

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ
ΔΠΜΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

Διπλωματική εργασία

**Θέμα: «Νέες προσεγγίσεις στην αντιμετώπιση της μικροβιακής
αντίστασης έναντι των β – λακταμικών αντιμικροβιακών»**

Νικολίνα Βούρβου

Φοιτήτρια ΔΠΜΣ Βασικών Βιοϊατρικών Επιστημών



ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2023

«... Θα 'ναι φριχτό να φύγουμε έτσι, δίχως

μια πίστη, έναν αγώνα, μια κραυγή.

Άνθρωποι που πεθάναν δίχως μια αμυχή...

Άνθρωποι που “διελύθησαν ησύχως” ...»

B. Λεοντάρης

*Η παρούσα εργασία είναι αφιερωμένη
στον σύζυγο και την οικογένειά μου,
που δεν σταματούν να αγωνίζονται.*

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Βασικών Βιοϊατρικών Επιστημών», της Ιατρικής Σχολής, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η μελέτη, η ανάλυση και η συγγραφή της, πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψη του κ. Γεώργιου Λεονταρίτη, Επίκουρου Καθηγητή Φαρμακολογίας.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Γεώργιο Λεονταρίτη, για τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσε αλλά και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά την διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Η βοήθειά του υπήρξε καθοριστικής σημασίας καθώς με υπομονή και συμπαράσταση με καθοδήγησε και συντέλεσε στην κατανόηση του αντικειμένου μου. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Περικλή Παππά, καθηγητή Φαρμακολογίας καθώς και την κα. Αικατερίνη Αντωνίου, καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για όλη την βοήθεια που μου προσέφεραν. Η ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας θα ήταν αδύνατη χωρίς την πολύτιμη υποστήριξη και καθοδήγησή τους.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω βαθιά τον σύζυγό μου, για την υπομονή, την κατανόηση και την υποστήριξή του κατά την διάρκεια εκπόνησης των μεταπτυχιακών μου σπουδών. Τέλος ιδιαίτερα θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω στην οικογένειά μου, οι οποίοι υπήρξαν πάντα έναν ανεκτίμητο στήριγμα για εμένα, σε όλη την διάρκεια των σπουδών μου μέχρι και σήμερα.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	iii
Abstract	iv
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο	1
1. β – Λακταμικά αντιμικροβιακά.....	2
1.1. Κατηγορίες β-λακταμικών αντιμικροβιακών	6
1.2. Μηχανισμός δράσης β-λακταμικών αντιμικροβιακών.....	16
1.3. Ανεπιθύμητες ενέργειες β – λακταμικών αντιμικροβιακών.....	18
1.4. Χρήση β-λακταμικών αντιμικροβιακών.....	19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο	24
2.1.Μηχανισμοί - Είδη Αντίστασης μικροοργανισμών σε β – λακταμικά αντιμικροβιακά	25
2.1.1. 1ος Μηχανισμός: Περιορισμένη πρόσληψη αντιμικροβιακού	28
2.1.2. 2ος Μηχανισμός: Αντλίες εκροής αντιμικροβιακού φαρμάκου.....	29
2.1.3. 3ος Μηχανισμός: Τροποποίηση των μορίων – στόχων των αντιμικροβιακών	31
2.1.4. 4ος Μηχανισμός: Απενεργοποίηση του αντιμικροβιακού. Δράση β - λακταμασών.....	33
2.2.Παθογόνοι μικροοργανισμοί που εμφανίζουν αντίσταση	34
2.2.1. <i>Acinetobacter baumannii</i> και εμφάνιση αντοχής	35
2.2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> και ανοχή στις καρβαπενέμες.....	37
2.2.3. Εντεροβακτήρια και ανοχή στις καρβαπενέμες.....	41
2.3. Ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις.....	45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο	47
3.1. β – λακταμάσες.....	48
3.1.1.Κατηγοριοποίηση σύμφωνα με την πρωτεϊνική τους αλληλουχία.....	48
3.1.2.Κατηγοριοποίηση σύμφωνα με τα λειτουργικά χαρακτηριστικά	49
3.2. Μηχανισμός δράσης β – λακταμασών	54
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο	55
4.1.Προσεγγίσεις στην αντιμετώπιση της αντίστασης	56
4.1.1.Εναλλακτικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση τις αντίστασης	56
4.1.1.1. Στόχευση παραγόντων μόλυνσης.....	56
4.1.1.2. Χρήση νανοσωματιδίων	57
4.1.2.Χρήση αντιβιοτικών συνδυαστικά με ανοσοενισχυτικές ενώσεις	57
4.1.3. Χρήση αναστολέων β – λακταμασών.....	60

4.1.3.1.Αναστολείς β – λακταμασών που δεν διαθέτουν στην δομή τους β – λακταμικό δακτύλιο..	61
4.1.3.2.Αναστολείς αντλιών εκροής.....	67
4.1.4. Νέα β – λακταμικά αντιμικροβιακά	68
4.1.5. Τελευταίες εξελίξεις στην αντιμετώπιση της αντίστασης στα β – λακταμικά	69
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ^ο	74
5. Συμπεράσματα - Συζήτηση	75
Βιβλιογραφία.....	80

Περίληψη

Τα αντιμικροβιακά φάρμακα αποτέλεσαν για πάρα πολλά χρόνια, το σημαντικότερο όπλο στην αντιμετώπιση των μικροοργανισμών αλλά και των ασθενειών που αυτά μπορούν να επιφέρουν. Τα τελευταία χρόνια όμως η εμφανιζόμενη αντίσταση των μικροοργανισμών στα παραδοσιακά αντιμικροβιακά είναι ολοένα και αυξανόμενη. Ασθένειες που άλλοτε αντιμετωπιζόνταν με την χορήγηση των φαρμάκων αυτών, πλέον απαιτούν εναλλακτικές ή και συνδυαστικές θεραπείες. Στην δύσκολη αυτή κατάσταση συνέβαλε σημαντικά η διαδεδομένη και ευρεία χρήση των αντιμικροβιακών, όχι μόνο στην κοινότητα των ανθρώπων και στις δομές υγείας, αλλά και στην κτηνοτροφία και την γεωργία. Η μεγάλη επαφή των μικροοργανισμών με τους αντιμικροβιακούς αυτούς παράγοντες, συνέβαλλε στην ανάπτυξη μηχανισμών από τους μικροοργανισμούς αυτούς, ώστε να επιβιώνουν παρουσία των παραγόντων αυτών. Μια κατηγορία αντιμικροβιακών φαρμάκων αποτελούν τα β – λακταμικά αντιμικροβιακά. Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιεί σύντομη ανασκόπηση στις κατηγορίες, τις ιδιότητες καθώς και τους μηχανισμούς δράσης των β – λακταμικών αντιμικροβιακών. Επίσης μελετά τους διαφορετικούς μηχανισμούς αντίστασης που αναπτύσσονται από τους μικροοργανισμούς, προκειμένου να επιβιώνουν παρουσία των αντιμικροβιακών φαρμάκων. Ιδιαίτερη βαρύτητα δίνεται στις β – λακταμάσες, ένζυμα τα οποία έχουν ως στόχο τα β – λακταμικά αντιμικροβιακά και συμβάλλουν στην αναστολή της δράσης τους και την εμφάνιση αντίστασης. Τέλος παρουσιάζονται νέες στρατηγικές αντιμετώπισης της αντίστασης των μικροοργανισμών, στα αντιμικροβιακά φάρμακα, οι οποίες ελέγχονται και δοκιμάζονται από επιστήμονες στο συγκεκριμένο πεδίο έρευνας.

Abstract

Antimicrobial drugs are widely used to kill or inhibit the growth of pathogenic microbes and infectious disease. However in the last decades infectious diseases continue to be one of main reason for death worldwide, because of antimicrobial resistance. Antimicrobial resistance occurs when bacteria, viruses, fungi and parasites change over time and no longer respond to medicines making infections harder to treat. The increasing resistance of microorganisms towards antimicrobials has lead to serious health problems. The β – lactam antibiotics are antibiotics that contain a beta – lactam ring in their chemical structure. The aim of our study is to analyze the mechanism of b – lactam drugs as well as the different mechanisms of resistance against these drugs. We also analyze the mechanism of beta – lactamases. They are enzymes produced by bacteria that provide multi – resistance to beta – lactams antibiotics. More over in this study we summarize a number of new strategies in antimicrobial therapy.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

1. β – Λακταμικά αντιμικροβιακά

Με τον όρο αντιμικροβιακά, αναφερόμαστε σε χημικές ουσίες, οι οποίες διαθέτουν βακτηριοκτόνες ή βακτηριοστατικές ιδιότητες. Οι χημικές αυτές ουσίες μπορεί να αποτελούν φυσικά παράγωγα των μικροοργανισμών καθώς επίσης και ημισυνθετικές ή/και συνθετικές ενώσεις (Διαδικτυακή πηγή: <https://www.galinos.gr> – Εθνικό συνταγολόγιο Κεφ. 05.01). Αναφέρονται έτσι ως χημειοθεραπευτικά φάρμακα, η χρήση των οποίων έχει ως στόχο την θεραπεία ή την πρόληψη των βακτηριακών λοιμώξεων. Τα αντιμικροβιακά, ενώ εμφανίζουν υψηλή αποτελεσματικότητα έναντι των μυκήτων και των παρασίτων, φαίνεται να μην διαθέτουν την αντίστοιχη δράση έναντι των ιών. Δυο είναι τα βασικά αίτια για την εμφάνιση αυτού του φαινομένου (Διαδικτυακή πηγή: <https://www.galinos.gr> – Εθνικό συνταγολόγιο Κεφ. 05.01):

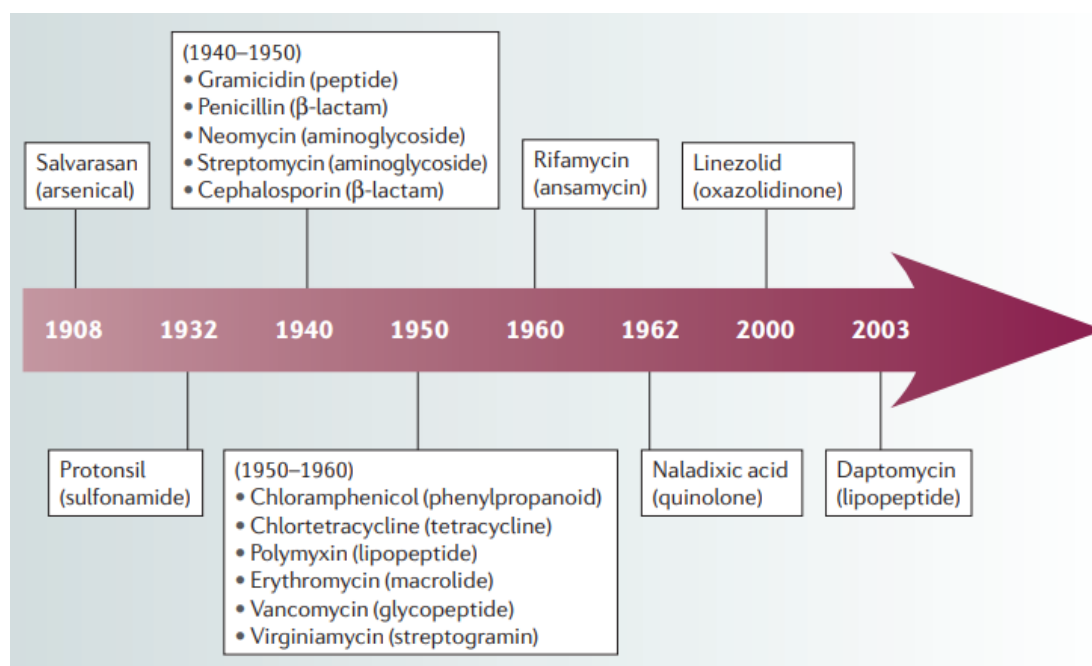
- αφενός το ότι, οι ιοί δεν διαθέτουν δικό τους μεταβολισμό καθώς παρασιτούν και χρησιμοποιούν τους μηχανισμούς του κυττάρου,
- αφετέρου η αυξημένη δυσκολία της παραγωγής φαρμάκων, τα οποία διαθέτουν εκλεκτική τοξικότητα έναντι του παθογόνου, χωρίς να προκαλούν βλάβες στο ανθρώπινο κύτταρο.

Οι κυριότερες ομάδες αντιμικροβιακών είναι:

- β – λακτάμες
- Αμινογλυκοσίδες
- Μακρολίδες
- Λινκοζαμίδες
- Παράγωγα αμινιξέα
- Τετρακυκλίνες
- Χλωραμφενικόλη
- Πολυπεπίδια
- Στεροειδή αντιβιοτικά
- Σουλφοναμίδες – τριμεθοπρίμη
- Κινολόνες
- Αντιφυματικά φάρμακα

Πραγματοποιώντας μια σύντομη ανασκόπηση στην ιστορία των αντιμικροβιακών, αξίζει να αναφέρουμε ορισμένα σημαντικά σημεία – ορόσημο (Εικόνα 1). Έτσι ξεκινώντας το 1877 αναγνωρίζεται, για πρώτη φορά, από τους Pasteur και Joubert, η κλινική χρήση των μικροοργανισμών καθώς και των παραγώγων τους (Lima *et al.*, 2020). Στο αποτέλεσμα αυτό συνετέλεσε η παρατήρηση του βακίλου του άνθρακα, ο οποίος αναπτυσσόταν ταχύτατα έπειτα από εμβολιασμό του σε ούρα, παράλληλα όμως εμφάνιζε αδυναμία να πολλαπλασιαστεί. Παρατηρήθηκε επίσης ότι ο βάκιλος αυτός πέθαινε σχεδόν άμεσα, αν τα ούρα στα οποία εμβολιάζονταν, μολύνονταν από βακτήρια από τον περιβάλλοντα αέρα (L.Pasteur and J.Joubert, 1877). Το 1928 παρατηρείται από τον Alexander Fleming, σε τρυβλίο εμβολιασμένο με στέλεχος *Staphylococcus*, το

οποίο έχει επιμολυνθεί από τον μύκητα *Penicillium notatum*, μείωση της ανάπτυξης του βακτηριακού στελέχους. Συγκεκριμένα η εικόνα του τρυβλίου είχε ως εξής, γύρω από τους σχηματισμούς του αναπτυσσόμενου μύκητα, είχε δημιουργηθεί ένα διαφανές στεφάνι, δείκτης λύσης και μείωσης του ρυθμού ανάπτυξης του βακτηριακού στελέχους. Εξήχθη έτσι το συμπέρασμα ότι ο αναπτυσσόμενος μύκητας παρήγαγε βακτηριοστατικούς παράγοντες (Lima *et al.*, 2020). Παρά τις παρατηρήσεις του Fleming από το 1928, μόλις το 1940 οι Ernest Boris Chain και Lord Howard Florey, κατόρθωσαν την απομόνωση της πενικιλίνης και την παραγωγή της σε σημαντικές ποσότητες, με απώτερο στόχο την χρήση της σε δοκιμές σε ποντίκια. Αντίστοιχα το 1941 καταγράφονται οι πρώτες κλινικές δοκιμές της πενικιλίνης στον άνθρωπο (Lima *et al.*, 2020).



Εικόνα 1: Απεικόνιση του χρονοδιαγράμματος ανακάλυψης των αντιμικροβιακών (Gerard D. Wright, 2007).

Έπειτα από τις πρώτες αυτές ανακαλύψεις πληθώρα αντιμικροβιακών ανακαλύφθηκαν. Η βασική ομάδα αντιμικροβιακών που θα αποτελέσει το αντικείμενο ανάλυσης στην παρούσα εργασία είναι η ομάδα των β-λακταμικών αντιμικροβιακών.

Τα β-λακταμικά αντιμικροβιακά, αποτελούν τα πλέον διαδεδομένα, ως προς την χρήση τους, αντιμικροβιακά. Υπολογίζεται ότι πάνω από το 65% της συνολικής αγοράς φαρμάκων αντιστοιχεί στα β-λακταμικά αντιμικροβιακά φάρμακα, με τα αντίστοιχα ποσά που αντιστοιχούν στην κατανάλωση των φαρμάκων αυτών, να ανέρχονται στα 15 δισεκατομμύρια δολάρια ετησίως (Thakuria B. *et al.*, 2013). Η διαδεδομένη χρήση τους οφείλεται στο ότι, διαθέτουν αντιμικροβιακή δράση μεγάλου εύρους σε συνδυασμό με την εμφάνιση ελάχιστων παρενεργειών καθώς επίσης και υψηλής αντοχής. Σε ότι αφορά την δομή τους, τα αντιμικροβιακά της ομάδας αυτής, διαθέτουν έναν

κοινό β-λακταμικό δακτύλιο (Lima *etal.*, 2020). Έτσι η ομάδα αυτή των αντιμικροβιακών διαιρείται σε υποκατηγορίες, ανάλογα με την χημική δομή του δακτυλίου, ο οποίος ενώνεται με τον β-λακταμικό δακτύλιο (Εικόνα 2). Οι υποκατηγορίες αυτές είναι:

1. Κεφαλοσπορίνες: σύνδεση του β-λακταμικού δακτυλίου με έναν εξαμελή δακτύλιο που περιέχει θείο.
2. Πενικιλίνες: σύνδεση του β-λακταμικού δακτυλίου με έναν πενταμελή δακτύλιο που περιέχει θείο.
3. Καρβαπενέμες: σύνδεση του β-λακταμικού δακτυλίου με έναν δακτύλιο κυκλοπεντανίου. Αντίστοιχα στις πενέμες με έναν δακτύλιο 2,3 – διυδροθειοφαινίου.
4. Μονοβακτάμες: ο β-λακταμικός δακτύλιος δεν συνδέεται με κάποιον δακτύλιο.

Μια ακόμα κατηγορία β-λακταμικών αντιμικροβιακών μπορεί να αποτελέσει μια ομάδα αναστολέων των β-λακταμασών. Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει παράγοντες αναστολής της δράσης των β-λακταμασών.

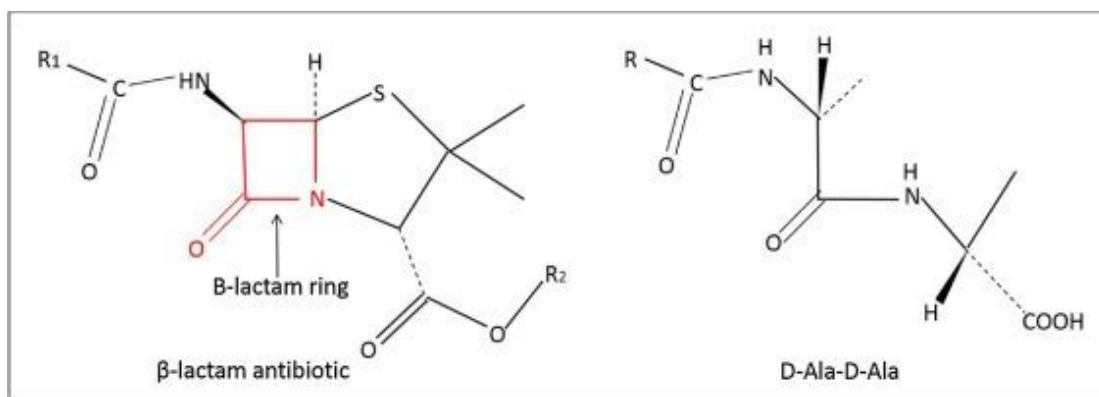
Τα β-λακταμικά αντιμικροβιακά διαθέτουν ευρεία κλινική χρήση για την αντιμετώπιση διαφόρων λοιμώξεων. Στον **πίνακα 1** που ακολουθεί συγκεντρώνονται ορισμένες από τις λοιμώξεις οι οποίες αντιμετωπίζονται με την χρήση των β-λακταμικών αντιβιοτικών.

Πίνακας 1: Γενικός πίνακας της χρήσης των β-λακταμικών αντιμικροβιακών ανάλογα με το είδος και την περιοχή της εμφανιζόμενης λοίμωξης.

<i>Περιοχή μόλυνσης</i>	<i>Β-λακταμικά αντιμικροβιακά</i>
Δέρμα και μαλακοί ιστοί	Κεφαλοσπορίνες, Πενικιλίνες, Καρβαπενέμες
Οδοντοστοιχία	Πενικιλίνες
Φάρυγγας	Κεφαλοσπορίνες, Πενικιλίνες
Ιγμορίτιδα	Πενικιλίνες, Κεφαλοσπορίνες
Μηνιγγίτιδα	Κεφαλοσπορίνες 3ης και 4ης γενιάς, Καρβαπενέμες
Κατώτερη αναπνευστική οδός	Πενικιλίνες, Κεφαλοσπορίνες, Καρβαπενέμες
Ουροποιητικό	Πενικιλίνες, Κεφαλοσπορίνες,

	Μονοβακτάμες, Καρβαπενέμες
Ενδο-κοιλιακές Λοιμώξεις	Κεφαλοσπορίνες σε συνδυασμό με παράγοντες με αναερόβια δράση, καρβαπενέμες, ουριδινο-πενικιλίνη συνδυαστικά με β-λακταμικό αναστολέα
Οστά και αρθρώσεις	Πενικιλίνες, Κεφαλοσπορίνες
Μολυσματική ενδοκαρδίτιδα	Πενικιλίνες, Κεφαλοσπορίνες

Η ύπαρξη του β-λακταμικού δακτυλίου (Εικόνα 2) στην δομή των β-λακταμικών αντιμικροβιακών, έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση της αντιμικροβιακής δράσης. Ως εκ τούτου είναι λογικό, το φάσμα της αντιμικροβιακής αυτής δράσης, να εμφανίζει μια σχέση εξάρτησης ως προς τους φυσικοχημικούς παράγοντες που σχετίζονται με την δομή των αντιμικροβιακών. Είναι γενικά γνωστό ότι σε κατά Gram αρνητικά βακτηριακά στελέχη, η δράση των αντιμικροβιακών της ομάδας αυτής ευνοείται από την υδροφιλικότητά τους, ενώ αντίστοιχα σε κατά Gram θετικά βακτηριακά στελέχη η δράση τους ευνοείται από την λιποφιλικότητά τους (Lima *et al.*, 2020). Στις ενότητες που ακολουθούν, πραγματοποιείται εκτενέστερη ανάλυση των υποομάδων των β-λακταμικών αντιμικροβιακών.

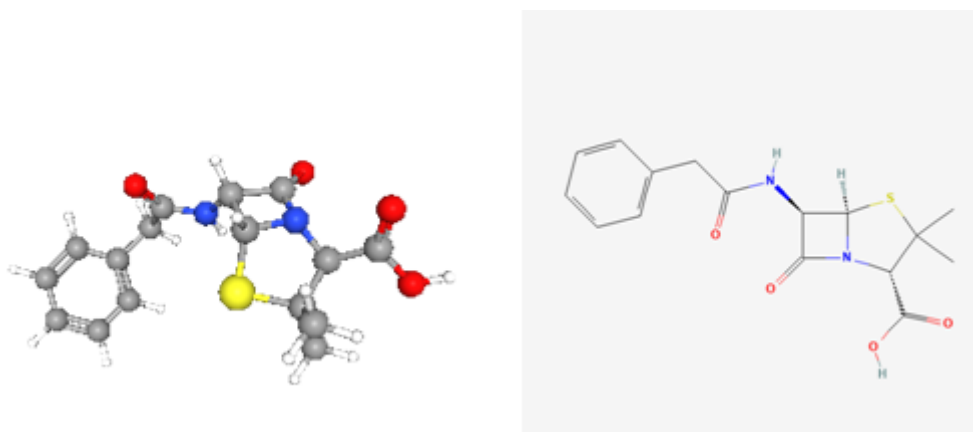


Εικόνα 2: Απεικόνιση του λακταμικού δακτυλίου των β – λακταμικών αντιμικροβιακών (δακτύλιος με κόκκινο χρώμα) και της δομικής ομοιότητας αυτού με το πεπτίδιο D – αλανίνη – D – αλανίνη, το οποίο αποτελεί υπόστρωμα των PBPs (Penicillin Binding Proteins). (Lingzhi Li *et al.*, 2018).

1.1.Κατηγορίες β-λακταμικών αντιμικροβιακών

1.1.1.Πενικιλίνες

Όπως προαναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, τα β-λακταμικά αντιμικροβιακά κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις κύριες κατηγορίες ανάλογα με την δομή του δακτυλίου, με τον οποίον ενώνεται ο β-λακταμικός δακτύλιος. Μια κατηγορία εξ αυτών αποτελούν οι Πενικιλίνες. Η πενικιλίνη αποτελεί το πρώτο αντιμικροβιακό το οποίο ανακαλύφθηκε από τον Alexander Fleming το 1928. Πρόκειται για την βενζυλοπενικιλίνη G (**Εικόνα 3**), η οποία περιγράφεται σαν ένα παράγωγο ασταθές σε υδατικό περιβάλλον, που όμως εμφανίζει ιδιότητες, οι οποίες το καθιστούν, χρήσιμο αντισηπτικό καθώς και εκλεκτικό παράγοντα για την απομόνωση κατά Gram αρνητικών βακτηρίων. Ακόμα εμφανίζει υψηλή δραστηριότητα έναντι στρεπτοκοκκικών και σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων (Bush and Bradford, 2016). Γενικά οι περισσότερες Πενικιλίνες αποτελούν ημισυνθετικά παράγωγα, τα οποία προκύπτουν από την προσθήκη πλευρικών άκυλο – αλυσίδων, στην 6-αμινομάδα.



Εικόνα 3: Απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής της Πενικιλίνης G (Αριστερά), καθώς επίσης και της διδιάστατης δομής της (Δεξιά) (Διαδικτυακή Πηγή: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Penicillin-g>).

Οι Πενικιλίνες αυτές ταξινομούνται σε υποκατηγορίες ανάλογα με το αντιμικροβιακό τους φάσμα. Οι κατηγορίες είναι οι εξής (Jason B.Sauberan and John S.Bradley, 2018):

- Τα φυσικά παράγωγα Πενικιλίνης
- Οι αμινοπενικιλίνες: Προσθήκη αμινο- ομάδας στην βασική δομή του μορίου τους πενικιλίνης.
- Οι Πενικιλίνες που εμφανίζουν αντοχή στην πενικιλινάση: Πενικιλίνες όπου έχει γίνει προσθήκη μιας πλευρικής ισοξαζολυλικής αλυσίδας στην βασική δομή τους πενικιλίνης. Ως

εκ τούτου προστατεύεται ο β-λακταμικός δακτύλιος από την όξινη υδρόλυση που προκαλούν οι πενικιλινάσες.

- Οι καρβοξυπενικιλίνες: αντίστοιχη προσθήκη καρβόξυ-ομάδας στην δομή του μορίου τους πενικιλίνης.
- Ουριδοπενικιλίνες: Προσθήκη της ούριδο-ομάδας στην δομή της πενικιλίνης έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενώσεων αζλοκιλίνης και μεζλοκιλίνης.

Στις Πενικιλίνες που αποτελούν φυσικά παράγωγα, ανήκει η πρώτο ανακαλυφθείσα βενζυλοπενικιλίνη G, η οποία παράγεται από την διαδικασία ζύμωσης του μύκητα *Penicillium crysogenum*. Τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά που εμφανίζει η βενζυλοπενικιλίνη G είναι (Lima *et al.*, 2020):

- Διασπάται στο στομάχι από τα οξέα του στομάχους.
- Αποικοδομείται πλήρως τους νεφρούς κατά την πειραματική έκκριση.
- Ο χρόνος ημιζωής τους είναι 20 – 30 λεπτά έπειτα από την ενδομυϊκή ένεση.
- Εμφανίζει αυξημένη σταθερότητα σε pH5,5 έως 8.
- Μπορεί να διασπάται από τις πενικιλινάσες, οι οποίες αποτελούν β-λακταμάσες παραγόμενες από στελέχη του γένους *Staphylococcus*.
- Εμφανίζει μικρό αντιμικροβιακό φάσμα.

Πέραν της βενζυλοπενικιλίνης G, ακόμη ένα φυσικό παράγωγο αποτελεί και η φαινοξυ-μεθυλοπενικιλίνη, η οποία είναι γνωστή και ως πενικιλίνη V. Η πενικιλίνη V προκύπτει έπειτα από την προσθήκη φαινόξυ οξικού οξέος. Η βασική τους χρήση είναι η αντιμετώπιση λοιμώξεων οι οποίες προκαλούνται από τον *Streptococcus spp*, και η χορήγηση γίνεται μέσω πόσιμων σκευασμάτων, καθότι η προσθήκη του φαινόξυ οξικού οξέος προσδίδει σταθερότητα έναντι των γαστρικών οξέων. Το αντιμικροβιακό τους φάσμα είναι όμοιο με εκείνο της βενζυλοπενικιλίνης (Pottgard *etal.*, 2015). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τόσο η Βενζυλοπενικιλίνη όσο και η φαινοξυ – μεθυλοπενικιλίνη υδρολύονται από τις β-λακταμάσες (Lima *et al.*, 2020).

Πίνακας 2: Κατάταξη των διαφορετικών πενικιλινών σε κατηγορίες σύμφωνα με το αντιμικροβιακό τους φάσμα. (Διαδικτυακή πηγή: Infectious Disease & antimicrobial agents – <http://www.antimicrobe.org/>)

Υποκατηγορίες Πενικιλινών

Φυσικά Παράγωγα	Πενικιλίνες με αντοχή στις Πενικιλινάσες	Αμινοπενικιλίνες	Καρβόξυπενικιλίνες	Ουριδοπενικιλίνες
Πενικιλίνη G σε άλας καλίου (Penicillin G potassium)	Μεθικιλίνη (Methicillin)	Αμπικιλίνη (Ampicillin)	Καρβενικιλίνη (Carbenicillin)	Αζλοκιλλίνη (Azlocillin)
Φαινόξυ-μέθυλοπενικιλίνη (phenoxymethyl penicillin)	Ναφκιλλίνη (Nafcillin)	Αμοξικιλίνη (Amoxicillin)	Τικαρκιλλίνη (Ticarcillin)	Μεζλοκιλλίνη (Mezlocillin)
Προκαϊνούχος Βένζυλοπενικιλίνη (Penicillin G procaine)	Οξακιλλίνη (Oxacillin)	Βακαμπικιλίνη (Bacampicillin)		Πιπερακιλλίνη (Piperacillin)
Βενζανθινική πενικιλίνη (Penicillin G benzathine)	Κλοξακιλλίνη (Cloxacillin)			
Συνδυασμός προκαϊνούχου και Βενζανθινικής πενικιλίνης	Δίκλοξακιλλίνη (Dicloxacillin)			

Σε ότι αφορά το αντιμικροβιακό φάσμα, τα φυσικά παράγωγα πενικιλίνης, εμφανίζουν αυξημένη δράση έναντι (<http://www.antimicrobe.org/index.asp>):

- των κατά Gram θετικών κόκκων, οι οποίοι εμφανίζουν αδυναμία σύνθεσης β-λακταμασών.
- Στελέχη στρεπτόκοκκου τα οποία ανήκουν στην ομάδα A, καθώς και του *Streptococcus Pneumoniae*.
- Αναερόβιους στρεπτόκοκκους όπως *Peptostreptococcus* και *Peptococcus*.
- Του βακτηριακού στελέχους *Staphylococcus aureus* καθώς και έναντι αρνητικών στην κοαγκουλάση στελεχών *Staphylococcus*. Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί, ότι η δράση των φυσικών παραγώγων πενικιλίνης έναντι των στελεχών αυτών, υφίσταται μόνο έναντι σε στελέχη του γένους αυτού τα οποία δεν έχουν την δυνατότητα να παράγουν πενικιλινάσες.
- Του *Clostridium sp* καθώς επίσης και του *Actinomyces sp*.
- Των Gram αρνητικών βακτηρίων, η οποία όμως είναι ασθενής. Έτσι εμφανίζει δράση έναντι των στελεχών *Neisseria meningitidis* και *Neisseria gonorrhoeae*, τα οποία όπως και στην περίπτωση των σταφυλοκόκκων, δεν έχουν την δυνατότητα παραγωγής πενικιλινάσων.

