

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TANJA RING

**OBČUTLJIVOST SLOVENSКИH IZOLATOV VEČKRATNO ODPORNIH
GRAMNEGATIVNIH BACILOV ZA KOLISTIN**

MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TANJA RING

**OBČUTLJIVOST SLOVENSКИH IZOLATOV VEČKRATNO ODPORNIH
GRAMNEGATIVNIH BACILOV ZA KOLISTIN**

**SUSCEPTIBILITY OF MULTIDRUG RESISTANT GRAMNEGATIVE BACILLI
TO COLISTIN**

MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo v Laboratoriju za bakteriološko diagnostiko črevesnih infekcij (ENT) in službo za spremljanje občutljivosti bakterij in gliv (SSO) pod mentorstvom prof. dr. Eve Ružić- Sabljic, dr. med in somentorstvom doc. dr. Mateje Pirš, dr. med.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Evi Ružić- Sabljic, dr. med., za vso strokovno pomoč, prijaznost in svetovanje pri izdelavi magistrskega dela. Zahvaljujem se somentorici asist. dr. Mateji Pirš, dr. med., za strokovno usmerjanje pri laboratorijskem delu ter za vso pomoč pri izdelavi magistrskega dela. Zahvalila bi se tudi vsem zaposlenim na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo, ki so mi pomagali pri izvedbi laboratorijskega dela. Zahvaljujem se tudi predsedniku komisije prof. dr. Borutu Štruklju, mag.farm. ter članu komisije doc. dr. Roku Frlanu mag.farm., za prijaznost ter prilagodljivost. Iskreno se zahvaljujem družini (še posebej mami in sestri) in prijateljem za spodbudne besede ter podporo. Predvsem pa se zahvaljujem Daniju, ki mi je tekom študija stal ob strani, me podpiral in vztrajal z mano ♥.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Eve Ružić- Sabljic, dr. med. in somentorstvom doc. dr. Mateje Pirš, dr. med.

Tanja Ring

Predsednik komisije: prof. dr. Borut Štrukelj, mag.farm.

Mentorica: prof. dr. Eva Ružić- Sabljic, dr.med.

Somentorica: doc. dr. Mateja Pirš, dr.med.

Član komisije: doc. dr. Rok Frlan, mag.farm.

VSEBINA

1. UVOD	1
1.1 POLIMIKSINI	1
1.2 KEMIJSKA STRUKTURA.....	1
1.3 ODNOS MED STRUKTURO IN DELOVANJEM.....	2
1.4 MEHANIZEM DELOVANJA	3
1.5 SPEKTER DELOVANJA	6
1.6 KLINIČNA UPORABA, INDIKACIJE V HUMANI MEDICINI.....	6
1.7 FARMAKOKINETIKA in FARMAKODINAMIKA.....	7
1.8 NEŽELENI UČINKI POLIMIKSINOV	8
1.9 OBLIKE IN MEHANIZMI ODPORNOSTI PROTI KOLISTINU	9
1.10 METODE ZA TESTIRANJE OBČUTLJIVOSTI ZA ANTIBIOTIKE.....	11
1.10.1 DILUCIJSKE METODE	11
1.10.1.1 Mikrodilucija v bujonu.....	12
1.10.1.2 Dilucijska metoda v agarju.....	12
1.11 POSEBNOSTI TESTIRANJA OBČUTLJIVOSTI ZA KOLISTIN	13
1.12 SUPERPOLIMIKSIN AGAR.....	13
1.13 PORABA KOLISTINA IN ODPORNOST PROTI KOLISTINU	14
2. NAMEN DELA.....	16
3. MATERIALI IN METODE	17
3.1 BAKTERIJSKI SEVI	17
3.1.1 Tehnični pripomočki in oprema za kultivacijo sevov	18
3.1.2 Kultiviranje bakterijskih sevov	18
3.2 MIKRODILUCIJSKA METODA DOLOČANJA MINIMALNIH INHIBITORNIH KONCENTRACIJ ZA ANTIBIOTIK KOLISTIN	20
3.2.1 Pripomočki in oprema za izvedbo mikrodilucijske metode	20
3.2.2 Priprava raztopin antibiotika kolistin	21
3.2.3 Izbira bujona.....	24
3.2.4 Izbira mikrotitrskih plošč	24
3.2.5 IZVEDBA KLASIČNE MIKRODILUCIJE ZA KOLISTIN	25

3.2.5.1	Nanos raztopin antibiotika na mikrotitrsko ploščico.....	26
3.2.5.2	Priprava bakterijske suspenzije oziroma inokuluma.....	27
3.2.5.3	Nanos inokuluma na mikrotitrsko ploščico.....	27
3.2.5.4	Kontrola kakovosti	28
3.2.5.5	Inkubacija	28
3.2.5.6	Odčitavanje rezultatov.....	28
3.2.5.7	Kontrola inokuluma.....	30
3.3	PRESEJALNO TESTIRANJE S SUPERPOLIMIKSIN AGARJEM.....	30
3.3.1	Tehnični pripomočki in oprema	30
3.3.2	Sestava in priprava Superpolimiksin agarja	30
3.3.3	Izvedba presejalnega testiranja s Superpolimiksin agarjem.....	31
3.3.4	Analiza podatkov presejalnega testiranja s Superpolimiksin agarjem in Minimalno inhibitorno koncentracijo kolistina.....	33
3.4	ODKRIVANJE PLAZMIDNO POGOJENE ODPORNOSTI PROTI KOLISTINU (GEN MCR-1) Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO	34
4.	REZULTATI.....	36
4.1	OPREDELITEV MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE IZBRANIH IZOLATOV <i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i> CRA _b ZA KOLISTIN.....	36
4.2	OPREDELITEV MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE IZBRANIH IZOLATOV <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> CRP _s ZA KOLISTIN	37
4.3	OPREDELITEV MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE IZBRANIH IZOLATOV <i>ESCHERICHIA COLI</i> CRE ZA KOLISTIN	37
4.4	OPREDELITEV MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE IZBRANIH IZOLATOV <i>KLEIBSIELLA PNEUMONIAE</i> CRE ZA KOLISTIN.....	38
4.5	OPREDELITEV MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE IZBRANIH IZOLATOV <i>ENTEROBACTER</i> spp. CRE ZA KOLISTIN.....	39
4.6	SKUPNA OBCUTLJIVOST VEČKRATNO ODPORNIH PO GRAMU NEGATIVNIH BACILOV	40

4.7 DETEKCIJA GENA MCR-1 PRI IZOLATIH VEČKRATNO ODPORNIH PO GRAMU NEGATIVNIH BACILOV, KI SO ODPORNI PROTI KOLISTINU	40
4.8 PRESEJALNI TEST SUPERPOLIMIKSIN AGAR	41
5. RAZPRAVA	44
6. SKLEP.....	48
7. LITERATURA.....	49

KAZALO SLIK

Slika 1: Struktura kolistina A in B, kolistimetata A in B in polimiksina B1 in B2 (8)	1
Slika 2: kolistinijev sulfat; s puščicami so označena mesta za sulfometiliranje prostih amino skupin (11).....	2
Slika 3: Celična stena po Gramu negativnih bakterij (17) (levo) ter zgradba lipopolisaharida (desno); GlcNAc: N- acetilglukozamin; Kdo: 3-deoksi-D-mano-okt-2-ulosonična kislina; Hep: L-glicero-D-mano-heptoza; Glc: D-glukoza; Gal: galaktoza; EtN: etanolamin; P: fosfatne skupine.....	4
Slika 4: Shematska predstavitev konvergentne poti za biosintezo lipida A-Kdo2 (16) Pi: angl. inorganic phosphate; GlcN: glukozamin; ACP: angl. acyl carrier protein; KdsD: arabinoza 5P izomeraza;.....	5
Slika 5: Farmakokinetična pot polimiksinov (8)	8
Slika 6: Trend porabe polimiksinov (ATC skupina J01XB) v bolnišničnem sektorju v Sloveniji od leta 1997 do 2015 prikazan kot DDD (daily defined dose)/100 prebivalcev/dan (50).....	14
Slika 7: EUCAST podatki o internacionalni distribuciji minimalne inhibitorne koncentracije kolistina za <i>Acinetobacter baumannii</i> (51)	15
Slika 8: EUCAST podatki o internacionalni distribuciji minimalne inhibitorne koncentracije kolistina za <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (51)	15
Slika 9: EUCAST podatki o internacionalni distribuciji minimalne inhibitorne koncentracije kolistina za <i>Escherichia coli</i> (51).....	15
Slika 10: EUCAST podatki o internacionalni distribuciji minimalne inhibitorne koncentracije kolistina za <i>Klebsiella pneumoniae</i> (51).....	15
Slika 11: EUCAST podatki o internacionalni distribuciji minimalne inhibitorne koncentracije kolistina za <i>Enterobacter aerogenes</i> (51).....	15

Slika 12: EUCAST podatki o internacionalni distribuciji minimalne inhibitorne koncentracije kolistina za <i>Enterobacter cloacae</i> (51)	15
Slika 13: Izolacija čiste kulture s cepilno zanko (levo); ter sterilna cepilna zanko iz polisterena, modra 10 µl (desno),* z A, B, C, D so označene serije potez cepljenja bakterijskih izolatov do posameznih kolonij (54)	19
Slika 14: Priprava željenih koncentracij kolistina: A: 20 mL raztopine s koncentracijo c_1 ; B: 20 mL kationsko prilagojenega Mueller-Hinton bujona; C: raztopina s koncentracijo c_2	23
Slika 15: Model mikrotitrne ploščice	25
Slika 16: Shema za izvedbo mikrodilucije s koncentracijami kolistina v µg/mL. Prikazane so koncentracije kolistina, testirani izolati (izolat 1, izolat 2, izolat 3) ter PK+ (pozitivna kontrola) ter NK- (negativna kontrola).....	25
Slika 17: Stojalo z bralnim zrcalom za mikrotitrsko ploščo	29
Slika 18: Različne variacije delovnih shem na Superpolimiksin agarju; na levi sliki testiramo dva izolata, na desni sliki testiramo dvajset izolatov; PK: pozitivna kontrola, NK: negativna kontrola	32
Slika 19 : Shematski prikaz verižne reakcije s polimerazo (65).....	34
Slika 20: Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK µg/mL) kolistina za izolate <i>A. baumannii</i> , ki so odporni proti karbapenemom (CRAb).....	36
Slika 21: Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK µg/mL) kolistina za izolate <i>P. aeruginosa</i> , ki so odporni proti karbapenemom (CRPs).....	37
Slika 22: Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK µg/mL) kolistina za izolate <i>E. coli</i> , ki so odporni proti karbapenemom (CRE).....	38
Slika 23: Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK µg/mL) kolistina za izolate <i>K. pneumoniae</i> , ki so odporni proti karbapenemom (CRE).....	38
Slika 24: Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK µg/mL) kolistina za izolate <i>Enterobacter</i> spp., ki so odporni proti karbapenemom (CRE).....	39
Slika 25: Rezultati pomnoževanja gena <i>mcr-I</i> s PCR metodo pri izolatih odpornih na kolistin; NK-: negativna kontrola; PK+: pozitivna kontrola	40
Slika 26: Superpolimiksin agar in rast bakterij, ki so odporne proti kolistinu; Levo zgoraj vidimo pozitivno rast kontrolnega seva <i>Escherichia coli</i> NCTC 13846 (<i>mcr-I</i> pozitiven), levo spodaj vidimo negativno rast kontrolnega seva <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, ter desno spodaj vidimo pozitivno rast testiranega izolata <i>K. pneumoniae</i>	42

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Protokol priprave krvnega agarja	18
Preglednica II: Kontrola kakovosti (63)	28
Preglednica III: Kriteriji za opredelitev občutljivosti (44).....	29
Preglednica IV: Priprava Superpolimiksin agarja po Nordmann in sod. (49).....	31
Preglednica V: Tabela 2x2.....	33
Preglednica VI: Pogoji verižne reakcije s polimerazo za <i>mcr-1</i> gen (37, 65):	35
Preglednica VII: Izolati in njihova minimalna inhibitorna koncentracija ($\mu\text{g/mL}$) za kolistin, pri katerih nismo zaznali rasti kolonij (0-1 CFU/mL) na Superpolimiksin agarju	41
Preglednica VIII: Izolati in njihova minimalna inhibitorna koncentracija ($\mu\text{g/mL}$) za kolistin, ki so kazale rast več kot 1 kolonije (≤ 1 CFU/mL) na Superpolimiksin agarju	42
Preglednica IX: Vrednotenje testiranih bakterij z metodo presejalnega testiranja s Superpolimiksin agarjem.....	43
Preglednica X: Rezultati senzitivnosti, specifičnosti, pozitivne in negativne napovedane vrednosti *(RP: resnično pozitivni; LN: lažno negativni;RN: resnično negativni; LP: lažno pozitivni).....	43

POVZETEK

Kolistin spada med ciklične polipeptidne antibiotike- polimiksine, ki so učinkoviti pri zdravljenju okužb povzročenih z večino po Gramu negativnih bakterij. Njegova uporaba v humani medicini je bila v sedemdesetih letih prejšnjega stoletja zaradi nefro- in nevrotoksičnosti ter boljše učinkovitosti ostalih antibiotikov večinoma opuščena. Danes se poraba kolistina v humani medicini povečuje, predvsem na račun zdravljenja okužb z večkratno odpornimi po Gramu negativnimi bakterijami (VOB-GN). Problematične so predvsem proti karbapenemom odporne enterobakterije *Escherichia coli* in *Klebsiella pneumoniae*, ter *Pseudomonas aeruginosa* in *Acinetobacter baumannii*, ki sta odporna proti karbapenemom in drugim betalaktamskim antibiotikom. Terapevtske možnosti za zdravljenje okužb s tovrstnimi izolati so omejene, kar je povečalo zanimanje za polimiksine, ki pogosto ostajajo zadnja možnost antibiotičnega zdravljenja. S povečano uporabo kolistina opazamo tudi porast deleža VOB-GN, ki izkazujejo polimiksinsko odpornost. Do pred kratkim so bili edini znani mehanizmi odpornosti proti kolistinu posledica kromosomskih mutacij, leta 2015 pa so na Kitajskem odkrili prvi primer plazmidno zapisane odpornosti proti kolistinu, *mcr-1 gen*. Plazmidno pogojena odpornost je zelo zaskrbljujoč pojav, saj se lahko prenaša znotraj ali med bakterijski vrstami in se lahko razširi tudi med človeške patogene. Po smernicah EUCAST velja, da je mikrodilucijska metoda edini primeren način določanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) za kolistin. Naš cilj je bil opredeliti občutljivost VOB-GN za kolistin, z referenčno metodo mikrodilucije in ugotoviti, ali bi lahko med rutinskim testiranjem antibiotične občutljivosti s presejalnim testiranjem izolatov uporabili selektivni polimiksinski agar, s katerim bi hitro odkrivali izolate, pri katerih je nujna opredelitev MIK. V raziskavo smo vključili 212 izolatov VOB-GN ter glede na smernice EUCAST opredelili 10/212 (4,7 %) izolatov odpornih na kolistin (MIK \geq 4 μ g/mL). Odporne izolate 10/212 (4,7 %) smo testirali na *mcr-1 gen* s PCR metodo. Vseh 10/212 izolatov je bilo negativnih na *mcr-1 gen*, kar kaže na to, da pri izolatih ne gre za plazmidno pogojeno odpornost. V drugem delu smo ocenili uspešnost presejalnega testiranja s Superpolimiksin agarjem. Rezultati so pokazali 100% senzitivnost, 99% specifičnost, 100% negativno napovedano vrednost ter 77% pozitivno napovedano vrednost. Pokazali smo, da je presejalno testiranje z agarjem obetavna metoda in da jo lahko uporabljamo med rutinskim testiranjem antibiotične občutljivosti ter MIK opredelimo le pri izolatih, ki porastejo na selektivnem agarju. S tem izločimo del izolatov, pri katerih ocena MIK ni potrebna ter zmanjšamo stroške testiranja in prispevamo k zgodnjemu odkrivanju VOB-GN, ki imajo zmanjšano občutljivost za kolistin.

KLJUČNE BESEDE

Kolistin, polimiksini, večkratno odporni po Gramu negativni bacili (VOB-GN), odpornost proti antibiotikom, *mcr-1*, mikrodilucija, presejalni test, Superpolimiksin agar, minimalna inhibitorna koncentracija (MIK)

ABSTRACT

Colistin belongs to a class of cyclic polypeptide antibiotics-polymyxins, which are effective against most infections caused by Gram-negative bacteria. In the 1970s their use in human medicine was abandoned due to toxicity, especially nephro- and neuro-toxicity and better efficacy of other antibiotics. Recently, the use of colistin in human medicine has been increasing, mainly as a result of threatening infections caused by multidrug resistant gram-negative bacteria (MDRGNB). Among these are mainly the carbapenem resistant enterobacteria *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, as well as *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*, resistant to carbapenems and other beta-lactam antibiotics. Therapeutic options for the treatment of infections with these isolates are limited, which has increased the interest in polymyxins that often remain the last resort for antibiotic treatment. With increased use of colistin an increase in the proportion of MDRGNB that exhibit polymyxin resistance has also been noticed. Until recently, the only known mechanisms of colistin resistance resulted from chromosomal mutations, but in 2015 the first example of plasmid-encoded resistance to colistin (*mcr-1*) was discovered in China. Plasmid-encoded resistance is a very worrying phenomenon, since it can be transmitted within or between bacterial species and can also spread to human pathogens. According to the EUCAST guidelines, the microdilution method is the only suitable way of determining minimal inhibitory concentration (MIC) for colistin. The goal of our study was to determine the susceptibility of MDRGNB for colistin, using the reference method of microdilution, and to determine whether we could screen isolates, using selective agar, during the routine antimicrobial susceptibility testing, to quickly detect isolates that require the determination of colistin MIC. The study included 212 MDRGNB isolates. According to EUCAST guidelines, we identified 10/212 (4,7 %) colistin resistant isolates ($MIC \geq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$), which were then tested for *mcr-1* gene with the PCR method. All 10/212 (4,7 %) isolates were negative for the *mcr-1* gene, indicating that isolates do not have a plasmid-dependent resistance. In the second part of our study, we evaluated the effectiveness of screening using SuperPolymyxin agar. The results showed 100% sensitivity, 99% specificity, 100% negative and 77% positive predicted value. We have shown that agar screening is a promising method and can be used during routine susceptibility testing and MIC can be defined only for isolates that grow on the selective agar. This eliminates a large part of the isolates in which the definition of MIC is not necessary and significantly reduces the cost of testing these isolates and contributes to the early detection of MDRGNB with reduced susceptibility to colistin.

KEY WORDS

Colistin, polymyxins, multiple drug resistance gramnegative bacteria (MDRGNB), antibiotic resistance, *mcr-1*, microdilution, screening test, Superpolymyxin agar, minimal inhibitory concentration (MIC)

SEZNAM OKRAJŠAV

ATCC	organizacija (<i>angl.</i> American Type Culture Collection)
CAMHB	kationsko prilagojen Mueller-Hinton bujon (<i>angl.</i> Cation adjusted Mueller Hinton Bujon)
CFU	enota, kolonijsko število (<i>angl.</i> colony forming units)
CLSI	Inštitut za klinične in laboratorijske standarde (<i>angl.</i> Clinical Laboratory Standards Institute)
CRAb	proti karbapenemom odporne bakterije <i>Acinetobacter baumannii</i> (<i>angl.</i> carbapenem resistant <i>Acinetobacter baumannii</i>)
CRE	Proti karbapenemom odporne Enterobakterije (<i>angl.</i> carbapenem resistant <i>Enterobacteriaceae</i>)
CRPs	proti karbapenemom odporne bakterije <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (<i>angl.</i> carbapenem resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
Dab	diaminobutanojska kislina (<i>angl.</i> diaminobutyric acid)
DNK	deoksiribonukleinska kislina (<i>angl.</i> deoxyribonucleic acid, DNA)
EUCAST	Evropska komisija za testiranje protimikrobne občutljivosti (<i>angl.</i> European Union Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)
EMB	Eosin metilen modro (<i>angl.</i> Eosin methylene blue)
i.e.	internacionalna enota (<i>angl.</i> IU internacional unit)
Kdo	3-deoksi-D-mano-okt-2-ulosonična kislina
LPS	lipopolisaharid
Lpx	lipoprotein X (<i>angl.</i> lipid expression)
MCR	mobilised or modern colistin resistance
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
NCTC	organizacija (<i>angl.</i> National Collection of Type Cultures)
NKM	natrijev kolistimetat (<i>angl.</i> colistimethate, CMS)
OprH	H protein zunanje membrane (<i>angl.</i> outer membrane protein H)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (<i>angl.</i> Polymerase chain reaction)
SAR	odnos med strukturo in delovanjem (<i>angl.</i> Structure activity relationship)
SPA	Superpolimiksin agar (<i>angl.</i> Superpolymyxin agar)
spp	vrsta (<i>lat.</i> species)
VOB-GN	večkratno odpornimi po Gramu negativni bacili

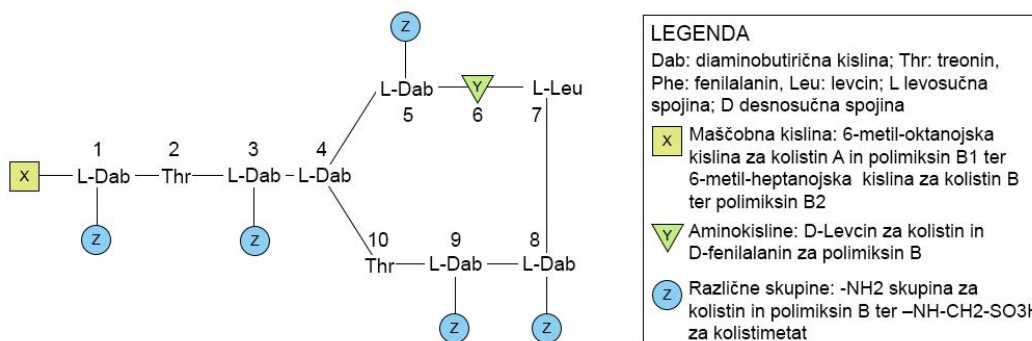
1. UVOD

1.1 POLIMIKSINI

Polimiksini so ciklični kationski polipeptidni antibiotiki, ki delujejo na bakterijsko celično membrano (1). Prvič so jih izolirali leta 1947 iz po Gramu pozitivne bakterije *Paenibacillus polymyxa*, znane tudi kot *Bacillus polymyxa* (2). So baktericidni in učinkoviti pri zdravljenju okužb povzročenih z nekaterimi po Gramu negativnimi bakterijami. Poznamo 5 vrst polimiksinskih antibiotikov (polimiksin A, B, C, D, E). Polimiksin E (kolistin) in polimiksin B sta glavna predstavnika skupine polimiksinov in tudi edina antibiotika iz te skupine, ki se uporabljata v humani klinični praksi (1, 3).

