumin and fibrinogen. J Sep Sci **32**, 295–308 (2009).
25. Zhao, G., Ceci, P., Ilari, A., Giangiacomo, L., Laue, T. M., Chiancone, E., Chasteen, N. D.: Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells. A ferritin-like DNA-binding protein of *Escherichia coli*. J Biol Chem **277**, 27689–27696 (2002).
26. Karas, V. O., Westerlaken, I., Meyer, A. S.: The DNA-binding protein from starved cells (Dps) utilizes dual functions to defend cells against multiple stresses. J Bacteriol **197**, 3206–3215 (2015).
27. Visweswaran, G. R., Leenhouts, K., van Roosmalen, M., Kok, J., Buist, G.: Exploiting the peptidoglycan-binding motif, LysM, for medical and industrial applications. Appl Microbiol Biotechnol **98**, 4331–4345 (2014).
28. Liu, Y. F., Yan, J. J., Lei, H. Y., Teng, C. H., Wang, M. C., Tseng, C. C., Wu, J. J.: Loss of outer membrane protein C in *Escherichia coli* contributes to both antibiotic resistance and escaping antibody-dependent bactericidal activity. Infect Immun **80**, 1815–1822 (2012).
29. Wang, Y.: The function of OmpA in *Escherichia coli*. Biochem Biophys Res Commun **292**, 396–401 (2002).
30. Llobet, E., March, C., Giménez, P., Bengoechea, J. A.: *Klebsiella pneumoniae* OmpA confers resistance to antimicrobial peptides. Antimicrob Agents Chemother **53**, 298–302 (2009).

31. Stoorvogel, J., van Bussel, M. J., van de Klundert, J. A.: Biological characterization of an *Enterobacter cloacae* outer membrane protein (OmpX). J Bacteriol **173**, 161–167 (1991).
32. Gayet, S., Chollet, R., Molle, G., Pagès, J. M., Chevalier, J.: Modification of outer membrane protein profile and evidence suggesting an active drug pump in *Enterobacter aerogenes* clinical strains. Antimicrob Agents Chemother **47**, 1555–1559 (2003).
33. Dupont, M., Dé, E., Chollet, R., Chevalier, J., Pagès, J. M.: *Enterobacter aerogenes* OmpX, a cation-selective channel *mar*- and *osmo*-regulated. FEBS Lett **569**, 27–30 (2004).
34. Kádár, B., Kocsis, B., Kristóf, K., Tóth, Á., Szabó, D.: Effect of antimicrobial peptides on colistin-susceptible and colistin-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter asburiae*. Acta Microbiol Immunol Hung **62**, 501–508 (2015).