- Των σπειροχαιτών, όπου εδώ χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το στέλεχος *Treponema pallidum*, το οποίο είναι υπεύθυνο για την εμφάνιση της νόσου της σύφιλης.

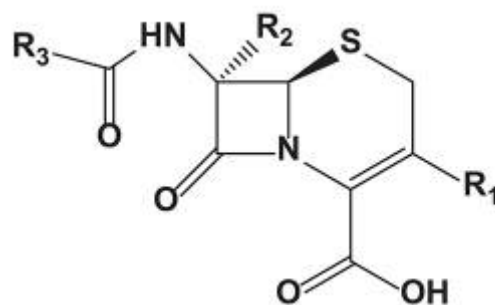
Αντίστοιχα, για την κατηγορία των πενικιλινών που εμφανίζουν ανθεκτικότητα έναντι των πενικιλινασών, διαθέτουν αυξημένη δράση έναντι των σταφυλόκοκκων, για τον λόγο αυτό λέγονται συχνά και αντισταφυλοκοκκικές Πενικιλίνες (Infectious Disease & antimicrobial agents). Στην κατηγορία αυτή ταξινομείται η Μεθικιλίνη.

Άλλη κατηγορία αποτελούν οι Αμινοπενικιλίνες, οι οποίες αναπτύχθηκαν ώστε να βελτιωθεί η δράση των φυσικών παραγώγων πενικιλίνης, έναντι των κατά Gram αρνητικών βακτηρίων. Παρόλα αυτά το αντιμικροβιακό τους εύρος είναι όμοιο με εκείνο των φυσικών παραγώγων. Οι αμινοπενικιλίνες χορηγούνται συνήθως μαζί με αναστολείς των β-λακταμασών (Neelanjana Pandey and Marco Cascella, 2022). Τέλος εμφανίζουν ελαφρώς βελτιωμένη δράση έναντι των εντερόκοκκων από ότι τα φυσικά παράγωγα πενικιλίνης.

Σε ότι αφορά τις ουριδινοπενικιλίνες, εμφανίζουν δραστηριότητα έναντι των ανθεκτικών στις αμινοπενικιλίνες, κατά Gram αρνητικών βακίλων όπως η *Pseudomonas aeruginosa*. Και αυτές όπως και οι αμινοπενικιλίνες χορηγούνται μαζί με αναστολείς β-λακταμασών (Neelanjana Pandey and Marco Cascella, 2022).

1.1.1. Κεφαλοσπορίνες

Οι κεφαλοσπορίνες αποτελούν την δεύτερη κατηγορία των β-λακταμικών αντιμικροβιακών. Η ομάδα αυτή προέκυψε με την ανακάλυψη της κεφαλοσπορίνης C, έπειτα από καλλιέργεια του μύκητα *Cephalosporium acremonium*. Η κεφαλοσπορίνη C είναι ένα φυσικό παράγωγο το οποίο εμφάνιζε ορισμένες σημαντικές ιδιότητες, μεταξύ αυτών και σταθερότητα έναντι των πενικιλινασών (Newton and Abraham, 1956 ; 1987). Αποτέλεσε έτσι ένα χρήσιμο εργαλείο έναντι των λοιμώξεων από τον *S. aureus*, ο οποίος είχε την δυνατότητα παραγωγής πενικιλινασών, εμφανίζοντας έτσι ανοχή στις πενικιλίνες. Η αρχική παρατήρηση έγινε από τον Giuseppe Brotzu, έναν Ιταλό φαρμακολόγο, ο οποίος σε απομονωμένα στελέχη *Cephalosporium acremonium*, από το αποχετευτικό σύστημα της Σαρδηνίας, παρατήρησε αναστολή της ανάπτυξης βακτηρίων που προκαλούσαν τον τυφοειδή πυρετό όπως η *Salmonella typhi* (Lima et al., 2020). Όπως προαναφέρθηκε οι κεφαλοσπορίνες δομικά αποτελούνται από τον βασικό πυρήνα του β-λακταμικού δακτυλίου ο οποίος ενώνεται με έναν δακτύλιο διυδροθειαζίνης (Εικόνα 4) (Lima et al., 2020).



Εικόνα 4: Απεικόνιση της δομής της κεφαλοσπορίνης, η οποία προκύπτει από την ένωση του β-λακταμικού δακτυλίου με έναν δακτύλιο διωδροθειαζίνης (Karen Bush and Patricia A. Bradford, 2016).

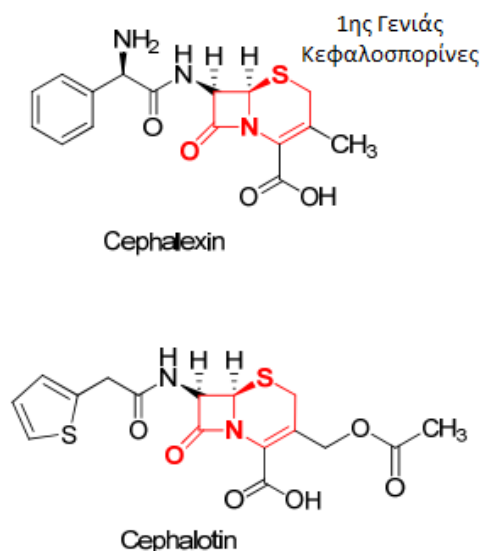
Οι κεφαλοσπορίνες μπορούν να χορηγούνται είτε από του στόματος είτε παρεντερικά και εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση με MIC \leq 4μg/ml, έναντι ορισμένων μικροοργανισμών όπως οι εξής: *Staphylococci*, *Streptococcus pneumoniae* αλλά και ορισμένων εντεροβακτηρίων που δεν εμφανίζουν δυνατότητα παραγωγής β-λακταμασών (Karen Bush and Patricia A. Bradford, 2016). Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί, ότι οι κεφαλοσπορίνες που προορίζονται για παρεντερική χρήση εμφανίζουν αυξημένη αποτελεσματικότητα, καθότι είναι οκτώ φορές πιο αποτελεσματικές έναντι των αντίστοιχων που προορίζονται για από του στόματος χορήγηση. Συχνά η χρήση τους έχει στόχο την αντικατάσταση των πόσιμων σκευασμάτων σε ασθενείς με αλλεργίες στην πενικιλίνη (Karen Bush and Patricia A Bradford, 2016).

Οι κεφαλοσπορίνες διακρίνονται σε κατηγορίες:

1. 1^{ης} Γενιάς Κεφαλοσπορίνες
2. 2^{ης} Γενιάς Κεφαλοσπορίνες
3. 3^{ης} Γενιάς Κεφαλοσπορίνες
4. 4^{ης} Γενιάς Κεφαλοσπορίνες
5. 5^{ης} Γενιάς Κεφαλοσπορίνες

Οι κεφαλοσπορίνες 1^{ης} γενιάς εμφανίζονται ήδη πριν από το 1980 και περιλαμβάνουν ενώσεις ιδιαίτερα ασταθείς και ευάλωτες στις β-λακταμάσες. Το γεγονός αυτό είχε ως αποτέλεσμα ορισμένες μόνες από αυτές να χρησιμοποιούνται έως και σήμερα. Οι βασικές χρήσεις τους είναι δυο, είτε για λοιμώξεις του δέρματος, των μαλακών ιστών καθώς και σοβαρών λοιμώξεων του MSSA (Methicillin-susceptible *S. aureus*), είτε ως προφύλαξη από λοιμώξεις σε χειρουργικές επεμβάσεις (Sudo T et al., 2014). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν η κεφαζολίνη (cefazolin), η κεφαλεξίνη (Cefalexin) (Εικόνα 5) και η κεφαδροξίνη (Cefadroxil) (Karen Bush and Patricia A Bradford, 2016).

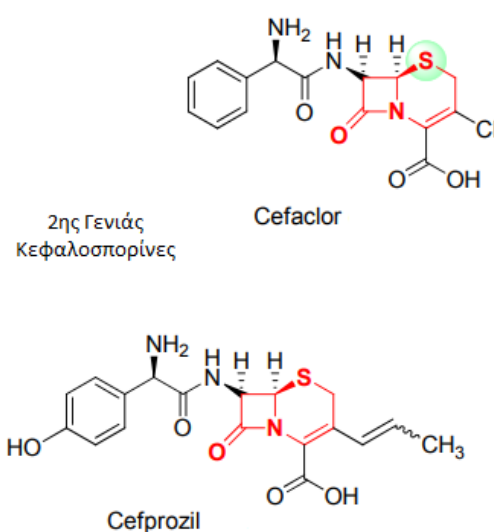
Τα χρόνια που ακολούθησαν σημειώθηκαν πολλές αναφορές για την μεταφορά γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν β-λακταμάσες, από μικροοργανισμό σε μικροοργανισμό μέσω μεταφερόμενων πλασμιδίων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτέλεσε το γονίδιο της TEM-1 β-λακταμάσης. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί την αντίστοιχη λακταμάση η οποία έχει την δυνατότητα να υδρολύει κυρίως κεφαλοσπορίνες και πενικιλίνες. Προσδίδει έτσι αντίσταση έναντι των β-λακταμικών φαρμάκων, κυρίως σε κατά Gram αρνητικά βακτηριακά στελέχη, καθώς και στα στελέχη *Neisseria gonorrhoeae* και *Haemophilus influenzae*. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην ανάπτυξη των κεφαλοσπορινών 2^{ης} γενιάς, έτσι ώστε να αντιμετωπιστεί η ανεπάρκεια των πενικιλινών και των κεφαλοσπορινών όχι μόνο έναντι των στελεχών που διέθεταν το γονίδιο αυτό αλλά και στα αντίστοιχα εντεροβακτήρια καθώς και την *P. aeruginosa* που θα μπορούσαν να το αποκτήσουν μέσω μεταφοράς πλασμιδίου (Karen Bush and Patricia A Bradford, 2016).



Εικόνα 5: Απεικόνιση της δομής 1^{ης} γενιάς κεφαλοσπορινών, της κεφαλεξίνης (επάνω) και της Κεφαλοτίνης (κάτω) (Lima *et al.*, 2020).

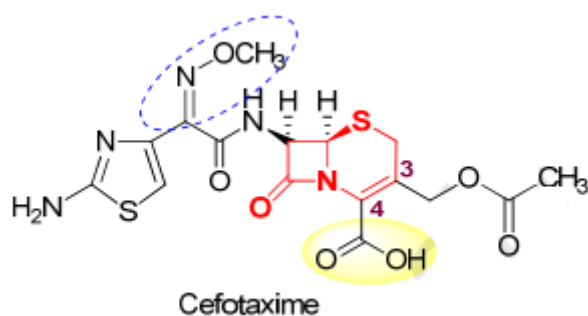
Η κατηγορία των κεφαλοσπορινών αυτών, εμφανίζει υψηλή σταθερότητα έναντι των TEM -1 λακταμασών. Έχει παρατηρηθεί ότι εμφανίζουν μειωμένη δράση έναντι των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων παράλληλα όμως διαθέτουν βακτηριοκτόνο δράση έναντι των κατά Gram αρνητικών βακτηρίων (Karen Bush and Patricia A Bradford, 2016). Στην κατηγορία αυτή των κεφαλοσπορινών απαντώνται η κεφουροξίμη (Cefuroxime), η κεφοξιτίνη (Cefoxitin), η Κεφοτετάνη (Cefotetan), η κεφακλόρη (Cefaclor) (Εικόνα 6) και η Κεπροζίλη (Cefprozil). Η χρήση τους έχει ως στόχο την αντιμετώπιση λοιμώξεων του άνω αναπνευστικού, στην προφύλαξη κατά την διάρκεια χειρουργικών επεμβάσεων και στην περίπτωση των κεφοξιτίνη

και κεφοτετάνη στην αντιμετώπιση κολπικών λοιμώξεων (Karen Bush and Patricia A Bradford, 2016).



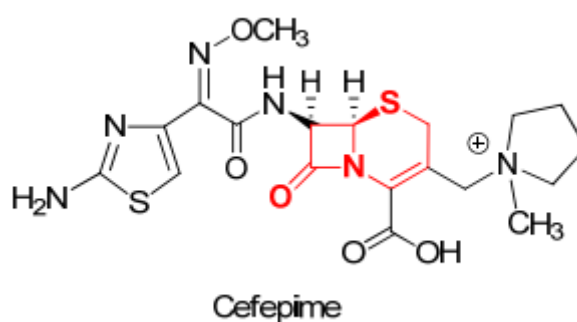
Εικόνα 6: Απεικόνιση της δομής 2^{ης} γενιάς κεφαλοσπορινών, της κεφακλόρης (επάνω) και της Κεφπραζόλης (κάτω) (Lima *et al.*, 2020).

Βασικός λόγος για την μελέτη και ανάπτυξη των κεφαλοσπορινών 3^{ης} γενιάς αποτέλεσε το γεγονός ότι, οι κεφαλοσπορίνες 2^{ης} γενιάς των οποίων η χορήγηση γίνονταν από του στόματος, εμφάνιζαν μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα με συνέπεια την μειωμένη δραστηριότητά τους. Οι κεφαλοσπορίνες 3^{ης} γενιάς περιλαμβάνουν την κεφοταξίμη (Cefataxime) (Εικόνα 7), την κεφτριαξόνη (Ceftriaxone), την κεφοδοξίμη (Cefprodoxime) την κεφιζίμη (Cefixime) την κεφδινίρη (Cefdinir) και την κεφτιμπουτένη (Ceftibuten). Η χρήση των κεφαλοσπορινών της κατηγορίας αυτής έχει ως στόχο την αντιμετώπιση της πνευμονίας που προέρχεται από την κοινότητα, της μηνιγγίτιδας, των λοιμώξεων του ουροποιητικού, της στρεπτοκοκκικής ενδοκαρδίτιδας, της γονόρροιας αλλά και σοβαρών ασθενειών όπως η ασθένεια Lyme (πρόκειται για σοβαρή αρθρίτιδα οφειλόμενη στο βακτήριο *Borelia burgdoferi*).



Εικόνα 7: Απεικόνιση της δομής 3^{ης} γενιάς κεφαλοσπορινών, της κεφοταξίμης (Lima *et al.*, 2020).

Οι κεφαλοσπορίνες 4^{ης} γενιάς, δεν διαφέρουν σημαντικά, ως προς το εύρος δράσης τους έναντι των κατά Gram αρνητικών βακτηρίων, με τις κεφαλοσπορίνες 3^{ης} γενιάς. Εμφανίζουν όμως ορισμένα πλεονεκτήματα έναντι των κεφαλοσπορινών 3^{ης} γενιάς, καθώς διαθέτουν μεγαλύτερη δράση έναντι των κατά Gram θετικών βακτηρίων, αλλά και αυξημένη σταθερότητα έναντι της υδρόλυσης των β-λακταμασών. Διαθέτουν επίσης ικανοποιητική δράση έναντι της *Pseudomonas aeruginosa*, του *Streptococcus spp.*, των εντερικών κατά Gram αρνητικών βακίλων καθώς και του MSSA (Lima *et al.*, 2020). Σημαντικότερα και ευρέως χρησιμοποιούμενοι εκπρόσωποι της κατηγορίας αυτής των κεφαλοσπορινών είναι η κεφεπίμη (Εικόνα 8) και η κεφπιρόμη.



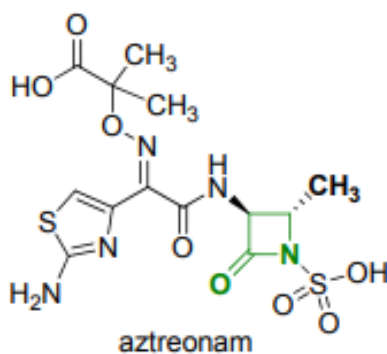
Εικόνα 8: Απεικόνιση της δομής 4^{ης} γενιάς κεφαλοσπορινών, της κεφεπίμης (Lima *et al.*, 2020).

Τέλος οι κεφαλοσπορίνες 5^{ης} γενιάς, οι οποίες ονομάζονται και ως κεφαλοσπορίνες έναντι του MRSA (Methicillin Resistant *S.aureus*), διαθέτουν δυο κύριους εκπροσώπους την κεφταρολίνη και την κεφτιμπιρόλη. Οι κεφαλοσπορίνες αυτές, εμφανίζουν σημαντική δράση έναντι των κατά Gram θετικών κόκκων, των κατά Gram αρνητικών εντερικών ραβδοειδών, των MSSA και MRSA καθώς και των στρεπτοκοκκινών στελεχών. Εξάιρεση αποτελούν οι μικροοργανισμοί *Acinetobacter baumannii* και *Stenotrophomonas maltophilia*, οι οποίοι είναι παραγωγοί β-λακταμασών εκτεταμένου φάσματος (Lima *et al.*, 2020).

1.1.2. Μονοβακτάμες

Η τρίτη κατηγορία των β-λακταμικών αντιμικροβιακών περιλαμβάνουν τις Μονοβακτάμες. Οι Μονοβακτάμες αποτελούν μονοκυκλικά β-λακταμικά αντιμικροβιακά (R.B. Sykes *et al.*, 1982). Εντοπίζονται ως φυσικά προϊόντα, όμως δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην φυσική τους μορφή καθώς η αντιμικροβιακή δράση που σημειώνουν είναι ιδιαίτερα χαμηλή. Για τον λόγο αυτό είναι απαραίτητη η δομική τους επεξεργασία, ώστε να βελτιωθεί η αντιμικροβιακή τους δράση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα ενός τέτοιου φυσικού προϊόντος, το οποίο έχει υποστεί επεξεργασία, είναι η σουλφαζεκίνη. Η σουλφαζεκίνη αποτελεί φυσικό προϊόν το οποίο εντοπίζεται σε

καλλιέργειες στελεχών ψευδομονάδας και αποτέλεσε το πρώτο κυκλικό β-λακταμικό αντιμικροβιακό (Lima *et al.*, 2020). Δομικές μετατροπές στην ένωση της σουλφαζεκίνης οδήγησε στην παραγωγή της αζτρεονάμης (Εικόνα 9), το πρώτο φαρμακευτικό προϊόν το οποίο κυκλοφόρησε προς χρήση στην φαρμακευτική αγορά το 1984 (W.E. Paul, 2016).



Εικόνα 9: Απεικόνιση της δομής του πρώτου αντιμικροβιακού μονοβακτάμης της αζτρεονάμης (Lima *et al.*, 2020).

Η δομή της μονοβακτάμης χαρακτηρίζεται από την σύνδεση στην ομάδα του σουλφονικού οξέος, του αζώτου στον β-λακταμικό δακτύλιο, μιας δομής μονοβακτάμης. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες που εμφανίζει η αζτρεονάμη λόγω δομής, της προσδίδουν ορισμένα σημαντικά χαρακτηριστικά (Lima *et al.*, 2020):

- Διαπερνά εύκολα την μεμβράνη των κατά Gram αρνητικών βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένου και της *Pseudomonas aeruginosa*.
- Εμφανίζει υψηλή συγγένεια ως προς τις πρωτεΐνες πρόσδεσης των πενικιλινών (Penicillin – Binding Proteins, PBPs), και συγκεκριμένα των PBP-3. Οι PBP-3 εντοπίζονται κυρίως στα κατά Gram αρνητικά βακτήρια (S. Han *et al.*, 2010).
- Δεν εμφανίζει κάποια σύνδεση με τις αντίστοιχες PBPs των κατά Gram θετικών βακτηρίων (S. Han *et al.*, 2010).
- Έχει αυξημένη σταθερότητα έναντι των β-λακταμασών.
- Δεν απορροφάται εύκολα από τον γαστρεντερικό σωλήνα και εμφανίζει μειωμένη διαθεσιμότητα από την χορήγηση από του στόματος.

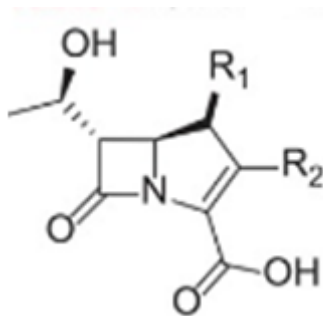
Ως επακόλουθο των παραπάνω προκύπτει, σε ότι αφορά την δράση της μονοβακτάμης, η υψηλή δραστηριότητά της ενάντια στα αερόβια κατά Gram αρνητικά βακτήρια, σε αντίθεση με την έλλειψη δράσης της ενάντια στα αναερόβια κατά Gram θετικά. Τέλος πρέπει να σημειωθεί,

ότι η αζτρεονάμη, χρησιμοποιείται συχνά σε ασθενείς με ιστορικό αλλεργίας σε πινικιλίνες και κεφαλοσπορίνες (Lima *et al.*, 2020).

1.1.3. Καρβαπενέμες

Οι καρβαπενέμες αποτελούν ακόμα μια ομάδα β-λακταμικών αντιμικροβιακών. Θεωρούνται πολύ σημαντική κατηγορία αυτών, καθώς χαρακτηρίζονται από την μεγάλη αντίστασή τους στην υδρόλυση των περισσότερων β-λακταμασών. Ο τρόπος με τον οποίον εμφανίζουν την αντίσταση αυτή στις β-λακταμάσες είναι είτε λειτουργώντας ως υποστρώματα επιβράδυνσης των β-λακταμασών, είτε ως αναστολείς τους (Lima *et al.*, 2020). Όπως και άλλα β-λακταμικά αντιμικροβιακά, έτσι και οι καρβαπενέμες, μπορούν να διεισδύουν στην εξωτερική μεμβράνη των κατά Gram αρνητικών βακτηρίων και να συνδέονται με τις PBPs.

Οι καρβαπενέμες αποτελούν δομικά, ανάλογες δομές της Θειεναμικύνης. Η θειεναμικύνη αποτελεί αναστολέα των β-λακταμασών, ο οποίος απομονώθηκε από το στέλεχος *Streptomyces cattleya* (Lima *et al.*, 2020). Οι καρβαπενέμες αποτελούνται από την δομή της β-λακτάμης συντηγμένη σε έναν πενταμελή δακτύλιο (Εικόνα 10), όπου στην θέση 1 του δακτυλίου βρίσκεται άνθρακας και όχι θείο (Kahan *et al.*, 1979; K.Bush and P.A.Bradford, 2016). Από μελέτες προκύπτει ότι, η στερεοχημεία των καρβαπενεμών στον άνθρακα έξι (C6), είναι αυτή που σχετίζεται με την εμφάνιση αντίστασης στην υδρόλυση των β-λακταμασών. Πιο συγκεκριμένα στον C6 των καρβαπενεμών, η πλευρική αλυσίδα είναι πάντα μια χειρόμορφη ομάδα υδρόξυ-αιθυλίου. Αυτό συνάδει με την διατήρηση μιας trans σχετικής διαμόρφωσης, με την πλευρική αλυσίδα του C5, οδηγώντας στο χαρακτηριστικό της αντίστασης στις β-λακταμάσες (Lima *et al.*, 2020).



Εικόνα 10: Απεικόνιση της τυπικής δομής μιας καρβαπενέμης, η οποία αποτελείται από τον δακτύλιο της β-λακτάμης, ο οποίος είναι συντηγμένος με έναν πενταμελή δακτύλιο (Lima *et al.*, 2020).

Το πρώτο αντιμικροβιακό καρβαπενέμης, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την αντιμικροβιακή του δράση, ήταν η ιμιπενέμη. Η ιμιπενέμη αποτελεί παράγωγο της Θειεναμικύνης το οποίο εγκρίθηκε για την χρήση του το 1985. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι, η θειεναμικύνη και η ιμιπενέμη

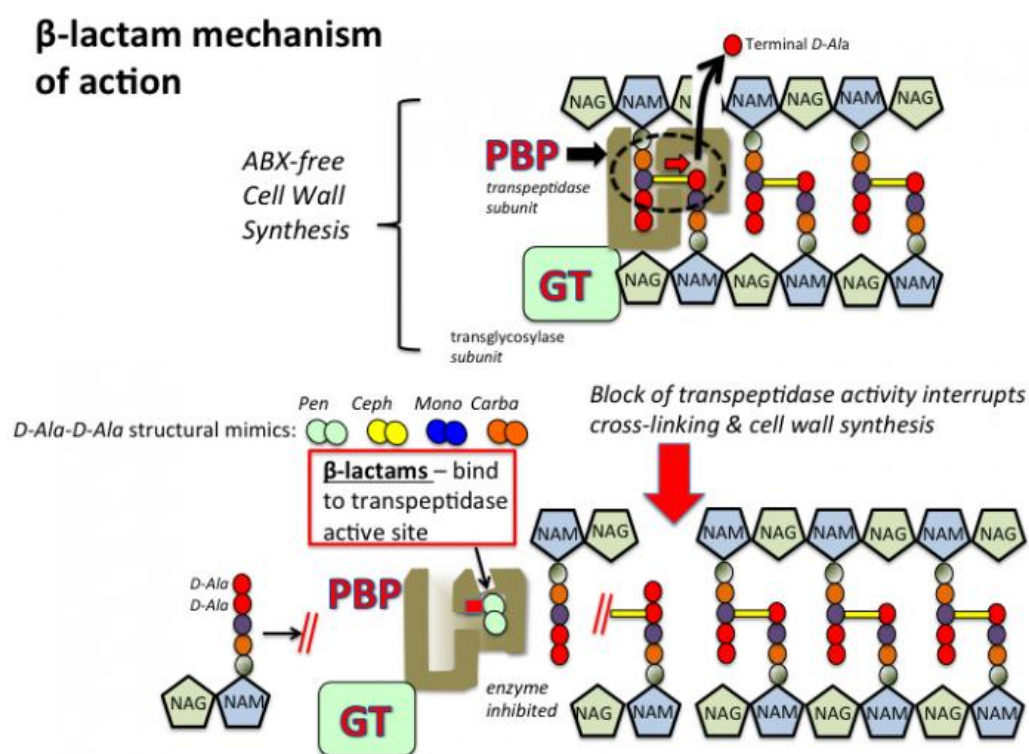
αποτελούν ενώσεις οι οποίες μεταβολίζονται ταχύτατα από τους νεφρούς και συγκεκριμένα από την διυδροπεπτιδάση 1(DHP-1). Ως εκ τούτου η ιμιπενέμη εντοπίζεται σε πολύ μικρές ποσότητες στα ούρα ασθενούς στον οποίο έχει χορηγηθεί και αποτελεί ιδιαίτερα νεφροτοξική ένωση. Για τον λόγο αυτό η ιμιπενέμη συνήθως χορηγείται με σιλαστατίνη, έναν αναστολέα της DPHP-1, με τον οποίον αποτρέπεται η νεφροτοξικότητα της ιμιπενέμης (K.M. Papp-Wallace et al., 2011).

Οι καρβαπενέμες γενικά εμφανίζουν ένα ευρύ φάσμα αντιμικροβιακής δράσης έναντι, κατά Gram αρνητικών αλλά και θετικών βακτηρίων (K.M. Papp-Wallace et al., 2011). Γενικά λόγω του σημαντικού τους αυτού χαρακτηριστικού, που αποτελεί η αντίσταση στην υδρόλυση των β-λακταμασών, η εμφάνιση μικροβιακής αντίστασης στα αντιμικροβιακά της κατηγορίας των καρβαπενεμών, θεωρούνταν κάτι εξαιρετικά σπάνιο. Από το 2007 όμως και έπειτα, η αναπτυσσόμενη αντίσταση των μικροοργανισμών στα αντιμικροβιακά έχει αναχθεί σε μείζον ζήτημα της δημόσιας υγείας. Η αντίσταση αυτή παρατηρείται κυρίως σε κατά Gram αρνητικά παθογόνα όπως η *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* και ο *Acinetobacter baumannii*. Ο μηχανισμός με τον οποίον εμφανίζεται η αντίσταση στα στελέχη αυτά είναι είτε με ενζυμική αδρανοποίηση στις καρβαπενέμες, είτε με μεταλλαγή στην θέση στόχευσης των καρβαπενεμών (D.M. Livermore and W.Neil, 2000).

1.2.Μηχανισμός δράσης β-λακταμικών αντιμικροβιακών

Τα β-λακταμικά αντιμικροβιακά, εμφανίζουν έναν μηχανισμό δράσης, ο οποίος περιλαμβάνει μια ομάδα ενζύμων, που σχετίζονται με τον σχηματισμό των τοιχωμάτων του βακτηριακού κυττάρου. Πρόκειται για τις πενικιλινο-δεσμευτικές πρωτεΐνες (Penicillin Binding Proteins, PBPs), οι οποίες αποτελούν ένζυμα τα οποία εμπλέκονται στα τελευταία στάδια σύνδεσης της πεπτιδογλυκάνης, τόσο στα κατά Gram θετικά όσο και στα αρνητικά βακτήρια (Giguere S et al., 2006; K.Bush and P.A.Bradford, 2016). Από τα όσα είναι έως σήμερα γνωστά, κάθε βακτήριο διαθέτει ξεχωριστή ομάδα PBPs και η ομάδα αυτή είναι δυνατό να αποτελείται από τρία έως οκτώ ένζυμα (Georgorapadaku NH, Liu FY., 1980). Η αναστολή σύνδεσης της πεπτιδογλυκάνης, φαίνεται να οφείλεται στην δομική ομοιότητα της πενικιλίνης G με το τερματικό διπεπίδιο D-Ala-D-Ala της νεοσυντιθέμενης πεπτιδογλυκάνης. Ο ακριβής μηχανισμός περιγράφεται από την σύνδεση της πενικιλίνης ή οποιουδήποτε β-λακταμικού αντιμικροβιακού, με μια ενεργή σερίνη, η οποία εμφανίζεται σε όλα τα λειτουργικά PBPs (Εικόνα 11) (Georgorapadaku N. et al., 1977). Από την σύνδεση αυτήν προκύπτει ένα ανενεργό άκυλο-ένζυμο το οποίο στην συνέχεια υδρολύει αργά το αντιμικροβιακό, ώστε να προκύψει τελικώς μια ανενεργή μικροβιολογικά ένωση (Frère JM, Joris B, 1985). Αποτέλεσμα της σύνδεσης του αντιμικροβιακού με τα PBPs είναι η διατάραξη του κυτταρικού τοιχώματος και η λύση του κυττάρου.