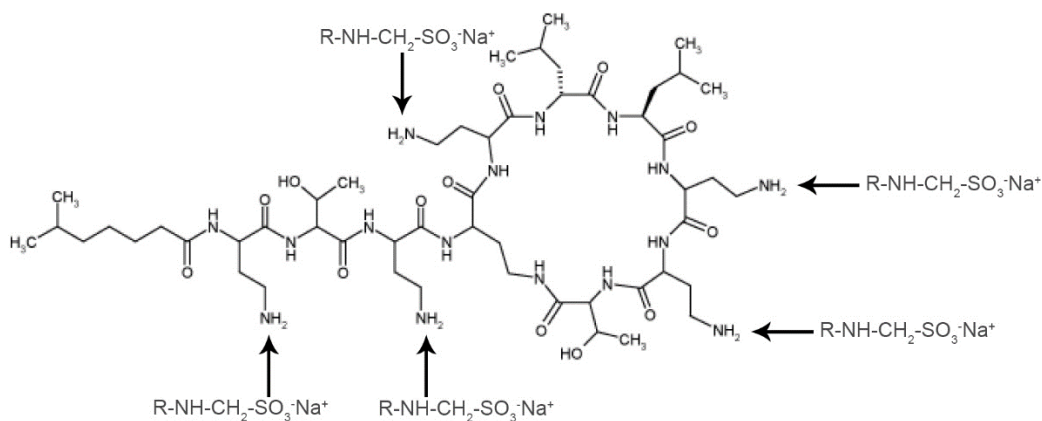
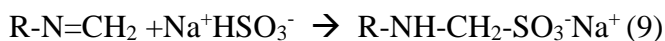
1.2 KEMIJSKA STRUKTURA

Osnovno strukturo polimiksinov (**Slika 1**) predstavlja ciklični heptapeptid s tripeptidno stransko verigo, na katero je preko amidne vezi vezana maščobna kislina na N-terminalnem delu tripeptida. Tako so polimiksini dejansko po strukturi dekapeptidi sestavljeni iz treh delov: heptapeptidni obroč, tripeptidna stranska veriga ter maščobna kislina (**Slika 1**) (4, 5). Polimiksin E in polimiksin B se med seboj razlikujeta v eni aminokislini na peptidnem obroču in sicer na poziciji 6 (**Slika 1**), kjer kolistin vsebuje aminokislino D-levcin, polimiksin B pa aminokislino D-fenilalanin (6). Kolistin je kationski ciklični dekapeptid, ki vsebuje aminokislino D-levcin in L-treonin ter α - γ -diaminobutanojsko kislino (Dab), ki je povezana z maščobnima kislinama: 6-metil-oktanojska kislina (Kolistin A) ali 6-metil-heptanojska kislina (kolistin B) (7).



Slika 1: Struktura kolistina A in B, kolistimetata A in B in polimiksina B1 in B2 (8)

Polimiksin E (kolistin) poznamo v dveh oblikah kot *kolistinijev sulfat* (**Slika 2**) in kot neaktivno predzdravilo *natrijev kolistimetat* (NKM). Pojma “kolistin” in “natrijev kolistimetat” ne smemo enačiti, saj gre za dve različni obliki kolistina (5). NKM nastane z reakcijo kolistina, formaldehida in natrijevega bisulfata ($\text{Na}^+\text{HSO}_3^-$) (8, 9), ki nato v vodnih raztopinah ter *in vivo*, v bioloških tekočinah hidrolizira v zdravilno učinkovino kolistin oziroma kolistinijev sulfat ter druge neaktivne stranske produkte (8, 10). S sulfometiliranjem prostih amino skupin na kolistinijevem sulfatu (**Slika 2**) poskušamo zmanjšati ali spremeniti neželene stranske učinke, tako da na proste $-\text{NH}_2$ skupine najprej vežemo formaldehid (HCHO) in nato v drugi stopnji reakcije še natrijev bisulfat ($\text{Na}^+\text{HSO}_3^-$) in tako dobimo sulfometilni derivat (9):



Slika 2: kolistinijev sulfat; s puščicami so označena mesta za sulfometiliranje prostih amino skupin (11)

1.3 ODNOS MED STRUKTURO IN DELOVANJEM

Polimiksini so po kemijski strukturi najbolj podobni kationskim peptidnim antibiotikom (12). Polimiksini imajo izjemne strukturne lastnosti: so polikationi (visoko polarne molekule s pH 7,4) in imajo lipofilne (hidrofobne) in hidrofilne (polarne) lastnosti. Polarnost v strukturi predstavlja pet diaminobutirnih kislin (Dab), hidrofobnost pa maščobna kislina na N-terminalnem delu strukture ter tudi poziciji 6 in 7 v heptapeptidnem obroču (**Slika 1**). Amfifilnost je glavna lastnost skoraj vseh peptidnih antibiotikov in je bistvenega pomena za antibakterijsko aktivnost polimiksinov. Ciklični heptapeptid in linearni tripeptid polimiksina zagotavljata optimalno razdaljo med vsako domeno, kar omogoča polimiksinom amfifilnost

(mešanica hidrofilnih in lipofilnih skupin) (13, 14). Današnje razumevanje odnosa med strukturo in delovanjem (SAR) polimiksinov temelji na dejstvu, da so za protimikrobno aktivnost polimiksinov pomembne elektrostatske in hidrofobne interakcije z lipidom A. Za razvoj novih analogov oziroma za izboljšanje antibakterijske aktivnosti polimiksinov in za zmanjšanje njihove toksičnosti je v strukturi polimiksinov ključnih 5 elementov (15):

- hidrofobna N-terminalna maščobna veriga
- pozitiven naboj stranskih verig Dab
- linearni tripeptidni segment
- hidrofobne lastnosti na položajih 6 in 7 v cikličnem heptapeptidnem obroču
- ciklični heptapeptid (15)

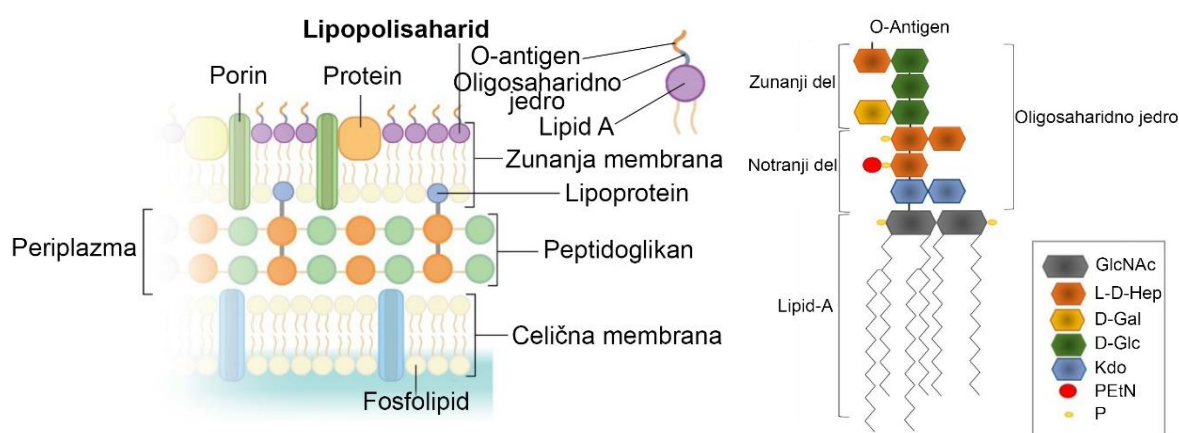
S pomočjo jedrske magnetne resonance je bilo ugotovljeno, da se kompleks polimiksin–lipid A stabilizira preko elektrostatskih in hidrofobnih interakcij (13). Pozitivno nabite stranske verige Dab v strukturi polimiksina tvorijo elektrostatske interakcije z negativno nabitimi fosfatnimi skupinami lipida A. Modifikacije fosfatnih skupin v lipidu A (npr. dodajanje 4-amino-4-deoksi arabinoze) pogosto opazimo pri polimiksinsko odpornih izolatih. Te modifikacije blokirajo elektrostatske interakcije med fosfatnimi skupinami lipida A ter pozitivno nabitimi molekulami polimiksina (Dab) in tako destabilizirajo kompleks polimiksin-lipid A. Za razvoj novih polimiksinskih analogov je tako ključno poznavanje SAR polimiksinov oziroma strukturno poznavanje kompleksa polimiksin–lipid A (15).

1.4 MEHANIZEM DELOVANJA

Struktura lipopolisaharida

Za razumevanje mehanizmov polimiksinske antibakterijske aktivnosti moramo poznati tudi zgradbo zunanje bakterijske celične membrane po Gramu negativnih bakterij (**Slika 3**). Zunanjo membrano predstavlja asimetrični lipidni dvosloj (zunanji in notranji). Notranji lipidni sloj je podoben fosfolipidnemu sloju citoplazemske membrane, medtem ko je zunanji lipidni sloj sestavljen predvsem iz bakterijskega lipopolisaharida (LPS), proteinov in fosfolipidov (15). LPS oziroma endotoksin je sestavni del zunanje membrane skoraj vseh po Gramu negativnih bakterij in je običajno sestavljen iz *antigena O*, *oligosaharidnega jedra* in *lipida A* (**Slika 3**). Protimikrobna aktivnost polimiksinov je večinoma vezana na Lipid A (16). Lipid A predstavlja hidrofobni del LPS in je sestavljen iz bis-fosforiliranega glukozaminskega disaharida, na katerega so z amidno ali estrsko vezjo vezane številne maščobne kisline s katerimi je LPS zasidran v bakterijsko membrano. Divalentni kationi

(Mg^{2+} in Ca^{2+}) so pomembni za fosfoestrsko funkcijo lipida A in pripomorejo k stabilizaciji LPS molekul (15). Oligosaharidni središčni del je neposredno pripet na lipid A in tako povezuje lipid A z antigenom O. Oligosaharid je običajno razdeljen na notranje in zunanje jedro. Notranje jedro je združeno z lipidom A in je sestavljeno iz L-glicero-D-mano-heptoze in 3-deoksi-D-mano-okt-2-ulosonične kisline, znane tudi kot 2-keto-3-deoksi-oktanoat (Kdo). Zunanje jedro je povezano z antigenom O in je sestavljeno iz običajnih sladkorjev, kot so heksoze in heksozamini. Antigen O predstavlja distalni oz. najbolj zunanji del molekule LPS in je sestavljen iz ponavljajočih se polisaharidnih enot. Značilno je, da je antigen O odsoten v številnih po Gramu-negativnih vrstah. Predstavlja hidrofilno in imunodominantno domeno LPS (16).

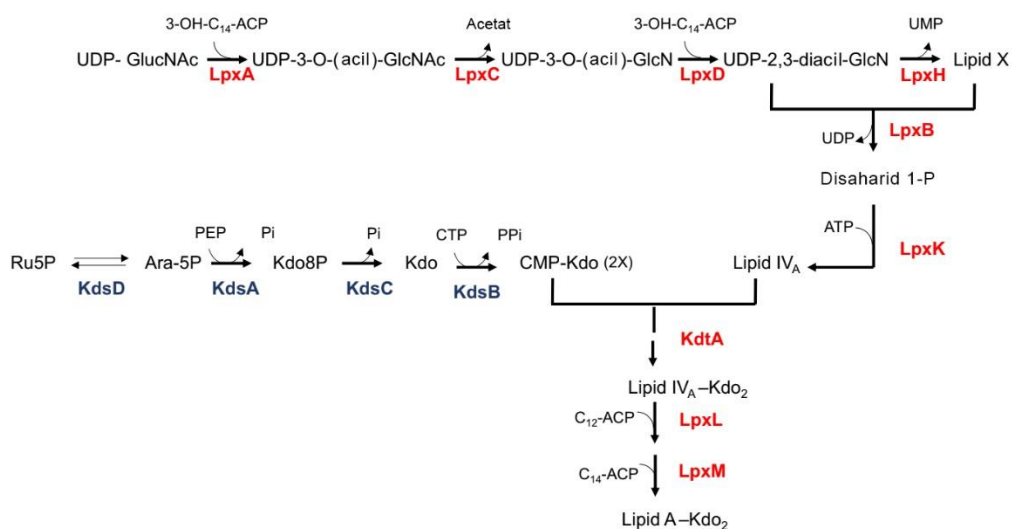


Slika 3: Celična stena po Gramu negativnih bakterij (17) (levo) ter zgradba lipopolisaharida (desno) (16); GlcNAc: N- acetilglukozamin; Kdo: 3-deoksi-D-mano-okt-2-ulosonična kislina; Hep: L-glicero-D-mano-heptoza; Glc: D-glukoza; Gal: galaktoza; EtN: etanolamin; P: fosfatne skupine

Biosinteza lipopolisaharida

Biosinteza lipida A ter oligosaharidnega jedra nastopi v citoplazmi notranje membrane. Prva reakcija, ki poteče pri biosintezi lipida A je aciliranje sladkornega nukleotida UDP-N-acetilglukozamina (*angl.* uridine diphosphate acetylglucosamine, UDP-GlcNAc) z LpxA (*angl.* lipidA expression) encimom. Nato sledi deacetiliranje z encimom LpxC in zaporedne reakcije z acetiltransferazo LpxD, pirofosfataze LpxH in disaharidno sintazo LpxB s katerimi dobimo lipid IV_A oz. β-1-6 disaharidni skelet na katerega so pritrjene štiri verige maščobnih kislin (16, 18). Sinteza Kdo oz. 2-keto-3-deoksi-oktanoata poteka ločeno (19) in je katalizirana z arabinozo 5P izomerazo (KdsD), ki je pogosto tarča načrtovanja novih antibiotikov. Lipidni del IV_A-Kdo₂ nastane s CMP (*angl.* cytidine monophosphate)-Kdo transferazo, ki zaporedno doda dva aktivirana CMP-ostanka k lipidu IV_A. Heksa-acilirani

lipidA-Kdo2 se nato sintetizira z delovanjem aciltransferaze LpxL in LpxM (Slika 4). Sladkorji, ki sestavljajo oligosaharidno jedro, so povezani z lipidom A-Kdo2 prek specifične glikoziltransferaze in tako tvorijo strukturo sestavljeno iz oligosaharidnega jedra ter lipida A. Struktura oligosaharid-lipida A je prek svojih hidrofilnih lastnosti zasidrana v notranjo membrano. Prek ATP (adenozin-trifosfat) vezavnega transporterja (MsbA) je citoplazma prek notranje membrane povezana s periplazmo. Ponavljajoče se polisaharidne enote antigena O so sintetizirane v citoplazmi zunanje membrane preko wyz- ali drugih sinteznih poti. Biosintezne poti antigena O ter strukture oligosaharid-lipid A se združijo prek verižne reakcije z ligazo na periplazmi zunanje membrane, ki je katalizirana z WaaL ligazo s katero dobimo “zrel” LPS (16).



Slika 4: Shematska predstavitev konvergentne poti za biosintezo lipida A-Kdo2 (16) Pi: *angl.* inorganic phosphate; GlcN: glukozamin; ACP: *angl.* acyl carrier protein; KdsD: arabinoza 5P izomeraza;

Mehanizem delovanja polimiksinov

LPS je osnovna tarča polimiksinov, vendar natančen mehanizem delovanja polimiksinov še ni povsem pojasnjen in verjetno deluje na več tarčnih mest hkrati (8). Osnovna tarča protimikrobne aktivnosti polimiksinov so molekule LPS na zunanji bakterijski celični membrani. Gre za elektrostatsko interakcijo med kationskim polipeptidom (kolistin) oz. pozitivno nabito α - γ -diaminobutirno kislino (Dab) in anionskim nabojem LPS oz. negativnim nabojem fosfatnih skupin lipida A (8). Polimiksini delujejo baktericidno s tem, ko na podoben način kot kationski detergenti razgrajujejo fosfolipidni dvosloj. Kolistin izpodrine dvovalentne magnezijeve (Mg^{2+}) in kalcijeve (Ca^{2+}) katione, ki stabilizirajo lipopolisaharidne molekule negativno nabitih fosfatnih skupin membranskih lipidov, kar

povzroči lokalno motnjo na zunanji bakterijski membrani (20). Hidrofobne N-terminalne maščobne kisline ter poziciji 6 in 7 v heptapeptidu se usidrajo v zunanjo bakterijsko membrano (15) in s tem pride do destabilizacije LPS (7). Rezultat tega je povečana prepustnost celične membrane, kar vodi do razpada celične strukture, uhajanja celične vsebine in posledično povzroči celično smrt (7, 8). Kolistin deluje tudi na endotoksično aktivnost lipida A, komponento lipopolisaharidnega sloja v celični steni po Gramu negativnih bakterij. Toksični učinek LPS je večinoma vezan na lipid A, ta spodbudi makrofage k sproščanju večjih količin vnetnih mediatorjev (citokinov), kar posledično lahko pripelje do šoka. Kolistin z vezavo na lipopolisaharid nevtralizira tudi lipid A in tako prepreči sproščanje teh citokinov (8, 21). Poleg zgoraj omenjenih mehanizmov je pri polimiksinih znana tudi inhibicija tipa II, NADH-kinon oksidoreduktaza ali NDH-2 (nikotinamid adenin dinukleotid), ki igra osrednjo vlogo pri respiratorni presnovi bakterij (22). Biokemične študije so tudi pokazale protimikrobno aktivnost polimiksinov zaradi nastajanja hidroksilnih radikalov prek Fentonove reakcije pri *A. baumannii* in tudi *E. coli* (23).

1.5 SPEKTER DELOVANJA

Polimiksini imajo ozek protibakterijski spekter delovanja. Delujejo na po Gramu negativne aerobne bakterije, ne delujejo na po Gramu negativne koke (npr. *Neisseria* spp.), po Gramu pozitivne bakterije, anaerobne bakterije, parazite in glive. Aktivni so proti večini bakterij, ki spadajo v družino enterobakterij, vključno z *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp. in *Shigella* spp., niso učinkoviti proti rodu Proteae (*Proteus* spp., *Morganella morganii*, *Providencia* spp.). Polimiksini delujejo tudi na nefermentativne po Gramu negativne bakterije kot so *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* in *Stenotrophomonas maltophilia*. Poleg rodu Proteae je naravna oziroma intrinzična odpornost proti polimiksinom opisana tudi pri *Burkholderia mallei* in *B. cepacia*, *Chromobacterium* spp., *Edwardsiella* spp., *Brucella* spp., *Legionella* spp., *Campylobacter* spp. in *Vibrio cholerae* (7, 8).