Απαραίτητη προϋπόθεση για την δράση των β-λακταμικών αντιμικροβιακών, είναι η είσοδος τους εντός του βακτηριακού κυττάρου. Λόγω της διαφορετικότητας των τοιχωμάτων των βακτηριακών κυττάρων εμφανίζονται και διαφορές στην δράση των β-λακταμικών. Για παράδειγμα τα κατά Gram αρνητικά βακτήρια διαθέτουν ένα επιπλέον λιποπολυσακχαρικό στρώμα, μειώνοντας έτσι την διέλευση του αντιμικροβιακού στο εσωτερικό του κυττάρου. Το χαρακτηριστικό αυτό των κατά Gram αρνητικών βακτηρίων τα καθιστά πιο ανθεκτικά σε αντίθεση με τα κατά Gram θετικά, τα οποία εμφανίζονται πιο ευαίσθητα στα β-λακταμικά αντιμικροβιακά. Να σημειωθεί εδώ ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα περιοριστικής χρήσης, αυτό της πενικιλίνης, η οποία δεν διαπερνά εύκολα τις μεμβράνες των θηλαστικών κυττάρων (Davis, J. L. 2018). Ακόμα ένας παράγοντας που έχει σημαντικό ρόλο στην δράση των β-λακταμικών αντιμικροβιακών είναι και ο βαθμός συγγένειας που αυτά εμφανίζουν, ως προς τα PBPs του εκάστοτε βακτηρίου. Χαμηλή συγγένεια του προς χρήση β-λακταμικού αντιμικροβιακού σχετίζεται με μειωμένη δράση του, ενώ αντίστοιχα υψηλή συγγένεια με αυξημένη δράση του. Τέλος να σημειωθεί ότι σε ορισμένες μελέτες φαίνεται να επιδρά, η δέσμευση επιλεγμένων β-λακταμικών σε μια αλλοστερική θέση του PBP2a στον *S. aureus*, και να αυξάνει την ευαισθησία του μικροοργανισμού αυτού στο συγκεκριμένο αντιμικροβιακό (Otero LH. et al., 2013; Gonzales PR. Et al., 2015).



Εικόνα 11: Μηχανισμός δράσης των β – λακταμικών αντιμικροβιακών (Usman Umar Zango, et al., 2019).

1.3. Ανεπιθύμητες ενέργειες β – λακταμικών αντιμικροβιακών

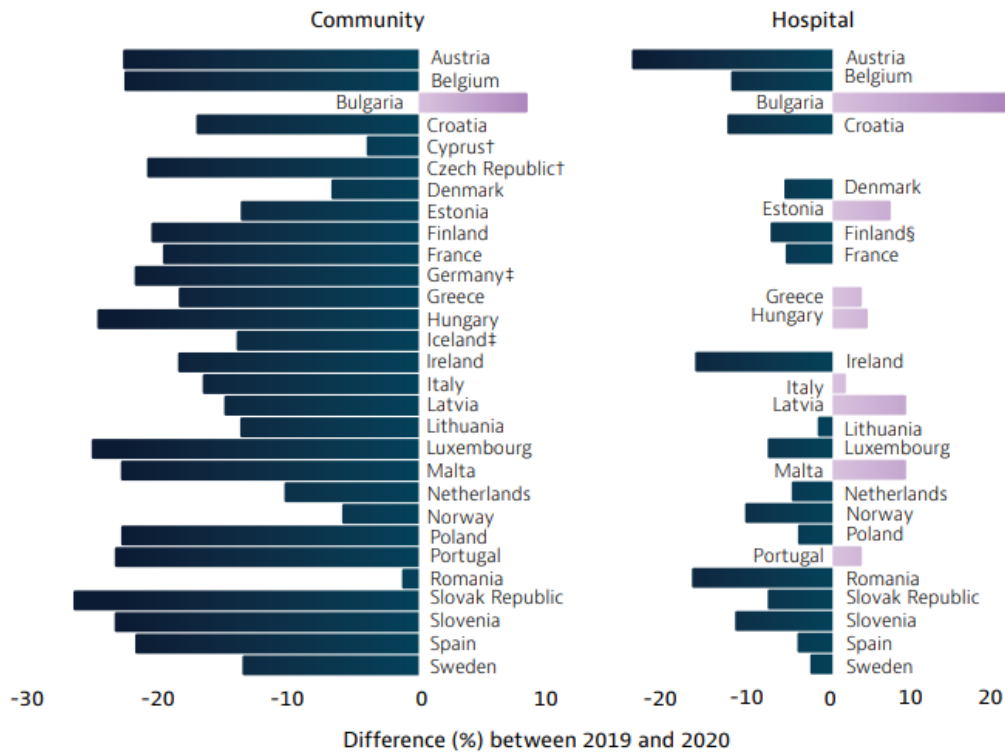
Συγκριτικά με άλλα αντιμικροβιακά φάρμακα, τα β – λακταμικά αντιμικροβιακά αναφέρονται ως ασφαλή και με μειωμένο αριθμό ανεπιθύμητων ενεργειών. Παρά ταύτα οι πιο συχνά εμφανιζόμενες ανεπιθύμητες ενέργειες που αναφέρονται, σχετίζονται περισσότερο με αλλεργικές αντιδράσεις και η εμφάνισή τους κυμαίνονται από 0,7 έως 10%. Ως αλλεργική αντίδραση σε οποιαδήποτε δοσολογία των β – λακταμικών, χαρακτηρίζεται η εμφάνιση κηλιδοβατιδώδους εξανθήματος και σε μικρότερο ποσοστό, της τάξης του 0,004 έως 0,015%, η εμφάνιση περιστατικών αναφυλαξίας (Miller RL, et al., 2019). Πλην όμως των αλλεργικών αντιδράσεων, τα β – λακταμικά αντιμικροβιακά μπορούν να προκαλούν και έναν αριθμό άλλων ανεπιθύμητων αντιδράσεων, οι οποίες συνοψίζονται παρακάτω (Podlecka D. et al., 2019):

- ◆ Η πενικιλίνη G καθώς και η πιπερακιλλίνη, σχετίζονται με διαταραχές στην διαδικασία πήξης του αίματος, με αποτέλεσμα την μειωμένη αιμόσταση, λόγω ελαττωματικής συσσώρευσης αιμοπεταλίων.
- ◆ Ενδοφλέβια ένεση βενζαθινικής πενικιλίνης G, συνδέεται με καρδιοαναπνευστική ανακοπή και θάνατο.
- ◆ Οι κεφαλοσπορίνες συνδέονται με την εμφάνιση σπάνιων περιπτώσεων καταστολής του μυελού των οστών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η κοκκιοκυτταροπενία, η οποία περιλαμβάνει σημαντική μείωση του αριθμού των κοκκιοκυττάρων. Τα κοκκιοκύτταρα αποτελούν τύπο λευκοκυττάρων, τα οποία διαθέτουν στο εσωτερικό τους μικροσκοπικούς κόκκους, δηλαδή σάκους, οι οποίοι περιέχουν ένζυμα. Τα ένζυμα αυτά συμμετέχουν στην διάσπαση και καταπολέμηση μικροοργανισμών – αντιγόνων, κατά την είσοδό τους στον ανθρώπινο οργανισμό.
- ◆ Ορισμένες κεφαλοσπορίνες είναι δυνητικά νεφροτοξικές και σχετίζονται με νέκρωση των νεφρικών σωληναρίων. Παράδειγμα της κατηγορίας αυτής αποτελεί η κεφτριαξόνη, η οποία μπορεί να προκαλέσει ίκτερο στα μωρά, εκτοπίζοντας την χολερυθρίνη από την αλβουμίνη. Επίσης είναι δυνατόν να προκαλέσει ψευδολιθίαση των χοληφόρων λόγω υψηλής συγγένειας με το ασβέστιο.
- ◆ Η κεφεπίμη συνδέεται με την εμφάνιση εγκεφαλοπάθειας αλλά και μη σπασμωδικής επιληπτικής κρίσης, όταν χορηγείται σε υψηλές δόσεις ή όταν χορηγείται σε ασθενείς με νεφρικές παθήσεις.
- ◆ Η ιμιπενέμη συνδέεται με την εμφάνιση επιληπτικής κρίσης, όταν χορηγείται σε υψηλές δόσεις ή όταν χορηγείται σε ασθενείς με βλάβες στο ΚΝΣ, ή σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια.

1.4.Χρήση β-λακταμικών αντιμικροβιακών

Η ευρέως διαδεδομένη χρήση των αντιβιοτικών, αποτέλεσε και αποτελεί σημαντικό υγειονομικό ζήτημα. Η μεγαλύτερη χρήση αντιβιοτικών, παρατηρείται παγκοσμίως, είτε για την εφαρμογή τους σε εκτρεφόμενα ζώα που προορίζονται για την παραγωγή τροφίμων, είτε για την θεραπεία ή την πρόληψη, νόσων του ανθρώπου. Εστιάζοντας στην χρήση των αντιμικροβιακών, αναφορικά με την ανθρώπινη κατανάλωση, πρέπει να σημειωθεί ότι αυτή εκφράζεται ως καθορισμένες ημερήσιες δόσεις (Defined Daily Doses-DDD), ανά χίλιους κατοίκους, ανά ημέρα. Η κατανάλωση αντιμικροβιακών διαχωρίζεται σε εκείνη, η οποία λαμβάνει χώρα στην κοινότητα και σε εκείνη, η οποία λαμβάνει χώρα σε νοσοκομειακές εγκαταστάσεις, όπως αναλύεται και στην συνέχεια (Εικόνα 12) (Πηγή: European Center for Disease Prevention and Control – ECDC, 2021).

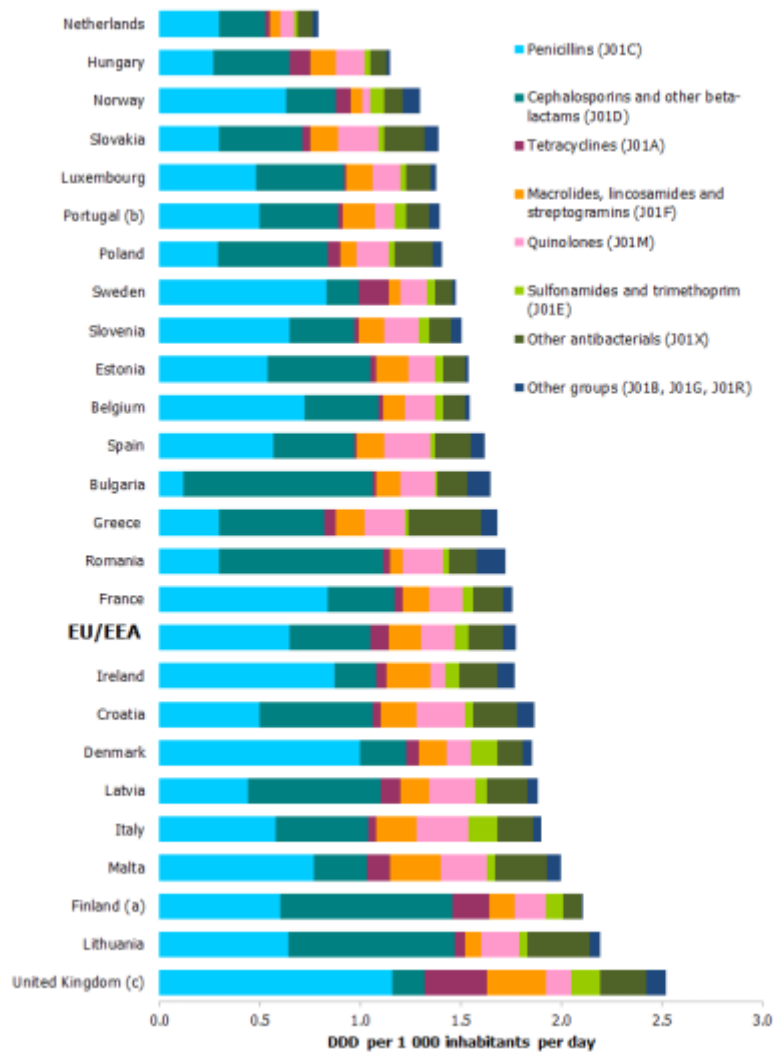
Δίνοντας αρχικά μια γενική εικόνα της χρήσης των αντιμικροβιακών τα τελευταία έτη, φαίνεται μια παρατηρούμενη μείωση στην χρήση τους. Από την ανασκόπηση του Ευρωπαϊκού Κέντρου Πρόληψης και Ελέγχου Νοσημάτων, προκύπτει ότι κατά το έτος 2018, σε 29 χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, χρησιμοποιήθηκαν 4.264 τόνοι αντιβιοτικών, ποσότητα που αντιστοιχεί σε μια μέση κατανάλωση αντιμικροβιακών από τον άνθρωπο, της τάξης των 133mg ενεργού συστατικού, ανά κιλό υπολογιζόμενης βιομάζας. Αντίστοιχα από την ίδια ανασκόπηση προκύπτει ότι, από το έτος 2011 έως και το έτος 2020, η κατανάλωση αντιμικροβιακών μειώθηκε κατά 23%, με ιδιαίτερα αυξημένη πτώση της χρήσης τους κατά τα έτη 2019 και 2020 όπου έκανε την εμφάνισή της η πανδημία Covid-19 και όπου η πτωτική αυτή πορεία άγγιξε μόνο τα έτη αυτά, το ποσοστό του 18%. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 12 που ακολουθεί, για την πλειονότητα των χωρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης παρατηρείται μείωση τόσο στην χρήση των αντιμικροβιακών στην κοινότητα όσο και στις νοσοκομειακές εγκαταστάσεις. Συγκεκριμένα στην χώρα μας παρατηρείται μεγάλη μείωση της χρήσης αντιμικροβιακών στην κοινότητα, όχι όμως και αντίστοιχη μείωση στην χρήση αυτών στα νοσοκομεία.



Εικόνα 12: Γραφική αναπαράσταση της κατανάλωσης αντιμικροβιακών τόσο στην κοινότητα όσο και σε νοσοκομειακές εγκαταστάσεις (Πηγή: ECDC, 2021).

1.4.1. Χρήση β-λακταμικών σε Δομές Παροχής Υπηρεσιών Υγείας

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η κατανάλωση αντιμικροβιακών διακρίνεται σε εκείνη στην κοινότητα, καθώς και σε εκείνη η οποία λαμβάνει χώρα εντός των νοσοκομειακών δομών καθώς και τον μονάδων εντατικής θεραπείας. Σε ότι αφορά την μέση κατανάλωση των αντιμικροβιακών εντός των νοσοκομειακών δομών, στα πλαίσια συστηματικής χρήσης, κατά το έτος 2019 μεταξύ των Ευρωπαϊκών χωρών, φαίνεται να ανέρχεται στην τιμή του 1,8 DDD/ 1000 κατοίκους ανά ημέρα. Η τιμή αυτή, εμφανίζει διακύμανση μεταξύ των χωρών και κυμαίνεται από την τιμή 0,8 DDD/ 1000 κατοίκους ανά ημέρα, την οποία εμφανίζει η Ολλανδία, έως την τιμή 2,5 DDD/ 1000 κατοίκους ανά ημέρα, την οποία εμφανίζει η Αγγλία (ECDC, 2019). Στην Ελλάδα, όπως προκύπτει και από το γράφημα της εικόνας 13, η μέση κατανάλωση αντιμικροβιακών στις δομές παροχής υπηρεσιών υγείας, αντιστοιχεί για τις πενικιλίνες στην τιμή 0,30 DDD/1000 κατοίκους ανά ημέρα, ενώ για τα υπόλοιπα β-λακταμικά αντιμικροβιακά στην τιμή 0,52 DDD/ 1000 κατοίκους ανά ημέρα (ECDC, 2019).



Εικόνα 13: Γραφική αναπαράσταση της κατανάλωσης των αντιμικροβιακών εντός νοσοκομειακών υποδομών, στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, εκφρασμένη σε DDD/ 1000 κατοίκους ανά ημέρα. Η αντίστοιχη αυτή κατανάλωση για την Ελλάδα σημειώνει τιμή 0,30 DDD/ 1000 κατοίκους ανά ημέρα σε ότι αφορά τις πενικιλίνες, υπό-ομάδα των β-λακταμικών αντιμικροβιακών. Αντίστοιχα για τα υπόλοιπα β-λακταμικά αντιμικροβιακά πλην των πενικιλινών η τιμή αυτή φτάνει στο 0,52 DDD/ 1000 κατοίκους ανά ημέρα. (Πηγή: ECDC, 2019).

1.4.2. Χρήση β-λακταμικών στην κοινότητα

Σύμφωνα με καταγραφές του Ευρωπαϊκού Κέντρου Πρόληψης και Ελέγχου Νοσημάτων, στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, η μέση κατανάλωση αντιμικροβιακών για συστηματική χρήση στην κοινότητα, για το έτος 2019, υπολογίζεται στην τιμή 18,0 DDD/1000 κατοίκους ανά ημέρα. Όπως προκύπτει και από την εικόνα 14, εμφανίζεται σημαντική διακύμανση μεταξύ των χωρών, με χαρακτηριστικά παραδείγματα εκείνο της Ολλανδίας, η οποία εμφανίζει μέση κατανάλωση αντιμικροβιακών 8,7 DDD/1000 κατοίκους ανά ημέρα και εκείνο της Ελλάδας, η οποία εμφανίζει μέση κατανάλωση 32,4 DDD/1000 κατοίκους ανά ημέρα. Σε ότι αφορά συγκεκριμένα τα β-λακταμικά αντιμικροβιακά, σημειώνεται ότι για το έτος 2019, η μέση κατανάλωση πενικιλινών στις

Ευρωπαϊκές χώρες αντιστοιχεί σε 8,0 DDD/100 κατοίκους ανά ημέρα, ενώ πιο συγκεκριμένα στην Ελλάδα η κατανάλωση αυτή αντιστοιχεί σε 11,0 DDD/1000 κατοίκους ανά ημέρα. Για τα υπόλοιπα β-λακταμικά αντιμικροβιακά, πέραν των πενικιλινών, η αντίστοιχη μέση κατανάλωση στην Ευρώπη αντιστοιχεί σε 2,0 DDD/ 1000 κατοίκους ανά ημέρα, με το αντίστοιχο ποσοστό για την Ελλάδα να αγγίζει το 7,6 DDD/1000 κατοίκους ανά ημέρα (Πηγή: Antimicrobial Consumption Database, ESAC-Net). Επιπλέον, γίνεται αντιληπτή η μεγάλη χρήση των β-λακταμικών αντιμικροβιακών, συγκριτικά με τις υπόλοιπες ομάδες αντιμικροβιακών. Κύρια υπο-ομάδα των β-λακταμικών με τα υψηλότερα ποσοστά χρήσης είναι οι πενικιλίνες.

Από τις αντίστοιχες καταγραφές του ECDC για το έτος 2020, προκύπτει επίσης ότι, η μέση κατανάλωση αντιμικροβιακών τα οποία διαθέτουν ευρύ φάσμα δράσης, ήταν 3,5 φορές υψηλότερη, συγκριτικά με την χρήση των αντιμικροβιακών με στενό φάσμα δράσης. Από το 2011 έως και το 2020 παρατηρείται ότι χώρες όπως η Βουλγαρία, η Κροατία, η Εσθονία, η Ουγγαρία και η Ιταλία, φαίνεται να στρέφονται στην χρήση αντιμικροβιακών με ευρύ φάσμα δράσης, για την θεραπεία λοιμώξεων στην κοινότητα. Σε αντίθεση με χώρες όπως το Βέλγιο, η Αυστρία, η Δανία, η Γαλλία και η Γερμανία, οι οποίες φαίνεται να στρέφονται στην χρήση αντιμικροβιακών με στενότερο φάσμα δράσης (ECDC, 2022). Αντίστοιχα, σχετικά με την χρήση των αντιμικροβιακών σε δομές παροχής υπηρεσιών υγείας, το ποσοστό κατανάλωσης αντιμικροβιακών τα οποία διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα δράσης, εμφανίζει ανοδική τάση, για το ίδιο χρονικό διάστημα, σε χώρες της Ευρώπης, με εξαίρεση την χώρα της Σλοβενίας στην οποία εμφανίζεται πτωτική τάση στην χρήση αντιμικροβιακών με ευρύ φάσμα δράσης.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι, το 2017, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO), εισήγαγε ένα σύστημα κατηγοριοποίησης των αντιμικροβιακών, το σύστημα AWaRe, “ Access, Watch, Reserve”. Στόχος του συστήματος αυτού ήταν η κατηγοριοποίηση των αντιμικροβιακών, ως εργαλείο για την βελτιστοποίηση της χρήσης τους. Σύσταση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, είναι η χρήση αντιμικροβιακών που ανήκουν στην ομάδα “Access”, η οποία αποτελείται κυρίως από πρώτης και δεύτερης γραμμής αντιμικροβιακά. Τα αντιμικροβιακά της κατηγορίας αυτής χαρακτηρίζονται από την προσφορά της μέγιστης θεραπευτικής αξίας τους, χωρίς να εμφανίζουν υψηλές δυνατότητες ανάπτυξης ανθεκτικών σε αυτά στελεχών (AMR-Antimicrobial drug Resistance). Μέχρι και το 2020, η χρήση και κατανάλωση των αντιμικροβιακών της ομάδας αυτής, δεν ξεπερνά το 60% της συνολικής κατανάλωσης. Παρόλα αυτά υπάρχουν ελπίδες ώστε έως το 2023, τα αντιμικροβιακά της κατηγορίας αυτής να αποτελούν τουλάχιστον το 60% της συνολικής κατανάλωσης (ECDC, 2022).



Εικόνα 14: Γραφική αναπαράσταση της κατανάλωσης των αντιμικροβιακών στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, εκφρασμένη σε DDD/ 1000 κατοίκους ανά ημέρα. Η αντίστοιχη αυτή κατανάλωση για την Ελλάδα σημειώνει τιμή 11,0 DDD/ 1000 κατοίκους ανά ημέρα σε ότι αφορά τις πενικιλίνες, υπό-ομάδα των β-λακταμικών αντιμικροβιακών. Αντίστοιχα για τα υπόλοιπα β-λακταμικά αντιμικροβιακά πλην των πενικιλινών η τιμή αυτή πέφτει στο 7,6DDD/ 1000 κατοίκους ανά ημέρα (Πηγή: ECDC, 2019).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

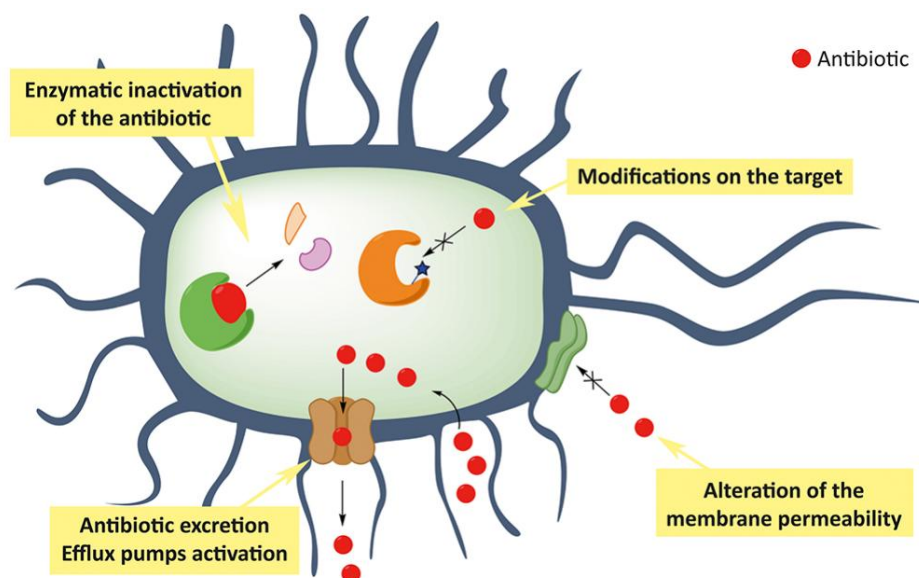
2.1.Μηχανισμοί - Είδη Αντίστασης μικροοργανισμών σε β – λακταμικά αντιμικροβιακά

Όπως είναι γνωστό, τα αντιμικροβιακά εμφανίζουν άλλοτε βακτηριοστατική και άλλοτε βακτηριοκτόνο δράση. Χρησιμοποιούνται έτσι για την αντιμετώπιση πολλών βακτηριακών λοιμώξεων, είτε περιορίζοντας την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, είτε οδηγώντας τον μικροοργανισμό στον θάνατο. Τα αντιμικροβιακά όμως, για να εμφανίσουν την δράση τους αυτή θα πρέπει να εισέλθουν στο βακτηριακό κύτταρο. Έναν πρώτο μηχανισμό άμυνας που χρησιμοποιεί το βακτηριακό κύτταρο είναι το κυτταρικό περίβλημά του. Θα μπορούσαμε να παρομοιάσουμε το κυτταρικό περίβλημα του βακτηρίου, με το δέρμα του ανθρώπου το οποίο αποτελεί έναν πρώτο, μη ειδικό μηχανισμό άμυνας του οργανισμού μας σε οποιοδήποτε παθογόνο. Έτσι και το κυτταρικό περίβλημα, αποτελεί έναν δυναμικό φραγμό, ο οποίος εμποδίζει την είσοδο τοξινών και αντιμικροβιακών. Στα κατά Gram αρνητικά βακτήρια, το κυτταρικό περίβλημα αποτελείται από μια εξωτερική μεμβράνη, η οποία αποτελείται από μια ασύμμετρη διπλοστιβάδα λιποπολυσακχαρίτη – φωσφολιπιδίου. Η εξωτερική μεμβράνη των βακτηρίων αυτών διαθέτει επίσης πορίνες, διάσπαρτες σε όλη την έκτασή της, οι οποίες ευνοούν την είσοδο μικρών μορίων ενώ μπορούν να αποκλείουν παθητικά μεγάλα μόρια και αντιμικροβιακά (Gerard D. Wright, 2007). Αντίστοιχα τα κατά Gram θετικά βακτήρια, στερούνται της εξωτερικής μεμβράνης με αποτέλεσμα να εμφανίζουν αυξημένη ευαισθησία σε πολλά αντιμικροβιακά. Πλην όμως του εξωτερικού αυτού φραγμού, τα βακτήρια μπορούν να εμφανίζουν και άλλους μηχανισμούς ώστε να προστατεύονται από τα αντιμικροβιακά ή να εμφανίζουν κάποια αντίσταση σε αυτά. Τέτοιοι μηχανισμοί με τους οποίους κατορθώνουν οι μικροοργανισμοί αυτοί να εμφανίζουν την αντίσταση είναι οι εξής (Εικόνα 15) (Lingzhi Li et al., 2018):

- Περιορισμένη πρόληψη αντιμικροβιακού.
- Τροποποίηση των μορίων – στόχων των αντιμικροβιακών φαρμάκων. Για παράδειγμα τροποποίηση των πρωτεϊνών δέσμευσης της πενικιλίνης (PBPs), που αποτελούν στόχο των β – λακταμικών αντιμικροβιακών.
- Παραγωγή β – λακταμασών από τον μικροοργανισμό.
- Παρεμπόδιση του β – λακταμικού αντιμικροβιακού να φτάσει στις πρωτεΐνες – στόχους είτε αλλάζοντας την διαπερατότητα των μεμβρανών, είτε ενισχύοντας την λειτουργία των αντλιών εκροής των αντιμικροβιακών.
- Μεταφορά και εξάπλωση γονιδίων που εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά, με τους μηχανισμούς του μετασχηματισμού, της μεταγωγής και της σύζευξης.

Πριν την ανάλυση των μηχανισμών εμφάνισης αντίστασης, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι, η αντίσταση στα αντιμικροβιακά την οποία μπορούν να εμφανίσουν οι μικροοργανισμοί, μπορεί να

έχει είτε φυσική είτε επίκτητη προέλευση. Η φυσική προέλευση, μπορεί να κατηγοριοποιείται σε εγγενή και επαγόμενη. Με τον όρο εγγενής γίνεται αναφορά στην αντίσταση, η οποία εκφράζεται πάντα σε ένα είδος μικροοργανισμού και αποτελεί χαρακτηριστικό του (πίνακας 3). Συνεπώς η εμφάνιση της αντίστασης αποτελεί ανεξάρτητο χαρακτηριστικό του είδους και δεν σχετίζεται με προηγούμενη έκθεση του μικροοργανισμού στο αντίστοιχο αντιβιοτικό αλλά ούτε και με οριζόντια μεταφορά κάποιου γονιδίου (Martinez JL, 2014). Παραδείγματα εγγενούς αντίστασης είναι η μειωμένη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης καθώς επίσης και η φυσική δραστηριότητα των αντλιών εκροής αντιμικροβιακών. Ο δεύτερος μηχανισμός είναι δυνατόν να συναντάται και ως μηχανισμός επαγόμενης αντίστασης (Cox G, Wright GD., 2013). Αντίστοιχα η επαγόμενη αντίσταση, αποτελεί ένα είδος φυσικής αντίστασης, κατά το οποίο τα γονίδια τα οποία φέρουν το χαρακτηριστικό της αντίστασης, απαντώνται στα βακτήρια, η έκφρασή τους όμως ενεργοποιείται, μόνο μετά από την έκθεση των βακτηρίων στο αντίστοιχο αντιβιοτικό (Cox G, Wright GD., 2013).



Εικόνα 15: Απεικόνιση των διαφορετικών μηχανισμών εμφάνισης αντίστασης ενός βακτηριακού κυττάρου: (1) ενζυμική απενεργοποίηση του αντιμικροβιακού, (2) τροποποιήσεις του μορίου – στόχου, (3) Αλλαγή στην διαπερατότητα των μεμβρανών, με στόχο την μείωση της λήψης των αντιμικροβιακών από το κύτταρο και (4) Ενεργοποίηση αντλιών εκροής μέσω των οποίων το αντιμικροβιακών εξάγεται από το κύτταρο (Concepcion Gonzá lez-Bello, et al, 2020).

Σε ότι αφορά την επίκτητη αντίσταση, συνδέεται με την απόκτηση του βακτηρίου, κάποιου γονιδιακού συστατικού το οποίο αποδίδει αντίσταση σε κάποιο αντιμικροβιακό. Το συνηθέστερο αυτό συστατικό το οποίο αποκτάται από τα βακτήρια, είναι τα πλασμίδια, ενώ σπάνια είναι η εμφάνιση αντίστασης μέσω βακτηριοφάγων. Η εισαγωγή γονιδιακών στοιχείων είναι είτε από το περιβάλλον είτε εσωτερικά στους μικροοργανισμούς. Στην περίπτωση της εσωτερικής μεταφοράς

γενετικών στοιχείων, εισαγόμενες αλληλουχίες καθώς και οι ιντεγκρίνες, αποτελούν μηχανισμούς μεταφοράς γονιδίων, όπως επίσης και οι στρεσογόνοι παράγοντες όπως έλλειψη τροφής, UV ακτινοβολία και ύπαρξη χημικών ενώσεων, οδηγεί σε υψηλή εμφάνιση μεταλλαγών στους μικροοργανισμούς. Οι μεταλλάξεις που συνδέονται με την εμφάνιση αντίστασης κυρίως συμβαίνει σε συγκεκριμένα γονίδια (Wanda C Reygaert, 2018). Τα γονίδια αυτά είναι είτε γονίδια τα οποία κωδικοποιούν στόχους φαρμάκων, μεταφορείς φαρμάκων, ρυθμιστές που ελέγχουν μεταφορείς φαρμάκων, είτε ένζυμα τα οποία τροποποιούν τα αντιμικροβιακά φάρμακα. Η επίκτητη αντίσταση μπορεί να είναι είτε μόνιμη είτε προσωρινή (Martinez JL., 2014).

Πίνακας 3: Συγκεντρωτικός πίνακας μικροοργανισμών, οι οποίοι εμφανίζουν εγγενή αντίσταση, σε ορισμένα αντιμικροβιακά.

Είδη μικροοργανισμών	Εγγενής Αντίσταση
Βακτηριοειδή (αναερόβια)	Αμινογλυκοσίδες, β – λακταμικά, κινολόνες
Όλα τα Gram +	Αζτρεονάμη
Εντερόκοκκοι	Αμινογλυκοσίδες, κεφαλοσπορίνες, λινκοσαμίδες
<i>Listeria monocytogenes</i>	Κεφαλοσπορίνες
Όλα τα Gram -	Γλύκοπεπτίδια, λίποπεπτίδια
<i>Escherichia coli</i>	μακρολίδες
<i>Klebsiella spp.</i>	Αμπικιλίνη
<i>Serratia marcescens</i>	Μακρολίδες
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Σουλφοναμίδες, αμπικιλίνη, 1 ^{ης} και 2 ^{ης} γενιάς κεφαλοσπορίνες, χλωραμφενικόλη, τετρακυκλίνη
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Αμινογλυκοσίδες, β – λακταμικά, καρβαπενέμες, κινολόνες
<i>Acinetobacter spp.</i>	Αμπικιλίνη, γλυκοπεπτίδια

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι, πολλές φορές οι μεταλλάξεις που συμβαίνουν και σχετίζονται με την εμφάνιση αντίστασης σε έναν μικροοργανισμό, συνοδεύονται και από κάποιο κόστος για αυτόν. Για παράδειγμα η εμφάνιση αντίστασης στον *Staphylococcus aureus*, έναντι της μεθικιλίνης, συνοδεύεται από μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης του βακτηρίου (Reygaert WC, 2009).

2.1.1. 1ος Μηχανισμός: Περιορισμένη πρόσληψη αντιμικροβιακού

Όπως χαρακτηριστικά αναφέρθηκε στην αρχή αυτού του κεφαλαίου, ο πρώτος μηχανισμός άμυνας των βακτηρίων, έναντι των αντιμικροβιακών, είναι το κυτταρικό τους περίβλημα. Αυτό συνάδει με τον 1^ο μηχανισμό ανάπτυξης αντίστασης, σε πολλούς μικροοργανισμούς, ο οποίος σχετίζεται με περιορισμένη πρόσληψη του αντιμικροβιακού.

Όπως είναι γνωστό, ανάλογα με την χημική σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων, μπορούν να κατηγοριοποιούνται σε κατά Gram θετικά και κατά Gram αρνητικά βακτήρια. Στην περίπτωση των κατά Gram αρνητικών βακτηρίων, παρατηρείται ότι αυτά, χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη ενός στρώματος λιποπολυσακχαριτών (LPS), το οποίο παρέχει στο κύτταρο ένα είδος φραγμού, έναντι ορισμένων μορίων. Ως αποτέλεσμα αυτού πολλά είδη βακτηρίων, αποκτούν έμφυτη αντίσταση, έναντι πολλών ομάδων αντιμικροβιακών παραγόντων, όπως και των β - λακταμικών. Ακόμα, τα βακτήρια αυτά, μπορούν να εμφανίζουν μια φαρδιά εξωτερική μεμβράνη, όπου τα απαραίτητα συστατικά και μόρια διαπερνούν τον φραγμό αυτό, μέσω καναλιών πορινών. Στην περίπτωση των Gram αρνητικών βακτηρίων, η διέλευση υδρόφιλων μορίων ευνοείται, διαμέσου των καναλιών αυτών (Blair JM. et al., 2014). Συνεπώς θα λέγαμε ότι υδρόφιλα αντιμικροβιακά είναι δυνατόν να εισέρχονται στα βακτηριακά κύτταρα διαμέσου των καναλιών αυτών. Έτσι η εμφάνιση των καναλιών μπορεί να αποτελέσει με την σειρά του ρυθμιστικό παράγοντα στην διέλευση μορίων εντός του κυττάρου και να επιτυγχάνει και την παρεμπόδιση εισόδου τους. Προκύπτει λοιπόν ότι οι πορίνες μπορούν να εμποδίζουν την διέλευση μορίων εντός του κυττάρου με δυο βασικούς τρόπους (Kumar A, Schweizer HP, 2005):

- ✓ Με μείωση του αριθμού των καναλιών τους στην επιφάνεια των βακτηριακών κυττάρων
- ✓ Με την εμφάνιση μεταλλαγών οι οποίες αλλάζουν την επιλεκτικότητα των πορινών.

Μέλη της οικογένειας των εντερόκοκκων, εμφανίζουν αντίσταση, μέσω άλλοτε της μείωσης του αριθμού των καναλιών τους στην επιφάνεια των μεμβρανών τους και άλλοτε μέσω της πλήρους παύσης παραγωγής πορινών. Ο μηχανισμός αυτός που χρησιμοποιούν, τους προσδίδει αντίσταση έναντι των καρβαπενεμών. Αντίστοιχα μεταλλαγές που σχετίζονται με αλλαγές στα κανάλια των πορινών, παρατηρούνται στο *E. aerogenes*, ο οποίος εμφανίζει έπειτα ανθεκτικότητα στην ιμιπενέμη και σε πολλές κεφαλοσπορίνες, καθώς και στο *N. gonorrhoeae*, το οποίο αποκτά ανθεκτικότητα έναντι των β – λακταμικών (Wanda C Reygaert, 2018).

Στην περίπτωση των κατά Gram θετικών βακτηρίων, η εξωτερική μεμβράνη η οποία είναι παρούσα στα κατά Gram αρνητικά βακτήρια, απουσιάζει. Συνεπώς τα κατά Gram θετικά

στερούνται αυτού του επιπλέον φραγμού, γεγονός που τα καθιστά πιο ευαίσθητα στα αντιμικροβιακά. Παρά το γεγονός αυτό, εμφανίζουν αντίσταση σε αντιμικροβιακά.

Εκτός από τις περιπτώσεις που αναφέρθηκαν, μεγάλο ενδιαφέρον εμφανίζει ένα αρκετά πλέον διαδεδομένο φαινόμενο, το οποίο περιλαμβάνει την αποίκιση βακτηρίων προς σχηματισμού βιοϋμενίου (βιοφίλμ). Με τον όρο βιοϋμένιο αναφερόμαστε σε ένα σύνολο μικροβιακών κυττάρων, προσκολλημένων σε μια επιφάνεια, που συνήθως εσωκλείεται σε ένα, εξωτερικής ουσίας, στρώμα. Τα βιοϋμένια αυτά, μπορούν να περιέχουν έναν κυρίαρχο οργανισμό όπως για παράδειγμα τον *P. aeruginosa* στον πνεύμονα, είτε να αποτελείται από μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών, όπως έχει παρατηρηθεί στην φυσιολογική χλωρίδα του εντέρου (Wanda C Reygaert, 2018). Ο Σχηματισμός αυτών των βιοϋμενίων προσδίδει ορισμένα πλεονεκτήματα στον αναπτυσσόμενο σε αυτά παθογόνο μικροοργανισμό:

- ✓ Περιβάλλει τα παθογόνα και τα προστατεύει από επιθέσεις του ανοσοποιητικού συστήματος.
- ✓ Η παχιά κολλώδης σύσταση της μήτρας του βιοϋμενίου, περιέχει λιποπολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες και DNA των βακτηρίων, δημιουργώντας σημαντικό φραγμό στην διέλευση και εισχώρηση αντιμικροβιακών παραγόντων που έχουν στόχο τα βακτηριακά κύτταρα. Συνεπώς σε τέτοιες περιπτώσεις απαιτείται και μεγαλύτερη ποσότητα αντιμικροβιακού ώστε να γίνει αποτελεσματικό.
- ✓ Τα βακτήρια στο σχηματιζόμενο βιοϋμένιο χαρακτηρίζονται από μειωμένο μεταβολικό ρυθμό καθώς επίσης και από αργή κυτταρική διαίρεση. Έτσι τα αντιμικροβιακά, στόχος των οποίων είναι τα ταχέως αυξανόμενα και διαιρούμενα κύτταρα δεν είναι σημαντικά δραστικά έναντι αυτών των κυττάρων.
- ✓ Πρέπει ακόμα να σημειωθεί ότι στα βακτηριακά κύτταρα του βιοϋμενίου, ευνοείται ιδιαίτερα η οριζόντια μεταφορά γονιδίων, λόγω της εγγύτητας των βακτηριακών κυττάρων. Συνεπώς η χρήση γονιδίων βακτηριακής αντίστασης είναι ευκολότερη σε αυτές τις περιπτώσεις (Van Acker H et al., 2014).

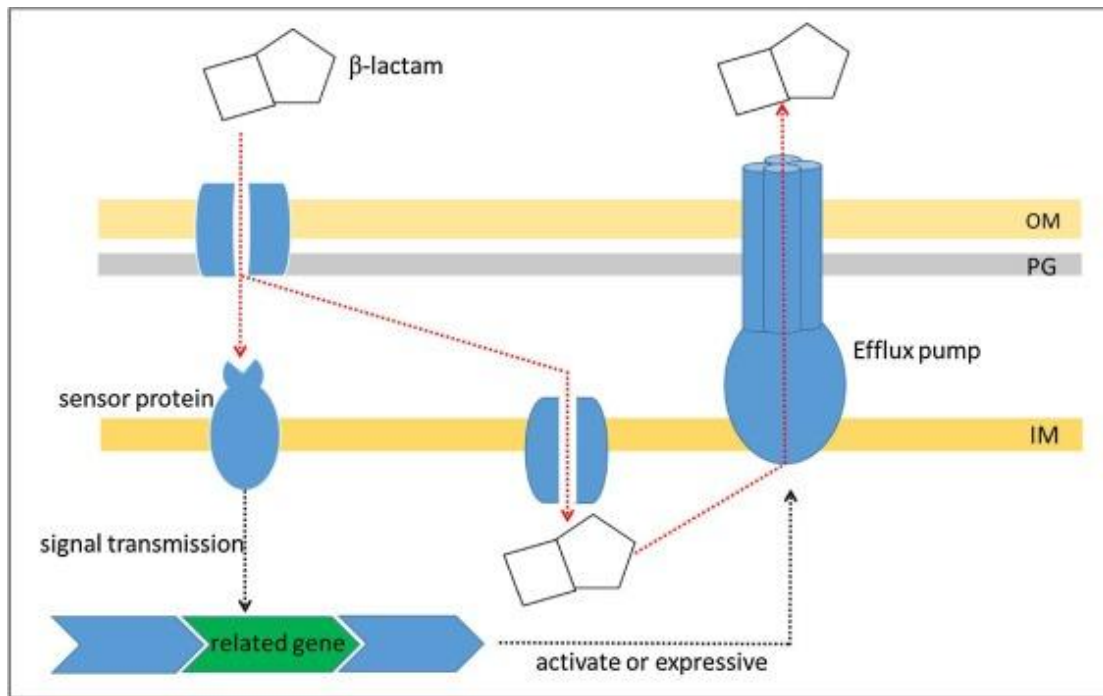
2.1.2. 2ος Μηχανισμός: Αντλίες εκροής αντιμικροβιακού φαρμάκου

Όλα τα βακτήρια, στο χρωμοσωμικό τους DNA διαθέτουν γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν τον σχηματισμό αντλιών εκροής. Ρόλος των αντλιών αυτών είναι να απορρίψουν προς το περιβάλλον, πιθανές τοξικές ουσίες για το βακτηριακό κύτταρο. Τέτοιο παράδειγμα ουσιών, για το βακτηριακό κύτταρο, αποτελεί και το αντιμικροβιακό φάρμακο. Πολλές από τις αντλίες αυτές μπορούν να μεταφέρουν μεγάλη ποικιλία ενώσεων, για τον λόγο αυτό χαρακτηριστικά αναφέρονται

ως MDR αντλίες εκροής, ενώ άλλες να εμφανίζουν εξειδίκευση ως προς την ουσία που μεταφέρουν. Οι αντλίες εκροής είναι δυνατόν να εκφράζονται, σε ορισμένα βακτήρια, από το χρωμοσωμικό τους DNA, ενώ σε άλλες περιπτώσεις η έκφρασή τους ή αντίστοιχα η υπερέκφρασή τους, επάγεται από ορισμένα περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Η έκφρασή ή αντίστοιχα η υπερέκφραση αυτή, μπορεί να επάγεται και σε περίπτωση ύπαρξης κατάλληλου υποστρώματος (Blair JM et al., 2014).

Από μελέτες είναι γνωστό ότι, τα βακτήρια διαθέτουν ποικιλία στους εμφανιζόμενους τύπους αντλιών εκροής. Συγκεκριμένα εμφανίζονται πέντε κύριες κατηγορίες αντλιών εκροής, οι οποίες κατηγοριοποιούνται ανάλογα με την δομή του αλλά και την πηγή ενέργεια την οποία αξιοποιούν για την λειτουργία τους. Οι οικογένειες αυτές είναι: αντλίες σύνδεσης ATP (ABC – ATP Binding Cassette), αντλίες εκροής πολλαπλών φαρμάκων και τοξικών συστατικών (MATE – Multidrug and toxic compound extrusion), αντλίες εκροής με μικρή αντίσταση σε πολλαπλά φάρμακα (SMR – Small multidrug resistance), αντλίες εκροής με διαμεσολάβηση (MFS - Major facilitator superfamily) και τέλος τις αντλίες εκροής RND (Resistance-nodulation-cell division).

Οι περισσότερες από τις αντλίες αυτές, είναι αντλίες οι οποίες σχετίζονται με την μεταφορά ενός συστατικού κατά μήκος της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Στην περίπτωση των RND αντλιών όμως, οι αντλίες της οικογένειας αυτής σχετίζονται με την μεταφορά πολλών συστατικών και δρουν σε συνεργασία με μια πρωτεΐνη σύντηξης της περιπλασματικής μεμβράνης (MFP) και μια πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης (OMP). Οι αντλίες της οικογένειας αυτής συναντώνται σχεδόν εξολοκλήρου σε κατά Gram αρνητικά βακτήρια. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 16 η είσοδος του αντιμικροβιακού στο βακτηριακό κύτταρο ενεργοποιεί την έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων που αφορά τις αντλίες εκροής με αποτέλεσμα την έκφραση ή ενεργοποίηση των αντλιών αυτών και την έξοδο του αντιμικροβιακού από το βακτηριακό κύτταρο.



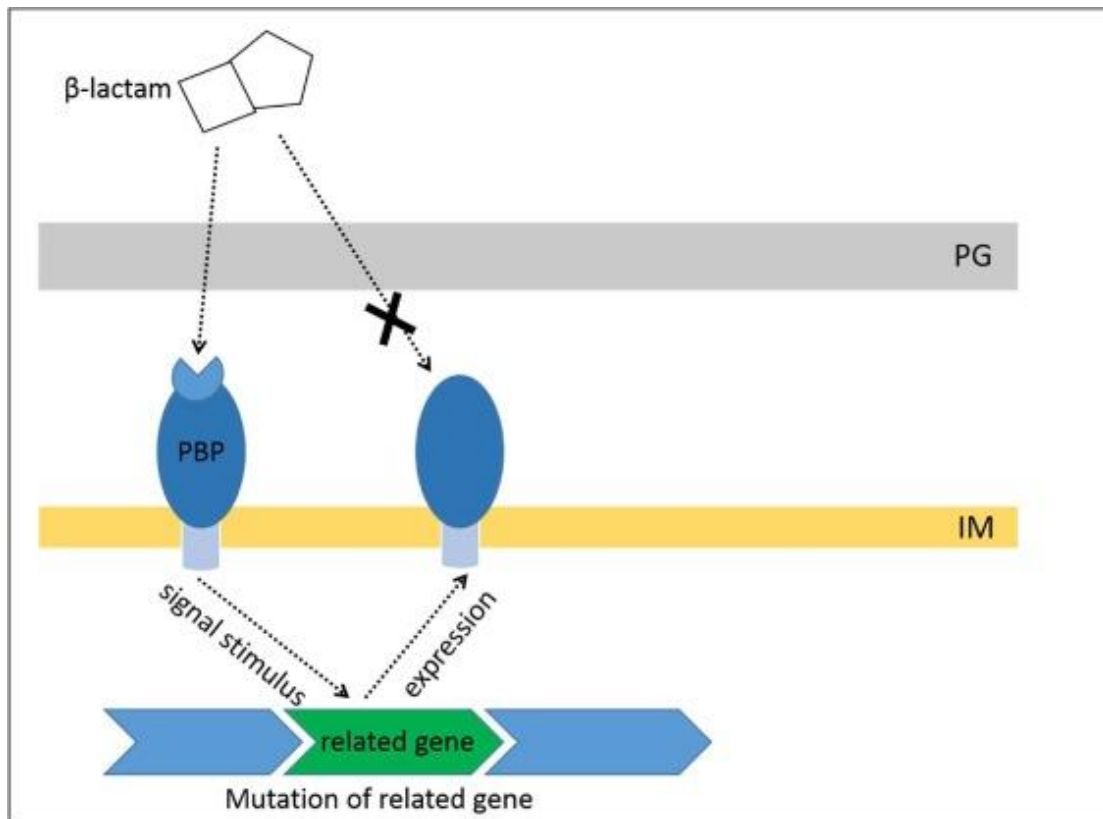
Εικόνα 16: Απεικόνιση του μηχανισμού δράσης των αντλιών εκροής ως απάντηση στην είσοδο του αντιμικροβιακού φαρμάκου στο εσωτερικό του βακτηριακού κυττάρου. Ενεργοποιούνται τα γονίδια που σχετίζονται με τις ενεργοποίηση ή την έκφραση των αντλιών εκροής και το αντιμικροβιακό μεταφέρεται εκτός κυττάρου (Lingzhi Li et al., 2018).

2.1.3. 3ος Μηχανισμός: Τροποποίηση των μορίων – στόχων των αντιμικροβιακών

Γενικά, τα συστατικά εντός του κυττάρου, τα οποία πιθανόν αποτελούν στόχο κάποιου αντιμικροβιακού φαρμάκου, είναι πολυάριθμα. Άρα σαν άμεσο επακόλουθο του συλλογισμού αυτού αποτελεί το συμπέρασμα ότι, πολλοί είναι αυτοί οι στόχοι εντός του κυττάρου, οι οποίοι μπορούν να τροποποιηθούν, ώστε να προκύψει η αντίσταση στο εκάστοτε αντιμικροβιακό. Συγκεκριμένα θα αναφερθούμε στους στόχους εκείνους οι οποίοι σχετίζονται με την δομή του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηριακών κυττάρων. Και αυτό γιατί, τα β – λακταμικά αντιμικροβιακά τα οποία αναλύονται στην παρούσα εργασία, από προηγούμενη ενότητα έχουμε δει ότι προκειμένου να είναι αποτελεσματικά στοχεύουν μόρια, τα οποία σχετίζονται με την σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, έτσι εμποδίζοντάς την να επιτυγχάνουν την εξουδετέρωση του μικροοργανισμού. Ο μηχανισμός ο οποίος συναντάται και χρησιμοποιείται, σχεδόν εξ ολοκλήρου από τα κατά Gram θετικά βακτήρια, σχετίζεται με αλλαγές στην δομή ή/και στον αριθμό των πρωτεϊνών δέσμευσης της πενικιλίνης (PBP – Penicillin Binding Proteins). Οι PBPs είναι τρανσπεπτιδάσες, οι οποίες εμπλέκονται στον σχηματισμό των πεπτιδογλυκανών του κυτταρικού τοιχώματος. Αλλαγή στον αριθμό των PBPs (εικόνα 17) (Wanda C Reygaert, 2018) :

- Είτε αύξηση του αριθμού των PBPs, οι οποίες όμως εμφανίζουν μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης με τα αντιμικροβιακά,
- Είτε μείωση του αριθμού των PBPs, οι οποίες εμφανίζουν φυσιολογική ικανότητα δέσμευσης με τα αντιμικροβιακά φάρμακα, οδηγούν σε σημαντικές επιπτώσεις, ως προς την ποσότητα του αντιμικροβιακού που απαιτείται ώστε να προσδεθεί στα μόρια – στόχος.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα μικροοργανισμού, ο οποίος χρησιμοποιεί τον μηχανισμό αυτόν για εμφάνιση αντίστασης είναι ο *S. aureus*. Πραγματοποιείται αλλαγή στην δομή της PBP2a, με την απόκτηση ενός γονιδίου *mecA*. Έτσι η έκφραση του γονιδίου αυτού, οδηγεί στην αλλαγή της δομής της PBP2a, με άμεσο επακόλουθο την μείωση ή /και την εξάλειψη της ικανότητας σύνδεσης του φαρμάκου με αυτήν (Becceiro A, et al., 2013).



Εικόνα 17: Απεικόνιση του μηχανισμού εμφάνισης αντίστασης των βακτηρίων, έναντι των β – λακταμικών αντιμικροβιακών. Όπως φαίνεται στην εικόνα η απόκτηση γονιδίων από το εκάστοτε βακτήριο μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στην δομή των PBPs, με αποτέλεσμα την μειωμένη ή την πλήρη απώλεια της ικανότητας δέσμευσης, των β – λακταμικών αντιμικροβιακών στις PBPs (Lingzhi Li et al., 2018).

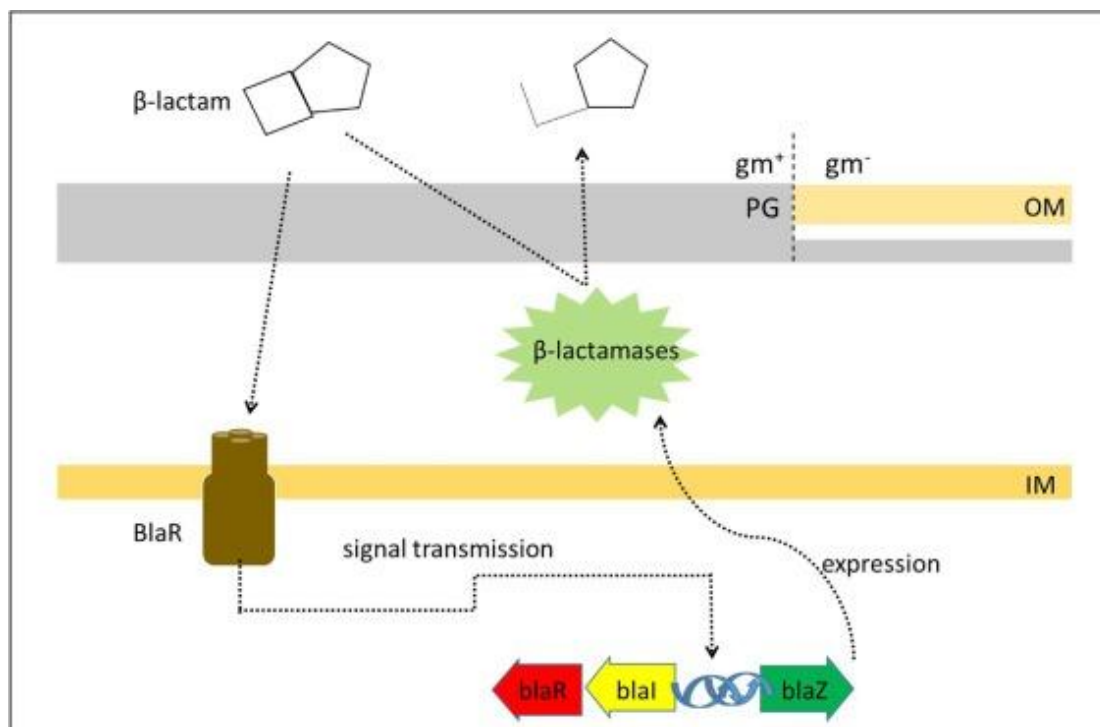
2.1.4. 4ος Μηχανισμός: Απενεργοποίηση του αντιμικροβιακού. Δράση β - λακταμασών

Οι τρόποι με τους οποίους ένα βακτήριο μπορεί και απενεργοποιεί ένα αντιμικροβιακό φάρμακο, μετά την εισαγωγή του δεύτερου σε αυτό είναι δυο:

Με τον κατακερματισμό του αντιμικροβιακού φαρμάκου

- Με την μεταφορά μιας χημικής ομάδας στην δομή του φαρμάκου.

Ο πιο διαδεδομένος μηχανισμός απενεργοποίησης του β - λακταμικού φαρμάκου μετά την είσοδό του στο εσωτερικό του βακτηρίου, είναι οι β - λακταμάσες. Οι β - λακταμάσες, όπως θα αναλυθεί στο 3^ο κεφάλαιο της παρούσας εργασίας, είναι ένζυμα τα οποία καταστέλλουν την δράση των β - λακταμικών αντιμικροβιακών, υδρολύοντάς τα. Πιο συγκεκριμένα, τα μόρια αυτά έχουν την δυνατότητα να υδρολύουν συγκεκριμένη ομάδα του β - λακταμικού δακτυλίου, προκαλώντας το άνοιγμα του δακτυλίου αυτού. Ο ανοιγμένος πλέον δακτύλιος δεν μπορεί να συνδεθεί στις PBPs, ώστε να διαταραχθεί η συνοχή του κυτταρικού τοιχώματος (Εικόνα 18). Η παραγωγή των β - λακταμασών συνδέεται με απόκτηση αντίστοιχου γονιδιακού συστατικού που κωδικοποιεί την παραγωγή των ενζύμων αυτών, από το βακτήριο, είτε μέσω μεταφοράς πλασμιδίου είτε μέσω μεταλλαγών στο ίδιο το γονιδίωμα του βακτηριακού κυττάρου.



Εικόνα 18: Απεικόνιση του μηχανισμού δράσης των β - λακταμασών. Με την δράση των β - λακταμασών, τα β - λακταμικά αντιμικροβιακά υδρολύονται, με αποτέλεσμα το άνοιγμα του β - λακταμικού δακτυλίου. Το γεγονός αυτό

συμβάλλει στην αποτυχία της δέσμευσης του αντιμικροβιακού στις PBPs, μόρια τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό των κυτταρικών τοιχωμάτων (Lingzhi Li et al., 2018).

Η παραγωγή των β – λακταμασών αποτελεί τον πιο κοινό μηχανισμό στα κατά Gram αρνητικά βακτήρια αλλά και τα θετικά. Αποτελούν σημαντικό μηχανισμό αντίστασης έναντι των πενικιλινών και των κεφαλοσπορινών. Αναλυτικά για τον μηχανισμό δράσης των β – λακταμασών, γίνεται αναφορά στο 3^ο κεφάλαιο της παρούσας εργασίας.

2.2. Παθογόνοι μικροοργανισμοί που εμφανίζουν αντίσταση

Η αντίσταση στα αντιμικροβιακά, είναι ένα φαινόμενο το οποίο παρατηρείται ειδικά τα τελευταία χρόνια, με κλιμακούμενη εμφάνιση. Η επιστημονική κοινότητα έχει προχωρήσει σε μια κατηγοριοποίηση των μικροοργανισμών αυτών στις εξής κατηγορίες:

- **Multi Drug Resistance (MDR):** τα βακτήρια της κατηγορίας αυτής εμφανίζουν αντίσταση σε τουλάχιστον ένα αντιμικροβιακό παράγοντα τριών ή περισσότερων αντιμικροβιακών κατηγοριών.
- **Extensive Drug Resistance (XDR):** τα βακτήρια της κατηγορίας αυτής εμφανίζουν αντίσταση σε τουλάχιστον έναν παράγοντα, σε όλες εκτός από μια ή δυο κατηγορίες αντιμικροβιακών.
- **Pandrug Resistant (PDR):** τα βακτήρια στην κατηγορία αυτή εμφανίζουν αντίσταση, σε όλους τους παράγοντες, όλων των αντιμικροβιακών κατηγοριών. Συνεπώς τα βακτηριακά απομονωμένα στελέχη, δεν εμφανίζουν ευαισθησία, σε κανένα κλινικά διαθέσιμο φάρμακο.

Τον Φεβρουάριο του 2017, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO), δημοσίευσε μια λίστα που περιλάμβανε, όλα εκείνα τα παθογόνα για τα οποία υπήρχε αυξημένη ανάγκη για ανάπτυξη νέων αντιμικροβιακών (World Health Organization. 2017). Στην λίστα των παθογόνων αυτών συμπεριλαμβάνονταν οι *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* και είδη εντεροβακτηρίων. Τα παθογόνα αυτά σημειώθηκαν ως υψηλής προτεραιότητας. Μέσω γενετικών μεταλλαγών αλλά και κινητών γενετικών στοιχείων, οι παραπάνω μικροοργανισμοί, ανέπτυξαν μηχανισμούς αντίστασης, έναντι πολλών αντιβιοτικών, συμπεριλαμβανομένων και των β – λακταμικών (Naylor NR et al., 2018).

Στις παραγράφους που ακολουθούν θα πραγματοποιηθεί μια σύντομη αναφορά στους μικροοργανισμούς αυτούς οι οποίοι εμφανίζουν αντίσταση στα β – λακταμικά αλλά και σε άλλα αντιμικροβιακά και η ανάπτυξη νέων αντιμικροβιακών θεωρείται πλέον αναγκαία.