1.6 KLINIČNA UPORABA, INDIKACIJE V HUMANI MEDICINI

Polimiksin E (kolistin) je odobren za klinično uporabo v Evropski uniji in je na voljo v dveh oblikah in sicer kot kolistinijev sulfat in kot neaktivno predzdravilo NKM (24, 25). Namenjena sta predvsem za zdravljenje resnih, življenjsko ogrožujočih okužb, ki jih

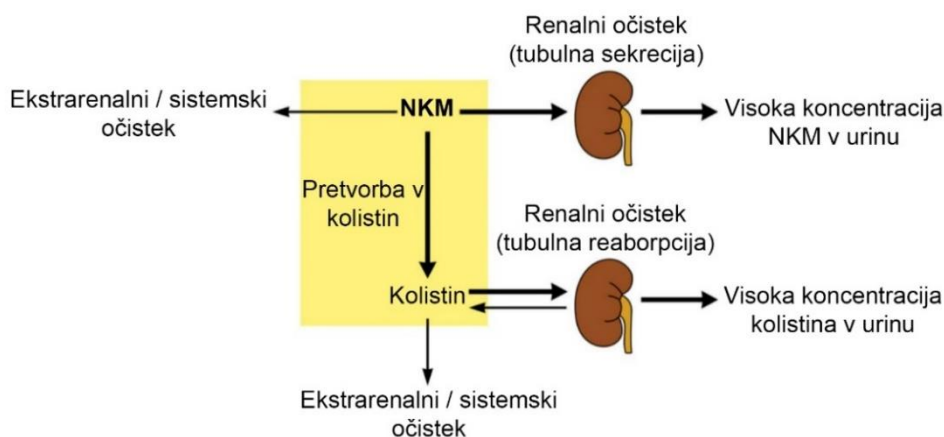
povzročajo VOB-GN. Uporabljata se brez starostnih omejitev, vendar so podatki za nekatere skupine bolnikov pomanjkljivi (bolniki z okvaro ledvic in jeter ter pediatrični bolniki), zato je zdravljenje s polimiksini strogo omejeno samo za zdravljenje zelo resnih okužb, s čimer vzdržujemo učinkovitost kolistina proti VOB-GN (25).

Kolistinijev sulfat se uporablja peroralno v obliki tablet ali sirupa za dekontaminacijo črevesja (nevtropenični bolniki in bolniki z jetrno encefalopatijo). Topikalno se uporablja pri raznih bakterijskih okužbah kože (okužene rane, opekline idr.), pri vnetju očesne veznice in sluhovoda (3, 24). Za zdravljenje sistemske potekajočih okužb je potrebna parenteralna aplikacija, saj se polimiksini po *per os* aplikaciji skoraj ne resorbirajo iz prebavil (3). Zaradi visoke ravni toksičnosti, ki je povezana s parenteralno uporabo, so za zdravljenje sistemskih okužb razvili NKM (25). Natrijev kolistimetat je manj toksično predzdravilo kolistina z manj neželenimi učinki (26) in se uporablja parenteralno, intravensko ali intramuskularno. Pri intramuskularni aplikaciji je absorbcija variabilna, nezanesljiva in nepredvidljiva, prav tako lahko povzroči hude lokalne bolečine, zato je takšna aplikacija v klinični praksi redka (24). Inhalacijsko uporabimo NKM za zdravljenje kroničnih pljučnih okužb, ki jih povzroča *P. aeruginosa*, pri bolnikih s cistično fibrozo (25, 26). Polimiksini imajo od koncentracije odvisen baktericiden učinek na občutljive bakterije (27).

1.7 FARMAKOKINETIKA in FARMAKODINAMIKA

Informacij o farmakokinetiki in farmakodinamiki NKM in kolistina je malo. Za kolistin je bilo v preteklosti opravljenih le malo kliničnih študij. Posledično so obstoječi podatki o kolistinu pomanjkljivi, nepopolni, stari ali nezanesljivi. Podatki o odmerkih temeljijo na maloštevilnih podatkih, zlasti je malo podatkov o varnosti velikih odmerkov ($>6 \times 10^6$ internacionalnih enot (i.e.) /dan) in o odmerkih za posebne populacije (bolniki z okvaro ledvic in otroci). Priporočen odmerek NKM za zdravljenje sistemske potekajočih okužb pri odraslih je med 240- 720 mg/dan oz. $3-9 \times 10^6$ i.e./dan, v 2 do 3 deljenih odmerkih (24, 25). Pri določanju odmerka in trajanju zdravljenja s polimiksini je potrebno upoštevati težo okužbe ter splošno stanje bolnika. V nekaterih študijah je opisano, da je nefrotoksičnost povezana s kumulativnim odmerkom in časovnim trajanjem zdravljenja, zato je potrebno pretehtati korist dolgotrajnega zdravljenja glede na možno tveganje nefrotoksičnosti, ki pa je lahko posledica prevelikega odmerjanja, sočasne uporabe drugih zdravil ali neprimerne odmerka pri bolnikih z okvaro ledvic in pri otrocih (27). Polimiksini se pri lokalni in peroralni aplikaciji slabo absorbirajo. Po infundiranju NKM se neaktivno predzdravilo

pretvori v aktivni kolistin (24). Mehanizem pretvorbe natrijevega kolistimetata v kolistin ni razjasnjen, prav tako ni popolnoma znan mehanizem očistka kolistina, vključno z dogajanjem v ledvicah (28). Pri zdravih osebah se v ledvicah pretvori približno 30 % NKM v kolistin, pri bolnikih z zelo slabim delovanjem ledvic (očistek kreatinina < 30 mL/min) je pretvorba večja, tudi 60 do 70 %. Očistek je odvisen od očistka kreatinina in z zmanjšanim delovanjem ledvic, se večji delež NKM pretvori v kolistin. Koncentracije v krvi so običajno nizke, saj se polimiksini vežejo na celično membrano (6, 27). Po parenteralni uporabi NKM je glavna pot izločanja preko ledvic z glomerulno filtracijo in tubulno sekrecijo (26). Pri zdravih osebah se od 60 do 70 % NKM izloči nespremenjenega v urin v 24 urah. Kolistin se v veliki meri reabsorbira v ledvičnih tubulih in se lahko odstrani sistemsko (ne-ledvično) ali se presnovi v ledvicah. Razpolovni čas kolistina je približno 3-4 ure, celotni očistek pa je približno 3 L/uro. Pri kritično bolnih pacientih se razpolovni čas podaljša na približno 9 do 18 ur (27). Farmakokinetična pot polimiksinov je prikazana na **Slika 5**.



Slika 5: Farmakokinetična pot polimiksinov (8)

1.8 NEŽELENI UČINKI POLIMIKSINOV

Nevrotoksičnost in nefrotoksičnost sta glavna neželena učinka polimiksinov. Pojavita se predvsem pri parenteralni aplikaciji. Nevrotoksični neželeni učinki so parestezija, omotica (vertigo), motnje vida in govora, šibkost, zmedenost, ataksija, zaspanost, živčno-mišična blokada, respiratorna depresija oz. apneja. So reverzibilni in so odvisni od odmerka. Pojavijo se lahko, ko je koncentracija v serumu višja od 1-2 $\mu\text{g/mL}$. Drugi dejavniki tveganja so hipoksija, sočasno uživanje mišičnih relaksantov, narkotikov, sedativov in kortikosteroidov (1, 28). Nevrotoksičnost je pogostejša pri ženskah (28). Nefrotoksičnost je najpogostejši neželen učinek kolistina in se lahko pojavi, ko je koncentracija kolistina v plazmi nad 2,5–

3,0 µg/mL. Dodatni dejavniki tveganja za nefrotoksičnost so sočasno jemanje drugih nefrotoksičnih učinkovin (nesteroidni antirevmatiki, aminoglikozidni antibiotiki, vankomicin, diuretiki), starost, hipoalbuminemija, hiperbilirubinemija, bolniki s kronično ledvično boleznijo. Alergijske reakcije so redke vendar se lahko pri večkratni intravenski infuziji pojavijo spremembe na koži in sluznicah (srbež, urtikarija), povišana telesna temperatura ter anafilaktični šok (1, 28).

1.9 OBLIKE IN MEHANIZMI ODPORNOSTI PROTI KOLISTINU

Odpornost proti antibiotikom pomeni, da nekatere populacije bakterij preživijo kljub temu, da so izpostavljene protimikrobni učinkovini. Poznamo naravno in pridobljeno odpornost (29). Naravno odpornost najdemo pri skoraj vsaki vrsti oziroma rodu bakterij, medtem ko pridobljeno najdemo samo pri določenih sevih znotraj vrste ali rodu. Mehanizmi pridobljene odpornosti proti kolistinu so številni in so večinoma posledica kromosomskih mutacij (30). Najpomembnejši mehanizmi odpornosti proti polimiksinom so pripisani različnim modifikacijam LPS na zunanji bakterijski celični membrani (8, 31).

Te modifikacije so lahko:

- dodajanje kationskih skupin [fosfoetanolamin (pEtN *angl.* phosphoethanolamin) in/ali 4-amino-4-deoksi -L-arabinoza] na LPS oz. lipid A, kar zmanjšuje negativni naboj lipida A in posledično je zmanjšana vezava polimiksinov na LPS, ki je predpogoj za penetracijo in delovanje teh antibiotikov (8, 31)
- izguba LPS ter posledično izguba tarčnega mesta polimiksinov (modifikacije v LpxA, LpxC in LpxD genih pri *A. baumannii* vodijo do inaktivacije biosinteze lipida A oz. do izgube LPS) (8, 31)
- prekomerna produkcija anionskih polisaharidnih kapsul (*angl.* capsule polysaccharide CPS), ki zavzamejo vezavna mesta polimiksinov. Osnovni mehanizem tega delovanja je elektrostatska interakcija med kationskim polimiksinom in anionskimi kapsulami polisaharidov (8, 32)
- povečano izražanje proteina zunanje membrane H1, ki se veže na vezavna mesta Mg²⁺ in Ca²⁺ in s tem inhibira delovanje polimiksinov (32)
- specifične modifikacije OprH (*angl.* outer membrane protein H) porinskih proteinov zunanje membrane, ki so odgovorni za stabilizacijo membrane. (8, 33)
- povečano delovanje membranskih izlivnih črpalk (*angl.* efflux pump) (8, 31, 33)

Modifikacije LPS kontrolirajo številni dvokomponentni regulatorni sistemi TCSs (*angl.* two-component system). Regulatorni sistemi so sestavljeni iz transmembransko senzorne histidin kinaze (npr. PhoQ, PmrB, ParS), ki se odzove na okoljske signale ter iz citoplazemskega odzivnega/transkripcijskega regulatorja (npr. PhoP, PmrA, ParP), ki regulira transkripcijo modifikacijskih genov, kot odziv na senzorski protein. Znani so številni dvokomponentni regulatorni sistemi, ki so vključeni v pridobljeno polimiksinško odpornost. Ti dvokomponentni sistemi so PhoP/PhoQ, PmrA/PmrB, ParR/ParS, CoIR/CoIS, CprR/CprS (8, 34). PmrA/PmrB in PhoP/PhoQ sodelujeta pri biosintezi 4-amino-4-deoksi-L-arabinoza (LAra4N) (8, 32). Do nedavnega so bili zgoraj opisani mehanizmi odpornosti proti kolistinu posledica kromosomskih mutacij, konec leta 2015 pa so prvič opisali primer plazmidno zapisane odpornosti proti kolistinu (gen *mcr-1*), kasneje pa tudi gen *mcr-2*.

Mcr-1 gen (*angl.* mobilised colistin resistance), kodira fosfoetanolamin transferazo in se je sposoben s pomočjo horizontalnega genetskega prenosa hitro širiti med bakterijskimi vrstami. *Mcr* gen je bil do danes odkrit pri različnih vrstah enterobakterij, predvsem pri *E. coli*, *K. pneumoniae* in rodu *Salmonella* na različnih kontinentih, tako pri izolatih človeškega izvora (okužbe in kolonizacije), kot tudi iz hrane (mesa in zelenjave), iz kmetijskih in divjih živali ter iz vodnih okolij (34, 35, 36). Pri izolatih *A. baumannii* in *P. aeruginosa* človeškega, živalskega ali okoljskega izvora, genov *mcr* zaenkrat še niso opisali (34). Mehanizem, s katerim *mcr* encimi vodijo v odpornost proti polimiksinom, se v glavnem ne razlikuje od tistega, ki ga najdemo pri naravno odpornih po Gramu negativnih bakterijah (34). Naravno odporne po Gramu negativne bakterije, na primer *Proteus mirabilis* in *Burkholderia cepacia*, imajo lipidni fosfat v celoti nadomeščen z etanolaminom ali aminoarabinozo (27). Mehanizem naravne odpornosti prav tako temelji na modifikacijah, ki temeljijo na dodajanju kationskih skupin (fosfoetanolamin) ter L-Ara4N na LPS in so vidne v odpornih sevih *E. coli*, *K. pneumoniae* ali *A. baumannii* z mutacijami v regulatorih genih (34). Glavni problem gena *mcr* je njegova lokacija na prenosljivih plazmidih, kot sta npr. *pHNSHP45* in *pKP37-BE*, ki se lahko zlahka prenašata s pomočjo konjugacije in transformacije med bakterijskimi sevi (34). Zaskrbljujoče je, da ima plazmid *pHNSHP45*, ki vsebuje gen *mcr-1*, zelo visoko stopnjo prenosa med sevi *E. coli* in se je eksperimentalno sposoben prenesti tudi v epidemične vrste enterobakterij, kot sta *E. coli* ST131 in *K. pneumoniae* ST11, kot tudi v *P. aeruginosa*, kar kaže na to, da se gen *mcr-1*, lahko hitro širi tudi med človeško populacijo teh bakterij (37).

1.10 METODE ZA TESTIRANJE OBČUTLJIVOSTI ZA ANTIBIOTIKE

Antibiogram je laboratorijska metoda, s katero *in vitro* ugotavljamo občutljivost za oziroma odpornost določenega bakterijskega izolata proti protimikrobni učinkovini. Rezultate občutljivosti za protimikrobno učinkovino opredelimo s tremi kategoričnimi kategorijami:

- občutljiv (S, *angl.* susceptible) izolat
- zmerno ali intermediarno občutljiv (I, *angl.* intermediate) izolat
- odporen (R, *angl.* resistant) izolat (38)

Poznamo številne metode za določanje bakterijske občutljivosti oziroma odpornosti bakterij: disk difuzijske, dilucijske (makro-, mikro-, agar dilucijske) in gradient difuzijske (39). Metode delimo na kvalitativne (difuzijska metoda) ali kvantitativne (makro-, mikro- in agar-dilucijski antibiogrami in gradient difuzijska metoda). S kvalitativnimi metodami lahko določimo kategorično (S, I ali R) občutljivost bakterijskih izolatov za določene protimikrobne učinkovine. S kvantitativnimi metodami pa določimo tudi v kakšni koncentraciji je protimikrobna učinkovina učinkovita oziroma določamo minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK), to je najnižja koncentracija učinkovine, ki popolnoma prepreči rast in razmnoževanje bakterij, sočasno pa običajno opredelimo tudi kategorično (S, I ali R) občutljivost za testirani antibiotik (38). Ponovljivost in primerljivost rezultatov omogočajo mednarodni standardi oziroma smernice, ki jih določajo različne za to odgovorne organizacije. Med takšne organizacije spadajo CLSI (Inštitut za klinične in laboratorijske standarde, *angl.* Clinical and Laboratory Standards Institute) in EUCAST (Evropska komisija za testiranje protimikrobne občutljivosti, *angl.* European Union Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) (39).

1.10.1 DILUCIJSKE METODE

Namen uporabe dilucijskih metod je določitev MIK antibiotika v $\mu\text{g/mL}$ in izračun pravega odmerka antibiotika za zdravljenje bakterijske okužbe. Za izvedbo metode lahko uporabljamo trda (agar dilucija) ali tekoča (makro- in mikro- dilucija) gojišča z rastočimi koncentracijami protimikrobne učinkovine, ki so običajno testirana pri 2-kratni serijski razredčitvi (\log_2). Med dilucijske metode spadajo makro in mikro- dilucija v bujonu ter agar dilucijska metoda. Za izvedbo teh metod vnaprej določimo koncentracijsko območje, ki mora zajeti koncentracije s katerimi lahko določimo občutljivost, zmerno (intermediarno) občutljivost ali odpornost izolata ter določimo pričakovani MIK kontrolnih sevov (40). Dilucijske metode so referenčne metode za *in vitro* določanje protimikrobne občutljivosti in

se tudi uporabljajo za vzpostavitev in ocenjevanje uspešnosti drugih metod testiranja občutljivosti (41).

1.10.1.1 Mikrodilucija v bujonu

Mikrodilucija v bujonu je ena izmed referenčnih metod za določanje protimikrobne občutljivosti številnih antibiotikov med katerimi je tudi kolistin. Metoda nosi ime "mikrodilucija", ker pri tej metodi uporabljamo majhne volumne bujona. Metodo izvajamo na sterilnih, plastičnih mikrotitrskih ploščicah z ravnim ali okroglim dnom. Po priporočilih CLSI je pri mikrodiluciji v bujonu priporočena uporaba kationsko prilagojenega Mueller-Hinton bujona (*angl.* cation adjusted Mueller-Hinton broth, CAMHB), rastoče koncentracije protimikrobne učinkovine z 2-kratno serijsko razredčitvijo in končna koncentracija bakterijskega inokuluma 5×10^5 CFU (*angl.* colony forming units)/mL (42, 43). V luknjice nanese rastoče koncentracije antibiotika, dodamo bakterijsko suspenzijo ter inkubiramo. Rezultat, ki ga dobimo s to metode je vrednost MIK, najnižja koncentracija protimikrobnega agensa, ki zavre vidno rast testirane bakterije. Metoda omogoča testiranje več protimikrobnih snovi hkrati, prav tako lahko na eni mikrotitrski ploščici spremljamo odpornost večjega števila izolatov (38, 41). Mikrodilucijo običajno izvajamo v dveh ali treh ponovitvah in s tem zagotovimo pravilno izvajanje metode, pravilno interpretacijo rezultatov ter ponovljivost. Med izvedbo lahko pride do številnih napak (napake med pipetiranjem, priprava antibiotika in inokuluma, kontaminacija, pojav t.i. "skipped well" (med vdolbinicami z rastjo, je prisotna vdolbinica brez rasti). Za točne rezultate občutljivosti in kontrolo kakovosti, moramo za vsako testirano serijo vključiti vsaj en kontrolni sev, ki ima znane MIK vrednosti. Vrednosti MIK pri testiranih kontrolnih sevov morajo biti v ustreznem območju, da se metoda šteje za sprejemljivo (41, 44).

1.10.1.2 Dilucijska metoda v agarju

Metodo izvajamo na hranljivem agarju, ki vključuje različne koncentracije antibiotika. Pripravimo bakterijski inokulum, ki ustreza standardu 0,5 McFarland (približno 10^8 CFU/mL) in izvedemo 10-kratne razredčitve. En mikroliter te razredčitve (približno 10^4 CFU bakterij) nanese na hranljiv agar ročno ali z avtomatskim sistemom. Po inkubaciji opazujemo rast bakterijskih kolonij. Prednost dilucijske metode v agarju je možnost testiranja več sevov na isti plošči ter polavtomatizacija. Pomanjkljivost metode je predvsem v tem, da metoda ni avtomatizirana (8, 45).

1.11 POSEBNOSTI TESTIRANJA OBČUTLJIVOSTI ZA KOLISTIN

Testiranje protimikrobne občutljivosti za kolistin predstavlja v mikrobioloških laboratorijih velik izziv. Problemi, ki nastajajo pri teh velikih, amfifilnih molekulah so številni. Kolistin zaradi svoje velikosti in kationskih značilnosti slabo difundira v agar, zaviralna cona je posledično lahko navidezno manjša in zato daje nezanesljive rezultate. Dodaten problem lahko predstavlja različna občutljivost bakterijskih populacij znotraj seva za kolistin, heterorezistenca (8, 46, 47). EUCAST je sicer od prve objave tabel leta 2010 z interpretacijskimi kriteriji vedno priporočal testiranje občutljivosti za kolistin z opredelitvijo MIK (48). V rutinski diagnostiki se je za opredelitev MIK za kolistin zaradi svoje priročnosti pogosto uporabljala komercialna gradient difuzijska metoda. Ob vedno pogostejši uporabi kolistina v humani medicini so ugotovili, da so nekatere rutinske metode za določanje občutljivosti za kolistin (gradient difuzijska in disk difuzijska metoda) neprimerne, zato po skupnih priporočilih CLSI in EUCAST velja, da je edini primeren način določanja MIK z metodo mikrodilucije (45). Po priporočilih EUCAST in CLSI je za določevanje MIK kolistina z mikrodilucijo priporočena uporaba CAMHB ter kolistinijevega sulfata in ne predzdravila NKM. Pri testiranju ne smemo uporabiti dodatkov kot so polisorbit-80 ali druge površinsko aktivne snovi. Mikrotitrne ploščice morajo biti sestavljene iz navadnega polistirena in se pred uporabo ne smejo obdelati na kakršen koli način. Druge metode, kot so agar dilucija, disk difuzija in gradient difuzijska metoda po priporočilih EUCAST in CLSI niso primerne za določanje protimikrobne občutljivosti kolistina (43).

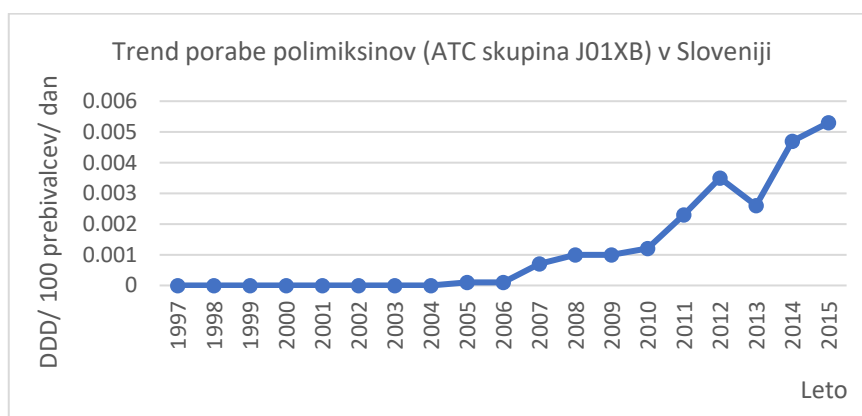
1.12 SUPERPOLIMIKSIN AGAR

Superpolimiksin agar (SPA) je selektivno gojišče, ki vsebuje določeno koncentracijo kolistina na katerem lahko zrastejo po Gramu negativne bakterije, pri katerih je MIK za kolistin višji kot je v gojišču (torej imajo intrinzično ali pridobljeno odpornost proti kolistinu) (49). Temelji na osnovi selektivno-diferencialnega EMB gojišča (*angl.* Eosin methylene blue lactose agar). Kombinacija barvil eozin in metilen modro zavira rast po Gramu pozitivnih bakterij in omogoča rast številnih po Gramu negativnih organizmov. EMB je tudi diferencialno gojišče, saj vsebuje laktozo, ki jo nekateri mikrobi razkrajajo, drugi pa ne. Tako lahko ločimo med fermentativnimi (obarvane kolonije) in nefermentativnimi kolonijami (brezbarvne kolonije). Po Gramu negativne bakterije, ki fermentirajo laktozo, proizvajajo kislino, ki pretvori kolonije v temno vijolično. Poleg tega nekatere bakterije, ki fermentirajo laktozo, proizvajajo ravne, temne kolonije z zelenim kovinskim sijajem. Drugi

laktozni fermentorji proizvajajo večje, mukoidne kolonije, pogosto vijolične le v svojem središču. V EMB agarju ima večina sevov *E. coli* značilno zeleno barvo. EMB gojišču sta dodana daptomicin, ki prepreči rast stafilokokov in streptokokov na EMB gojišču, ter amfotericin B, ki prepreči rast gliv. Za iskanje bakterij z zmanjšano občutljivostjo za kolistin, je gojišču dodan kolistinijev sulfat. Superpolimiksinski agar je bil razvit z namenom hitrega odkrivanja izolatov, ki so nosilci polimiksinske odpornosti (49).

1.13 PORABA KOLISTINA IN ODPORNOST PROTI KOLISTINU

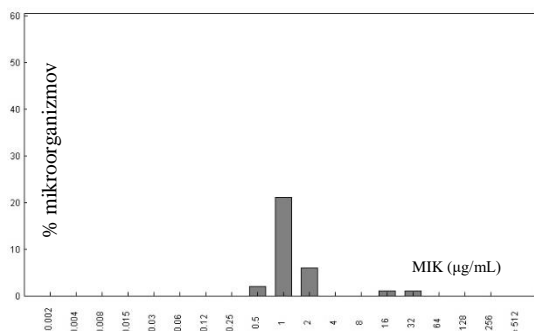
Delež izolatov VOB-GN narašča, zato se večja tudi poraba kolistina. Trend porabe polimiksinov (ATC skupina J01XB) v bolnišničnem sektorju v Sloveniji od leta 1997 do 2015 (**Slika 6**) je narasel iz 0,0000 na 0,0053 DDD (dnevno definiran odmerek, *angl.* daily defined dose)/100 prebivalcev/na dan) (50). Vse večja potreba po kolistinu je zaskrbljujoča, saj postaja zdravljenje z VOB-GN vedno bolj omejeno.



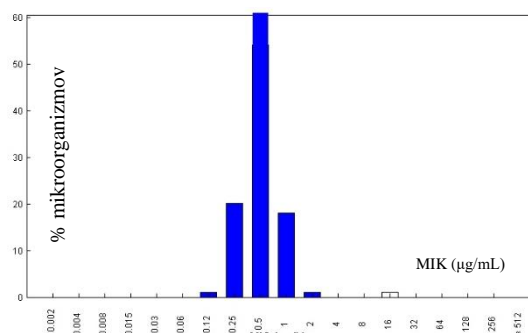
Slika 6: Trend porabe polimiksinov (ATC skupina J01XB) v bolnišničnem sektorju v Sloveniji od leta 1997 do 2015 prikazan kot DDD (daily defined dose)/100 prebivalcev/dan (50)

Podatkov o občutljivosti po Gramu negativnih bakterij za kolistin je malo, pogosto so testirane predvsem odporne podskupine kot so VOB-GN, uporabljene metode pa se med študijami razlikujejo. Na spletni strani EUCAST so zbrani podatki o distribuciji MIK iz več virov, različnih geografskih območij in časovnih obdobj (51). Internacionalne MIK distribucije kolistina za *A. baumannii* se gibljejo med 0,5-2,0 µg/mL, manjši del izolatov pa ima vrednost MIK 16 µg/mL in 32 µg/mL (**Slika 7**). Vrednosti MIK kolistina za *P. aeruginosa* se gibljejo med 0,25- 4 µg/mL, največ izolatov ima MIK kolistina 1 µg/mL ali 2 µg/mL (**Slika 8**). Za izolate *E. coli* se vrednosti MIK kolistina gibljejo med 0,12-1 µg/mL, največ izolatov ima MIK kolistina 0,5 µg/mL (**Slika 9**). Vrednosti MIK kolistina za *K.*

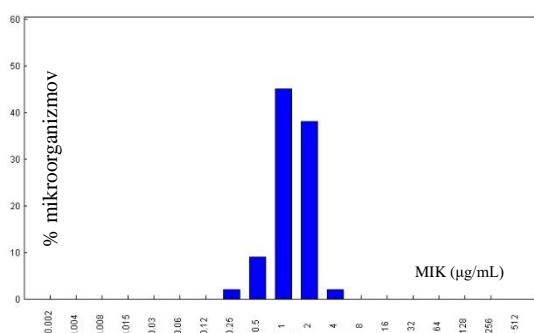
pneumoniae se gibljejo med 0,12-2 µg/mL, največ izolatov ima MIK kolistina 0,5 µg/mL, majhen odstotek ima vrednosti MIK 16 µg/mL (Slika 10). Internacionalne vrednosti MIK kolistina za *Enterobacter* spp se gibljejo med 0,12-2 µg/mL, največ izolatov ima MIK kolistina 0,5 µg/mL, majhen odstotek ima vrednosti MIK 128 µg/mL (Slika 11 in Slika 12).



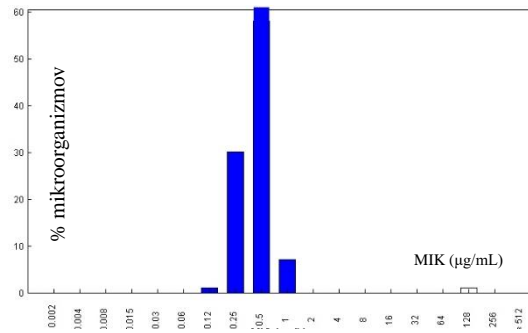
Slika 7: EUCAST podatki o internacionalni distribuciji minimalne inhibitorne koncentracije kolistina za *Acinetobacter baumannii* (51)



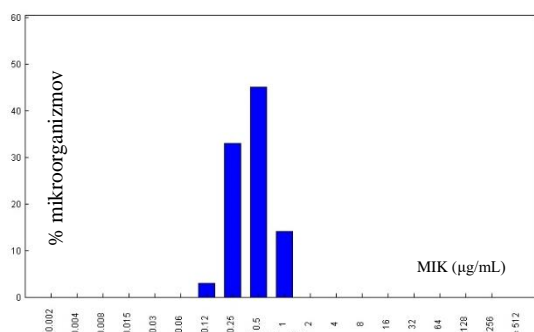
Slika 10: EUCAST podatki o internacionalni distribuciji minimalne inhibitorne koncentracije kolistina za *Klebsiella pneumoniae* (51)



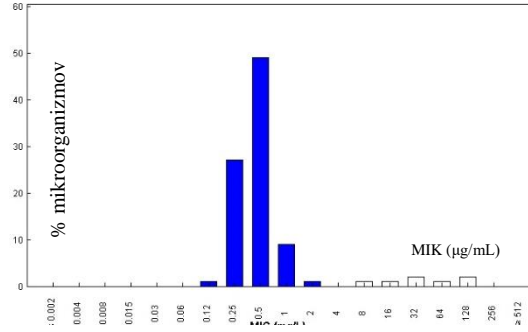
Slika 8: EUCAST podatki o internacionalni distribuciji minimalne inhibitorne koncentracije kolistina za *Pseudomonas aeruginosa* (51)



Slika 11: EUCAST podatki o internacionalni distribuciji minimalne inhibitorne koncentracije kolistina za *Enterobacter aerogenes* (51)



Slika 9: EUCAST podatki o internacionalni distribuciji minimalne inhibitorne koncentracije kolistina za *Escherichia coli* (51)



Slika 12: EUCAST podatki o internacionalni distribuciji minimalne inhibitorne koncentracije kolistina za *Enterobacter cloacae* (51)

2. NAMEN DELA

Namen magistrskega dela je:

1. Z referenčno metodo mikrodilucije opredeliti občutljivost večkratno odpornih po Gramu negativnih bacilov (VOB-GN), iz laboratorijske zbirke Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo (IMI), za antibiotik kolistin.
2. Ugotoviti, ali bi lahko s presejalnim testiranjem že opredeljenih bakterijskih izolatov z uporabo selektivnega agarja, ki vsebuje določeno koncentracijo kolistina (Superpolimiksin agar, SPA), hitro odkrivali izolate pri katerih je nujno izvesti opredelitev minimalne inhibitorne koncentracije kolistina.

Hipoteze:

1. Predpostavljamo, da je odpornost večkratno odpornih po Gramu negativnih bacilov proti kolistinu manjša kot 5 %.
2. Predpostavljamo, da lahko SPA uporabljamo za presejalno testiranje pri iskanju bakterij, ki so odporni proti kolistinu, sočasno z rutinskim testiranjem občutljivosti za antibiotike.

3. MATERIALI IN METODE

Za izvedbo izbranih metod ter pri izbiri opreme, pripomočkov, topil in sestavin, ki smo jih uporabili za našo študijo, smo upoštevali priporočila EUCAST in CLSI. Pri pripravi gojišč in raztopin smo se držali protokolov ter navodil predpisanih s strani proizvajalcev.

3.1 BAKTERIJSKI SEVI

V študijo smo vključili 212 izolatov večkratno odpornih po Gramu negativnih bacilov (VOB-GN), zamrznjenih na -80 °C iz laboratorijske zbirke na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo (IMI), od tega:

- 41 izolatov *A. baumannii*, odpornih proti karbapenemom (CRAb) (63,4 % z encimom OXA-23, 29,3 % z encimom OXA-40 ter 2,4 % z encimom OXA-58, pri 4,9 % ni bilo možno opredeliti katera karbapenemaza je prisotna),
- 33 izolatov *P. aeruginosa*, odpornih proti karbapenemom in drugim betalaktamskim antibiotikom (CRPs) (63,6 % CRPs izolatov, ki niso izločali karbapenemaze ter 36,4 % z encimom VIM),
- 138 izolatov enterobakterij, odpornih proti karbapenemom (CRE) :
 - 54 izolatov *E. coli* (70,4 % CRE brez karbapenemaze, 7,4 % z encimom NDM, 1,9 % z encimom NDM/OXA-48, 14,8 % z encimom OXA-48 ter 5,6 % z encimom VIM)
 - 45 izolatov *K. pneumoniae* (57,8 % CRE brez karbapenemaze, 2,2 % z encimom NDM, 24,4 % z encimom NDM/OXA-48 ter 15,6 % z encimom OXA-48)
 - 39 izolatov *Enterobacter* spp (71,8 % CRE brez karbapenemaze, 2,6 % z encimom IMI ter 25,6 % z encimom VIM)

Pri vseh 212 izolatih VOB-GN smo testirali občutljivost za kolistin z referenčno mikrodilucijsko metodo ter preverjali rast na SPA. Kot referenčne seve smo uporabili:

- izolat *E. coli* ATCC 25922,
- izolat *P. aeruginosa* ATCC 27853 ter
- izolat *E. coli* NCTC 13846 (*mcr-1* pozitiven)

Referenčne seve smo pridobili od organizacij ATCC oziroma NCTC.

ATCC ali American Type Culture Collection je neprofitna organizacija, ki zagotavlja zdravstvenim delavcem in znanstvenikom zanesljiv vir za medicinske raziskave. Organizacija pridobiva, zbira, proizvaja in distribuira standardne referenčne mikroorganizme, celične linije in druge materiale pomembne za raziskave in razvoj v medicini in farmaciji (52).

NCTC ali National Collection of Type Cultures je evropska oz. angleška različica ATCC, ustanovljena leta 1920 in je ena izmed najstarejših zbirk bakterijskih kultur po vsem svetu. NCTC podpira akademske, zdravstvene, živilske in veterinarske ustanove in se uporabljajo v mikrobioloških laboratorijih v številnih različnih sektorjih in raziskovalnih ustanovah po vsem svetu (53).

3.1.1 Tehnični pripomočki in oprema za kultivacijo sevov

Za kultiviranje bakterijskih sevov smo izbrali obogateno gojišče krvni agar, ki ga pripravimo po standardnem protokolu, ki je predstavljen v **Preglednica I**. Pri kultivaciji sevov smo potrebovali še:

- Sterilne inokulacijske, cepilne zanke ("eze") iz polistirena (Sarstedt, modre 10 µl)
- Inkubator Termostat 35°C , WTB Binder, Nemčija

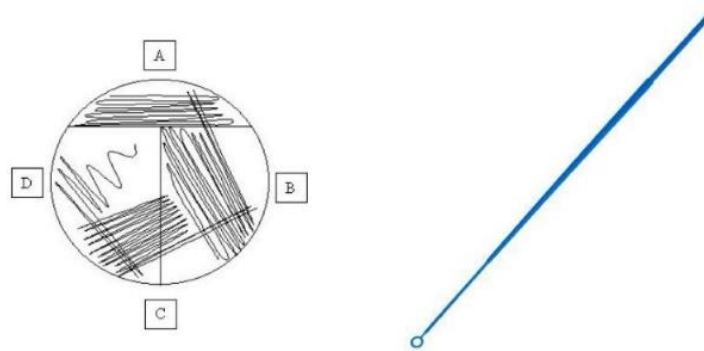
Preglednica I: Protokol priprave krvnega agarja

Sestava	Zahteve
Krvni agar baza BBL 211037	40 g
Destilirana voda	1000 mL
Dodatek: defibrirana ovčja kri	50 mL
Avtoklaviranje	121°C 15 min
Ohlajevanje	ohladimo na 42-45 °C

3.1.2 Kultiviranje bakterijskih sevov

Izbrane bakterijske izolate smo odmrznili in jih nacepili na izbrano gojišče krvni agar. Za nacepljanje in inokulacijo smo uporabili sterilno cepilno zanko iz polistirena (Sarstedt, modre 10 µl), ki je prikazana na **Slika 13** (desno). Kadar nacepljamo bakterijske izolate na trdna gojišča, morajo biti kolonije po inkubaciji dovolj narazen, da lahko dobimo posamezne kolonije. Posamezne kolonije smo dobili tako, da smo bakterijske izolate razredčili po

površini krvnega agarja v petrijevki. Bakterijsko kulturo smo nanесли na majhno površino ob robu gojišča in nato vsako nadaljnjo potezo cepljenja začeli s sterilno cepilno zanko. Na **Slika 13** (levo) so z črkami A, B, C, D označene poteze redčenja bakterijskih kultur do posameznih kolonij. Izolate smo inkubirali v aerobni atmosferi 18-24 h pri 35 ± 2 °C. Seve smo nato še dvakrat precepili, tako da smo na krvnem agarju izbrali eno kolonijo bakterije, ter jo s cepilno zanko precepili na svežo ploščo krvnega agarja s potezami A, B, C, D (**Slika 13**). Izolate smo ponovno kultivirali aerobno 18-24 h pri 35 ± 2 °C. Tretjo pasajo oživiljenih sevov smo uporabili za nadaljnjo analizo. Na tak način smo dobili aktivne in čiste kulture bakterij (54).



Slika 13: Izolacija čiste kulture s cepilno zanko (levo); ter sterilna cepilna zanka iz polistirena, modra 10 μ l (desno), * z A, B, C, D so označene serije potez cepljenja bakterijskih izolatov do posameznih kolonij (54)

3.2 MIKRODILUCIJSKA METODA DOLOČANJA MINIMALNIH INHIBITORNIH KONCENTRACIJ ZA ANTIBIOTIK KOLISTIN

Z referenčno mikrodilucijsko metodo smo določili MIK za antibiotik kolistin in tako *in vitro* določili občutljivost izbranih bakterijskih izolatov. Za izvedbo mikrodilucije smo si najprej izdelali delovno shemo. Pri pripravi delovne sheme smo morali biti pozorni tudi na tehnično opremo in materiale, ki jih bomo pri delu s kolistinom uporabili, saj lahko vplivajo na končno določitev MIK.

3.2.1 Pripomočki in oprema za izvedbo mikrodilucijske metode

- Kalibrirane pipete različnih velikosti: 0,5-10 μ l, 10-100 μ l, 100-1000 μ l (Eppendorf Reaserch plus, Hamburg Nemčija)
- Multipipeta (Eppendorf-Multipipette plus) ter multikanalska pipeta
- Plastični nastavki za pipete 2-200 μ l (Sarstedt, Biosphere filter tips)
- Plastični nastavki za pipete 0,1- 10 μ l
- Sterilne mikrotitrne ploščice s 96 vdolbinicami
- Epruvete s 2,5 mL sterilno fiziološko raztopino
- Steklene, sterilne epruvete z navojem
- Sterilne bombažne vatirane palčke
- Sterilne hokejke
- Sterilne krio tubice za zamrzovanje pri nizkih temperaturah
- Zamrzovalnik -80 °C
- Nefelometer
- Vorteks mešalo (stresalnik)
- Inkubator Termostat 35 °C , WTB Binder, Nemčija
- Cepilne, inokulacijske sterilne zanke "eze"
- Sterilne plastične petrijevke
- Stojalo z ogledalom
- Temna podlaga
- Stojalo za epruvete

3.2.2 Priprava raztopin antibiotika kolistin

Najprej smo pripravili raztopino antibiotika in ocenili koliko raztopine bomo dnevno potrebovali. Upoštevati smo morali, da bomo za vsako koncentracijo antibiotika potrebovali dve ali tri vzporedne ponovitve ter še naknadne ponovitve zaradi kontaminacij med delom ali drugih napak. Za testiranje MIK polimiksinov se uporabljata komercialno razpoložljiva polimiksin B ali polimiksin E v obliki kolistinijevega sulfata. Razmerja med sestavo zdravilne učinkovine se lahko razlikujejo med proizvodnimi serijami in tudi med različnimi proizvajalci, kar lahko vpliva na rezultate, zato je pomembno, da med raziskavo uporabljamo isto proizvodno serijo, istega proizvajalca. Predzdravilo NKM se ne uporablja za določanje MIK, saj lahko daje lažno visoke vrednosti MIK (običajno 3-8 krat višje v primerjavi z kolistinijevim sulfatom) (55). Za izvedbo mikrodilucije je priporočena sveža priprava antibiotika, vendar je sprejemljiva tudi vnaprejšnja priprava antibiotika, kar je zaradi zahtevnosti in časovne zamudnosti te metode bolj praktično in lažje izvedljivo. Predpostavljamo, da enkratna zamrznitev in odmrznitev antibiotika na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, ne vpliva na stabilnost antibiotika, ki se lahko pri temperaturah, ki so nižje od $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, shranjuje 6 mesecev (56).