2.2.1. *Acinetobacter baumannii* και εμφάνιση αντοχής

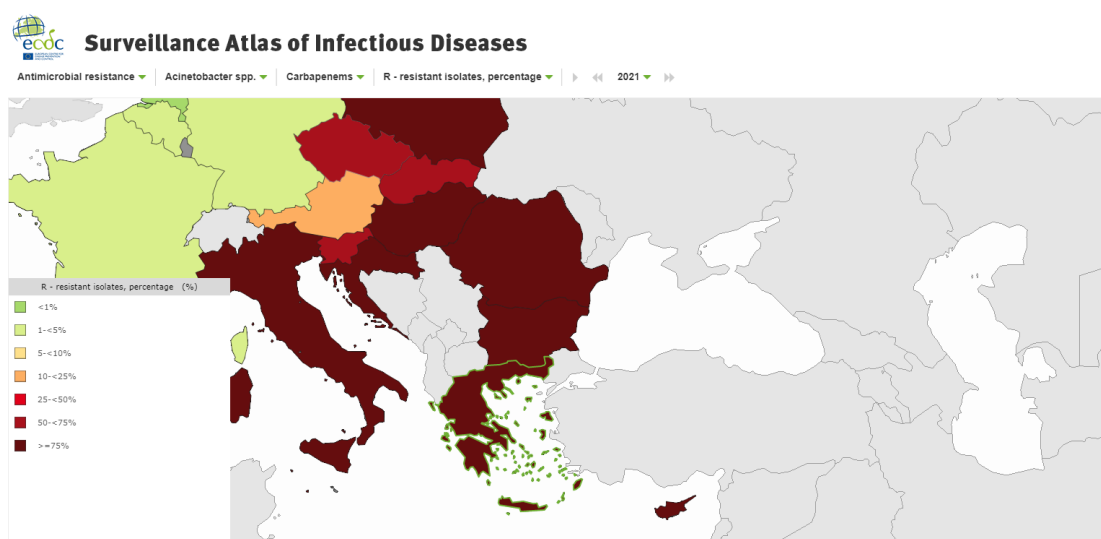
Ο *Acinetobacter baumannii*, αρχικά απομονώθηκε από το έδαφος, με την χρήση κατάλληλου μέσου, εμπλουτισμένο με οξικό ασβέστιο (Peleg, A.Y. et al., 2008). Η πρώτη αυτή περιγραφή του, οδήγησε στην ονομασία *Micrococcus calcoaceticus*. Σήμερα, ο μικροοργανισμός αυτός περιγράφεται πλήρως με την ονομασία *Acinetobacter*, η οποία προέρχεται από την ελληνική λέξη ακίνητος. Το γεγονός αυτό οφείλεται στους Brisou και Prevot, οι οποίοι το 1954, προσπάθησαν να διαχωρίσουν τους μικροοργανισμούς σε κινητούς και μη κινητούς (Brisou, J. & Prevot, 1954). Έτσι ο *Acinetobacter baumannii* περιγράφεται ως μη κινητός μικροοργανισμός και τα περισσότερα στελέχη τα οποία ανήκουν στο γένος *Acinetobacter*, εμφανίζουν σπασμωδική κινητικότητα (Baumann, P. et al., 1968).

Είναι πλέον γνωστό ότι στο γένος *Acinetobacter* ανήκουν πενήντα ακόμα είδη, τα οποία εντοπίζονται στο περιβάλλον και δεν θεωρούνται παθογόνα (Wong D. et al., 2017). Σε αντίθεση με αυτά ο *A. baumannii* αναφέρεται ως το πιο απειλητικό. Στις αρχές του 1970, οι κλινικές του απομονώσεις φανέρωσαν την ευαισθησία του σε κοινά αντιβιοτικά όπως η αμπικιλίνη, η γενταμισίνη, η χλωραμφενικόλη και το ναλιδικό οξύ. Ήδη όμως από τα τέλη του 1970, γίνεται σημαντική αναφορά του ως νοσοκομειακό παθογόνο, συσχετιζόμενο κυρίως με την χρήση ευρύ φάσματος αντιβιοτικών (Townser, K.J., 2009). Η άποψη αυτή ενισχύθηκε και από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, που υποστήριζε ότι, ο *A. baumannii* είναι ένας από τους πιο επικίνδυνους μικροοργανισμούς, ο οποίος εμφανίζει αντίσταση. Στις αρχές του 1980 εστίες νοσοκομειακών λοιμώξεων αναφέρονται σε πολλές χώρες της Ευρώπης και της Ασίας. Ο *A. baumannii* εντοπίζεται στον στοματοφάρυγγα, στις αναπνευστικές εκκρίσεις αλλά και το δέρμα ασθενών (Sayar MS and Altay FA., 2020). Σήμερα είναι ανθεκτικός στα περισσότερα αντιβιοτικά πρώτης γραμμής. Η κολιστίνη και η τιγκεκυκλίνη, είναι τα μόνα αντιβιοτικά τα οποία είναι ακόμα δραστικά έναντι του *A. baumannii*, και αποτελούν την σημαντικότερη πηγή θεραπείας του XDR *A. baumannii*. Παρά το γεγονός αυτό, έχουν καταγραφεί ορισμένες αναφορές για εμφάνιση αντίστασης του στελέχους έναντι της κολιστίνης (Cai, Y. Et al., 2012).

Σε ότι αφορά τα β – λακταμικά αντιμικροβιακά, ο *A. baumannii* εμφανίζει αντίσταση στις καρβαπενέμες. Αυτό συμβαίνει με δυο κυρίως τρόπους: είτε με την υπερέκφραση της οξακιλλινάσης, η οποία υδρολύει την καρβαπενέμη (Rumbo, C. et al., 2013), είτε με υπερέκφραση της ριβοσωμικής μεθυλοτρανσφεράσης ArmA RNA 16S (Adams-Haduch, J.M et al., 2008). Χαρακτηριστικό παράδειγμα στην πρώτη περίπτωση είναι η β - λακταμάση OXA – 51, η οποία έχει χρωμοσωμική προέλευση. Αντίστοιχα άλλες β – λακταμάσες οι οποίες αποκτώνται είναι οι OXA – 23 και OXA – 24, αλλά και οι 58 και 123. Από αυτές, το ένζυμο OXA – 23 έχει συσχετιστεί με

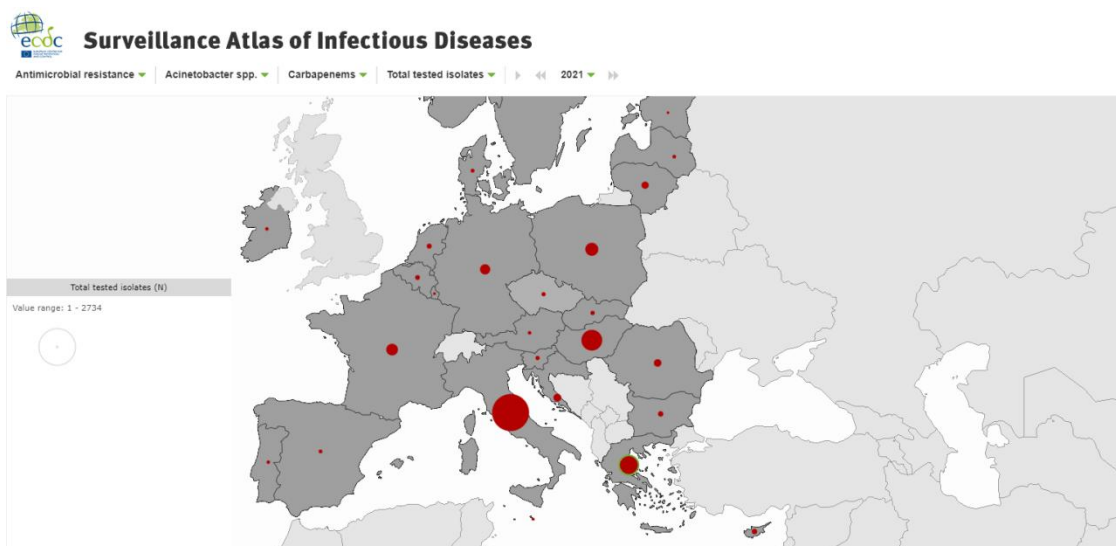
αυξημένη διάδοση και ισχυρή αντίσταση στις καρβαπενέμες με σημαντικές κλινικές συνέπειες (Mugnier, P.D. et al., 2009). Αντίθετα το ένζυμο OXA – 24 εμφανίζει ήπια έως μέτρια υδρολυτική δράση έναντι των καρβαπενεμών. Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι, το ένζυμο OXA – 51, παράγεται φυσιολογικά από το στέλεχος *A. baumannii*, χωρίς να προσδίδει αντίσταση σε αντιμικροβιακά. Ο παράγοντας εκείνος που καθιστά το ένζυμο αυτό ικανό να προσδίδει αντίσταση, είναι η ύπαρξη της αλληλουχίας ISAba1 ή ISAba9, γειτονικά του γονιδίου που εκφράζει το OXA – 51. Έχοντας σαν αποτέλεσμα την υπερέκφραση του ενζύμου και εμφανίζοντας με τον τρόπο αυτό αντίσταση σε αντιμικροβιακά (Figueiredo, S. et al., 2009). Σε γενικές γραμμές η ομάδα των ενζύμων OXA προσδίδουν αντοχή έναντι των καρβαπενεμών. Όμως στην αντοχή έναντι των καρβαπενεμών εμπλέκεται και ο μηχανισμός μειωμένης έκφρασης της πρωτεΐνης 2 που δεσμεύει την πενικιλίνη (PBP 2).

Ο ECDC στις καταγραφές του, από το 2012 έως και το 2021, σχετικά με την απομόνωση στελεχών *A. baumannii*, τα οποία εμφανίζουν αντίσταση στις καρβαπενέμες, δηλώνει συνεχή αυξανόμενη πορεία και την περιοχή της Ελλάδας αλλά και γενικότερα της Ευρώπης. Σε ότι αφορά την περιοχή της Ελλάδας, εμφανίζει ποσοστό απομονωμένων στελεχών του γένους *Acinetobacter* με εμφάνιση αντίστασης στις καρβαπενέμες με ποσοστά άνω του 75% (Εικόνα 19). Συγκεκριμένα ο ECDC δηλώνει για τον ελλαδικό χώρο, το ποσοστό των απομονώσεων *Acinetobacter spp.* για το έτος 2021 σε ποσοστό 96,9%, κατατάσσοντάς μας στις περιοχές με την μεγαλύτερη εξάπλωση και εμφάνιση των στελεχών αυτών (Center for Disease Control and Prevention).



Εικόνα 19: Απεικόνιση του χάρτη σύμφωνα με το Ευρωπαϊκό Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων, για τα καταγραμμένα απομονωμένα στελέχη του γένους *Acinetobacter spp.*, τα οποία εμφανίζουν αντίσταση στις καρβαπενέμες, στην Ευρώπη και συγκεκριμένα, σε ότι μας αφορά, στην περιοχή της Ελλάδας. Τα ποσοστά για το έτος 2021 ξεπερνούν το 75% (Centers for Disease Control and Prevention).

Παρατηρώντας αντίστοιχα το γενικό πλήθος απομονώσεων *Acinetobacter spp*, δηλαδή τα συνολικά στελέχη τα οποία απομονώθηκαν και αποτελούν εκείνα με εμφάνιση αντίστασης στις καρβαπενέμες αλλά και εκείνα που δεν εμφάνιζαν αντίσταση. Σύμφωνα λοιπόν με τον ECDC, η Ελλάδα κατέχει την τρίτη θέση με σύνολο απομονώσεων 1.377, ακολουθώντας την Ιταλία που κατέχει την πρώτη θέση με σύνολο απομονώσεων 2.734, αλλά και την Ουγγαρία με σύνολο απομονώσεων 1.445 (Center for Disease Control and Prevention) (Εικόνα 20).



Εικόνα 20: Απεικόνιση του χάρτη σύμφωνα με το Ευρωπαϊκό Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων, για τα καταγραφόμενα απομονωμένα στελέχη του γένους *Acinetobacter spp*, στην Ευρώπη και συγκεκριμένα, σε ότι μας αφορά, στην περιοχή της Ελλάδας. Για το έτος 2021 η Ελλάδα κατέχει την τρίτη θέση με αριθμό απομονώσεων 1.377, ενώ πρώτη θέση έχει η Ιταλία με πλήθος απομονώσεων 2.734 και δεύτερη η Ουγγαρία με αντίστοιχο πλήθος απομονώσεων 1445 (Centers for Disease Control and Prevention).

2.2.2. *Pseudomonas aeruginosa* και ανοχή στις καρβαπενέμες

Το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa*, είναι ένας κατά Gram αρνητικός βάκιλος, ο οποίος είναι αερόβιος και ανήκει στην οικογένεια *Pseudomonadaceae*. Βρίσκεται συνήθως στο περιβάλλον, όπως για παράδειγμα στο έδαφος και το νερό. Εμφανίζει μικρές απαιτήσεις επιβίωσης, μπορεί να χρησιμοποιεί ποικίλες πηγές άνθρακα και έχει την δυνατότητα να επιβιώνει σε πυκνά διαλύματα αλατιού. Σε ότι αφορά το θερμοκρασιακό εύρος μέσα στο οποίο το βακτήριο αυτό μπορεί να επιβιώσει, αυτό κυμαίνεται από τους 20° C έως τους 42° C. Τα χαρακτηριστικά αυτά που διαθέτει, το καθιστούν ικανό να βρίσκεται και να επιβιώνει σε πολλά διαφορετικά περιβάλλοντα, όπως και το νοσοκομειακό περιβάλλον (Igbnosa, I., 2015). Η εμφάνισή του στο νοσοκομειακό περιβάλλον έχει συσχετιστεί σε μεγάλο βαθμό με νοσοκομειακές λοιμώξεις όπως λοιμώξεις της αναπνευστικής οδού, χειρουργικών τραυμάτων, του γαστρεντερικού συστήματος, του ουροποιητικού συστήματος και του

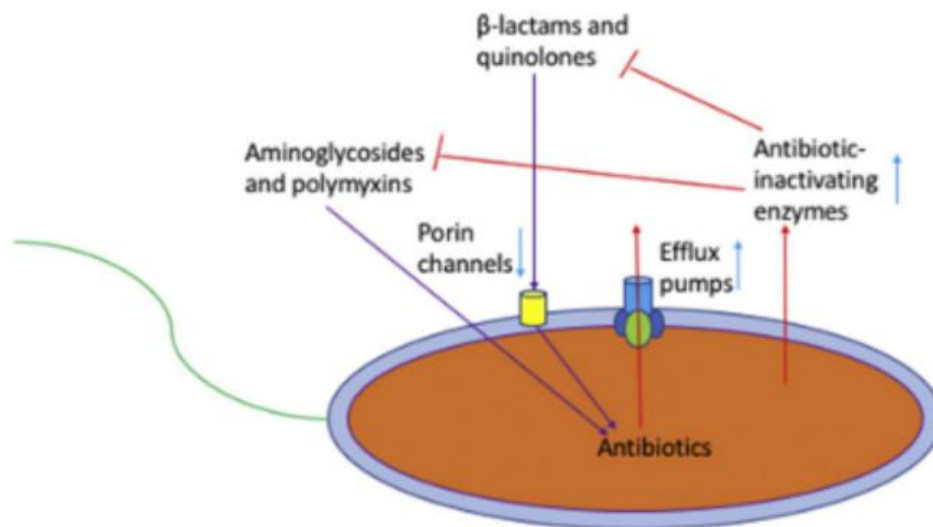
αίματος. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων το βακτήριο αυτό εμφανίζει αντίσταση στα αντιμικροβιακά διακρίνεται σε τρεις τύπους:

- Την εγγενή αντίσταση, η οποία αναφέρεται στην ικανότητα του βακτηρίου να αντιστέκεται στην αποτελεσματικότητα του αντιβιοτικού, ως αποτέλεσμα είτε περιορισμένης διαπερατότητας του αντιβιοτικού στην εξωτερική μεμβράνη του κυττάρου, είτε στην λειτουργία των αντλιών εκροής και των ενζύμων αδρανοποίησης των αντιμικροβιακών όπως η δράση των β – λακταμασών.
- Την επίκτητη αντίσταση, η οποία αναφέρεται σε μεταλλάξεις που φέρει το βακτήριο ή σε απόκτηση γονιδίων αντίστασης μέσω οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς.
- Προσαρμοστική αντίσταση, η οποία χαρακτηρίζεται ως ασταθής ή παροδική. Μέσω της αντίστασης αυτής πραγματοποιείται αύξηση στην ικανότητα του βακτηρίου να επιβιώνει έναντι των αντιβιοτικών, ως αποτέλεσμα παροδικών αλλαγών στην έκφραση γονιδίων και / ή πρωτεϊνών σε περιβαλλοντικό στρες. Η αλλαγή αυτή στην έκφραση συμβαίνει μέσω προσαρμοστικών πολλαπλών μεταλλακτικών μηχανισμών και μέσω γενετικής ανατροφής (Pang et al., 2018).

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου το βακτήριο *P. aeruginosa* εμφανίζει αντίσταση έναντι των καρβαπενεμών, είναι πολυπαραγοντικός καθώς αποτελεί αλληλεπίδραση πολλών παραγόντων (Εικόνα 21). Πιο συγκεκριμένα ένας πρώτος παράγοντας εμφάνισης αντίστασης, είναι ορισμένα είδη μεταλλάξεων οι οποίες αφορούν τις πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης του κυττάρου. Τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η OprD πορίνη, μια πρωτεΐνη της οποίας ρόλος είναι η δημιουργία πόρων στην εξωτερική μεμβράνη του βακτηρίου. Συνεπώς μεταλλάξεις οι οποίες σχετίζονται με την μειωμένη έκφρασή της ή ακόμα και την πλήρη απώλεια της, συμβάλλουν στην εμφάνιση αντίστασης καθώς τα σχηματιζόμενα από αυτήν κανάλια, αποτελούν είσοδο πολλών αμινοξέων αλλά και των καρβαπενεμών. Με τον τρόπο αυτόν παρεμποδίζεται η είσοδός τους στο εσωτερικό των κυττάρων και παρατηρείται εμφάνιση αντίστασης στην ιμιπενέμη αλλά και μείωση της ευαισθησίας των βακτηρίων έναντι της μεροπενέμης.

Ένας δεύτερος εξίσου σημαντικός παράγοντας, που οδηγεί στην εμφάνιση αντίστασης, είναι η ενεργοποίηση ή υπερέκφραση των αντλιών εκροής του βακτηρίου. Οι αντλίες εκροής έχουν ως ρόλο την μεταφορά του αντιμικροβιακού αλλά και άλλων τοξικών ουσιών, από το εσωτερικό περιβάλλον του κυττάρου στο εξωτερικό του περιβάλλον. Στην περίπτωση του βακτηρίου *P. aeruginosa*, το σύστημα αντλιών εκροής το οποίο εντοπίζεται στα περισσότερα απομονωμένα του στελέχη, είναι το σύστημα MexAB – OprM. Υπερέκφραση του συστήματος αυτού, οδηγεί σε

μείωση της ευαισθησίας του βακτηρίου έναντι της μεροπενέμης, όμως η ευαισθησία του έναντι της μιπενέμης δεν επηρεάζεται (Mirsalehian, A., et al., 2017).

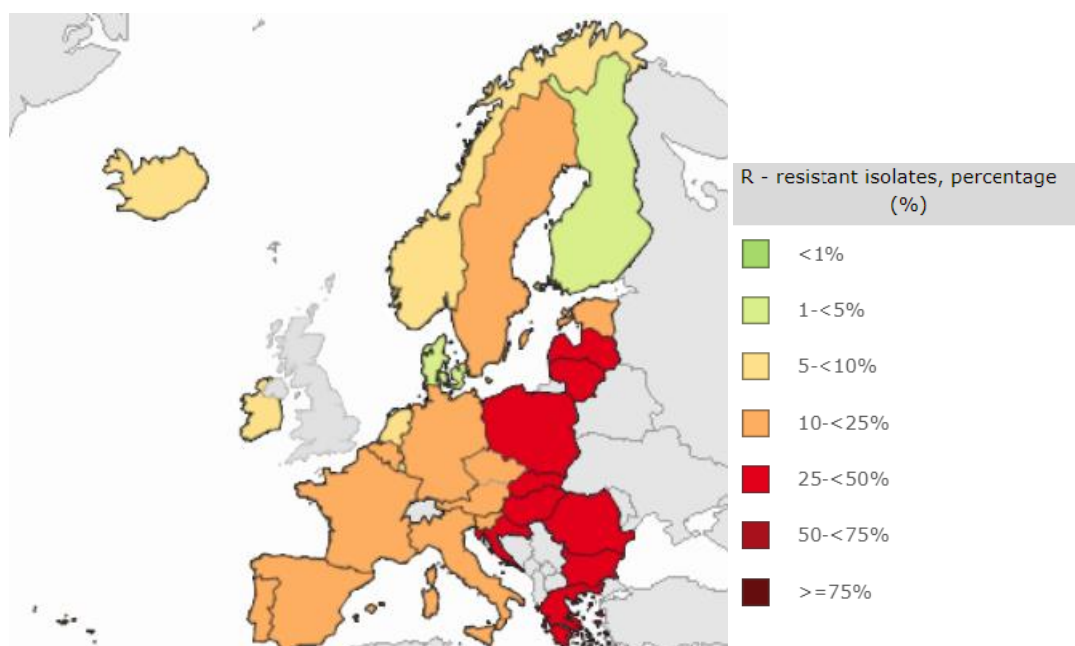


Εικόνα 21: Απεικόνιση των μηχανισμών εμφάνισης αντίστασης στο βακτηριακό κύτταρο του *P. aeruginosa*. Σε ότι αφορά τα β – λακταμικά αντιμικροβιακά, διαταραχή στην διέλευσή τους λόγω των πορινών, η αυξημένη εκροή τους μέσω των αντλιών εκροής αλλά και η υδρόλυση – απενεργοποίησή τους από τις β – λακταμάσες είναι οι κυριότεροι μηχανισμοί εμφάνισης αντίστασης του βακτηρίου σε αυτά (Z. Pang et al., 2018).

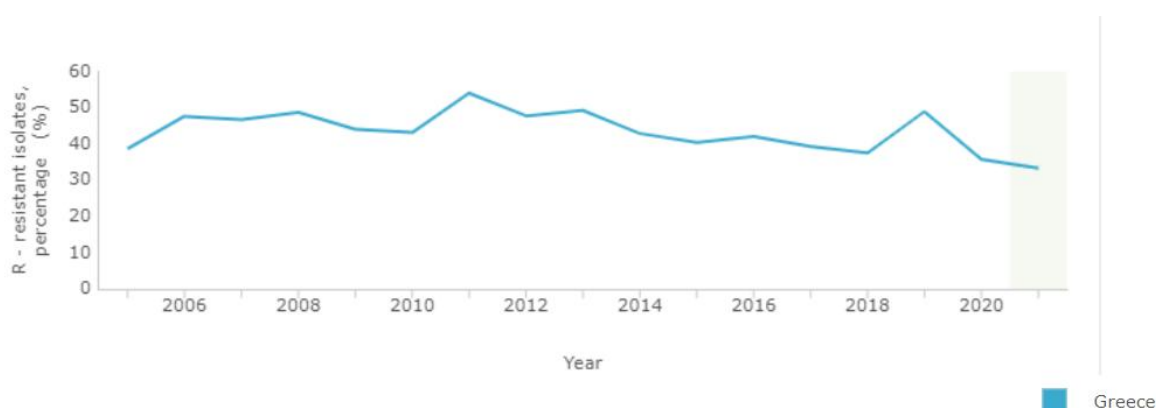
Τέλος, όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες ενότητες, ένας πολύ σημαντικός μηχανισμός εμφάνισης αντίστασης είναι η δράση των β – λακταμασών. Το βακτήριο αυτό στο χρωμοσωμικό του DNA, φέρει την πληροφορία για την έκφραση και την παραγωγή της β – λακταμάσης AmpC. Μεταλλάξεις στην περιοχή αυτή του DNA του βακτηρίου συχνά οδηγεί σε υπερέκφραση της AmpC, οδηγώντας σε εμφάνιση αντίστασης τόσο έναντι των καρβαπενεμών όσο και άλλων αντιμικροβιακών. Ακόμα συχνά τα βακτήρια μπορούν να αποκτούν κινητά γενετικά στοιχεία και μέσω αυτών να αποκτούν γενετική πληροφορία για την έκφραση και παραγωγή και άλλων β – λακταμασών. Με τον τρόπο αυτό τα αντιμικροβιακά και στην περίπτωση αυτή οι καρβαπενεμένες, μετά την είσοδό τους στο κύτταρο, υδρολύονται από τις παραγόμενες β – λακταμάσες (A. Silva et al, 2020).

Σύμφωνα με το Κέντρο Πρόληψης και Διαχείρισης Νοσημάτων, τα δεδομένα τα οποία έχουν συλλεχθεί μέχρι και το έτος 2021, δείχνουν μεγάλη αύξηση των απομονωμένων στελεχών *Pseudomonas aeruginosa*, με εμφάνιση αντίστασης στις καρβαπενέμες (Εικόνα 22). Συγκεκριμένα στον Ελλαδικό χώρο, με μέγιστη εμφάνιση να παρατηρείται το 2011 με ποσοστό εμφάνισης 54% και το 2019 με ποσοστό εμφάνισης 48,9%, για το έτος 2021 το ποσοστό εμφάνισης αντίστασης

ανέρχεται στο 33,3% (Εικόνα 23). Παρατηρείται μια σταθερή και ανοδική εμφάνιση των στελεχών με αντίσταση στις καρβαπενέμες, με το μικρότερο ποσοστό εμφάνισης, από καταγραφές του 2005 και έπειτα, να εμφανίζεται το έτος 2021 με ποσοστό 33,3%.



Εικόνα 22: Απεικόνιση της εμφάνισης στελεχών *Pseudomonas aeruginosa*, με αντίσταση στις καρβαπενέμες, στην περιοχή του ελλαδικού χώρου αλλά και της Ευρώπης. Παρατηρούμε ότι στην Ελλάδα τα ποσοστά κυμαίνονται από 25% και μικρότερα από 50%, ποσοστά τα οποία βρίσκονται υψηλά στην βαθμολογική κλίμακα (ECDC, Surveillance Atlas of Infectious Diseases 2021).

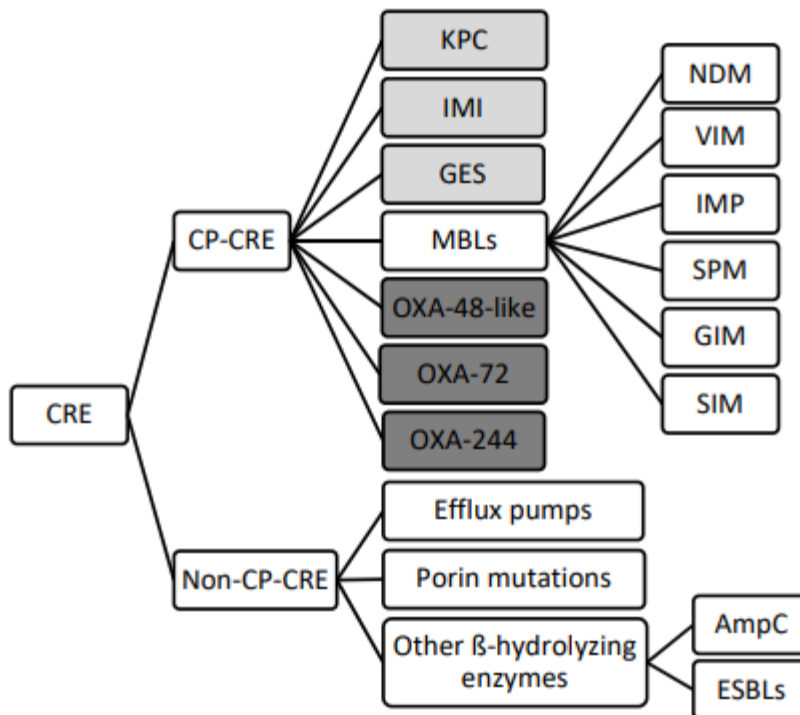


Εικόνα 23: Απεικόνιση σε ποσοστιαία κλίμακα της εμφάνισης στελεχών *Pseudomonas aeruginosa*, στην περιοχή του ελλαδικού χώρου. Οι καταγραφές σημειώνονται από το έτος 2005, οπότε και τα απομονωμένα στελέχη με εμφάνιση αντίστασης στις καρβαπενέμες, ανέρχεται στο 38,7%. Τα επόμενα έτη σημειώνεται ανοδική τάση της εμφανιζόμενης αντίστασης των βακτηρίων αυτών, με τα υψηλότερα ποσοστά να εμφανίζονται τα έτη 2011 και 2019, με ποσοστά 54% και 48,9% αντίστοιχα (ECDC, Surveillance Atlas of Infectious Diseases 2021).

2.2.3. Εντεροβακτήρια και ανοχή στις καρβαπενέμες

Τα Εντεροβακτήρια αποτελούν μια οικογένεια βακτηρίων, της οποίας μέλη της συναντάμε σε ποικίλα μέρη, όπως το έδαφος, το νερό, φυτά αλλά και τα ζώα. Ορισμένα από αυτά απαντώνται και στον άνθρωπο, συγκεκριμένα στον γαστρεντερικό του σωλήνα, ως φυσική χλωρίδα. Για τον λόγο αυτό συνδέονται με την εμφάνιση διάφορων ασθενειών στον άνθρωπο, σε περίπτωση διατάραξης της χλωρίδας αυτής, όπως διάρροιες και εξωεντερικές λοιμώξεις (Leimbach A et al., 2013). Σχετίζονται επίσης με ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις όπως μολύνσεις του ουροποιητικού από την χρήση καθετήρα, λοιμώξεις του αναπνευστικού, πνευμονίες, ενδοκαρδίτιδα, μηνιγγίτιδα και ενδοκοιλιακές λοιμώξεις. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, βακτήρια της οικογένειας αυτής, εμφανίζουν αντίσταση στις καρβαπενέμες. Τα σημαντικότερα μέλη εξ αυτών είναι το βακτήριο *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* αλλά και άλλα είδη εντεροβακτηριδίων. Τα βακτήρια αυτά αναφέρονται ως CRE, Carbapenem – resistant *Enterobacteriaceae*.

Όπως και οι προηγούμενες περιπτώσεις βακτηρίων, έτσι και τα εντεροβακτήρια διαθέτουν τρεις κύριους μηχανισμούς με τους οποίους καταφέρνουν και εμφανίζουν ανθεκτικότητα στις καρβαπενέμες: η παραγωγή β – λακταμασών, η δράση αντλιών εκροής και μεταλλαγές στις πορίνες της εξωτερικής μεμβράνης. Ο κυριότερος μηχανισμός με τον οποίον εμφανίζουν αντίσταση είναι η παραγωγή ενζύμων τα οποία υδρολύουν τα αντιμικροβιακά. Τέτοια ένζυμα αποτελούν και οι β – λακταμάσες. Τα βακτήρια CRE κατηγοριοποιούνται σε εκείνα που εμφανίζουν την δυνατότητα παραγωγής των β – λακταμασών και σε εκείνα που δεν εμφανίζουν την δυνατότητα αυτή (Εικόνα 24). Στην περίπτωση των βακτηρίων τα οποία μπορούν να συνθέτουν καρβαπενεμάσες, οι σημαντικότερες καρβαπενεμάσες είναι η KPC, η ιμιπενεμάση (IMP), μέταλλο – β – λακταμάσες (MBLs) και οι οξακιλλινάσες (Beatriz Suay-García and María Teresa Pérez-Gracia, 2019).



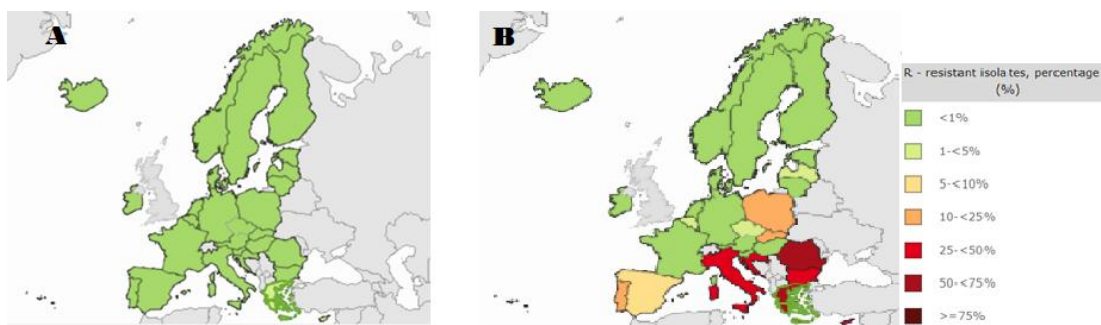
Εικόνα 24: Απεικόνιση της κατηγοριοποίησης των CRE βακτηρίων ανάλογα με την δυνατότητα παραγωγής καρβαπενεμασών ή όχι. Στην πρώτη περίπτωση κατηγοριοποιούνται και οι ανιχνευθέντες καρβαπενεμάσες ενώ αντίστοιχα στην δεύτερη περίπτωση οι εναλλακτικοί μηχανισμοί με τους οποίους τα βακτήρια εμφανίζουν ανθεκτικότητα στα αντιμικροβιακά (Beatriz Suay-García and María Teresa Pérez-Gracia, 2019).

Στην περίπτωση των CRE βακτηρίων, τα οποία δεν εμφανίζουν δυνατότητα παραγωγής καρβαπενεμασών, η εμφάνιση αντίστασης στα αντιμικροβιακά φάρμακα, λαμβάνει χώρα μέσω εναλλακτικών μηχανισμών όπως η παραγωγή άλλων ενζύμων τα οποία υδρολύουν τα β – λακταμικά αντιμικροβιακά όπως για παράδειγμα η β – λακταμάση Ampc καθώς και οι ESBLs, η απώλεια πορινών της εξωτερικής μεμβράνης λόγω γονιδιακών μεταλλαγών και η λειτουργία αντλιών εκροής. Πρέπει να σημειωθεί εδώ ότι μεταξύ των διαφορετικών συστημάτων αντλιών εκροής, το πιο συχνά εμφανιζόμενο κυρίως στο βακτήριο *E.coli*, είναι σύστημα AcrAB – TolC RND το οποίο σε συνδυασμό με την λειτουργία του συμπλέγματος εκροής CusABC είναι υπεύθυνο για την εμφάνιση αντίστασης σε ορισμένες περιπτώσεις της *E. coli* (Beatriz Suay-García and María Teresa Pérez-Gracia, 2019).

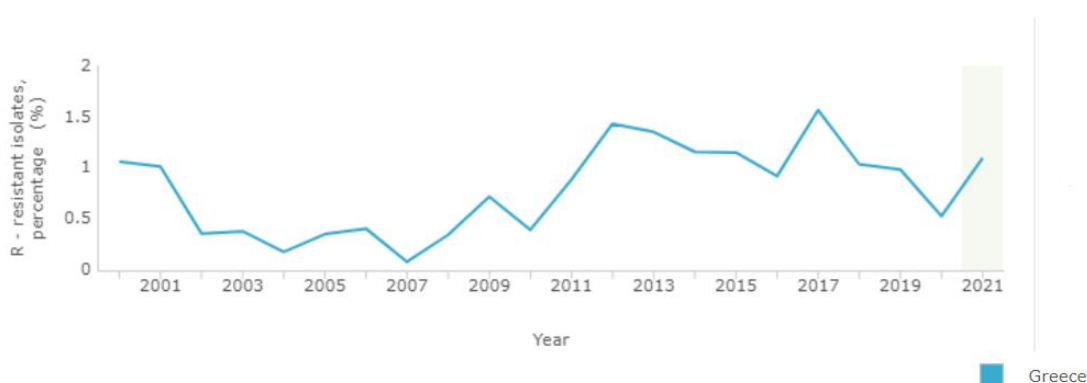
Πίνακας 3: Συγκεντρωτικός πίνακας καρβαπενεμασών που έχουν βρεθεί σε είδη της οικογένειας των Εντεροβακτηρίων.

Species	Class A	Class B (MBLs)	Class D	Ref.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-3	NDM-1, VIM-1	OXA-48	Okoche et al. Boutal et al.
<i>Klebsiella oxytoca</i>			OXA-48, OXA-181	Okoche et al. Boutal et al.
<i>Escherichia coli</i>	KPC	NDM-1, NDM-5, NDM-9, VIM	OXA-48, OXA-181, OXA-244	Okoche et al. Boutal et al.
<i>Proteus mirabilis</i>	KPC		OXA-48	Okoche et al. Boutal et al.
<i>Serratia marcescens</i>	KPC	VIM		Okoche et al. Boutal et al.
<i>Enterobacter cloacae</i>	KPC, IMI-1	VIM-4	OXA-48	Okoche et al. Boutal et al.
<i>Enterobacter aerogenes</i>	KPC		OXA-48	Okoche et al. Boutal et al.
<i>Citrobacter freundii</i>		VIM	OXA-48	Okoche et al. Boutal et al.
<i>Citrobacter koseri</i>			OXA-48	Okoche et al. Boutal et al.
<i>Salmonella enterica</i>	KPC-2	NMD-1, NMD-5, VIM-1, VIM-2, IMP-4	OXA-48	Fernández et al.
<i>Morganella morganii</i>		NDM-1	OXA-48	Boutal et al.
<i>Providencia stuartii</i>	KPC-2	VIM-1		Abdallah et al.
<i>Providencia rettgeri</i>		IMP-1	OXA-72	Abdallah et al.

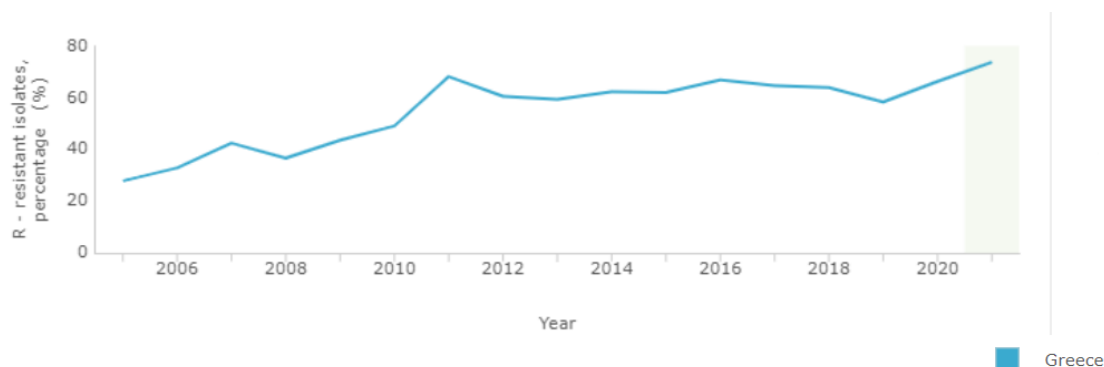
Σύμφωνα με το Κέντρο Πρόληψης και Διαχείρισης Νοσημάτων, για το έτος 2021, αλλά και για τα προηγούμενα έτη, σε ότα αφορά το βακτήριο *E. coli* και τα απομονωμένα στελέχη με εμφάνιση αντίστασης, προκύπτει ότι τα ποσοστά αυτών είναι ιδιαίτερα χαμηλά τόσο στην Ελλάδα όσο και στην Ευρώπη. Τα ποσοστά αυτά είναι μικρότερα από το 1% (Εικόνα 26), ενώ το μέγιστο ποσοστό είχε σημειωθεί το έτος 2017 με 7% εμφάνιση στελεχών με αντίσταση στις καρβαπενέμες (ECDC, Surveillance Atlas of Infectious Diseases 2021). Αντίστοιχα, για το βακτήριο της οικογένειας των εντεροβακτηρίων *Klebsiella pneumoniae*, τα ποσοστά δεν εμφανίζονται το ίδιο χαμηλά σε όλες τις περιοχές (Εικόνα 25B). Σε ορισμένες χώρες της Ευρώπης όπως επίσης και στην Ελλάδα παρατηρείται αύξηση των καταγραφών, για στελέχη του βακτηρίου αυτού με εμφάνιση αντίστασης στις καρβαπενέμες. Συγκεκριμένα στην Ελλάδα από το 2011 και μέχρι το 2019, το ποσοστό των καταγεγραμμένων στελεχών του βακτηρίου με αντίσταση στις καρβαπενέμες, κυμαίνεται σε ποσοστά από 58% έως και 68%. Το 2021 το ποσοστό αυτό έφτασε το 73,7%, σημειώνοντας έτσι μια σταθερά ανοδική πορεία εμφάνισης (Εικόνα 27) (ECDC, Surveillance Atlas of Infectious Diseases 2021).



Εικόνα 25: (Α) Απεικόνιση της εμφάνισης στελεχών *E.coli*, με αντίσταση στις καρβαπενέμες, στην περιοχή του ελλαδικού χώρου αλλά και της Ευρώπης. Παρατηρούμε ότι στην Ελλάδα τα ποσοστά εμφάνισης στελεχών του βακτηρίου με αντίσταση στις καρβαπενέμες είναι <1% το έτος 2021. (Β) Απεικόνιση της εμφάνισης στελεχών *Klebsiella pneumoniae*, τόσο στην Ευρώπη όσο και στην Ελλάδα, με αντίσταση στις καρβαπενέμες. Παρατηρούμε ότι τα ποσοστά εμφάνισης τέτοιων στελεχών ανέρχονται, σε ορισμένες περιοχές της Ελλάδας σε ποσοτό 73,7%, σημειώνοντας έτσι ανοδική πορεία εμφάνισης (ECDC, Surveillance Atlas of Infectious Diseases 2021).



Εικόνα 26: Γραφική αναπαράσταση των καταγραφών, των απομονωμένων στελεχών *E. coli* με αντίσταση στις καρβαπενέμες, τόσο στην Ελλάδα όσο και στην Ευρώπη. Οι καταγραφές από το 2000 έως και το 2021 παραμένουν σε χαμηλά ποσοστά κάτω από 1% (ECDC, Surveillance Atlas of Infectious Diseases 2021).



Εικόνα 27: Γραφική αναπαράσταση των καταγραφών, των απομονωμένων στελεχών *Klebsiella pneumoniae* με αντίσταση στις καρβαπενέμες, τόσο στην Ελλάδα όσο και στην Ευρώπη. Οι καταγραφές από το 2005 έως και το 2021

εμφανίζουν ανοδική τάση. Από το 2011 έως και το 2019 τα ποσοστά κυμαίνονται από 58% έως 68%, ενώ το 2021 το ποσοστό στην Ελλάδα φτάνει το 73,7% (ECDC, Surveillance Atlas of Infectious Diseases 2021).

2.3. Ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις

Ο όρος Ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις, χρησιμοποιείται για να περιγράψει λοιμώξεις οι οποίες προκύπτουν έπειτα από νοσηλεία ατόμων σε νοσοκομεία, δεν είχαν εκδηλωθεί κατά την εισαγωγή των ασθενών, αλλά εμφανίστηκαν 48 ώρες μετά την εισαγωγή τους. Τέτοιες κατηγορίες ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων αποτελούν οι εξής:

- I. Λοιμώξεις της κυκλοφορίας του αίματος – CLABSI (Central line – associated bloodstream infections).
- II. Λοιμώξεις του ουροποιητικού – CAUTI (Catheter – associated urinary track infections).
- III. Λοιμώξεις σε χειρουργικά τραύματα – SSI (Surgical site infections).
- IV. Νοσοκομειακή Πνευμονία – HAP (Hospital acquired pneumonia).
- V. Πνευμονία συσχετιζόμενη με χρήση μηχανικού αερισμού – VAP (Ventilator – associated pneumonia).
- VI. Λοιμώξεις που σχετίζονται με το *Clostridium difficile* – CDI.

Αντίστοιχα, οι παράγοντες που επηρεάζουν την επικινδυνότητα της ενδονοσοκομειακής λοίμωξης είναι:

- Οι πρακτικές αντιμετώπισης της λοίμωξης στις εγκαταστάσεις του νοσοκομείου.
- Η ανοσολογική κατάσταση των ασθενών.
- Η επικράτηση των παθογόνων στην κοινότητα.
- Η ηλικία των ασθενών.
- Το χρονικό διάστημα νοσηλείας των ασθενών.
- Η ύπαρξη πολλαπλών υποκείμενων νοσημάτων.
- Οι τακτικοί επισκέπτες στους ασθενείς.
- Η πιθανή χρήση αναπνευστική υποστήριξης του ασθενή.
- Οι πρόσφατες επεμβατικές διαδικασίες.
- Η παραμονή στην μονάδα εντατικής θεραπείας.

Σύμφωνα με μελέτες, οι πλέον συχνότερες ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις είναι η ενδονοσοκομειακή πνευμονία (HAP) και η σηψαιμία. Η HAP, λοίμωξη του αναπνευστικού με υψηλό ποσοστό νοσηρότητας, σε ποσοστό 85% έχει ως αιτιολογία κατά Gram αρνητικά βακτήρια. Τα βακτήρια αυτά τα οποία απομονώθηκαν ως αιτιολογία ήταν ο *Acinetobacter baumannii* σε

ποσοτό 28%, *Klebsiella pneumoniae* με ποσοστό 25%, *Pseudomonas aeruginosa* με ποσοστό 21% και τέλος *Escherichia coli* με ποσοστό 9% (Lynn Peters et al., 2019). Ακόμα σε μελέτη σε πλήθος ασθενών που εμφάνιζαν ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις, απομονώθηκαν 7.759 βακτηριακά στελέχη ως αιτιολογία της λοίμωξης. Από αυτά τα 3.223 χαρακτηρίστηκαν ως MDR (Multidrug resistant) (Meng Wang et al., 2019). Στο πλήθος αυτό των ασθενών, η συχνότητα μόλυνσης των ασθενών ως προς το είδος του στελέχους και την ένταση των συμπτωμάτων επηρεαζόταν από τους παράγοντες που αναφέρθηκαν και προηγουμένως για την επικινδυνότητα των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων, όπως η ηλικία και η διάρκεια νοσηλείας. Εμφανίζεται έτσι η συσχέτιση της αυξημένης συχνότητας εμφάνισης των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων αναλογικά με την εμφάνιση αντίστασης στα αντιμικροβιακά, πλήθους στελεχών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

3.1. β – λακταμάσες

Οι κύριοι αναστολείς των β-λακταμικών αντιμικροβιακών, είναι οι β-λακταμάσες. Πρόκειται για ένζυμα, τα οποία υδρολύουν τα β-λακταμικά αντιμικροβιακά. Η παραγωγή τους λαμβάνει χώρα κυρίως σε κατά Gram αρνητικά βακτήρια, τα οποία έχει παρατηρηθεί, ότι εμφανίζουν αντίσταση σε πολλά β-λακταμικά αντιμικροβιακά εν συγκρίσει με τα κατά Gram θετικά βακτήρια. Από αναφορές προκύπτει ότι, μέχρι και τα τέλη του 2009, ο αριθμός των μοναδικών πρωτεϊνικών αλληλουχιών, οι οποίες κωδικοποιούν β-λακταμάσες, ξεπέρασε τις 890 (K.Bush & G.A.Jacoby, 2010).

Οι β-λακταμάσες, πρωτοπεριγράφηκαν από τους Abraham και Chain το 1940 (Abraham EP, Chain E, 1940). Η ταξινόμησή τους σε κατηγορίες, πραγματοποιείται λαμβάνοντας υπόψη είτε την πρωτεϊνική τους αλληλουχία (Ambler, R. P. 1980), είτε τα λειτουργικά χαρακτηριστικά των ενζύμων αυτών (Bush, K.et al., 1995).

3.1.1.Κατηγοριοποίηση σύμφωνα με την πρωτεϊνική τους αλληλουχία

Ο πρώτος τρόπος κατάταξης των β-λακταμασών, είναι η κατάταξή τους σύμφωνα με την πρωτεϊνική τους αλληλουχία. Αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο και έχει προταθεί από τον Ambler το 1980 (Ambler, R. P. 1980). Σύμφωνα λοιπόν με αυτήν, οι β-λακταμάσες κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις διαφορετικές μοριακές τάξεις, τις A, B, C και D. Η κατάταξη αυτή στηρίζεται σε συντηρημένα μοτίβα αμινοξέων (Ambler, R.P., et al, 1991).

Οι β-λακταμάσες οι οποίες περιλαμβάνονται στις τάξεις A, C και D, αποτελούν βακτηριακά ένζυμα πρωτεϊνικής φύσης, τα οποία υδρολύουν τα υποστρώματά τους, προς παραγωγή ενός άκυλο – ενζύμου, μέσω μιας ενεργής σερίνης. Οι β-λακταμάσες των κατηγοριών αυτών έχουν συμπαγή σφαιρική δομή, με α-έλικες, β-φύλλα ή και ακανόνιστα δομημένους βρόγχους (A.M.Egorov et al., 2020). Παρότι όπως αναφέρθηκε, η δομή αυτή των β-λακταμασών είναι ιδιαίτερα συμπαγής, εμφανίζει μια ευελιξία η οποία εξασφαλίζεται από την ύπαρξη βρόγχων. Ένα καλά διατηρημένο στοιχείο αποτελεί ο βρόγχος Ω, ο οποίος εντοπίζεται στην περιοχή εισόδου του υποστρώματος, στην ενεργή θέση του ενζύμου (A.M. Egorov et al., 2020).

Σε αντίθεση με τις β-λακταμάσες των ομάδων A, C και D, οι β-λακταμάσες οι οποίες ανήκουν στην κατηγορία B, αποτελούν μέταλλο-ένζυμα. Απαντώνται στους προκαρυώτες όπου δρουν σε μικρά και απλά υποστρώματα, αλλά και στους ανώτερους ευκαρυώτες όπου διαθέτουν τον ρόλο επιδιόρθωσης του DNA και συμμετέχουν επίσης σε μονοπάτια επεξεργασίας του. Τα μέταλλο-ένζυμα αυτά, χρησιμοποιούν τουλάχιστον δύο ενεργές θέσεις ψευδαργύρου, ώστε να επιτευχθεί η υδρόλυση των β-λακταμικών αντιμικροβιακών (K.Bush & G.A.Jacoby, 2010). Γενικά οι β-λακταμάσες της κατηγορίας B, μπορούν να υδρολύουν τα περισσότερα από τα β-λακταμικά

αντιμικροβιακά, όμως δεν υδρολύουν μονοβακτάμες και δεν αλληλεπιδρούν με PBP's. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι β-λακταμάσες της κατηγορίας B, οι οποίες κωδικοποιούνται από πλασμίδια, αποτελούν ιδιαίτερο κλινικό ζήτημα, καθώς μπορούν να μεταφέρονται και να φιλοξενούνται σε άλλους μικροοργανισμούς προσδίδοντας ανθεκτικότητα σε άλλες τάξεις αντιμικροβιακών (Queenan, A. M. & Bush, K.,2007). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν β-λακταμάσες των οικογενειών IMP, VIM και NDM καθώς και παραλλαγές αυτών, οι οποίες είναι ιδιαίτερα διαδεδομένες και εμφανίζονται παγκοσμίως (Kazmierczak, K.M. et al., 2016). Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι οι β-λακταμάσες της κατηγορίας B είναι δυνατόν να διαχωρίζονται σε υποκλάσεις, τις B1, B2 και B3. Η κατηγοριοποίηση αυτή λαμβάνει χώρα, έπειτα από την χρήση δεδομένων για τις διατηρημένες περιοχές των αλληλουχιών (Rasmussen BA, Bush K., 1997). Από μελέτες όμως προκύπτει ότι, οι τρεις υποκατηγορίες αυτές, B1, B2 και B3, δεν πρέπει να θεωρούνται ως ισάξια διαχωρισμένες κατηγορίες. Φαίνεται ωστόσο ότι, οι B1 και B2 εμφανίζουν ομοιότητες στις αλληλουχίες τους, γεγονός που δεν συμβαίνει αντίστοιχα με την υποκατηγορία B3 (Hall BG. et al., 2003).

Είναι γεγονός ότι, η κατηγοριοποίηση των β-λακταμασών, είναι ευκολότερη με βάση τα δομικά χαρακτηριστικά, δηλαδή τυχόν διαφορές στην αλληλουχία τους. Όμως η λειτουργική τους κατάταξη δίνει την δυνατότητα για σύνδεση των β-λακταμασών με τον κλινικό τους ρόλο.

3.1.2.Κατηγοριοποίηση σύμφωνα με τα λειτουργικά χαρακτηριστικά

Σύμφωνα λοιπόν με τον τρόπο αυτόν κατάταξης, οι διαφορετικές ομάδες β-λακταμασών οι οποίες διαμορφώνονται αριθμούνται με τους φυσικούς αριθμούς 1, 2 και ούτω καθεξής και αντίστοιχα οι υποομάδες αυτών διαχωρίζονται σε 1a, 2b και λοιπά. Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι, η κάθε ομάδα κατάταξης σύμφωνα με τα λειτουργικά χαρακτηριστικά των β-λακταμασών, συνδέεται με τις αντίστοιχες ομάδες κατάταξής τους, σύμφωνα με τα δομικά τους χαρακτηριστικά.

Η πρώτη ομάδα β-λακταμασών σύμφωνα με τα λειτουργικά τους χαρακτηριστικά, αποτελεί την ομάδα 1. Η ομάδα αυτή χαρακτηρίζεται και ως ομάδα κεφαλοσπορινασών, καθότι είναι ιδιαίτερα δραστικές έναντι των κεφαλοσπορινών. Παράλληλα εμφανίζουν ασθενή δράση έναντι των βενζυλοπενικιλινών, ενώ είναι δραστικές έναντι στις κεφαμυκίνες (K.Bush & G.A.Jacoby, 2010). Οι β-λακταμάσες της ομάδας 1 φαίνεται να κωδικοποιούνται στα χρωμοσώματα πολλών εντεροβακτηρίων (Jacoby, G. A.,2009) και φαίνεται να αντιστοιχούν στις β-λακταμάσες της τάξης C, σύμφωνα με την μοριακή κατάταξη. Φαίνεται επίσης να εμφανίζουν υψηλή συγγένεια με την αζτρεονάμη, όχι όμως με τις κεφαλοσπορινάσες της τάξης A (Bush, K. 1988; K.Bush & G.A.Jacoby, 2010). Οι β-λακταμάσες της κατηγορίας αυτής εμφανίζουν επίσης ορισμένα ιδιότητες όπως:

- I. Έλλειψη δραστηριότητας έναντι της κεφοξιτίνης
- II. Αναστολή της δράσης τους από το κλαβουλανικό οξύ ή την ταζομπακτάμη.
- III. Δυνατότητα υδρόλυσης της κεφοταξίμης αλλά όχι της κεβταζιδίμης (Yu, W. L.2008).
- IV. Η προέλευσή τους φαίνεται να είναι χρωμοσωμική με την έκφραση του γονιδίου AmpC. Η έκφραση του γονιδίου αυτή, φαίνεται σε ορισμένες περιπτώσεις μικροοργανισμών, να είναι αναστρέψιμη, σε έκθεση των μικροοργανισμών (όπως *Citrobacter Freuadii*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*) σε ορισμένα β-λακταμικά όπως η αμοξικιλίνη, η αμπικιλίνη, η ιμιπενέμη καθώς και το κλαβουλανικό οξύ (Jacoby, G. A. 2009). Σε αντίθεση με τους παραπάνω μικροοργανισμούς στην *E.coli* καθώς και στον *Acinetobacter baumannii*, ένα ή περισσότερα συστατικά του συστήματος αναστολής των β-λακταμασών της ομάδας αυτής απουσιάζουν.

Πρέπει να σημειωθεί ότι, υπερπαραγωγή των β-λακταμασών της κατηγορίας αυτής, σε ξενιστές όπου η παρουσία β-λακταμικών αντιμικροβιακών είναι χαμηλή, είναι ικανή να δημιουργήσει αντίσταση έναντι των καρβαπενεμών (Quale, J.,et al.,2006). Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι β-λακταμάσες μπορούν να είναι είτε χρωμοσωμικής είτε πλασμιδιακής προέλευσης. Στην κατηγορία αυτή των β-λακταμασών εμφανίζονται και β-λακταμάσες πλασμιδιακής προέλευσης όπως οι CMY, ACT, DHA αλλά και άλλες, οι οποίες όμως είναι λιγότερο χρησιμοποιούμενες (Bush & G.A.Jacoby, 2010).

Υποομάδα της ομάδας 1 των β-λακταμασών αποτελεί η ομάδα 1e. Οι β-λακταμάσες της κατηγορίας αυτής εμφανίζουν βελτιωμένη δραστηριότητα έναντι της κεβταζιδίμης καθώς και άλλων β-λακταμικών. Η βελτιωμένη αυτή δράση οφείλεται σε υποκαταστάσεις, παρεμβολές ή και διαγραφές αμινοξέων στην αλληλουχία τους (Nordmann, P., 2007). Λόγω της βελτιωμένης αυτής τους δράσης, ονομάστηκαν εκτεταμένου φάσματος AmpC λακταμάσες και στην ομάδα αυτή περιλαμβάνονται β-λακταμάσες όπως οι CMY-10, CMY-19, CMY-37 και η GCI (Bush & G.A.Jacoby, 2010).

Η επόμενη ομάδα β-λακταμασών, είναι η ομάδα 2, η οποία περιλαμβάνει τις αντίστοιχες μοριακές κατηγορίες A και D. Τα τελευταία 20 χρόνια ολοένα και περισσότερες νέες β-λακταμάσες εκτεταμένου εύρους (ESBLs), προσδιορίζονται, καθιστώντας την ομάδα αυτή, την μεγαλύτερη ομάδα β-λακταμασών. Η μεγάλη αυτή ομάδα β-λακταμασών χωρίζεται σε υποκατηγορίες ανάλογα με τα χαρακτηριστικά των ενζύμων. Ανάλογα με τα διαφορετικά χαρακτηριστικά των ενζύμων της οικογένειας αυτής των β – λακταμασών, εμφανίζονται οι εξής υποκατηγορίες:

- **Υποκατηγορία 2a:** Πενικιλινάσες, με υδρολυτική δράση μικρού εύρους. Μεγαλύτερη υδρολυτική δραση έναντι των βενζυλοπενικιλινών και των παραγώγων πενικιλίνης και χαμηλή έναντι των κεφαλοσπορινών και των καρβαπενεμών (Karen Bush and George A.Jacoby, 2010). Αποτελεί την κυρίαρχη ομάδα β-λακταμασών στους κατά Gram θετικούς κόκκους, συμπεριλαμβανομένων και των σταφυλοκόκκων (Kernodle D. S.et al.,1989) και κατά περίπτωση και των εντερόκοκκων (Zscheck, K. K. and B. E. Murray, 1991). Οι β-λακταμάσες της κατηγορίας 2a, αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ και την ταζοβακτάμη.
- **Υποκατηγορία 2b:** κυρίως β-λακταμάσες οι οποίες υδρολύουν τις πενικιλίνες καθώς επίσης και τις Κεφαλοσπορίνες 1^{ης} γενιάς. Χαρακτηριστικά ένζυμα της ομάδας αυτής είναι οι β-λακταμάσες TEM-1, TEM-2 και SHV-1 (Matthew, M. 1979 ; Roy, C. et al., 1983).
- **Υποκατηγορία 2be:** β - λακταμάσες εκτεταμένου εύρους (ESBLs). Τα ένζυμα της κατηγορίας αυτής προέρχονται από τα αντίστοιχα της κατηγορίας 2b.
- **Υποκατηγορία 2br:** Περιλαμβάνει ένζυμα εκτεταμένου φάσματος, που όμως δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ καθώς επίσης και από όμοιους αναστολείς.
- **Υποκατηγορία 2ber:** Αποτελείται από ένζυμα TEM τα οποία ενώ εμφανίζουν ένα εκτεταμένο φάσμα δράσης, παράλληλα διαθέτουν και μια σχετική αντίσταση στο κλαβουλανικό οξύ (Karen Bush and George A.Jacoby, 2010).
- **Υποκατηγορία 2c:** Πενικιλινάσες. Δραστικά έναντι των καρβαπενικιλινών και των βενζυλοπενικιλινών. Υδρολύουν καρβαπενικιλίνη ή τικαρκιλλίνη τουλάχιστον 60% ταχύτερα από ότι υδρολύουν τις βενζυλοπενικιλίνες. Αντίστοιχα υδρολύουν κλοξακιλλίνη και την οξακιλλίνη σε ρυθμούς μικρότερους του μισού εν συγκρίσει με τους ρυθμούς υδρόλυσης των βενζυλοπενικιλινών. Αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ και την ταζομπακτάμη.
- **Υποκατηγορία 2ce:** Εκτεταμένου εύρους καρβοπενικιλινάσες RTG-4. Ευρεία δράση έναντι κεφεπίμης και κεφιπρόμης (Potron, A., et al., 2009).
- **Υποκατηγορία 2d:** Ένζυμα OXA υδρολύουν κλοξακιλλίνη και οξακιλλίνη. Μπορούν να υδρολύουν και καρβαπενικιλίνες.
- **Υποκατηγορία 2de:** Ενζυμα με ευρύ φάσμα δράσης που όμως δεν περιλαμβάνει τις καρβαπενέμες, υδρολύουν όμως οξακιλλίνη και κλοξακιλλίνη. Περιλαμβάνονται πολλά ένζυμα από την οικογένεια OXA. Γενικά τα ένζυμα της κατηγορίας αυτής, εντοπίζονται κυρίως σε απομονωμένα στελέχη *P. aeruginosa* και τα επίπεδα αντίστασης που παράγουν εμφανίζονται υψηλότερα και από τα αντίστοιχα της *E.coli* (Bradford P.A. 2001).
- **Υποκατηγορία 2df:** Ένζυμα της οικογένειας OXA των οποία εμφανίζουν δραστηριότητα έναντων των καρβαπενεμών. Τα ένζυμα της κατηγορίας αυτής, φαίνεται να εμφανίζονται με μεγαλύτερη

συχνότητα σε στελέχη του *Acinetobacter baumannii* και η προέλευσή τους, κατά κύριο λόγο, είναι χρωμοσωμική (Walther-Rasmussen, J., and N. Høiby, 2006).