Uporabljen antibiotik in topila:

- kolistinijev sulfat (kolistinijev sulfat, *angl.* Colistin sulphate $>15000\text{ UN/mg}$, Sigma-Aldrich, bel do umazano bel prašek, sol, shranjevanje $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$, topen v vodi (50 mg/mL)) (57)
- sterilna destilirana voda
- Mueller Hinton bujon s prilagojeno koncentracijo kationov (CAMHB: Cation Adjusted Mueller Hinton Bujon)

Koncentracijski interval smo izbrali s pomočjo standardov učinkovitosti za testiranje protimikrobne občutljivosti in glede na delovno shemo oz. mikrotitrsko ploščico. Interval smo razdelili na dvanajst koncentracij, ki rastejo s faktorjem 2 in dobili dvanajst osnovnih antibiotičnih raztopin. Upoštevati smo vsebnost čistega antibiotika v prašku. Podatek za kolistinijev sulfat je izražen v enotah/mg, zato moramo pri pripravi upoštevati naslednji izračun:

Kolistinijev sulfat

Vsebnost čistega antibiotika v prašku: $30.000 \text{ enot/mg} = 30 \text{ enot}/\mu\text{g} = 0,03333 \mu\text{g/enot}$

Izračun za pretvorbo v $\mu\text{g/mg}$ (58):

- aktivnost v enotah/mg pomnožimo s $0,03333 \mu\text{g/enoto}$

$$\text{aktivnost: } a_i \text{ (enot/mg)} \times 0,03333 \mu\text{g/enoto} = a_i \text{ (}\mu\text{g/mg)}$$

torej za kolistinijev sulfat : $15.000 \text{ enot/mg} \times 0,03333 \mu\text{g/enot} = 499,5 \mu\text{g/mg}$

ali

- aktivnost v enotah/mg delimo s $30 \text{ enot}/\mu\text{g}$

$$\text{aktivnost: } a_i \text{ (enot/mg)} / 30 \text{ enot}/\mu\text{g} = a_i \text{ (}\mu\text{g/mg)}$$

torej za kolistinijev sulfat $15.000 \text{ enot/mg} / 30 \text{ enot}/\mu\text{g} = 500 \mu\text{g/mg}$

Izračunan koncentracijski interval, ki smo ga pripravili (dvakratne serijske razredčine) c_1 ($\mu\text{g/mL}$): $64 \mu\text{g/mL} - 0,008 \mu\text{g/mL}$

Koncentracijski interval v vdolbinicah mikrotitrne ploščice

c_2 ($\mu\text{g/mL}$): $32 \mu\text{g/mL} - 0,016 \mu\text{g/mL}$

Pri izračunu za pripravo raztopin kolistina, smo upoštevali končni volumen raztopine v mikrotitrski ploščici ($100 \mu\text{l}$): $50 \mu\text{l}$ bakterijskega inokuluma + $50 \mu\text{l}$ antibiotične raztopine.

Koncentracije antibiotika smo izračunali po enačbi:

$$n_1 = n_2$$

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$$

$$c_2 = (c_1 \times V_1) / V_2$$

c_1 : izhodna koncentracija raztopine antibiotika

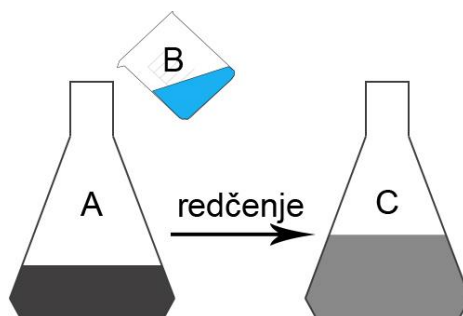
c_2 : končna, zahtevana koncentracija antibiotika po dodatku v inokulum

V_1 : volumen raztopine antibiotika ($50 \mu\text{l}$)

V_2 : končni volumen raztopine v mikrotitrski ploščici ($100 \mu\text{l}$): $50 \mu\text{l}$ bakterijskega inokuluma + $50 \mu\text{l}$ antibiotične raztopine

Raztopine antibiotika smo pripravili po navodilu proizvajalca in po standardih učinkovitosti za testiranje protimikrobne občutljivosti. Za topilo smo uporabili destilirano vodo (topnost kolistinijevega sulfata v vodi je 50 mg/mL). Nadaljnja redčenja smo izvajali z CAMHB.

Odločili smo se, da bomo testirali MIK v razponu 0,016 $\mu\text{g/mL}$ do 32 $\mu\text{g/mL}$. Za pripravo začetne koncentracije smo raztopili 6,4 mg kolistinijevega sulfata v 1 mL destilirane vode, nato smo 1 mL raztopine s koncentracijo 6,4 $\mu\text{g/mL}$ redčili v 99 mL CAMHB in dobili začetno koncentracijo 64 $\mu\text{g/mL}$. Da smo se izognili eksperimentalni napaki zaradi majhnih volumnov, smo pripravili večje količine antibiotične raztopine kolistina (58). Začetna koncentracija kolistina za serijske razredčine je bila 64 $\mu\text{g/mL}$. Redčili smo jo s faktorjem 2, tako da smo dobili željene koncentracije dvanajstih osnovnih serijskih razredčin, ki so ustrezale za dvakratno redčenje z bakterijsko kulturo. Vzeli smo 20 mL začetne raztopine s koncentracijo 64 $\mu\text{g/mL}$, dodali 20 mL CAMHB ter dobili koncentracijo 32 $\mu\text{g/mL}$ (**Slika 14**). Nato smo vzeli 20 mL raztopine s koncentracijo 32 $\mu\text{g/mL}$, dodali 20 mL CAMHB ter dobili raztopino s koncentracijo 16 $\mu\text{g/mL}$. Tako smo nadaljevali do koncentracije 0,008 $\mu\text{g/mL}$.



Slika 14: Priprava željenih koncentracij kolistina: A: 20 mL raztopine s koncentracijo c_1 ; B: 20 mL kationsko prilagojenega Mueller -Hinton bujona; C: raztopina s koncentracijo c_2

Pripravljene antibiotične raztopine smo filtrirali skozi sterilne membranske filtre z velikostjo por 0,2 μm , v sterilne steklene erlenmajerice. Nato smo raztopine porazdelili v sterilne 2 mL krio tubice, jih označili z vsebovano koncentracijo ter jih shranili do uporabe v zamrzovalnik pri temperaturi -80°C (44).

3.2.3 Izbira bujona

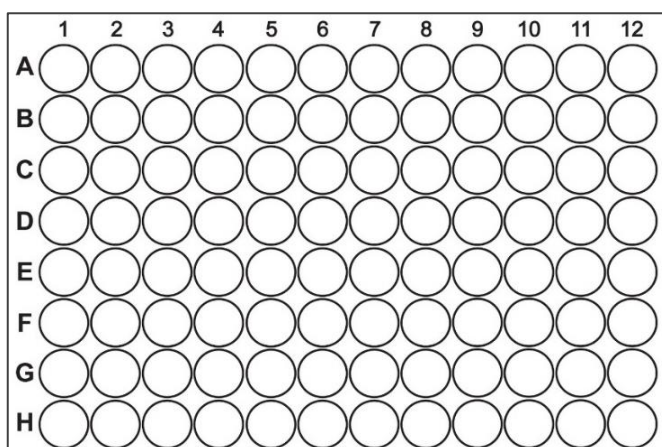
Dvokomponentni sistemi (PhoP/PhoQ in PmrA/PmrB) kontrolirajo številne modifikacije LPS, ki vodijo k odpornosti proti polimiksinom. Odzivajo se na različne dejavnike kot sta pH in kationi (kalcij, železo in magnezij) (8, 31). V Mueller-Hinton bujonu lahko obstaja velika variabilnost koncentracij kationov, zato je lahko MIK kolistina posledično napačen, če ga testiramo s klasičnim Mueller-Hinton bujonom ali če ga testiramo s strani CLSI in EUCAST priporočenim kationsko prilagojen MH bujonom (44, 45, 58). Upoštevati moramo, da je koncentracija kalcija, ki jo priporoča CLSI in EUCAST za določanje občutljivosti kolistina *in vitro*, dvakrat višja od koncentracije v *in vivo* tekočinah (59). Uporaba bujona, kationsko ali ne-kationsko prilagojenega je tako vprašljiva, zato moramo biti previdni in uporabiti vedno isti bujon z istimi koncentracijami kationov. Za našo raziskavo smo izbrali s strani CLSI in EUCAST priporočen CAMHB (44, 45, 58).

3.2.4 Izbira mikrotitrskih plošč

Pozorni smo morali biti tudi pri izbiri mikrotitrskih ploščic, saj se polimiksini zaradi svojih kationskih lastnosti lahko vežejo na negativno nabito površino plastičnih ploščic (polipropilen, polistiren) (8, 60). Površinsko aktivna snov (PAS) P-80 (Polisorbat 80), lahko prepreči ali vsaj zmanjša možnost vezave lipopolisaharida na plastične površine mikrotitrskih ploščic (8, 44, 58). P-80 lahko deluje sinergistično s polimiksini, kar vodi do lažno zmanjšanih vrednosti MIK (61). Pri bakterijskih izolatih *P. aeruginosa*, prisotnost P-80 poveča prepustnost bakterijske celice. Polimiksini že sami po sebi destabilizirajo zunanjo membrano, zato prisotnost P-80 znatno ne vpliva na izolate, ki so odporni na polimiksine. Problemi lahko nastanejo pri nižjih koncentracijah polimiksinov. CLSI od januarja 2014 priporoča testiranje brez prisotnosti P-80, vendar če se MIK gibljejo okoli $\leq 1 \mu\text{g}/\text{mL}$ so rezultati brez prisotnosti P-80, lahko napačni. Namesto plastičnih mikrotitrskih ploščic, bi lahko uporabili steklene, saj se polimiksini na steklo vežejo relativno manj kot na plastiko. Steklene ploščice so v primerjavi s plastičnimi dražje ter lažje lomljive (8, 62). Za našo raziskavo smo uporabili sterilne, transparentne mikrotitrške ploščice za gojenje celičnih kultur s 96 vdolbinicami (96-well standard microplates, transparent, U-bottom, BRANDplates® Microplates for Cell Culture, pure Grade™).

3.2.5 IZVEDBA KLASIČNE MIKRODILUCIJE ZA KOLISTIN

Mikrodilucijo smo izvajali na prozornih, sterilnih mikrotitrskih ploščicah s 96 luknjicami, z dnom v obliki črke U. Ploščice so navpično označene s številkami od 1-12, vodoravno pa s črkami od A-H. Mikrotitrski ploščici pripada še pokrov, s katerim preprečimo izhlapevanje bujona med inkubacijo. Model mikrotitrške ploščice je prikazan na **Slika 15**.



Slika 15: Model mikrotitrške ploščice

Pred izvedbo mikrodilucije smo izdelali shemo (**Slika 16**) oziroma načrt po katerem smo metodo izvajali.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
$\mu\text{g/mL}$		64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,063	0,031
A	Izolat 1												
B	Izolat 1												
C	Izolat 2												
D	Izolat 2												
E	Izolat 3												
F	Izolat 3												
G	PK +												
H	NK -												

Slika 16: Shema za izvedbo mikrodilucije s koncentracijami kolistina v $\mu\text{g/mL}$. Prikazane so koncentracije kolistina, testirani izolati (izolat 1, izolat 2, izolat 3) ter PK+ (pozitivna kontrola) ter NK- (negativna kontrola)

VRSTICE:

A-B: izbran bakterijski izolat v dveh ponovitvah/paralelah (50 µl bakterijskega inokuluma)

C-D: izbran bakterijski izolat v dveh ponovitvah/paralelah (50 µl bakterijskega inokuluma)

E-F: izbran bakterijski izolat v dveh ponovitvah/paralelah (50 µl bakterijskega inokuluma)

G: PK + pozitivna kontrola (100 µl bakterijskega inokuluma brez antibiotika)

H: NK - negativna kontrola (50 µl CAMHB +50 µl raztopine antibiotika)

STOLPCI:

1: 50 µl raztopine antibiotika s koncentracijo 64 µg/mL (v vrsticah od A-F ter vrstica H)

2: 50 µl raztopine antibiotika s koncentracijo 32 µg/mL (v vrsticah od A-F ter vrstica H)

3: 50 µl raztopine antibiotika s koncentracijo 16 µg/mL (v vrsticah od A-F ter vrstica H)

4: 50 µl raztopine antibiotika s koncentracijo 8 µg/mL (v vrsticah od A-F ter vrstica H)

5: 50 µl raztopine antibiotika s koncentracijo 4 µg/mL (v vrsticah od A-F ter vrstica H)

6: 50 µl raztopine antibiotika s koncentracijo 2 µg/mL (v vrsticah od A-F ter vrstica H)

7: 50 µl raztopine antibiotika s koncentracijo 1 µg/mL (v vrsticah od A-F ter vrstica H)

8: 50 µl raztopine antibiotika s koncentracijo 0,5 µg/mL (v vrsticah od A-F ter vrstica H)

9: 50 µl raztopine antibiotika s koncentracijo 0,25 µg/mL (v vrsticah od A-F ter vrstica H)

10: 50 µl raztopine antibiotika s koncentracijo 0,125 µg/mL (v vrsticah od A-F ter vrstica H)

11: 50 µl raztopine antibiotika s koncentracijo 0,063 µg/mL (v vrsticah od A-F ter vrstica H)

12: 50 µl raztopine antibiotika s koncentracijo 0,031 µg/mL (v vrsticah od A-F ter vrstica H)

3.2.5.1 Nanos raztopin antibiotika na mikrotitrsko ploščico

Na mikrotitrsko ploščico (**Slika 16**) smo najprej nanegli pripravljene raztopine antibiotika. V stolpec 1 nanese 50 µl najvišje koncentracije antibiotika (64 µg/mL). Nanesli smo jo v vrstice A-F ter v vrstico H. Vrstico G smo pustili prazno za pozitivno kontrolo oziroma rastno kontrolo. Delo smo si olajšali z uporabo multipipete, saj lahko tako nanašamo isto koncentracijo antibiotika v vse vdolbinice hkrati. Nadaljevali smo v stolpec 2, kamor smo nanegli 50 µl raztopine antibiotika s koncentracijo 32 µg/mL, v vrstice A-F ter v vrstico H. Vrstico G smo pustili prazno za pozitivno kontrolo oziroma rastno kontrolo. Tako smo nadaljevali do najnižje koncentracije antibiotika 0,031 µg/mL, ki je v stolpcu 12. Vsakič smo zamenjali nastavke za multipipeto, da ni prišlo do prenosa višjih koncentracij antibiotika k nižjim. V vrstico H smo nanegli 50 µl CAMHB. Tako imamo v vrstici H 50 µl CAMHB ter

50 µl ustrezne koncentracije antibiotika. Pokrijemo s pokrovom, da ne pride do kontaminacije.

3.2.5.2 Priprava bakterijske suspenzije oziroma inokuluma

S sterilno vatirano palčko smo vzeli približno 5 kolonij iz 18-24 urne kulture, ki smo jo inkubirali pri 35 ± 2 °C na krvnem agarju in jih prenesli v epruveto s 2,5 mL 2 % NaCl. Z nefelometrom smo pripravili začetno bakterijsko suspenzijo, ki ustreza standardu 0,5 po McFarlandovi lestvici, kar ustreza koncentraciji $1-2 \times 10^8$ CFU/mL. Suspenzijo smo dobro premešali z vorteks mešalom (15-20 s) in tako zagotovili homogeno suspenzijo, koncentracijo smo preverili z nefelometrom (oz. dezitometrom). Kulturo smo po potrebi redčili s 2 % fiziološko raztopino, da smo dosegli željeno koncentracijo 0,5 McFarland. Začetno bakterijsko suspenzijo je potrebno porabiti v roku 15 minut (44, 56).

Začetno bakterijsko suspenzijo 0,5 McFarland smo redčili v razmerju 1:100 in tako dobili željeno koncentracijo 1×10^6 CFU/mL. Odpipetirali smo 25 µl začetne bakterijske suspenzije 0,5 McFarland v 2500 µl CAMHB in dobro premešali na vorteks mešalu 15-20 sekund. Nova bakterijska suspenzija tako ustreza koncentraciji 1×10^6 CFU/mL (44, 56).

3.2.5.3 Nanos inokuluma na mikrotitrsko ploščico

S pomočjo multikanalske pipete, smo odpipetirali 50 µl bakterijske suspenzije 1×10^6 CFU/mL, v katerem je inokuliran izbran bakterijski izolat. Delali smo v dveh ponovitvah oz. paralelah. V vrstice A-B, C-D, E-F smo nanegli 50 µl inokuliranega izolata. Nanašali smo v smeri iz najnižje do najvišje koncentracije antibiotika (od stolpca 12 do stolpca 1), da ni prišlo do prenosa večje koncentracije antibiotika v manjšo. Ko je 50 µl inokuluma dodanega v vdolbinico s 50 µl antibiotika ustrezne koncentracije upoštevamo redčenje 1:2 bakterijskega inokuluma z 1×10^6 CFU/mL in tako dobimo končno koncentracijo inokuluma 5×10^5 CFU/mL oziroma 5×10^4 CFU na vdolbinico (sprejemljiva je $3-7 \times 10^5$ CFU/mL). Prav tako upoštevamo redčenje 1:2 za koncentracijo antibiotika (se razpolovi) (44).

V vrstico G smo nanegli 100 µl inokuliranega CAMHB (pozitivna, rastna kontrola), če delamo dve paraleli nanesimo v polja G1-G4 izolat 1, G5-G8 izolat 2, G8-G12 izolat 3. Delali smo 2 paralelni ponovitvi za vsak bakterijski izolat, zato smo na vsaki mikrotitrski plošči preizkusili tri izolate.

3.2.5.4 Kontrola kakovosti

Za pravilno interpretacijo rezultatov smo naredili kontrolo kakovosti z referenčnimi sevi *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 ter na kolistin odporen sev *E. coli* NCTC 13846 in tako zagotovili ponovljivost rezultatov in pravilno izvajanje metode. To pomeni, da smo vsakič testirali tudi zgoraj omenjene referenčne seve. Mejne vrednosti MIK za antibiotik kolistin so prikazane v spodnji **Preglednica II** (63).

Preglednica II: Kontrola kakovosti (63)

Referenčni sev	Tarčna MIK (mg/L)
	EUCAST Tabela kakovosti v. 7.0, veljavna od 2017-01-01
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0.5 -1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1 - 2
<i>Escherichia coli</i> NCTC 13846 (<i>mcr-1</i> pozitiven)	4 *(izredno, po potrebi je dovoljeno 2 ali 8 mg/L)

3.2.5.5 Inkubacija

Mikrotitrsko ploščico smo pokrili s pokrovom, da smo preprečili izgube volumna med inkubacijo in s tem spremembe koncentracije antibiotika. Inkubirali smo aerobno pri $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ 16-20 h (44).

3.2.5.6 Odčitavanje rezultatov

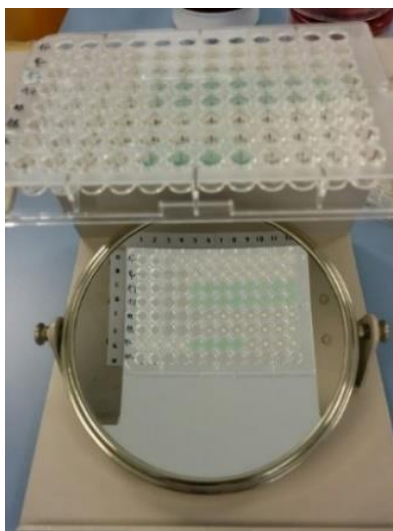
Rezultate smo odčitali s pomočjo stojala z ogledalom (**Slika 17**) ali na temni podlagi. Vsakemu testiranemu izolatu smo opredelili minimalno inhibitorno koncentracijo. MIK je najnižja koncentracija antibiotika, ki popolnoma prepreči rast bakterij v vdolbinici, to je prva vdolbinica brez motnosti oziroma rasti. Glede na smernice EUCAST smo opredelili rezultate občutljivosti za kolistin (**Preglednica III**) (44):

- izolate, ki imajo $\text{MIK} \geq 4 \mu\text{g/mL}$ kot odporne (R)
- izolate, ki imajo $\text{MIK} \leq 2 \mu\text{g/mL}$ kot občutljive (S)

Preglednica III: Kriteriji za opredelitev občutljivosti (44)

Vrsta bakterije	MIK $\mu\text{g/mL}$	
	S \leq	R $>$
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	2
<i>Escherichia coli</i>	2	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	2
<i>Enterobacter spp</i>	2	2

*MIK: minimalna inhibitorna koncentracija; S: občutljiv izolat, R: odporen izolat



Slika 17: Stojalo z bralnim zrcalom za mikrotitrsko ploščo

Mikrodilucijo smo ponavljali, če ni bilo rasti v vrstici G (pozitivna oz. rastna kontrola), če smo opazili t.i. »skipped well« (med vdolbinicami z rastjo, je vdolbinica brez rasti), če smo opazili rast v negativni kontroli (predstavlja sterilnost CAMHB bujona in antibiotika), če kontrolni oz. referenčni sevi niso bili v območju po izračunanih vrednostih s strani EUCAST (neustrezna kontrola kakovosti) ali v primeru, da nismo dobili enake vrednosti MIK pri obeh ponovitvah enega izbranega bakterijskega izolata (44).

3.2.5.7 Kontrola inokuluma

Iz vdolbinice s pozitivno kontrolo (vrstica G) smo po inokulaciji vzeli 0,01 mL in jih prenesli v 10 mL fiziološke raztopine (redčimo 1:1000), vorteksirali ter 0,1 mL redčitve prenesli na krvni agar in razmazali s »hokejko«. Po inkubaciji na $35\pm 1^{\circ}\text{C}$, 16-20 h, mora za pravilni inokulum rasti približno 50 kolonij oz. 5×10^5 CFU/mL (sprejemljivo je $2-8 \times 10^5$ CFU/mL) (44).