- **Υποκατηγορία 2e:** Κεφαλοσπορινάσες. Υδρολύουν εκτεταμένου εύρους κεφαλοσπορίνες. Μπορούν να αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ και την ταζομπακτάμη.
- **Υποκατηγορία 2f:** Καρβαπενεμάσες σερίνης. Υδρολύουν καρβαπενέμες και την αζτρεονάμη, δεν υδρολύουν όμως ικανοποιητικά οι εκτεταμένου εύρους κεφαλοσπορίνες. Αναστέλλονται καλύτερα από την ταζομπακτάμη παρά από το κλαβουλανικό οξύ (Karen Bush and George A. Jacoby, 2010).

Πίνακας 4: Συγκεντρωτικός πίνακας κατηγοριών β – λακταμασών και των φαρμάκων που αυτές αναστέλουν.

<i>Κατηγορίες β – λακταμασών ανάλογα με την δράση τους</i>		
	<i>Υποκατηγορίες</i>	<i>B – λακταμικά φάρμακα</i>
Ομάδα 1	<i>1e – κεφαλοσπορινάσες</i>	Κεφαλοσπορίνες, κεφαμυκίνες, βενζυλοπενικιλίνες
Ομάδα 2	<i>2a - Πενικιλινάσες</i>	Βενζυλοπενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες
	<i>2b – πενικιλινάσες & κεφαλοσπορινάσες 2be – ESBLs 2br – ESBLs 2ber – TEM ένζυμα</i>	Πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες 1 ^{ης} γενιάς
	<i>2c – Πενικιλινάσες 2ce – Καρβαπενικιλινάσες</i>	Καρβαπενικιλίνες, βενζυλοπενικιλίνες, τικαρκυλίνη
	<i>2d & 2de – OXA 2df - OXA</i>	Κλοξακιλλίνη, οξακιλλίνη Καρβαπενέμες
	<i>2e - Κεφαλοσπορινάσες</i>	Κεφαλοσπορίνες
	<i>2f – Καρβαπενεμάσες σερίνης</i>	Καρβαπενέμες, αζτρεονάμη
Ομάδα 3	<i>3a, 3b & 3c</i>	Πενικιλίνες, Κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες

Η τρίτη ομάδα β-λακταμασών, αποτελείται από τις μέταλλο-β – λακταμάσες (MBLs). Οι β-λακταμάσες αυτές αποτελούν μια ξεχωριστή ομάδα όχι μόνο δομικά αλλά και λειτουργικά. Η κύρια δομική διαφορά από τις άλλες β-λακταμάσες, είναι η απαραίτητη ύπαρξη ιόντος ψευδαργύρου στην ενεργή θέση του ενζύμου. Λειτουργικά, διαχωρίζονται από τα υπόλοιπα ένζυμα των άλλων κατηγοριών, λόγω της ικανότητάς τους να υδρολύουν καρβαπενέμες, χαρακτηριστικό το οποίο μόνο ορισμένες β-λακταμάσες έχουν αποκτήσει (Karen Bush and George A. Jacoby, 2010). Άλλη βασική διαφορά μεταξύ των μέταλλο-β-λακταμασών και των σερίνο-β-λακταμασών, είναι ότι οι πρώτες δεν

υδρολύουν σημαντικά μονοβακτάμες και δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ ή την ταζομπακτάμη. Αντίθετα οι μέταλλο-β-λακταμάσες μπορούν να αναστέλλονται από μέταλλοχηλικούς παράγοντες όπως είναι το EDTA και το διπικολινικό οξύ (Marchiario, P., et al., 2008).

Οι μέταλλο – β-λακταμάσες, διακρίνονται σε υποκατηγορίες με βάση την δομή τους. Σχηματίζονται έτσι τρεις υποομάδες, οι B1, B2 και B3 (Fre`re, J.M., et al., 2005), με τις B1 και B2 να εμφανίζουν όμοιες λειτουργίες. Μπορούν επίσης να κατατάσσονται και ανάλογα με την λειτουργία τους σε υποομάδες 3a, 3b και 3c. Αρχικά είχαν ανακαλυφθεί ως χρωμοσωμικά παράγωγα, σε κατά Gram θετικούς και περιστασιακά σε κατά Gram αρνητικούς βακίλους, όπως ο *Bacteroides fragilis* ή ο *Streptotrophomonas maltophilia* (Mercuri, P. S., et al., 2002). Μετά την εμφάνιση των μέταλλο – β-λακταμασών και στα χρόνια που ακολούθησαν, παρατηρήθηκε η αυξημένη εμφάνιση αυτών σε πολλά μεταθετά στοιχεία. Ως εκ τούτου, παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού τους καθώς και αυξημένη εμφάνιση παραλλαγών τους. Το γεγονός αυτό συντέλεσε σε διαφοροποίηση του τρόπου κατηγοριοποίησης των β-λακταμασών της κατηγορίας αυτής και πλέον προτείνεται εναλλακτική κατηγοριοποίησή τους. Η κατηγοριοποίηση αυτή αφορά κυρίως δυο βασικές κατηγορίες ανάλογα με την λειτουργίας τους:

1. Την υποομάδα 3a: περιλαμβάνονται ένζυμα, τα οποία κωδικοποιούνται από πλασμίδια, όπως τα IMP και VIM. Τα ένζυμα της κατηγορίας αυτής απαντώνται παγκοσμίως κυρίως σε ζυμωτικά βακτήρια και εντεροβακτήρια (Queenan, A.M. & Bush, K. 2007). Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει ένζυμα τα οποία, σύμφωνα με την μοριακή κατάταξη, ανήκουν στην κατηγορία B1 (Fre`re, J.M., et al., 2005). Τα ένζυμα αυτά εμφανίζουν υψηλό ρυθμό υδρόλυσης ως προς τις πενικιλίνες, τις κεφαλοσπορίνες, τις καρβαπενέμες, όχι όμως τις μονοβακτάμες.
2. Την υποομάδα 3b: Η υποομάδα αυτή αποτελεί μικρότερη ομάδα των MBLs. Διαθέτουν υψηλή υδρολυτική δράση έναντι των καρβαπενεμών συγκριτικά με την υδρολυτική δράση έναντι των κεφαλοσπορινών και πενικιλινών. Σχετικά με τον μηχανισμό δράσης τους, τα ένζυμα της ομάδας αυτής, προκειμένου να εμφανίζουν την υψηλή τους υδρολυτική δράση πιο αποτελεσματικά, είναι απαραίτητο η μια μόνο θέση ψευδαργύρου του ενεργού του κέντρου να είναι κατειλημμένη. Σε αντίθεση με τις άλλες υποομάδες, η παρουσία δεύτερης θέσης ιόντος ψευδαργύρου λειτουργεί ανασταλτικά στην ενζυμική τους δράση (Costello, A. L., et al., 2006).

Η ολοένα και αυξανόμενη εμφάνιση νέων β-λακταμασών, με ποικιλία ιδιοτήτων και χαρακτηριστικών έχει συντελέσει στην δημιουργία μιας τέταρτης ομάδας β-λακταμασών. Η ομάδα αυτή όμως δεν είναι ακόμα πλήρως χαρακτηρισμένη.

3.2. Μηχανισμός δράσης β – λακταμασών

Στην προηγούμενη ενότητα, αναλύθηκαν οι ομάδες των β-λακταμασών, των ενζύμων εκείνων, τα οποία αποτελούν τους αναστολείς των β –λακταμικών αντιμικροβιακών. Στην παρούσα ενότητα, αναλύεται ο μηχανισμός με τον οποίον οι αναστολείς αυτοί, επιτυγχάνουν την αναστολή των αντιμικροβιακών. Αρχικά σημειώνεται ότι, η αναστολή της δράσης κάποιου αντιμικροβιακού, μπορεί να είναι αποτέλεσμα δράσης πολλών παραγόντων, όπως αυτοί αναλύθηκαν στο κεφάλαιο 2 της παρούσας εργασίας.

Πρέπει να σημειωθεί ότι, οι β-λακταμάσες των διάφορων κατηγοριών, δεν διαθέτουν τον ίδιο μηχανισμό δράσης, έναντι των β λακταμικών αντιμικροβιακών. Για παράδειγμα οι β – λακταμάσες των κλάσεων A, C και D, φαίνεται να μοιράζονται τον ίδιο μηχανισμό δράσης. Γενικεύοντας και αναφερόμενοι στον μηχανισμό αυτό, πρόκειται για μια αντίδραση ακυλίωσης – αποακυλίωσης. Αντίστοιχα οι μέταλλο – β – λακταμάσες εμφανίζουν ένα χαρακτηριστικό μοτίβο His – Xaa – Xis – Xaa – Asp, το οποίο δομεί ένα μέταλλο – κέντρο. Το κέντρο αυτό εντοπίζεται στην διεπαφή των δυο β – φύλλων και αποτελεί το κέντρο της πρωτεΐνης. Τα χαρακτηριστικά του κέντρου αυτού, όπως η στερεοχημεία του και η αρχιτεκτονική του, αποτελούν εκείνα τα οποία καθορίζουν τις τρεις υποκατηγορίες των ενζύμων αυτής της κλάσης. εμφανίζει αρκετές δυσκολίες στην πλήρη αναγνώρισή του. Αυτό είναι αποτέλεσμα της μεγάλης ποικιλίας των δομικών χαρακτηριστικών των ενζύμων που ανήκουν ακόμα και στην ίδια υποκλάση. Φαίνεται επίσης να υπάρχει και διχογνωμία σχετικά με την αναγκαιότητα των δυο πυρήνων για την καταλυτική δράση των B1 ενζύμων. Παρά τις δυσκολίες αυτές όμως, υποστηρίζεται ότι ο βασικός μηχανισμός δράσης των ενζύμων αυτών στηρίζεται στην αντίδραση της υδρόλυσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

4.1. Προσεγγίσεις στην αντιμετώπιση της αντίστασης

4.1.1. Εναλλακτικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση της αντίστασης

Εκτός από την χρήση αναστολέων των β – λακταμασών αλλά και την ανάπτυξη νέων β – λακταμικών αντιμικροβιακών, προσεγγίσεις οι οποίες θα αναλυθούν στην συνέχεια αυτού του κεφαλαίου, μια σειρά από εναλλακτικές προσεγγιστικές μεθόδους ελέγχονται από τους επιστήμονες, ώστε να αυξηθούν οι τρόποι και οι εναλλακτικές μέθοδοι στην αντιμετώπιση του ολοένα και αυξανόμενου ζητήματος της αντίστασης των μικροοργανισμών στα αντιμικροβιακά.

4.1.1.1. Στόχευση παραγόντων μόλυνσης

Πέραν της χρήσης των αντιμικροβιακών φαρμάκων καθώς και των αναστολέων που σχετίζονται με την δράση αυτών αλλά και τα μόρια που αυτά αλληλεπιδρούν, πραγματοποιήθηκαν προσπάθειες, για την ανάπτυξη μορίων, ο στόχος των οποίων δεν σχετίζεται με την δράση των αντιμικροβιακών. Αντίθετα η στόχευση αφορούσε τις μεταβολικές λειτουργίες που χρησιμοποιούν οι μικροοργανισμοί ώστε να επιβιώσουν σε εχθρικά περιβάλλοντα. Τα παραδοσιακά αντιμικροβιακά εμφανίζουν βακτηριοκτόνο δράση είτε με την διάρρηξη της πλασματικής μεμβράνης, είτε παρεμποδίζοντας την ανάπτυξή τους. Τα αντι – μολυσματικά φάρμακα, έχουν ως στόχο τους μολυσματικούς παράγοντες οι οποίοι εκφράζονται μόνο κατά την διάρκεια της μόλυνσης. Οι παράγοντες αυτοί δεν είναι σημαντικοί για τον κύκλο ζωής του βακτηρίου, όμως είναι σημαντικοί παράγοντες για την έκφραση της παθογένειας στον ξενιστή. Τέτοιοι παράγοντες αποτελούν τα μονοπάτια βιοσύνθεσης των αμινοξέων, η διαδικασία αντίληψης απαρτίας και τα βιοϋμένια (Giannamaria Annunziato, 2019) για τα οποία από τις έως τώρα μελέτες συγκεντρώνονται τα εξής:

- ♦ μονοπάτια βιοσύνθεσης των αμινοξέων: χαρακτηριστικό παράδειγμα στην κατηγορία αυτή είναι το μονοπάτι βιοσύνθεσης της κυστεΐνης. Ο λόγος για τον οποίον επιλέχθηκε το συγκεκριμένο αμινοξύ, είναι η παρατήρηση ότι σε περιπτώσεις περιβαλλοντικού στρες όπως είναι η έλλειψη τροφής, η υποξία καθώς και το οξειδωτικό στρες, αυξάνεται η έκφραση των γονιδίων κυστεΐνης. Τα αντιβιοτικά δημιουργούν οξειδωτικό στρες στα βακτήρια στα οποία δρουν. Συνεπώς η αναστολή της σύνθεσης κυστεΐνης, ενισχύει την δράση των αντιμικροβιακών και συμβάλλει στην μείωση της αντίστασης. Επίσης πρέπει να σημειωθεί ότι η σημαντικότητα των ενζύμων που συμμετέχουν στην βιοσύνθεση της κυστεΐνης ποικίλει στην διάρκεια του κύκλου ζωής του βακτηρίου. Για παράδειγμα η δράση των ενζύμων αυτών είναι περιττή κατά την ανάπτυξη των μικροοργανισμών αυτών *in vitro* όπως ακόμα και στις οξείες λοιμώξεις. Στην φάση όμως της παραμονής του μικροοργανισμού, η δράση των ενζύμων αυτών είναι απαραίτητη (Bhave D.P, et al., 2007).

- ◆ Έλεγχος Απαρτίας: Σε πολλές περιπτώσεις παθογόνων, ο πληθυσμός τους υπόκειται σε μηχανισμό ελέγχου απαρτίας (Quorum Sensing - QS). Ο μηχανισμός αυτός στηρίζεται στην διακυτταρική επικοινωνία, η οποία ελέγχει την έκφραση φαινοτύπων, όπως είναι για παράδειγμα η μολυσματική δράση (Rutherford, S.T. & Bassler, B.L., 2012). Ο τρόπος δράσης του μηχανισμού αυτού, στηρίζεται στην συνεχή έκκριση σηματοδοτικών μορίων, από κάθε βακτήριο. Η διαδικασία αυτή ενεργοποιείται όταν η συγκέντρωση ενός σηματοδοτικού μορίου φτάσει σε μια ορισμένη συγκέντρωση. Από μελέτες φαίνεται, η μολυσματική δράση των παθογόνων να επηρεάζεται από την δράση του QS συστήματος. Συνεπώς μόρια που θα μπορούσαν να παρεμποδίσουν την δράση του συστήματος αυτού, αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης.
- ◆ Σχηματισμός βιοϋμενίων: Υψηλό ποσοστό των μικροβίων αναπτύσσονται σε βιοϋμένια. Τα βιοϋμένια αποτελούν κοινότητες μικροβίων, οι οποίες αναπτύσσονται σε επιφάνειες. Στην περίπτωση των βιοϋμενίων, οι προσεγγίσεις στόχευσής τους διακρίνονται σε φυσικοχημικές προσεγγίσεις και χρήση αντιμικροβιακών σε μήτρα, ώστε να προλαμβάνεται η ανάπτυξη των βιοϋμενίων (Giannamaria Annunziato, 2019). Γνωρίζοντας τα παραπάνω, αντικείμενο μελέτης υπήρξε μια κατηγορία παραγόμενων πεπτιδίων, που χρησιμοποιούνται ως ανοσοενισχυτικά των αντιβιοτικών. Τα πεπτίδια αυτά δεν εμφανίζουν μόνο ευρύ φάσμα δράσης αλλά εμφανίζουν και συνεργατική δράση με τα παραδοσιακά αντιμικροβιακά όπως η ιμιπενέμη και η σιπροφλαξίνη (Reffuveille F. et al., 2014).

4.1.1.2. Χρήση νανοσωματιδίων

Στην μάχη για την αντιμετώπιση της αντίστασης των μικροοργανισμών, χρησιμοποιήθηκαν από την επιστημονική κοινότητα και τα νανοσωματίδια. Η βασική υπόθεση της χρήσης αυτών στην αντιμετώπιση της αντίστασης, αφορούσε την δέσμευση των αντιμικροβιακών είτε στην επιφάνεια των νανοδομών αυτών, είτε στο εσωτερικό τους, ώστε να αυξηθεί η διαθεσιμότητά τους στο εσωτερικό των μικροοργανισμών, να επιτευχθεί η στοχευμένη δράση τους και να αυξηθεί η αποτελεσματικότητά τους. Με την χρήση λοιπόν των νανομεταφορέων, το αντιμικροβιακό μεταφέρεται στην περιοχή της λοίμωξης και έτσι εξασφαλίζεται το ότι το αντιμικροβιακό θα φτάσει στην περιοχή σε ικανοποιητική συγκέντρωση (Saravanan Muthupandian et al., 2019).

4.1.2.Χρήση αντιβιοτικών συνδυαστικά με ανοσοενισχυτικές ενώσεις

Όπως είναι αναμενόμενο, τα αντιβιοτικά για να δράσουν, θα πρέπει πρώτα να έχουν εισαχθεί στο κύτταρο – στόχο. Τα κατά Gram αρνητικά βακτήρια διαθέτουν ένα επιπλέον μέσο προστασίας, καθώς διαθέτουν εκτός της κυτταροπλασματικής τους μεμβράνης και μια εξωτερική μεμβράνη.

Όπως είναι αναμενόμενο εξάγεται το συμπέρασμα ότι η είσοδος του αντιβιοτικού στο εσωτερικό του βακτηρίου εξαρτάται από την σύνθεση και την αρχιτεκτονική των μεμβρανών του εκάστοτε βακτηρίου. Έτσι για την είσοδό τους τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούν δυο κύριες οδούς (Nikaido H., 2003):

- Τα υδρόφοβα μόρια όπως οι μακρολίδες και η ριφαμπικίνη, διαπερνούν την λιπιδική διπλοστιβάδα μέσω της παθητικής μεταφοράς.
- Τα υδρόφιλα μόρια όπως τα β – λακταμικά, οι φλουοροκινολόνες και τα φαινολικά αντιμικροβιακά, διαχέονται με ενεργό μεταφορά, εκμεταλλευόμενα το πλεονέκτημά τους να αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένες πορίνες

Προκειμένου η εξωτερική μεμβράνη να γίνει πιο εύκολα διαπερατή στα αντιμικροβιακά, η στρατηγική για χρήση μορίων ενισχυτών της διαπερατότητας της μεμβράνης, φαίνεται να είναι αποτελεσματική. Οι ενισχυτές αυτοί είναι είτε κατιονικά ή αμφίφιλα μόρια είτε χηλικοί παράγοντες, οι οποίοι αλληλεπιδρούν με πολυανιόνικούς λιποπολυσακχαρίτες ή δεσμεύουν κατιόντα της εξωτερικής μεμβράνης και έτσι αποσταθεροποιούν την μεμβράνη. Αποτέλεσμα της δράσης τους αυτής είναι η αύξηση της διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης σε ξενοβιοτικά. Τέτοιοι ενισχυτές είναι οι πολυμυξίνες, η κολιστίνη, οι αμινογλυκοσίδες, τα κατιονικά πεπτίδια, τα παράγωγα του κατιονικού χολικού οξέος και οι πολυαμίνες (Kwon D.H. & Lu C.-D., 2006).

Χαρακτηριστικά παραδείγματα μορίων στην ενότητα αυτή αποτελούν πεπτίδια που έχουν ως βάση τους την γλυκίνη (GBP). Τα πεπτίδια αυτά εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση η οποία είναι εξαρτώμενη από την συγκέντρωση του πεπτιδίου. Όταν η συγκέντρωση του πεπτιδίου είναι υψηλή, το κύτταρο οδηγείται σε κατακερματισμό. Ο μηχανισμός δράσης του πεπτιδίου αυτού, στηρίζεται στην διάσπαση της μεμβράνης καθώς και των καναλιών ιόντων στο βακτήριο *E. coli*. Αποτέλεσμα αυτών είναι η απώλεια ιόντων Ca^{2+} , K^{+} , Mg^{2+} . Η χρήση του πεπτιδίου αυτού συνδέεται με την βελτίωση της δράσης των αντιμικροβιακών της ριφαμπικίνης και της ερυθρομυκίνης. Τα αντιμικροβιακά αυτά, φυσιολογικά διεισδύουν στην μεμβράνη των κατά gram αρνητικών βακτηρίων. Στις περιπτώσεις όπου τα βακτήρια διαθέτουν ήδη διαπερατές μεμβράνες, έπειτα από την δράση κάποιας ουσίας που αυξάνει την διαπερατότητα των μεμβρανών, τα αντιμικροβιακά αυτά εισέρχονται ταχύτερα στο εσωτερικό των κυττάρων και συνδεόνται με τα μόρια – στόχους για τα οποία αρχικά είχαν σχεδιαστεί (Li Y.-Q, et al., 2015).

Αντίστοιχο μόριο με τα πεπτίδια γλυκίνης αποτελεί και η μεναδιόνη. Αποτελεί ουσία η οποία συνδιαστικά με την χρήση αντιβιοτικών της οικογένειας των αμινογλυκοσίδων, προκαλούν μείωση της εμφανιζόμενης αντίστασης από τα βακτήρια, οδηγώντας σε μια συνεργιστική δράση. Η

μεναδιόνη επιδρά στην διαπερατότητα των μεμβρανών πολλών MDR στελεχών όπως *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*. Στην περιοχή του εντέρου όμως η μεναδιόνη μετατρέπεται σε βιταμίνη K2 και εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση μόνο έναντι της *P. aeruginosa* (Giannamaria Annunziato, 2019). Επίσης παρόμοια δράση εμφανίζουν και ενδογενή αντιμικροβιακά πεπτίδια (AMPs), τα οποία εκκρίνονται από τα κύτταρα ή τα όργανα – ξενιστές, ως απόκριση στην είσοδο παθογόνων, ως πρώτη αμυντική γραμμή έμφυτης ανοσίας. Ο μηχανισμός με τον οποίον δρουν τα πεπτίδια αυτά, είναι όμοια με τα προηγούμενα, η αποσταθεροποίηση της εξωτερικής μεμβράνης των βακτηρίων, μέσω του σχηματισμού δομών α – ελίκων και β – πτυχωτών, στις μεμβράνες των βακτηρίων, προκαλώντας την δυσλειτουργία τους (Ding, B et al., 2004). Παρά της δράσης τους αυτής, τα πεπτίδια αυτά δεν έχουν αξιοποιηθεί ακόμα στην θεραπεία λοιμώξεων καθώς διαθέτουν υψηλό κόστος παραγωγής, σημαντικές συνέπειες ως προς τον μεταβολισμό τους αλλά και την πιθανή ανάπτυξη αντίστασης από βακτήρια, αφού ήδη υπάρχουν καταγραφές για την εξουδετέρωση της δράσης των AMPs από πρωτεάσες των βακτηρίων (Giannamaria Annunziato, 2019).

Τέλος οι κεραγενίνες (Ceragenins), ή αλλιώς τα κατιονικά στεροειδή αντιμικροβιακά (CSAs), αποτελούν συνθετικές ενώσεις μικρού μεγέθους, οι οποίες αποτελούνται από έναν σκελετό στερολών συνδεδεμένο με αμινοξέα ή άλλες χημικές ομάδες. Η χαρακτηριστική τους αυτή δομή, αποτελεί το χαρακτηριστικό εκείνο που τα καθιστά ανθεκτικά στην δράση των πρωτεασών, καθώς δεν παρουσιάζουν πεπτιδικούς δεσμούς στην δομή τους και επίσης παράγονται σε υψηλές ποσότητες. Εμφανίζουν επίσης την ικανότητα να ενσωματώνονται σταθερά στις μεμβράνες των βακτηρίων, σχηματίζοντας σύμπλοκα με τα φωσφολιπίδια (Erpand R.M., et al., 2008). Τέτοια μόρια έχουν σχεδιαστεί ώστε να λειτουργούν με όμοιο μηχανισμό με εκείνον των AMPs. Τέτοια παραδείγματα αποτελούν οι κεραγενίνες CSA – 13 και CSA – 8, ο μηχανισμός των οποίων στηρίζεται στην ταχεία μείωση του δυναμικού της μεμβράνης των μικροοργανισμών και στην αύξηση της διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης στα κατά Gram αρνητικά βακτήρια. Ως επακόλουθο αυτών είναι η αύξηση της ευαισθησίας των μικροοργανισμών αυτών, στα υδρόφοβα αντιβιοτικά. Τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η χρήση των CSA – 13 και CSA – 8 συνδυαστικά με το αντιμικροβιακό ερυθρομυκίνη, σε στελέχη *K. pneumoniae*. Η τιμή MIC της ευρυθρομυκίνης απουσία των CSA μορίων ήταν 70μg/ml, ενώ με την συνδυαστική τους χρήση μειώθηκε στο 1μg/ml (Giannamaria Annunziato, 2019). Είναι επίσης σημαντικό να σημειωθεί ότι η χρήση των μορίων αυτών συνδυαστικά με τα αντιμικροβιακά, υπέδειξε συνεργιστική δράση στην περίπτωση της κολιστίνης έως και 55%, ενώ δεν παρατηρήθηκε ανταγωνισμός των δυο αυτών μορίων. Παρόλα αυτά τα μόρια αυτά απαιτούν σημαντικές μελέτες που αφορούν την απορρόφησή τους, την

κατανομή και τον μεταβολισμό τους προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στον γενικό πληθυσμό (Giannamaria Annunziato, 2019).

4.1.3. Χρήση αναστολέων β – λακταμασών

Προκειμένου να αντιμετωπιστεί το μεγάλο πρόβλημα της αντίστασης των μικροοργανισμών στα αντιμικροβιακά, η πιο επιτυχημένη μέθοδος υπήρξε η συνδυαστική χορήγηση αντιμικροβιακού και αναστολέα β – λακταμάσης. Η χρήση του αντιμικροβιακού συνδυαστικά με τον αναστολέα β – λακταμασών, οδήγησε στην ανάκτηση της αντιμικροβιακής δράσης του φαρμάκου. Η χρήση των αναστολέων οδήγησε σε δυο βασικά πλεονεκτήματα (Concepcion Gonza' lez-Bello, et al, 2020):

- Επαναχρησιμοποίηση αντιμικροβιακών, των οποίων η πολύχρονη χρήση τους έχει αποδείξει ότι είναι ασφαλή και αποτελεσματικά στην κλινική πράξη.
- Αποφυγή αναγκαιότητας για ανακάλυψη και πιστοποίηση νέων θεραπευτικών στόχων.

Όπως προαναφέρθηκε και στην προηγούμενη ενότητα, οι μηχανισμοί μέσω των οποίων εμφανίζεται η αντίσταση, είναι είτε μέσω ενζυμικής απενεργοποίησης του αντιμικροβιακού, εκροή αντιμικροβιακού με την χρήση αντλιών εκροής, μετατροπές στο μόριο – στόχος του αντιμικροβιακού, είτε τέλος με την αλλαγή στην διαπερατότητα των μεμβρανών των κυττάρων (Εικόνα 27). Με βάση τους μηχανισμούς αυτούς αντίστασης, αναπτύχθηκαν τρεις κύριοι τύποι αναστολέων:

- Αναστολείς την δράσης των αντλιών εκροής.
- Μόρια αύξησης της διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης.
- Αναστολείς των β – λακταμασών.

Από τους αναστολείς αυτούς, εκείνοι με την μεγαλύτερη σημασία υπήρξαν οι αναστολείς των β – λακταμασών. Σε ότι αφορά λοιπόν τους αναστολείς αυτούς, θα λέγαμε ότι κατατάσσονται σε τρεις γενικές κατηγορίες:

- i. Αναστολείς β – λακταμασών οι οποίοι δεν διαθέτουν στην δομή τους β – λακταμικό δακτύλιο.
- ii. Σουλφόνες με βάση την πενικιλίνη που δρουν ως αναστολείς.
- iii. Διάφοροι αναστολείς β – λακταμασών.

4.1.3.1. Αναστολείς β – λακταμασών που δεν διαθέτουν στην δομή τους β – λακταμικό δακτύλιο.

Η πρώτη κατηγορία εξ αυτών, περιλαμβάνει αναστολείς β – λακταμασών οι οποίοι δεν διαθέτουν β – λακταμικό δακτύλιο στην δομή τους. Οι πιο κοινοί αναστολείς της κατηγορίας αυτής είναι αναστολείς β – λακταμασών με βάση το βορονικό οξύ. Οι αναστολείς αυτοί, αποτελούν σημαντικό εργαλείο στην αντιμετώπιση των βακτηρίων. Η ανακάλυψη των αναστολέων αυτών έγινε έπειτα από παρατήρηση της ικανότητας του βορονικού οξέος, να αναστέλλει σέρινο – πρωτεάσες (Smoum R., et al., 2012). Η παρατήρηση αυτή, συνδυαστικά με την γνώση για την αναστολή του ενζύμου της πενικιλλινάσης του *Bacillus cereus* από το βορονικό οξύ, οδήγησαν στην πρώτη ανάπτυξη, αντιστρεπτών αναστολέων όπως το φαίνυλο – βορονικό οξύ και το 3 – άμινο – φαίνυλο – βορονικό οξύ. Τα δυο αυτά μόρια εμφάνιζαν δράση έναντι των β – λακταμασών του *Bacillus cereus* (Beesley, T et al., 1983). Παρά το γεγονός αυτό, προβληματισμοί για την χρήση των αναστολέων αυτών υπήρξαν, καθότι υπήρξαν φόβοι για τι πιθανές παρενέργειες, εκτός στόχου, λόγω της ανασταλτικής δράσης των μορίων αυτών στις πρωτεάσες σερίνης των θηλαστικών. Ο προβληματισμός αυτός αποτέλεσε και το ερέθισμα των μελετών για βελτίωση της εκλεκτικότητας των μορίων αυτών, από τις οποίες προέκυψε η ανακάλυψη κυκλικών βορονικών μορίων όπως για παράδειγμα η βαμπορβακτάμη (Varbobactam). Η βαμπορβακτάμη δεν εμφανίζει αναστολείς των σερίνο – πρωτεασών στα θηλαστικά, γεγονός το οποίο πιθανόν οφείλεται στην χαμηλότερη συγγένεια του κυκλικού της μορίου, με τις πρωτεάσεις, οι οποίες εμφανίζουν μεγαλύτερη συγγένεια με τα αντίστοιχα γραμμικά μόρια. Παρόλα αυτά εμφανίζει δράση έναντι των σέρινο – καρβαπενεμασών και συγκεκριμένα των ενζύμων τύπου KPC από την κλάση A και C, όμως δεν εμφανίζει δράση έναντι των β – λακταμασών των κλάσεων B και D (Concepcion González-Bello, et al, 2020). Η δράση της βαμπορβακτάμης σχετίζεται με τροποποίηση της καταλυτικής σερίνης των ενζύμων, σχηματίζοντας έναν τετράεδρο με την προσθήκη βορονικού οξέος. Η βαμπορβακτάμη χορηγείται συνδυαστικά με την μεροπενέμη, βελτιώνοντας έτσι την δράση της μεροπενέμης και παρέχοντάς της τιμές MIC < 2μg/ml, σε εντεροβακτήρια τα οποία παράγουν KPC ένζυμα. Πρέπει να αναφερθεί ότι, το 2017 εγκρίθηκε από τον FDA, η συνδυαστική χορήγηση βαμπορβακτάμης / μεροπενέμης, με στόχο την θεραπεία πολύπλοκων λοιμώξεων του ουροποιητικού, συμπεριλαμβανομένου και της πυελονεφρίτιδας (Concepcion González-Bello, et al, 2020).