3.3 PRESEJALNO TESTIRANJE S SUPERPOLIMIKSIN AGARJEM

Istočasno z mikrodilucijsko metodo smo izvajali presejalno testiranje z uporabo selektivnega SPA agarja, ki vsebuje določeno koncentracijo kolistina (49), ki smo ga pripravili po protokolu, ki je predstavljen v **Preglednica IV**. Želeli smo odkriti ali lahko z uporabo SPA agarja *in vitro* na cenejši in bolj preprost način odkrivamo izolate, ki so razvili odpornost proti kolistinu in pri katerih je potrebno opredeliti MIK z mikrodilucijsko metodo. Mikrodilucijska metoda je časovno in tehnično zelo zahtevna, presejalno testiranje s SPA pa je preprostejše za izvedbo in cenejše od opredelitve MIK.

3.3.1 Tehnični pripomočki in oprema

- Epruvete s 2,5 mL sterilno fiziološko raztopino
- Stojalo za epruvete
- Sterilne bombažne vatirane palčke
- Nefelometer
- Vorteks mešalo
- Inkubator Termostat 35°C , WTB Binder, Nemčija
- Cepilne, inokulacijske sterilne zanke "eze" (modre, 10 μl)
- Sterilne plastične petrijevke

3.3.2 Sestava in priprava Superpolimiksin agarja

Za pripravo Superpolimiksin agarja smo upoštevali protokol po Nordmannu, ki je predstavljen v **Preglednica IV**.

Preglednica IV: Priprava Superpolimiksin agarja po Nordmann in sod. (49)

Izvedba	Zahteve	Končna koncentracija
Sestava EMB agar v prahu	15 g	3,75 %
Destilirana voda	400 mL	/
Dodatki Kolistinijev sulfat 20 mg/mL v vodi	70 µl	3,5 µg/mL
Daptomicin 20 mg/mL v vodi	0,2 mL	10 µg/mL
Amfotericin 20 mg/mL v 10 % D-(+)-glukozi	0,1 mL	5 µg/mL

* 400 mL SPA ustreza za cca 20 plošč oz. petrijevke

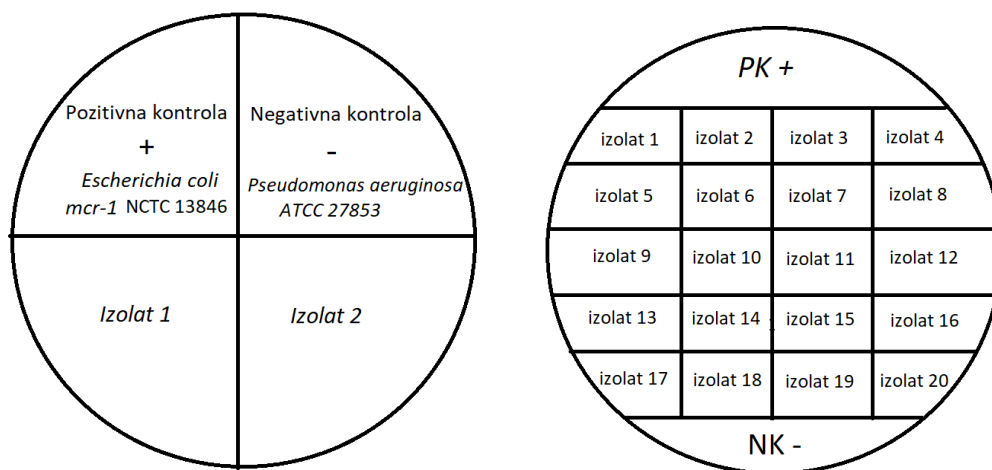
Raztopine kolistinijevega sulfata, daptomicina in amfotericina B smo pripravili po navodilu, ki je prikazano v **Preglednica IV**. Tako pripravljene raztopine lahko shranjujemo približno eno leto pri 20°C. Pri pripravi raztopin smo uporabili steklovino, s čimer smo se izognili potencialni vezavi kolistina na plastične vsebnike (49).

EMB agar v prahu smo raztopili v destilirani vodi (**Preglednica IV**) ter raztopino EMB avtoklavirali pri 121 °C 15 minut. EMB agar smo nato hladili 1 uro pri 56 °C. Ohlajeni raztopini smo dodali antibiotične raztopine kolistinijevega sulfata, daptomicina ter amfotericina B ter tako pripravljeno raztopino prelili v sterilne plastične petrijevke. SPA agar lahko shranjujemo do enega tedna, pri 4°C in zaščitene pred svetlobo (49).

3.3.3 Izvedba presejalnega testiranja s Superpolimiksin agarjem

Uporabili smo bakterijsko suspenzijo 0,5 McFarland, pripravljeno iz 18-24 urne bakterijske kulture, ki smo jo inkubirali pri 35 ± 2 °C, na krvnem agarju. Postopek priprave bakterijskega inokuluma je enak kot pri pripravi začetne bakterijske suspenzije oz. inokuluma za mikrodilucijsko metodo. Postopek priprave je opisan v poglavju **3.2.5.2 Priprava bakterijske suspenzije oziroma inokuluma**. Bakterijsko suspenzijo 0,5 McFarland smo pripravili v sterilni fiziološki raztopini ter jo uporabili v 15 minutah od priprave. Na pripravljene petrijevke s SPA agarjem smo narisali delovno shemo (**Slika 18**). Sterilno plastično zanko smo pomočili v bakterijski inokulum gostote 0,5 McFarland in z zanko plastične eze prenesli 10 µl inokuluma na SPA agar. Na eni plošči lahko testiramo več izolatov hkrati, število testiranih sevov si izberemo poljubno, vendar moramo na vsaki plošči poleg izbranih bakterijskih izolatov testirati tako pozitivno kot negativno kontrolo, ki nam

zagotavlja pravilno interpretacijo in pravilno izvajanje metode. Referenčna seva *E. coli* ATCC 25922 in *P. aeruginosa* ATCC 27853 predstavljata negativno kontrolo, sev *E. coli mcr-1* NCTC 13846 pa predstavlja pozitivno kontrolo.



Slika 18: Različne variacije delovnih shem na Superpolimiksin agarju; na levi sliki testiramo dva izolata, na desni sliki testiramo dvajset izolatov; PK: pozitivna kontrola, NK: negativna kontrola

Po inokulaciji izbranih izolatov smo pokrili petrijevke s pokrovom in jih inkubirali obrnjene navzgor v aerobni atmosferi 18-24 ur pri 35 ± 2 °C. Po 24 urah smo odčitali rezultate.

Kriteriji za interpretacijo Superpolimiksin agarja:

- **RAST 1 \geq kolonije na SPA agarju;** izolat opredelimo kot pozitiven oz. odporen proti kolistinu
- **NI RASTI na SPA agarju;** izolat opredelimo kot negativen oz. občutljiv na kolistin

3.3.4 Analiza podatkov presejalnega testiranja s Superpolimiksin agarjem in Minimalno inhibitorno koncentracijo kolistina

Za oceno presejalnega testiranja smo izbrali najbolj uporabne parametre za presojo rezultatov in sicer:

1. Senzitivnost (občutljivost) = resnično pozitivni / (resnično pozitivni + lažno negativni)
2. Specifičnost (zanesljivost) = resnično negativni / (resnično negativni + lažno pozitivni)
3. Pozitivna napovedna vrednost = resnično pozitivni / (resnično pozitivni + lažno pozitivni)
4. Negativna napovedna vrednost = resnično negativni / (resnično negativni + lažno negativni)

Kot osnovo za računanje senzitivnosti, specifičnosti, pozitivne napovedane vrednosti in negativne napovedane vrednosti uporabimo tabelo 2x2 (**Preglednica V**) (64).

Preglednica V: Tabela 2x2

	ODPOREN MIK \geq 4 μg/mL	OBČUTLJIV MIK \leq 2 μg/mL
RAST na SPA	Resnično pozitiven RP	Lažno pozitiven LP
NI RASTI na SPA	Lažno negativen LN	Resnično negativen RN

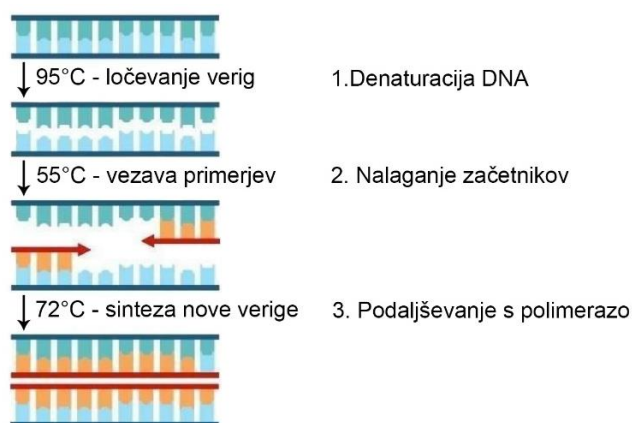
- **Senzitivnost (občutljivost)** je verjetnost, da bo rast pozitivna pri izolatih, ki so odporni na kolistin. Pove, kolikšen delež odpornih izolatov ima pozitivno rast.
- **Specifičnost (zanesljivost)** je verjetnost, da bo rast negativna oziroma ne bo prisotne rasti pri izolatih, ki so občutljivi na kolistin. Pove, kolikšen delež občutljivih izolatov ima negativno rast.
- **Negativna napovedna vrednost** je verjetnost, da je izolat občutljiv, ko na agarju ni prisotne rasti.
- **Pozitivna napovedna vrednost** je verjetnost, da je izolat odporen, ko je na agarju prisotna rast.

3.4 ODKRIVANJE PLAZMIDNO POGOJENE ODPORNOSTI PROTI KOLISTINU (GEN *MCR-1*) Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO

Po določitvi MIK kolistina z mikrodilucijsko metodo smo pri izolatih, ki so bili odporni proti kolistinu ($\text{MIK} \geq 4 \mu\text{g/mL}$) z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) (Slika 19) iskali gen za *mcr-1*. Namen testiranja je bil ugotoviti ali je odpornost proti kolistinu posledica plazmidno zapisanega gena *mcr-1* ali gre bodisi za drugo vrsto pridobljene odpornosti. V kolikor je bil PCR za gen *mcr-1* negativen, smo sklepali, da gre najverjetneje za kromosomske prilagoditvene mutacije različnih genov.

PCR predstavlja *in vitro* metodo sinteze nukleinskih kislin, s katero pomnožimo tarčni odsek deoksiribonukleinske kisline (DNK). Reakcijska zmes je sestavljena iz vzorca DNK, dveh oligonukleotidov (primerja), deoksinukleozid-trifosfatov (gradniki nove verige DNK), Mg^{2+} ionov, reakcijskega pufru in termostabilne DNK polimeraze. Reakcija navadno poteka v 20-40 ciklih, vsak cikel pa je sestavljen iz več stopenj (65):

- Začetna denaturacija (iniciacijska stopnja)
- Denaturacijska stopnja
- Stopnja pripenjanja (vezava, nalaganje začetnih oligonukleotidov)
- Podaljševalna stopnja (podaljševanje verige DNK)
- Zaključno podaljševanje oz. terminacija podaljševanja



Slika 19 : Shematski prikaz verižne reakcije s polimerazo (65)

Odporne izolate (R, MİK $\geq 4 \mu\text{g/mL}$) smo testirali na prisotnost gena *mcr-1* s PCR in uporabili naslednja začetna oligonukleotida oz. primerja (37):

- Primer CLR5-F (5'-CGGTCAGTCCGTTTGTTC-3')
- Primer CLR5-R (5'-CTTGGTCGGTCTGTA GGG-3')

Sestava reakcijske mešanice (25 μl) za en vzorec je sestavljena iz (37):

- Destilirana voda: 10,0 μl ,
- HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen, Nemčija): 2 x: 12,5 μl ,
- Oligonukleotidni začetnik: 0,25 μl smernega (F) in 0,25 μl protismernega (R), založna koncentracija oligonukleotidnih začetnikov je 50 μM
- izolirana DNK: 2 μl

V vsako reakcijo je bila vključena ena pozitivna in ena negativna kontrola. Pozitivna kontrola je referenčni sev z genom za *mcr-1 E. coli NCTC 13846*. Negativna kontrola je destilirana voda. Dobljene produkte PCR prikažemo z gelsko elektroforezo. Pogoji pomnoževanja PCR reakcije so prikazani v **Preglednica VI**.

Preglednica VI: Pogoji verižne reakcije s polimerazo za *mcr-1* gen (37, 65):

Število ciklov	Stopnja	T °C	Čas	Opis
1x	Začetna denaturacija	95	5 min	Denaturacija DNK vzorca
25x	Denaturacija	94	30 s	Prekinitev procesa polimerizacije in denaturacije dsDNK v ssDNK, porušijo se vodikove vezi med baznimi pari komplementarnih DNK verig; dobimo ločeni komplementarni verigi
	Vezava začetnih oligonukleotidov	58	30 s	Optimalna temperature za vezavo začetnih oligonukleotidov
	Podaljševanje verige DNK	72	30 s	Polimeraza sintetizira komplementarni verigi DNK
1x	Zaključno podaljševanje	72	5 min	Dokončna sinteza začetnih produktov PCR. Encim preveri, če se je celotna veriga podvojila
1x	Terminacija podaljševanja	4	∞	Konec PCR

*T: temperatura; DNK: deoksiribonukleinska kislina; PCR: Polymerase chain reaction (verižna reakcija s polimerazo); dsDNK: *angl.* double-stranded DNK; ssDNK: *angl.* single-stranded DNK; s: sekund

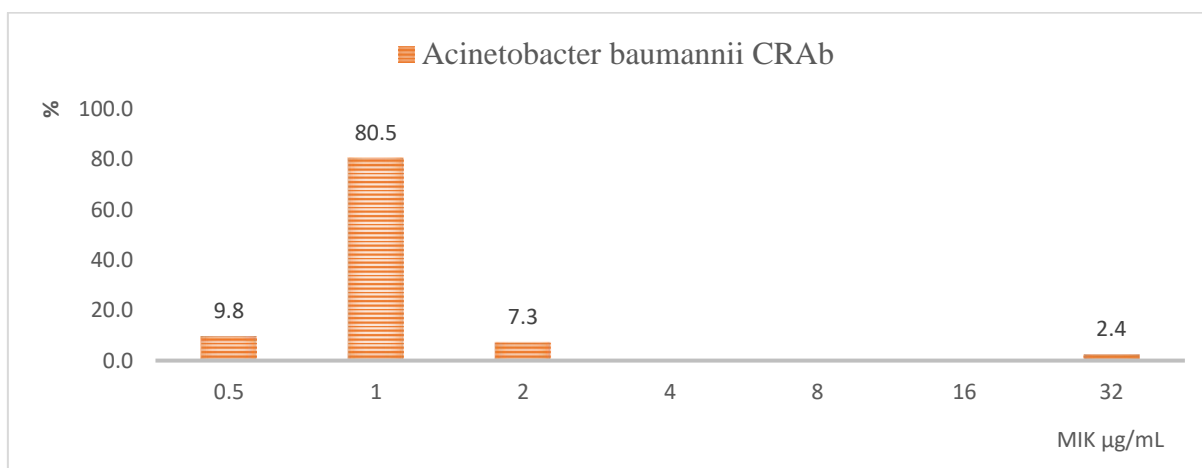
4. REZULTATI

Izhajajoč iz prve točke namena dela, katerega cilj je bil opredeliti občutljivost VOB-GN za kolistin z mikrodilucijsko metodo, smo testirali 212 izolatov VOB-GN in dobili rezultate, ki so prikazani v nadaljnjih poglavjih. Rezultate občutljivosti in minimalno inhibitorno koncentracijo kolistina smo opredelili glede na EUCAST smernice, ki so prikazani v **Preglednica III**.

Pri določevanju MIK za kolistin smo izvajali kontrolo kakovosti s sevi *E. coli* ATCC 25922 ali *P. aeruginosa* ATCC 27853, ki sta občutljiva na kolistin. Prav tako smo uporabili sev *E. coli* NCTC 13846 (*mcr-1* pozitiven), ki je odporen proti kolistinu. Ciljne vrednosti so prikazane v **Preglednica II**.

4.1 OPREDELITEV MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE IZBRANIH IZOLATOV *ACINETOBACTER BAUMANNII* CRAb ZA KOLISTIN

Z referenčno metodo smo na mikrotitrski ploščici testirali 41 izolatov *A. baumannii* CRAb. Spodnji graf (**Slika 20**) prikazuje, da smo pri testiranih izolatih dobili: 4/41 (9,8 %) izolatov z MIK 0,5 µg/mL; 33/41 (80,5 %) izolatov z MIK 1 µg/mL, 3/41 (7,3 %) izolatov z MIK 2 µg/mL, ter 1/41 (2,4 %) izolatov z MIK 32 µg/mL.

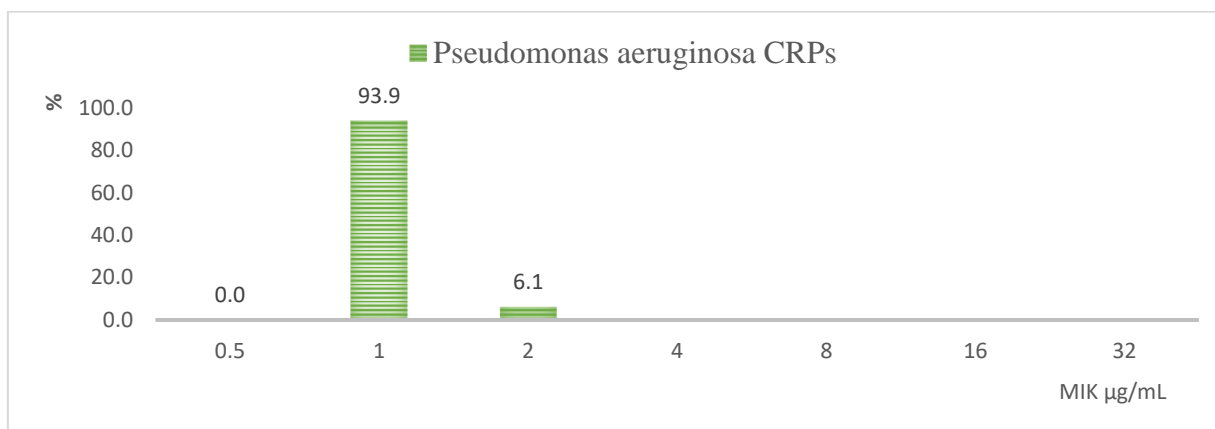


Slika 20: Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK µg/mL) kolistina za izolate *A. baumannii*, ki so odporni proti karbapenemom (CRAb)

Glede na EUCAST smernice opredelimo 40/41 (97,6 %) testiranih izolatov *A. baumannii* CRAb kot občutljive za kolistin in 1/41 (2,4 %) izolatov opredelimo kot odporne na kolistin, pri katerih je bil MIK kolistina $\geq 4 \mu\text{g/mL}$.

4.2 OPREDELITEV MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE IZBRANIH IZOLATOV *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CRPs ZA KOLISTIN

Z referenčno metodo mikrodilucije smo na mikrotitrski ploščici testirali 33 izolatov *P. aeruginosa* CRPs.. Spodnji graf (**Slika 21**) prikazuje, da smo pri testiranih izolatih dobili 31/33 (93,9 %) izolatov z MIK 1 $\mu\text{g/mL}$ ter 2/33 (6,1 %) z MIK 2 $\mu\text{g/mL}$.

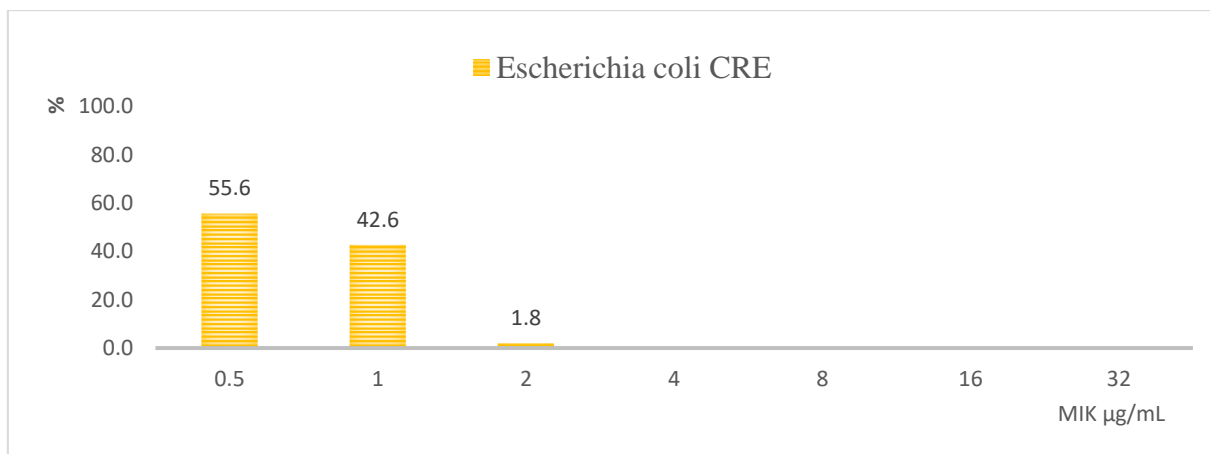


Slika 21: Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK $\mu\text{g/mL}$) kolistina za izolate *P. aeruginosa*, ki so odporni proti karbapenemom (CRPs)

Glede na EUCAST smernice, vseh 33 testiranih izolatov *P. aeruginosa* CRPs, opredelimo kot občutljive za kolistin.

4.3 OPREDELITEV MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE IZBRANIH IZOLATOV *ESCHERICHIA COLI* CRE ZA KOLISTIN

Z referenčno metodo mikrodilucije smo na mikrotitrski ploščici testirali 54 izolatov *E. coli*. Spodnji graf (**Slika 22**) prikazuje, da smo pri testiranih izolatih dobili 30/54 (55,6 %) izolatov z MIK 0,5 $\mu\text{g/mL}$; 23/54 (42,6 %) izolatov z MIK 1 $\mu\text{g/mL}$ ter 1/54 (1,8 %) z MIK 2 $\mu\text{g/mL}$.

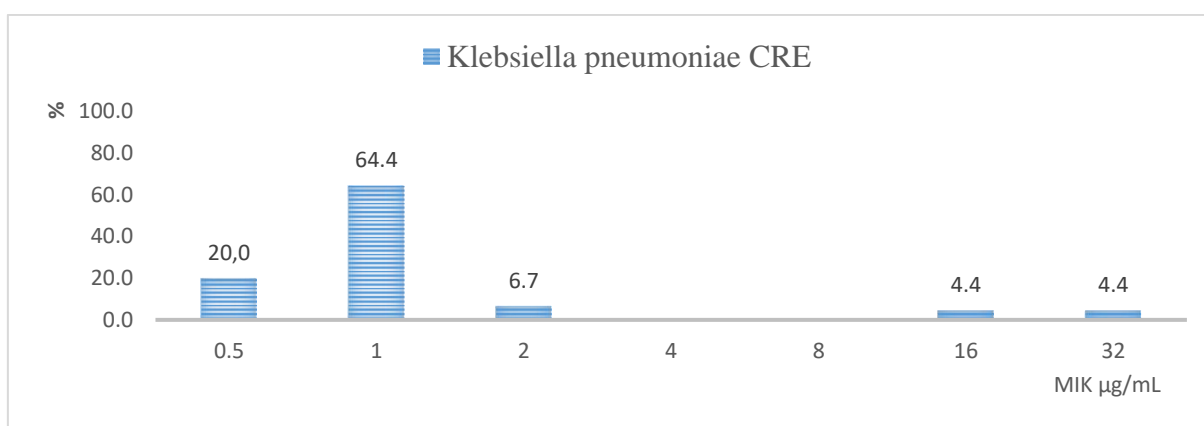


Slika 22: Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK µg/mL) kolistina za izolate *E. coli*, ki so odporni proti karbapenemom (CRE)

Vseh 54 testiranih izolatov *E. coli*, opredelimo kot občutljive za kolistin, glede na EUCAST smernice.

4.4 OPREDELITEV MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE IZBRANIH IZOLATOV *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* CRE ZA KOLISTIN

Z referenčno metodo mikrodilucije smo na mikrotitrski ploščici testirali 45 izolatov *K. pneumoniae* CRE. Spodnji graf (**Slika 23**) prikazuje, da smo pri testiranih izolatih dobili 9/45 (20,0 %) izolatov z MIK 0,5 µg/mL, 29/45 (64,4 %) izolatov z MIK 1,0 µg/mL, 3/45 (6,7 %) izolatov z MIK 2 µg/mL; 2/45 (4,4 %) izolatov z MIK 16 µg/mL ter 2/45 (4,4 %) z MIK 32 µg/mL.

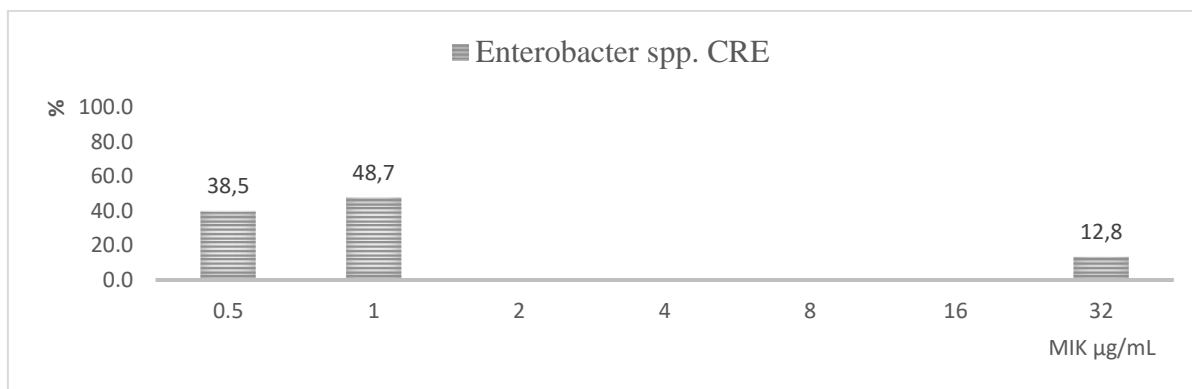


Slika 23: Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK µg/mL) kolistina za izolate *K. pneumoniae*, ki so odporni proti karbapenemom (CRE)

Glede na smernice EUCAST opredelimo rezultate občutljivosti za kolistin: 41/45 (91,2 %) izolatov *K. pneumoniae* CRE opredelimo kot občutljive za kolistin in 4/41 (8,8 %) izolatov opredelimo kot odporne proti kolistinu, pri katerih je bil MIK ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$.

4.5 OPREDELITEV MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE IZBRANIH IZOLATOV *ENTEROBACTER* spp. CRE ZA KOLISTIN

Z referenčno metodo mikrodilucije smo na mikrotitrski ploščici testirali 39 izolatov *Enterobacter* spp CRE. Spodnji graf (**Slika 24**) prikazuje, da smo pri testiranih izolatih 15/39 (38,5 %) izolatov z MIK 0,5 $\mu\text{g/mL}$; 19/39 (48,7 %) z MIK 1 $\mu\text{g/mL}$ ter 5/39 (12,8 %) izolatov z MIK 32 $\mu\text{g/mL}$.



Slika 24: Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK $\mu\text{g/mL}$) kolistina za izolate *Enterobacter* spp., ki so odporni proti karbapenemom (CRE)

Glede na smernice EUCAST opredelimo 34/39 (87,2 %) izolatov *Enterobacter* spp. CRE kot občutljive za kolistin in 5/39 (12,8 %) izolatov opredelimo kot odporne proti kolistinu, pri katerih je bil MIK kolistina ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$.

4.6 SKUPNA OBČUTLJIVOST VEČKRATNO ODPORNIH PO GRAMU NEGATIVNIH BACILOV

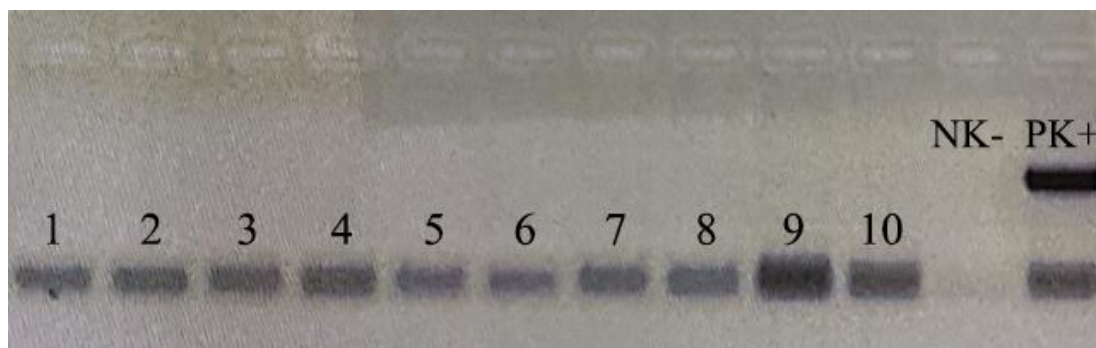
Skupna odpornost VOB-GN proti kolistinu je 10/212 (4,7 %). Ostalih 202/212 izolatov (95,3 %) je bilo občutljivih za kolistin, kar se sicer sklada z našo prvo hipotezo, ki pravi, da je odpornost VOB-GN proti kolistinu manjša kot 5 %, vendar to velja le za *A. baumannii* CRAb, *P. aeruginosa* CRPs in *E. coli* CRE. Delež odpornosti proti kolistinu večji od 5 %, smo opazili pri *K. pneumoniae* CRE in *Enterobacter* spp. CRE.

4.7 DETEKCIJA GENA MCR-1 PRI IZOLATIH VEČKRATNO ODPORNIH PO GRAMU NEGATIVNIH BACILOV, KI SO ODPORNI PROTI KOLISTINU

Izmed vseh 212 testiranih bakterijskih izolatov, smo glede na smernice EUCAST, z določitvijo MIK, opredelili 10 izolatov odpornih za kolistin, kar pomeni, da je bila njihova MIK ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$.

- 1 izolat *Acinetobacter baumannii* CRAb
- 4 izolati *Klebsiella pneumoniae* CRE
- 5 izolatov *Enterobacter* spp CRE

Vse odporne izolate smo nato testirali na prisotnost gena *mcr-1* s PCR metodo (**Slika 19**). Vsi testirani izolati so bili negativni na *mcr-1* gen, kar je predstavljeno na **Slika 25**. Skrajno desno na **Slika 25** vidimo pozitivno kontrolo (referenčni sev z genom za *mcr-1* *E. coli* NCTC 13846; PK+) ter negativno kontrolo NK- (destilirana voda).



Slika 25: Rezultati pomnoževanja gena *mcr-1* s PCR metodo pri izolatih odpornih na kolistin; NK-: negativna kontrola; PK+: pozitivna kontrola

4.8 PRESEJALNI TEST SUPERPOLIMIKSIN AGAR

Izhajajoč iz druge točke namena dela, katerega namen je bil hitro odkrivanje izolatov pri katerih je nujno izvesti opredelitev MIK, smo na vseh 212 izolatih izvedli tudi presejalno testiranje s Superpolimiksin agarjem in dobili spodaj predstavljene rezultate.

4.8.1 DOLOČITEV RASTI NA SUPERPOLIMIKSIN AGARJU

Pri vseh izolatih smo izvedli presejalno testiranje s selektivnim agarjem SPA. Rast več kot ene kolonije (≤ 1 CFU/mL) na SPA, smo šteli kot pozitiven rezultat oziroma smo pri bakterijskem izolatu postavili sum na zmanjšano občutljivost za kolistin.

V **Preglednica VII** so predstavljeni rezultati, ki smo jih dobili z uporabo SPA. Prikazano je število izolatov, pri katerih nismo zaznali rasti na SPA ali pa smo zaznali rast 1 kolonije (1 CFU/mL). V tabeli so predstavljene tudi MIK izolatov, ki smo jih določili z mikrodilucijo.

Preglednica VII: Izolati in njihova minimalna inhibitorna koncentracija ($\mu\text{g/mL}$) za kolistin, pri katerih nismo zaznali rasti kolonij (0-1 CFU/mL) na Superpolimiksin agarju

Koncentracija kolistina $\mu\text{g/mL}$	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	Skupno število izolatov
<i>A. baumannii</i>	0	4	31	3	0	0	0	0	38
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	31	2	0	0	0	0	33
<i>E. coli</i>	0	30	23	1	0	0	0	0	54
<i>K. pneumoniae</i>	0	9	29	3	0	0	0	0	41
<i>Enterobacter</i> spp	0	15	18	0	0	0	0	0	33
SKUPAJ	0	58	132	9	0	0	0	0	199

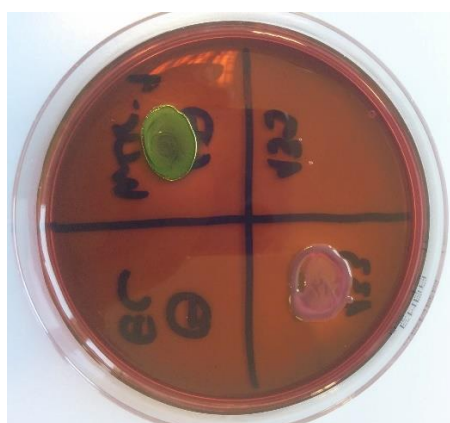
Zgornja **Preglednica VII** nam pove, da pri 199/212 testiranih izolatih, nismo zaznali rasti na SPA. MIK kolistina teh izolatov določena z mikrodilucijsko metodo je bila $\leq 2 \mu\text{g/mL}$.

Preglednica VIII: Izolati in njihova minimalna inhibitorna koncentracija ($\mu\text{g/mL}$) za kolistin, ki so kazale rast več kot 1 kolonije ($\leq 1 \text{ CFU/mL}$) na Superpolimiksin agarju

Koncentracija kolistina $\mu\text{g/mL}$	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	Skupno število izolatov
<i>A. baumannii</i>	0	0	2	0	0	0	0	1	3
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	0	0	0	0	0	0	2	2	4
<i>Enterobacter</i> spp	0	0	1	0	0	0	0	5	6
SKUPAJ	0	0	3	0	0	0	2	8	13

Zgornja **Preglednica VIII** nam pove, da smo pri 13/212 testiranih izolatih zaznali rast, ki je bila več kot 1 kolonija ($\leq 1 \text{ CFU/mL}$). Pri desetih (10) izolatih je bil MIK $\geq 4 \mu\text{g/mL}$, kar kaže na ustreznost metode in na resnično pozitiven rezultat. Pri treh (3) izolatih pa je bil MIK $\leq 2 \mu\text{g/mL}$, kar kaže na lažno pozitiven rezultat. Vsem 13/212 bakterijskim izolatom smo večkrat določili MIK in njih ponovno testirali na SPA, ter vedno dobili enake rezultate.

Na **Slika 26** so prikazani primeri rasti bakterij na Superpolimiksin agarju, ki smo jih dobili pri eksperimentalnem delu s SPA.



Slika 26: Superpolimiksin agar in rast bakterij, ki so odporne proti kolistinu; Levo zgoraj vidimo pozitivno rast kontrolnega seva *Escherichia coli* NCTC 13846 (*mcr-1* pozitiven), levo spodaj vidimo negativno rast kontrolnega seva *Escherichia coli* ATCC 25922 ter desno spodaj vidimo pozitivno rast testiranega izolata *K. pneumoniae*

4.8.2 INTERPRETACIJA PRESEJALNEGA TESTIRANJA IZOLATOV S SUPERPOLIMIKSIN AGARJEM IN NJIHOVOVE MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE

V spodnji **Preglednica IX** so prikazani rezultati, ki smo jih dobili s SPA. Testirali smo 212 izolatov.

Preglednica IX: Vrednotenje testiranih bakterij z metodo presejalnega testiranja s Superpolimiksin agarjem

Bakterija	Lažno pozitiven	Resnično negativen	Resnično pozitiven	Lažno negativen	Skupno število izolatov
<i>A. baumannii</i>	2	38	1	0	41
<i>P. aeruginosa</i>	0	33	0	0	33
<i>E. coli</i>	0	54	0	0	54
<i>K. pneumoniae</i>	0	41	4	0	45
<i>Enterobacter</i> spp	1	33	5	0	39
Skupaj	3	199	10	0	212

Za oceno presejalnega testa smo uporabili senzitivnost, specifičnost, pozitivno in negativno napovedano vrednost. Rezultati, ki smo jih dobili so prikazani v **Preglednica X**.

Preglednica X: Rezultati senzitivnosti, specifičnosti, pozitivne in negativne napovedane vrednosti *(RP: resnično pozitivni; LN: lažno negativni; RN: resnično negativni; LP: lažno pozitivni)

Formula	Senzitivnost	Specifičnost	Pozitivna napovedana vrednost %	Negativna napovedana vrednost %	RP	RN	LP	LN
	%	%						
Formula	RP/(RP+LN)	RN/(RN+LP)	RP/(RP+LP)	RN/(RN+LN)				
VOB-GN 212 izolatov	100	99	77	100	10	199	3	0
<i>A. baumannii</i>	100	95	33	100	1	38	2	0
<i>P. aeruginosa</i>	/	100	/	100	0	33	0	0
Enterobakterije <i>E. coli,</i> <i>K. pneumonia,</i> <i>Enterobacter</i> spp	100	99	90	100	9	128	1	0

5. RAZPRAVA

Pojav hitrega širjenja večkratno odpornih po Gramu negativnih bakterij postaja vedno večja svetovna težava. Možnosti za zdravljenje takšnih okužb postajajo vedno bolj omejene, zato se je povečala uporaba polimiksinskega antibiotika kolistina, ki je bil razvit pred več kot 50 leti in je večinoma ohranil učinkovitost proti VOB-GN. Uporaba polimiksinov (samih ali pogosto v kombinaciji z drugimi antibiotiki), zato postaja ključna. Vedno pogosteje so polimiksini tudi prva izbira za zdravljenje z VOB-GN (8). Nedavno odkritje plazmidno posredovanih mehanizmov odpornosti na polimiksine (gen *mcr-1* in gen *mcr-2*), predstavlja pomemben nov element v razvoju odpornosti proti polimiksinom (8). Pojavlja se potreba po ponovnem vrednotenju ključnih vprašanj v zvezi s polimiksini, potreba po novih epidemioloških študijah, oceni obsega razširjenosti odpornosti proti polimiksinom v človeški in veterinarski medicini ter predvsem natančno testiranje občutljivosti, določanje optimalnih serumskih koncentracij kolistina in boljše razumevanje težav povezanih s toksičnostjo polimiksinov. Ključnega pomena so zato nove študije polimiksinov, ki bodo dale boljše farmakokinetične in farmakodinamične podatke, podale raven njihove toksičnosti in smernice za ustrezno kombinacijo z drugimi zdravili (8). Nenazadnje je treba spodbuditi hitro odkrivanje izolatov, ki so odporni proti polimiksinom, saj takšni izolati zaradi pomanjkljivih podatkov o polimiksinih in zahtevnega testiranja, v mikrobioloških laboratorijih danes predstavljajo precejšen izziv.

V sklopu magistrskega dela smo želeli opredeliti občutljivost VOB-GN z referenčno metodo mikrodilucije in tako smo pridobili prve podatke o prevalenci odpornosti proti kolistinu med VOB-GN v Sloveniji. Hkrati pa smo testirali uporabnost presejalnega SPA agarja, na osnovi katerega bi lahko hitro in bistveno ceneje odkrivali izolate, pri katerih moramo izvesti opredelitev MIK za kolistin.

Skupna odpornost vseh 212 izolatov VOB-GN proti kolistinu je bila 10/212 (4,7 %), kar se sicer sklada z našo prvo hipotezo, ki pravi, da je odpornost VOB-GN proti kolistinu manjša kot 5 %, vendar ne velja za vse testirane vrste. Nizek delež odpornih izolatov (1/41; 2,4 %), smo z MIK za kolistin zaznali pri *A. baumannii* – CRAb (**Slika 20**), pri *P. aeruginosa* – CRPs (**Slika 21**) ter *E. coli* – CRE (**Slika 22**) pa nismo zaznali odpornih izolatov. Več kot 5 % odpornost na kolistin pa smo zaznali pri izolatih *K. pneumoniae* – CRE (**Slika 23**) (4/45;

8,8 % izolatov) ter *Enterobacter* spp – CRE (**Slika 24**) (5/39; 12,8 % izolatov), pri katerih je bil MIK kolistina ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$. Zdravljenje okužb s takšnimi bakterijami je lahko problematično, saj obstoječi antibiotiki pogosto niso učinkoviti pri zdravljenju okužb z odpornimi bakterijami, novih antibiotikov je malo, njihova uporabnost in učinkovitost pa je omejena. Kolistin v takšnih primerih predstavlja realno možnost za zdravljenje in kaže na to, da je odpornost proti kolistinu zelo zaskrbljujoča (8).

Podatke o distribuciji MIK lahko primerjamo z bazo podatkov EUCAST, ki vključujejo zbrane podatke MIK distribucij iz več virov, različnih geografskih območij in časovnih obdobj (51). Distribucije MIK za kolistin pri *A. baumannii* CRAB, ki smo jo dobili, so primerljive z bazo podatkov EUCAST (**Slika 7**) (51). Iz grafa (**Slika 7**) razberemo, da se vrednosti MIK gibljejo med 0,5-2,0 $\mu\text{g/mL}$, nekaj izolatov pa ima vrednost 16 $\mu\text{g/mL}$ in 32 $\mu\text{g/mL}$. Vrednosti MIK kolistina testiranih izolatov *A. baumannii* CRAB, ki smo jih dobili z našo raziskavo, se prav tako gibljejo med 0,5-2,0 $\mu\text{g/mL}$, 1/41 (2,4 %) izolat pa ima vrednost MIK 32 $\mu\text{g/mL}$.

Distribucija MIK za kolistin pri *P. aeruginosa* CRPs (**Slika 21**) (31/33 (93,9 %) izolatov z MIK 1 $\mu\text{g/mL}$ ter 2/33 (6,1 %) z MIK 2 $\mu\text{g/mL}$) so primerljive z bazo podatkov EUCAST (**Slika 8**) (51). Iz **Slika 8** razberemo, da se vrednosti MIK kolistina gibljejo med 0,25- 4 $\mu\text{g/mL}$, največ izolatov ima MIK kolistina 1 $\mu\text{g/mL}$ ali 2 $\mu\text{g/mL}$. Vrednosti MIK kolistina testiranih izolatov *P. Aeruginosa* CRPs, ki smo jih dobili z našo raziskavo so 1 $\mu\text{g/mL}$ in 2 $\mu\text{g/mL}$, kar je primerljivo z referenčno bazo.

Distribucija MIK za kolistin pri *E. coli* CRE (**Slika 22**) (30/54 (55,6 %) izolatov z MIK 0,5 $\mu\text{g/mL}$; 23/54 (42,6 %) izolatov z MIK 1 $\mu\text{g/mL}$ ter 1/54 (1,8 %) z MIK 2 $\mu\text{g/mL}$) je primerljiva z bazo podatkov EUCAST (**Slika 9**) (51). Iz **Slika 9** razberemo, da se vrednosti MIK kolistina gibljejo med 0,12-1 $\mu\text{g/mL}$, največ izolatov ima MIK kolistina 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Vrednosti MIK kolistina testiranih izolatov *E. Coli* CRE, ki smo jih dobili z našo raziskavo se gibljejo med 0,5-2 $\mu\text{g/mL}$.

Distribucija MIK za kolistin pri *K. pneumoniae* CRE (**Slika 23**) (41/45 (91,2 %) izolatov občutljivih za kolistin, 4/45 (8,8 %) izolatov MIK ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$) so primerljive z bazo podatkov EUCAST (**Slika 10**) (51). Iz **Slika 10** razberemo, da se vrednosti MIK kolistina gibljejo med 0,12-2 $\mu\text{g/mL}$, največ izolatov ima MIK kolistina 0,5 $\mu\text{g/mL}$, majhen odstotek ima vrednosti MIK 16 $\mu\text{g/mL}$. Vrednosti MIK kolistina testiranih izolatov *K. pneumoniae*

CRE, ki smo jih dobili z našo raziskavo se gibljejo med 0,5-2 µg/mL, 8,8 % izolatov je imelo vrednosti MIK nad 4 µg/mL.

Distribucija MIK za kolistin pri *Enterobacter* spp CRE (**Slika 24**) (15/39 (38,5 %) izolatov z MIK 0,5 µg/mL, 19/39 (48,7 %) z MIK 1 µg/mL ter 5/39 (12,8 %) izolatov z MIK 32 µg/mL). Glede na smernice EUCAST opredelimo 34/39 (87,2 %) izolatov kot S za kolistin in 5/39 (12,8 %) izolatov opredelimo kot R za kolistin, pri katerih je bil MIK kolistina ≥ 4 µg/mL. MIK distribucije, ki smo jih dobili, so primerljive z bazo podatkov EUCAST (**Slika 11** in **Slika 12**) (51). Iz grafa razberemo, da se vrednosti MIK kolistina gibljejo med 0,12-2 µg/mL, največ izolatov ima MIK kolistina 0,5 µg/mL. Nekaj odstotkov izolatov ima MIK kolistina nad 4 µg/mL.

Vse izolate, pri katerih je bil MIK kolistina ≥ 4 µg/mL (1/41 (2,4 %) izolat *Acinetobacter baumannii* CRAb, 4/45 (8,8 %) izolatov *K. pneumoniae* CRE, 5/39 (12,8 %) izolatov *Enterobacter* spp CRE), smo testirali na *mcr-1* gen s PCR metodo. Vsi testirani izolati so bili negativni na *mcr-1* gen (**Slika 25**), zato lahko sklepamo, da pri teh izolatih ne gre za plazmidno pogojeno odpornost in da so pri teh izolatih prisotne kromosomske mutacije. Kasneje je bilo odkritih še več *mcr* genov, tako da bi bilo možno, da je prisoten tudi kakšen od novejših različic gena *mcr*, kar je del nadaljnjih študij. Ne glede na to, da pri naših izolatih ni šlo za plazmidno pogojeno odpornost (*mcr-1*), moramo kritično pristopiti tudi do kromosomsko pridobljenih mutacij. Ob vedno večji porabi kolistina se povečuje tudi potreba po spremljanju pogostnosti pojavov sevov, ki so odpornih proti polimiksinom, ne glede na njihove mehanizme odpornosti bodisi plazmidno ali kromosomsko kodirane. Vedno pogosteje se poroča o izolatih *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, ki so odporni proti kolistinu in, ki pri nas in po svetu predstavljajo največji epidemiološki problem (66). Nedavna ugotovitev, da lahko na odpornost kolistina vpliva tudi uporaba klorheksidina (bisbigvanidinski antiseptik), ponovno dokazuje kompleksnost odpornosti proti antibiotikom (67). Zato so potrebne usklajene smernice za optimalno uporabo antibiotikov, kot tudi antiseptikov ter njihovem spremljanju, ne samo na področju uporabe na ljudeh, ampak tudi uporabe v veterini, hrani in navsezadnje tudi v okolju (67).

Drugi del magistrskega dela je bil usmerjen v enostavnejše in cenejše odkrivanje izolatov, ki so odporni proti polimiksinom, saj je potreba po odkrivanju takih izolatov vedno večja. Želeli smo ugotoviti ali bi lahko s presejalnim testiranjem rutinskih izolatov z uporabo SPA

agarja, ki vsebuje določeno koncentracijo kolistina (49), nezahtevno in ceneje odkrivali izolate, pri katerih moramo izvesti opredelitev minimalne inhibitorne koncentracije kolistina.

Na podlagi naših rezultatov (**Preglednica VII** in **Preglednica VIII**), smo prišli do zaključka, da lahko SPA uporabljamo kot presejalni test za iskanje izolatov odpornih proti kolistinu tekom rutinskega določanja občutljivosti za antibiotike. Naša raziskava je za 212 VOB-GN pokazala 100% senzitivnost, zato lahko s tako visoko občutljivim testom trdimo, da s SPA lahko prepoznamo izolate, ki so odporni na kolistin (**Preglednica X**). Specifičnost je bila 99%, kar kaže na to, da lahko s SPA prepoznamo tudi izolate, ki so občutljivi na kolistin (ne porastejo na agarju). Zelo spodbudno je bilo dejstvo, da nismo opazali lažno negativnih rezultatov, negativna napovedana vrednost je bila 100% (**Preglednica X**). Opažali smo lažno pozitivne rezultate, torej izolate, ki so porasli na SPA gojišču in so imeli nizek MIK za kolistin, pozitivna napovedana vrednost je znašala 77% (**Preglednica X**). Če je rezultat presejalnega testiranja s SPA pozitiven, torej če je na SPA prisotna rast, moramo pri takšnem izolatu preveriti MIK. Razlogi za nižjo pozitivno napovedane vrednost so lahko različni: problem gostote oz. količine inokuluma na SPA, problem variacije v lotih gojišča, ki je predvsem posledica težav pri pripravljanju kolistina; izguba kolistina oziroma vezava kolistina na plastične petrijevke, ipd. (8). Za dokončno opredelitev uporabnosti SPA za iskanje izolatov, ki so odporni proti kolistinu, sočasno z določanjem občutljivosti za antibiotike, je potrebna večja analiza na splošni populaciji po Gramu negativnih bakterij (ne samo na VOB-GN), kljub temu pa lahko ocenimo, da je metoda obetavna, saj bi lahko z nižjimi stroški poiskali izolate, pri katerih je potrebno določiti MIK za kolistin.

6. SKLEP

Naša študija je pokazala, da je skupna odpornost VOB-GN proti kolistinu 10/212 (4,7 %), kar se sicer sklada z našo prvo hipotezo, ki pravi, da je odpornost VOB-GN proti kolistinu manjša kot 5 %, vendar to ne velja za vse testirane vrste. Manj kot 5 % delež proti kolistinu odpornih izolatov smo zaznali pri *A. baumannii* – CRAb, *P. aeruginosa* – CRPs in pri *E. coli* – CRE. Več kot 5 % odpornost proti kolistinu smo opazili pri izolatih *K. pneumoniae* – CRE (4/45 (8,8 %)) izolatov ter *Enterobacter* spp – CRE (5/39 (12,8 %) izolatov), pri katerih je bil MIK kolistina $\geq 4 \mu\text{g/mL}$.

V drugem delu naše študije smo ugotovili, da se Superpolimiksin agar lahko uporablja za iskanje izolatov, pri katerih obstaja možnost odpornosti proti kolistinu in pri katerih je potrebno določiti minimalno inhibitorno koncentracijo za kolistin, med rutinskim testiranjem občutljivosti po Gramu negativnih bakterij, ne glede na njihov mehanizem odpornosti (plazmidno, kromosomsko kodirana ali intrinzična odpornost).

Z raziskavo smo pokazali, da lahko mikrodilucijo in s tem določitev MIK kolistina, izvajamo samo za po Gramu negativne izolate, ki imajo pozitivno rast na Superpolimiksin agarju. S tem si prihranimo čas, ki nam bi ga tehnično zahtevna metoda, kot je mikrodilucija, vzela za testiranje občutljivosti VOB-GN, poleg tega pa je presejalni test SPA tudi bistveno cenejši. Ugotovili smo, da je metoda presejalnega testiranja s SPA visoko senzitivna in enostavna za uporabo ter pripomore k hitrejšemu odkrivanju kolistinsko odpornih VOB-GN.

7. LITERATURA

1. Versalovic, Carroll, Funke, Jorgensen, Landry, Warnock: Antibacterial agents, Polymyxins; Manual of Clinical Microbiology, 10th edition, ASM press, Washington DC, 2011; 1063-1064
2. Benedict RG, Langlykke AF: Antibiotic activity of *Bacillus poly-myxa*, J Bacteriol, 1947, 54:24.
3. Marolt-Gomišček M.: Polimiksini, Antibiotiki in kemoterapevtiki v vsakdanji uporabi, 1.izdaja, Tangram, Zbirka Medicinska knjiga, 1992, 78
4. Falagas ME, Rafailidis PI, Matthaiou DK: Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options, Drug Resist Updat.,2010 Aug-Oct;13(4-5):132-138
5. Li J, Nation RL, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR, Paterson DL: Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections, Lancet Infect Dis, 2006 Sep;6(9):589-601
6. Nation RL, Velkov T, Li J. Colistin and polymyxin B: peas in a pod, or chalk and cheese? Clin Infect Dis. 2014 Jul 1;59(1):88-94
7. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. Clin InfectDis. 2005 May 1;40(9):1333-41
8. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. Clin Microbiol Rev. 2017 Apr;30(2):557-596
9. Barnett M, Bushby SRM, Wilkinson S: Sodium sulphomethyl derivatives of polymyxins. Br J Pharmacol Chemother. 1964 Dec;23:552-74
10. Li J, Milne RW, Nation RL, Turnidge JD, Coulthard K. Stability of colistin and colistin methanesulfonate in aqueous media and plasma as determined by high-performance liquid chromatography. Antimicrob Agents Chemother. 2003 Apr;47(4):1364-70
11. Kassamali Z, Rotschafer JC, Jones RN, Prince RA, Danziger LH. Polymyxins: wisdom does not always come with age. Clin Infect Dis. 2013 Sep;57(6):877-83.
12. Hancock RE. Peptide antibiotics. Lancet. 1997 Feb 8;349(9049):418-22

13. Mares J, Kumaran S, Gobbo M, Zerbe O. Interactions of lipopolysaccharide and polymyxin studied by NMR spectroscopy. *J Biol Chem.* 2009 Apr 24;284(17):11498-506
14. Pristovsek P, Kidric J: Solution structure of polymyxins B and E and effect of binding to lipopolysaccharide: an NMR and molecular modeling study. *J. Med. Chem.* 1999; 42(22):4604–4613.
15. Velkov T, Roberts KD, Nation RL, Thompson PE, Li J. Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics. *Future Microbiol.* 2013 Jun;8(6):711-24
16. Sperandio P, Martorana AM, Polissi A. Lipopolysaccharide biogenesis and transport at the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta,* 2017 Nov;1862(11):1451-1460
17. Bruslind L., Microbiology, Chapter 4, Pressbooks Sites, dostopno na <https://openoregonstate.pressbooks.pub/microbiology/chapter/bacterial-cell-walls/>, dostop 21.8.2017
18. Raetz CR, Reynolds CM, Trent MS, Bishop RE. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:295-329
19. Frirdich E, Whitfield C. Lipopolysaccharide inner core oligosaccharide structure and outer membrane stability in human pathogens belonging to the Enterobacteriaceae. *J Endotoxin Res.* 2005;11(3):133-44
20. Dixon RA, Chopra I. Leakage of periplasmic proteins from *Escherichia coli* mediated by polymyxin B nonapeptide. *Antimicrob Agents Chemother.* 1986 May;29(5):781-8
21. Li J, Nation RL, Milne RW, Turnidge JD, Coulthard K. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents,* 2005 Jan;25(1):11-25
22. Deris ZZ, Akter J, Sivanesan S, Roberts KD, Thompson PE, Nation RL, Li J, Velkov T. A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity. *J Antibiot (Tokyo).* 2014 Feb;67(2):147-51
23. Sampson TR, Liu X, Schroeder MR, Kraft CS, Burd EM, Weiss DS. Rapid killing of *Acinetobacter baumannii* by polymyxins is mediated by a hydroxyl radical death pathway, *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56(11):5642–5649

24. Yahav D, Farbman L, Leibovici L, Paul M. Colistin: new lessons on an old antibiotic. *Clin Microbiol Infect.* 2012 Jan;18(1):18-29
25. Splošni povzetek znanstvenega vrednotenja zdravil, ki vsebujejo polimiksine, Priloga IV, Znanstveni zaključki in podlaga za ohranitev dovoljenj za promet z zdravilom ali spremembo pogojev dovoljenj za promet z zdravilom, 19-22 , dostop 22.8.2017 http://www.ema.europa.eu/docs/sl_SI/document_library/EPAR_-_Scientific_Conclusion/human/001225/WC500189204.pdf
26. Li J, Milne RW, Nation RL, Turnidge JD, Smeaton TC, Coulthard K. Pharmacokinetics of colistin methanesulphonate and colistin in rats following an intravenous dose of colistin methanesulphonate, *J Antimicrob Chemother*, 2004 May;53(5):837-40
27. Znanstveni zaključki in podlaga za ohranitev dovoljenj za promet zdravilom ali spremembo pogojev dovoljenj za promet z zdravilom, kot je ustrezno, Splošni povzetek znanstvenega vrednotenja zdravil, ki vsebujejo polimiksine, Priloga A in Priloga I), 29-30 dostopno na: https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2014/20141216130250/anx_130250_sl.pdf , dostop 22.8.2017
28. Falagas ME, Kasiakou SK. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. *Crit Care.* 2006 Feb;10(1):R27
29. Mueller-Premru: Mikrobi in antibiotiki 2001, Mikrobiološki simpozij z mednarodno udeležbo, Medicinska fakulteta, Ljubljana 22-23. junij 2001; 27-37
30. Seme K.: Mehanizmi bakterijske odornosti proti antibiotikom, Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo, Gubina M., Ihan A., Ljubljana; Medicinski razgledi 2002a; 439-446
31. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol.* 2014 Nov 26;5:643
32. Falagas ME, Rafailidis PI, Matthaïou DK. Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resist Updat.* 2010 Aug-Oct;13(4-5):132-8
33. Yu Z, Qin W, Lin J, Fang S, Qiu J. Antibacterial mechanisms of polymyxin and bacterial resistance. *Biomed Res Int.* 2015;2015:679109
34. Jeannot K, Bolard A, Plésiat P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. *Int J Antimicrob Agents.* 2017 May;49(5):526-535

35. Li XP, Fang LX, Song JQ, Xia J, Huo W, Fang JT, Liao XP, Liu YH, Feng Y, Sun J. Clonal spread of *mcr-1* in PMQR-carrying ST34 *Salmonella* isolates from animals in China. *Sci Rep*. 2016 Dec 5;6:38511
36. Caniaux I, van Belkum A, Zambardi G, Poirel L, Gros MF. MCR: modern colistin resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017 Mar;36(3):415-420
37. 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. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. 2016 Feb;16(2):161-8
38. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis*. 2009 Dec 1;49(11):1749-55
39. Versalovic, Carroll, Funke, Jorgensen, Landry, Warnock: Susceptibility test methods: Dilution and disk diffusion methods; *Manual of Clinical Microbiology* 10th edition, ASM press, Washington DC, 2011; 1122
40. Versalovic, Carroll, Funke, Jorgensen, Landry, Warnock: Susceptibility test methods: Dilution and disk diffusion methods, Dilution methods; *Manual of Clinical Microbiology* 10th edition, ASM press, Washington DC, 2011; 1126
41. Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc*. 2008;3(2):163-75
42. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition*, document: M07-A9, Jan 2012
43. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group Published on www.eucast.org 22 March 2016
44. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Version 8.0, 2018. <http://www.eucast.org>

45. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1, 2017. <http://www.eucast.org>
46. Landman D, Salamera J, Quale J. 2013. Irreproducible and uninterpretable polymyxin B MICs for *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. J Clin Microbiol 51:4106 – 4111
47. Hindler JA, Humphries RM. 2013. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant Gram-negative bacilli. J Clin Microbiol 51:1678 –1684
48. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 1.0, 2009. <http://www.eucast.org>
49. Nordmann P, Jayol A, Poirel L. A Universal culture medium for screening Polymyxin-resistant Gram-negative isolates. J Clin Microbiol. 2016 May;54(5):1395-9
50. European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC), Trend of the consumption of Polymyxins (ATC group J01XB) in the hospital sector in Slovenia from 1997 to 2015, ESAC-Net data, april 2017
51. EUCAST, Antimicrobial wild type distributions of microorganisms, MIC distributions for colistin; database, dostopno na: <https://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=performSearch&BeginIndex=0&Micdif=mic&NumberIndex=50&Antib=834&Specium=-1> dostop: 23.11.2017
52. [https://en.wikipedia.org/wiki/ATCC_\(company\)](https://en.wikipedia.org/wiki/ATCC_(company)) , dostop 30.8.2017 ob 13.55
53. <https://www.phe-culturecollections.org.uk/collections/nctc.aspx>, dostop 30.8.2017
54. Turk M., Zalar P: 2.1.Nacepljanje mikroorganizmov na/v gojišče , Mikrobiologija, Praktikum, Gradivo za vaje za študente Univerze v Ljubljani, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 2012; 7
55. Bakthavatchalam YD, Pragasam AK, Biswas I, Veeraraghavan B. Polymyxin susceptibility testing, interpretative breakpoints and resistance mechanisms: An update. J Glob Antimicrob Resist. 2018 Mar;12:124-136
56. Versalovic, Carroll, Funke, Jorgensen, Landry, Warnock: Susceptibility test methods: Dilution and disk diffusion methods; Preparation, supplementation and

- storage od media; Manual of Clinical Microbiology 10th edition, ASM press, Washington DC, 2011; 1132
57. Product Specification Colistin sulfate salt, C4461 Sigma, dostopno na: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c4461?lang=en®ion=SI> 22.6.2017
 58. CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017, 192
 59. Matzneller P, Strommer S, Österreicher Z, Mitteregger D, Zeitlinger M. Target site antimicrobial activity of colistin might be misestimated if tested in conventional growth media. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015 Oct;34(10):1989-94
 60. Karvanen M, Malmberg C, Lagerbäck P, Friberg LE, Cars O. Colistin Is Extensively Lost during Standard In Vitro Experimental Conditions. Antimicrob Agents Chemother. 2017 Oct 24;61(11)
 61. Brown MR, Winsley BE. Synergistic action of polysorbate 80 and polymyxin B sulphate on *Pseudomonas aeruginosa*. J Gen Microbiol. 1968 Mar;50(3)
 62. Humphries RM. Susceptibility testing of the polymyxins: where are we now? Pharmacotherapy. 2015 Jan;35(1):22-7
 63. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST , Version 7.0, 2017
 64. Š. Adamič, Specifičnost in občutljivost kliničnih preiskav, Temelji Biostatistike, 2.izdaja, Medicinska fakulteta, 1989: 128-132
 65. Štrukelj B., Kos J.:Proučevanje genov, PCR in njegove izpeljanke; Biološka zdravila: od gena do učinkovine, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana 2007, 55
 66. Pokrajac T: Bolnišnične okužbe, UNI LJ- MF, Katedra za javno zdravje, 2010, dostop, 25.7.2017
<http://www.mf.unilj.si/dokumenti/356d31180995ac6b5dead925384724d1.pdf>,
 67. Wand ME, Bock LJ, Bonney LC, Sutton JM. Mechanisms of increased resistance to chlorhexidine and cross-resistance to colistin following exposure of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates to chlorhexidine. Antimicrob Agents Chemother. 2016 Dec 27;61(1)