Όπως αναφέρθηκε, οι αναστολείς αυτοί, δεν εμφανίζουν δράση έναντι των μέταλλο – β – λακταμασών καθώς και των ενζύμων της κλάσης D. Την τελευταία δεκαετία, ολοένα και περισσότερα βακτήρια, εμφανίζουν την δυνατότητα έκφρασης τόσο σέρινο – β – λακταμασών όσο και μέταλλο – β – λακταμασών (Bush K., et a., 2013). Η αναστολή των δυο αυτών ενζύμων διαφέρει. Οι σέρινο – β – λακταμάσες αναστέλλονται με ομοιοπολική κατάλυση, μέσω σχηματισμού

ομοιοπολικών δεσμών, ενώ αντίθετα οι μέταλλο – β – λακταμάσες με μη ομοιοπολική κατάλυση. Παρόλα αυτά, στα τετραεδρικά ενδιάμεσα που προκύπτουν στις δυο αυτές διεργασίες, οι ομοιότητες είναι πολλές. Στο χαρακτηριστικό αυτό στηρίχτηκαν οι προσπάθειες σχηματισμού αναστολέων εκτεταμένου εύρους. Πραγματοποιήθηκε έτσι διερεύνηση άλλων κυκλικών ενώσεων βορονικού οξέος. Τέτοιο παράδειγμα εκτεταμένου εύρους αναστολέων αποτελεί η τανιμπορβακτάμη (Taniborbactam), η οποία χορηγείται συνδυαστικά με την κεφεπίμη, αποτελεί ενέσιμο ανστολέα με βάση το βορονικό οξύ, ανακαλύφθηκε το 2012 και εμφανίζει ευρύ φάσμα δράσης έναντι των ενζύμων της κλάσης A, C, D και ορισμένων μέταλλο – β – λακταμασών όπως οι NDM – 1 και η VIM – ½ (Krajnc, A, et al., 2019). Την δεδομένη στιγμή η έγκριση για την χορήγηση τανιμπορβακτάμης/κεφεπίμης βρίσκεται στην φάση III, για την θεραπεία των μολύνσεων από MDR, οι οποίες οφείλονται στις παραγόμενες ESBLs καθώς επίσης και στις καρβαπενεμάσες των εντεροβακτηρίων και της *P. aeruginosa*. Τέλος, ένα ακόμα παράδειγμα αναστολέα με βάση το βορονικό οξύ, αποτελεί ο παράγοντας VNRX – 7145, ο οποίος χορηγείται από του στόματος και υφίσταται βιομετατροπή σε VNRX – 5236. Ο παράγοντας αυτός χορηγείται συνδυαστικά με την κεφτιμπουτένη, μια κεφαλοσπορίνη τρίτης γενιάς με βακτηριοκτόνο δράση. Αποτελεί σημαντικό αναστολέα των ενζύμων τύπου KPC καθώς και των OXA – 48 (Concepcion Gonzá lez-Bello, et al, 2020).

Εκτος από τους αναστολείς με βάση το βορονικό οξύ, άλλος τύπος αναστολέων στην κατηγορία αυτή είναι οι 1,6 – Diazabicyclo[3,2,1]octanes (DBO). Πρόκειται για αναστολείς οι οποίοι πρώτοσχεδιάστηκαν το 1990 από τους επιστήμονες, με στόχο να αποτελέσει ένα νέο αντιμικροβιακό ανάλογο των β – λακταμικών, λόγω του δίκυκλου καρβαμουλικού τμήματος της δομής τους, το οποίο υποστήριζαν ότι θα αποτελεί ένα καλό μιμητικό μόριο του β – λακταμικού δακτυλίου. Τελικά όμως, αποδείχθηκε εξαιρετικός αναστολέας έναντι των ενζύμων των κλάσεων A και C. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην ανάπτυξη μεγάλου αριθμού ανάλογων μορίων DBO, με αποτέλεσμα την ανακάλυψη της αβιβακτάμης. Ορισμένα παραδείγματα τέτοιων αναστολέων που χρησιμοποιούνται συνδυαστικά με αντιμικροβιακά είναι τα εξής:

- Αβιβακτάμη/κεφταζιδίμη: εγκρίθηκε το 2014 από τον FDA. Χορηγούνται συνδυαστικά για την αντιμετώπιση πολύπλοκων ενδοκοιλιακών λοιμώξεων, οι οποίες προκαλούνται από κατά Gram αρνητικά βακτήρια, την *E. coli*, *K. Pneumonia*, *P. aeruginosa* και από εντεροβακτήρια. Επίσης χρησιμοποιείται ως θεραπεία πολύπλοκων ουροποιητικών λοιμώξεων αλλά και ενδονοσοκομειακής πνευμονίας (Διαδικτυακή πηγή: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB09060>).

- Αζτρεονάμη/αβιβακτάμη: βρίσκεται ακόμα στην φάση ΙΙΙ των κλινικών μελετών.
- Φοσαμλική κεφταρολίνη/αβιβακτάμη καθώς επίσης και κεφταζιδίμη/φωσφομυκίνη/αβιβακτάμη, αποτελούν προτάσεις για μελέτη των κλινικών ερευνητών (Papp-Wallace, K. M.; Bonomo, R. A., 2016).

Νέα μόρια ανάλογα της αβιβακτάμης έχουν επίσης βρεθεί. Ορισμένα από αυτά είναι η ρελεμπακτάμη (Relebactam), η νακουβακτάμη (Nacubactam) και η ζιδεβακτάμη (Zidebactam). Τα ανάλογα αυτά αβιβακτάμης βρίσκονται ακόμα στην φάση των κλινικών μελετών όπου χρησιμοποιούνται ως εξής:

- Zidebactam/κεφεπίμη: βρίσκονται στην φάση Ι των μελετών. Συγχορηγούνται για την αντιμετώπιση λοιμώξεων οι οποίες προκαλούνται από MDR Gram ανηθητικά βακτήρια και εμφανίζουν δράση έναντι και των μέταλλο – β – λακταμάσων (Abuhussain, S. S. A, et al., 2019).
- Relebactam/ιμιπενέμη – σιλαστατίνη: Εγκρίθηκε από τον FDA το 2019. Χρησιμοποιείται για την θεραπεία πολύπλοκων μολύνσεων του ουροποιητικού αλλά και ενδοκοιλιακών λοιμώξεων. Εμφανίζει υψηλή δραστηριότητα έναντι των πνευμονικών λοιμώξεων καθώς επίσης έναντι των μικροοργανισμών *K. pneumoniae* και *P. aeruginosa* τα οποία εμφάνιζαν αντίσταση στην ιμιπενέμη (Moya, B. et al., 2017).
- Nacubactam/μεροπενέμη: Βρίσκεται ακόμα στις κλινικές δοκιμές. Έχει βρεθεί ότι ο αναστολέας της νακουβακτάμης προκαλεί αναστολή του ενζύμου PBP2. Διαθέτει ευρύ φάσμα δράσης και είναι σταθερός έναντι των β – λακταμασών (Monogue, M. L, et al., 2018).
- Τέλος δυο ακόμα ανάλογα της αβιβακτάμης είναι οι παράγοντες WCK5153 και WCK4234. Οι παράγοντες αυτοί εμφανίζουν δράση έναντι των ενζύμων των κλάσεων A και C, είναι όμως αναποτελεσματικοί έναντι των OXA ενζύμων (Moya B., et al., 2019).

Στην κατηγορία των DBOs ανήκει επίσης ο αναστολέας των β – λακταμασών durlobactam ή αλλιώς παράγοντας ETX2514. Ο παράγοντας αυτός μπορεί να αναστέλει β – λακταμάσες των κλάσεων A, C και D. Χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την σουλμπακτάμη. Η σουλμπακτάμη αποτελεί γνωστό β – λακταμικό αντιμικροβιακό, δραστικό έναντι του *A. baumannii*, εμφανίζοντας δράση έναντι των PBP1 και PBP3. Όμως είναι επίσης γνωστό και ως αναστολέας των β – λακταμασών της κλάσης A. Η αντιμικροβιακή δράση του συνδυασμού των ενώσεων αυτών πρόσφατα δικιμάστηκε (Dafna Yahav et al., 2021).

Άλλο είδος αναστολέα, το οποίο ανήκει στην κατηγορία αυτή των αναστολέων χωρίς β – λακταμικό δακτύλιο στην δομή τους, είναι τα παράγωγα θειολών. Είναι γνωστό ότι οι θειόλες αποτελούν χηλικούς παράγοντες του ψευδαργύρου (Zn). Για τον λόγο αυτόν χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες για την πιθανή τους χρήση ως αναστολείς των μέταλλο – β – λακταμασών, οι οποίες έχουν χαρακτηριστικά άτομα ψευδαργύρου στο ενεργό τους κέντρο. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται οι εξής αναστολείς (Concepcion Gonza'lez-Bello, et al, 2020):

- Καπτοπρίλη (captopril): υψηλά εκλεκτικός ανταγωνιστικός αναστολέας του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτασίνης.
- Θιορφάνη (Thiorphan): ενεργός μεταβολίτης της αντιδιαρροϊκής ρακεκαδοτρίλης που δρά ως αναστολέας της εγκεφαλινάσης.
- Τιοπρονίνη (Tioipronin): χρησιμοποιείται στην θεραπεία σοβαρών περιπτώσεων κυστινουρίας, μια νόσος η οποία αποτελεί την συχνότερη διαταραχή αμινοξέων στα παιδιά. Η εκδήλωση της νόσου είναι η εμφάνιση ουρολιθίασης.
- Διμερκαπρόλη (Dimercaprol): χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση δηλητηριάσεων από αρσένιο, κάδμιο και υδράργυρο.
- Ροδανίνη: Δράση έναντι των σέρινο – β – λακταμασών, των κλάσεων A και C. Εμφανίζει επίσης αντιμικροβιακή δράση καθώς αναγνωρίζουν και αλληλεπιδρούν με τις PBPs.

Οι παραπάνω ενώσεις εμφανίζουν καλή συνεργατική δράση με την ιμιπενέμη. Η συνηθισμένη δοσολογία με την οποία χορηγούνται αρκεί για την αναστολή των β – λακταμασών, όχι όμως και για την ανάκτηση της δράσης της ιμιπενέμης. Προσοχή όμως θα πρέπει να δίνεται σε τυχόν παρενέργειες, όπως η αλληλεπίδρασή τους με μέταλλο – ένζυμα του ανθρώπου. Άλλος παράγοντας που δρά όμοια με την ροδανίνη αποτελεί και ο παράγοντας ML302, ο οποίος είναι αναστολέας των VIM-2/IMP-1 και εμφανίζει σημαντική αποτελεσματικότητα έναντι πολλών κλινικών απομονώσεων. Επίσης ενισχύει την δράση της ιμιπενέμης σε βακτηριακά στελέχη όπως η *E.coli*, όπως και κλινικών απομονώσεων *K. pneumoniae*.

Στην κατηγορία των αναστολέων οι οποίοι δεν διαθέτουν λακταμικό δακτύλιο στην δομή τους, ανήκουν και τα δικαρβοξυλικά παράγωγα. Μια ένωση της κατηγορίας αυτής αποτελεί το 2,6 διπικολινικό οξύ, το οποίο δρα έναντι των μέταλλο – β – λακταμασών όπως επίσης και των NMD – 1, IMP – 1 και VIM – 1 ενζύμων. Επίσης βελτιώνει την δράση της ιμιπενέμης σε στελέχη που διαθέτουν NMD – 1 ένζυμα. Παρόλα αυτά δεν αποτέλεσαν αντικείμενο για περαιτέρω μελέτες καθώς (Roll D. M, et al., 2010):

- i. Διαθέτουν ένα τμήμα με ανιλίνη, το οποίο ενδεχομένως να σχετίζεται με καρκινική δράση.
- ii. Σχετίζονται με αναστολή ενζύμων που περιέχουν ψευδάργυρο στα θηλαστικά, όπως οι καρβόξυπεπτιδάσες A και B δυο προτεολυτικών ενζύμων.

Ακόμα μια ένωση στην κατηγορία αυτή είναι η ασπέργυλομαρασμίνη A, ένα φυσικό προϊόν το οποίο παράγεται και απομονώνεται από τον μύκητα *Aspergillus versicolor*. Αποτελεί αναστολέα των ενζύμων NMD – 1 και VIM – 2 σε μικρότερο βαθμό από ότι τα ένζυμα IMP – 7 (Dolgin, E, 2016). Επίσης αποκαθιστά πλήρως την δράση της μεροπενέμης έναντι των εντεροβακτηριδίων και των βακτηρίων που διαθέτουν ένζυμα VIM – 2 και NMD – 1. Τέλος απενεργοποιεί και τις μέταλλο – β – λακταμάσες.

Πρέπει να σημειωθεί ότι από τους πρώτους αναστολείς που αναπτύχθηκαν στην κατηγορία αυτή, υπήρξαν οι σουλφόνες με βάση την πενικιλίνη. Προέκυψαν έπειτα από την ανακάλυψη του κλαβουλανικού οξέος, ένα φυσικό παράγωγο το οποίο χορηγείται σε συνδυασμό με πενικιλίνες όπως η αμοξιλίνη. Ο μη αντιστρεπτός μηχανισμός δράσης του κλαβουλανικού, έδωσε το ερέθισμα για την ανακάλυψη πολλών μορίων όπως η σουλβακτάμη. Η σουλβακτάμη χορηγείται συνήθως με την αμπικιλίνη, την κεφοπεραζόνη ή την κεφτριαξόνη, ουσίες που διαθέτουν αντιμικροβιακή δράση έναντι πολλών παθογόνων. Είναι όμως αναποτελεσματική έναντι των καρβαπενεμο – υδρολασών της κλάσης D. Μεταγενέστερες τροποποιήσεις του μορίου της σουλβακτάμης, οδήγησε στην ταυτοποίηση της ταζοβακτάμης η οποία χρησιμοποιείται σε κλινικές δοκιμές συνδυαστικά με την πιπερακιλλίνη αλλά και με την κεφεπίνη (Shapiro A B, 2017; Dafna Yahav et al, 2021). Πρόσφατα αναπτύχθηκε και ένα νέο παράγωγο της ταζοβακτάμης, η ενμεταζοβακτάμη, η χρήση της οποίας γίνεται συνδυαστικά με την κεφεπίμη και βρίσκεται στην φάση III των κλινικών δοκιμών, για την θεραπεία ασθενών με σοβαρές λοιμώξεις του ουροποιητικού (Crandon, J L et al., 2015). Το παράγωγο αυτό εμφανίζει βελτιωμένη δράση συγκριτικά με την ταζοβακτάμη και φαίνεται να διαθέτει ιδιότητες αυξημένης διείσδυσης στο βακτηριακό κύτταρο.

Ακόμα ένα παράδειγμα συνδυασμού το οποίο βρίσκεται υπό μελέτη, είναι ο συνδυασμός κεφποντοξίμης (cefprodoxime) με τον παράγοντα ETX0282. Η κεφποντοξίμη αποτελεί β – λακταμικό αντιμικροβιακό, ενώ αντίστοιχα ο παράγοντας ETX0282 αποτελεί προφάρμακο του παράγοντα ETX1317. Ο παράγοντας ETX1317 αποτελεί αναστολέα β – λακταμασών των κλάσεων A, C και D. Ο συνδυασμός αυτός χρησιμοποιείται σε αναλογία 1:2 όπου φαίνεται να έχει ισχυρή δραστηριότητα (Dafna Yahav et al., 2021).

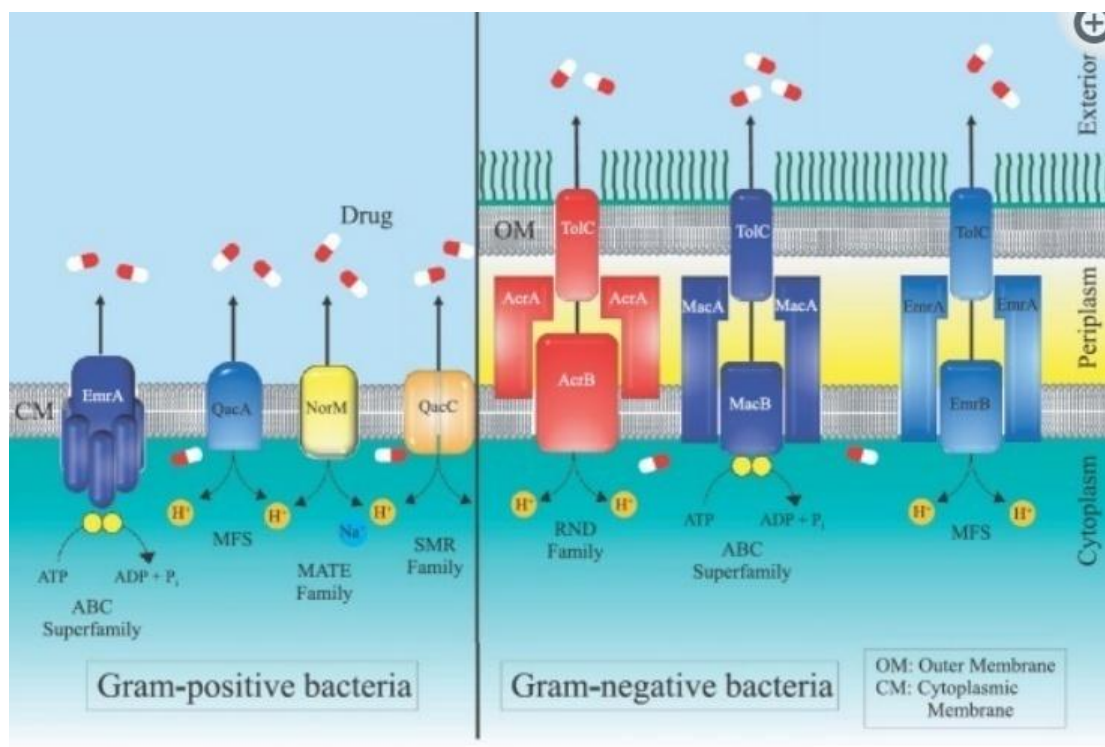
Πίνακας 5: Συγκεντρωτικός πίνακας αναστολέων β – λακταμασών και των αντίστοιχων ενζύμων που ανστέλλουν, όπως επίσης και των συνδυασμό αυτών με β – λακταμικά αντιμικροβιακά.

<i>Αναστολείς β – λακταμασών</i>					
			<i>Ανασταλτική Δράση</i>	<i>β - λακταμικά</i>	
<i>Απουσία λακταμικού δακτυλίου</i>	<i>Με βάση το βορονικό οξύ</i>	Φαίνυλο – βορονικό οξύ 3-άμινο φαίνυλο βορονικό οξύ	σέρινο - πρωτεασών πενικιλλινασών	-	
		Βαμπορβακτάμη	KPC ενζύμων των κλάσεων A και C	Συνδυαστικά με την μεροπενέμη	
		Τανμπορμπακτάμη (εκτεταμένου εύρους)	ενζύμων των κλάσεων A, C, D και ορισμένων της κλάσης B	Συνδυαστικά με κεφεπίμη	
		Παράγοντες VNRX - 7145	KPC και OXA -48	Συνδυαστικά με κεφτιμπουτένη	
	<i>DBO</i>	Αβιβκατάμη	Ένζυμα κλάσεων A & C	Συνδυαστικά με κεφταζιδίμη, αζτρεονάμη, φοσαμιλική κεφταρολίνη	
		Ανάλογα αβιβακτάμης: (i) Ρελεμπακτάμη (ii) Νακουβακτάμη (iii) Ζιδεβακτάμη (iv) Παράγοντες WCK5153 & WCK4234	Ένζυμα κλάσεων A & C και ορισμένων της κλάσης B	Κεφεπίμη, μεροπενέμη, μιπενέμη	
	<i>Παράγωγα θειολών</i>	Καπτοπρίλη, Θιορφάνη, Τιοπρονίνη, Διμερκαπρόλη, Ροδανίνη	Ένζυμα κλάσεων A & C και ορισμένων της κλάσης B	Ιμιπενέμη	
	<i>Δικαρβοξυλικά παράγωγα</i>	2,6 διπολινικό οξύ Ασπέργυλομαρασμίνη A	Ένζυμα κλάσεων A, B, C	Ιμιπενέμη Μεροπενέμη	
	<i>Παρουσία λακταμικού δακτυλίου</i>	<i>Σουλφόνες</i>	Κλαβουλανικό οξύ Σουλβακτάμη Ταζοβακτάμη ενμεταζοβακτάμη	Ένζυμα κλάσεων A, B, C	Αμικιλίνη Κεφοπεραζόνη, κεφτιαξόνη Πιπερακιλλίνη, κεφεπίμη

4.1.3.2. Αναστολείς αντλιών εκροής

Οι αντλίες εκροής αποτελούν βακτηριακές πρωτεΐνες μεταφοράς, οι οποίες εμπλέκονται στην εξώθηση υποστρωμάτων από το εσωτερικό του κυττάρου στο εξωτερικό περιβάλλον. Συχνά μεταλλάξεις των φυσιολογικών γονιδίων αυτών, οδηγούν σε υπερέκφραση και υπερπαραγωγή αντλιών εκροής στο βακτηριακό κύτταρο. Οι αντλίες εκροής κατηγοριοποιούνται ανάλογα με την ομολογία των αλληλουχιών τους, τον μηχανισμό τους και τα μοριακά χαρακτηριστικά τους σε 5 διαφορετικές οικογένειες:

1. Αντλίες σύνδεσης μορίων ATP (ATP –binding cassette, ABC)
2. Αντλίες μικρής ανθεκτικότητας σε φάρμακα (Small multidrug resistance, SMR).
3. Αντλίες αντίστασης RND (Resistance – nodulation – division)
4. Αντλίες MFs (Major facilitator)
5. Αντλίες μεταφοράς τοξικών συστατικών MATE (Multidrug and toxic compound extrusion superfamily).



Εικόνα 28: Απεικόνιση των αντλιών εκροής σε κατά Gram θετικά (αριστερά) και κατά Gram αρνητικά (δεξιά) βακτήρια. Στην εικόνα απεικονίζονται και πέντε κατηγορίες των αντλιών εκροής (Atin Sharma et al., 2019).

Η αναστολή της λειτουργίας των αντλιών εκροής μπορεί να γίνει με τους εξής τρόπους (Bhardwaj AK, Mohanty P, 2012):

- Μείωση της έκφρασης των γονιδίων των αντλιών εκροής με παρέμβαση στην γενετική ρύθμιση.
- Επανασχεδιασμός αντιβιοτικών, τα οποία δεν αναγνωρίζονται ως υποστρώματα.
- Αναστολή του σχηματισμού λειτουργικών αντλιών εκροής.
- Μπλοκάρισμα της αντλίας ώστε να μην πραγματοποιείται η δέσμευση του υποστρώματος στην ενεργή θέση.
- Παρεμπόδιση του μηχανισμού που είναι υπεύθυνος για την ενεργοποίηση των αντλιών εκροής.

Λαμβάνοντας υπόψη τα χαρακτηριστικά αυτά των αντλιών εκροής αναπτύχθηκαν αντίστοιχα αναστολείς αυτών, οι οποίοι διακρίνονται σε δυο κύριες κατηγορίες, στους αναστολείς διαρροής ενέργειας και στους αναστολείς με απευθείας πρόσδεση. Οι αναστολείς αυτοί εμφανίζουν πληθώρα εφαρμογών σε άλλες κατηγορίες αντιμικροβιακών, δεν εμφανίζουν όμως αντίστοιχες εφαρμογές στην κατηγορία των β – λακταμικών αντιμικροβιακών. Παρά το γεγονός αυτό έχει βρεθεί ότι η χρήση του αναστολέα NMP (1,1,-naphthylmethyl-piperazine), αυξάνει την δράση της οξακιλίνης, με συσσώρευση του αντιβιοτικού στο εσωτερικό του κυττάρου. Το μόριο αυτό προκύπτει έπειτα από επεξεργασία ενός άλλου αρχικού συνθετικού μορίου το οποίο ανήκει στην βιβλιοθήκη μορίων για την ενίσχυση της δράσης της λεβοφλαξινάσης στο βακτήριο *E. coli*, όπου υπάρχει υπερέκφραση των αντλιών εκροής AcrAB και AcrEF (Atin Sharma et al., 2019).

4.1.4. Νέα β – λακταμικά αντιμικροβιακά

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), μέχρι και τον Νοέμβριο του 2021, 45 αντιμικροβιακά με νέες θεραπευτικές δράσεις, βρίσκονται σε διαφορετικές φάσεις των κλινικών δοκιμών. Από τα 45 αυτά αντιβιοτικά, τα 27 έχουν στόχο τα παθογόνα υψηλής προτεραιότητας όπως αυτά έχουν επισημανθεί από τον WHO. Ακόμα από τον Ιούλιο του 2017, 12 αντιμικροβιακοί παράγοντες έχουν εγκριθεί από τον FDA. Οι αριθμοί αυτοί όμως δεν αφορούν αποκλειστικά β – λακταμικά αντιμικροβιακά και αναστολείς τους. Μέχρι και το 2021, μέσα στους 12 αυτούς αντιμικροβιακούς παράγοντες, οι οποίοι εγκρίθηκαν από τον FDA, συμπεριλαμβάνονταν η χρήση της βαρμποβακτάμης συνδυαστικά με την μεροπενέμη, της ρελεβακτάμης συνδυαστικά με την ιμιπενέμη καθώς επίσης και η κεφιντεροκόλη. Η βαρμποβακτάμη όπως και η ρελεβακτάμη αποτελεί αναστολέα των β – λακταμασών και τα χαρακτηριστικά τους, όπως και η χρήση τους συνδυαστικά με την μεροπενέμη έχουν αναλυθεί σε προηγούμενη παράγραφο για την χρήση των αναστολέων των β – λακταμασών.

Σε ότι αφορά την κεφιντεροκόλη, αποτελεί μια ευρέως φάσματος, σιδηροφόρο κεφαλοσπορίνη. Εμφανίζει δυνατότητα μετακίνησης διαμέσου της εξωτερικής μεμβράνης των κατά Gram αρνητικών βακτηρίων, με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται στον περιπλασματικό χώρο. Η κεφαλοσπορίνη αυτή εμφανίζει ισχυρή δράση έναντι των παθογόνων εκείνων τα οποία παράγουν καρβαπενεμάσες. Η δραστηριότητά της είναι ευρύτερη από ότι των τελευταίων φαρμάκων αλλά και των συνδυασμό αυτών με τις β – λακταμάσες, καθότι δρουν ενάντια πολλών μοριακών τύπων καρβαπενεμασών και όχι μόνο έναντι των KPC και OXA – 48. Αναμένεται να χρησιμοποιηθεί έναντι των MDR παθογόνων όπως τα στελέχη *Acinetobacter*, τα εντεροβακτήρια όπως επίσης και σε λοιμώξεις που έχουν προκληθεί από τον *Stenotrophomonas maltophilia*. Παρά την δράση της αυτή έναντι των Gram αρνητικών βακτηρίων, δεν παρουσιάζει δραστηριότητα έναντι των κατά Gram θετικών βακτηρίων. Μέχρι στιγμής και σύμφωνα με την έγκριση από τον FDA, η κεφιντεροκόλη, χρησιμοποιείται για την θεραπεία πολύπλοκων λοιμώξεων του ουροποιητικού, της ενδονοσοκομειακής πνευμονίας που προέρχεται από την χρήση αναπνευστήρα. Ακόμα έχει εγκριθεί για την χρήση της έναντι σε λοιμώξεις που προέρχονται από αερόβιους κατά Gram αρνητικούς οργανισμούς, σε ενήλικους με περιορισμένες θεραπευτικές επιλογές. Τέλος να σημειωθεί ότι ο η χορήγηση της κεφαλοσπορίνης αυτής πραγματοποιείται ενδοφλεβίως (**Διαδικτυακή πηγή:** 2021 antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis (who.int)).

4.1.5. Τελευταίες εξελίξεις στην αντιμετώπιση της αντίστασης στα β – λακταμικά

Πέραν των ενώσεων που αναφέρθηκαν στην παράγραφο των κατηγοριών των αναστολέων β – λακταμασών, ορισμένοι ακόμα αντιμικροβιακοί παράγοντες βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές, στα πλαίσια των ερευνών για την αντιμετώπιση της αντίστασης. Σύμφωνα λοιπόν με τις τελευταίες αναφορές του WHO, υπό διαφορετικά στάδια των κλινικών δοκιμών βρίσκονται οι ακόλουθοι συνδυασμοί αντιμικροβιακών παραγόντων (**Διαδικτυακή πηγή:** 2021 antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis (who.int)):

- Durlobactam (ETX7728 2514) + Sulbactam: Η ένωση Durlobactam αποτελεί αναστολέα β – λακταμασών τύπου DBO. Θεωρείται αναστολέας των β – λακταμασών των τάξεων A, C και D. Μελετάται ο συνδυασμός του με την σουλβακτάμη, β – λακταμικό αντιμικροβιακό, με ήπια αντιμικροβιακή δράση, το οποίο χρησιμοποιείται διαδεδομένα ως αναστολέας β – λακταμασών, ώστε να χορηγείται για την θεραπεία ενδονοσοκομειακής πνευμονίας. Βρίσκεται στην φάση III των κλινικών δοκιμών.
- Sulopenem: αποτελεί συνθετική πενέμη. Είναι δραστική έναντι των εντεροβακτηριδίων, συμπεριλαμβανομένων και όσων ανήκουν στους παραγωγούς των ESBL. Προορίζεται για την

χρήση στην θεραπεία ουρολοιμώξεων. Βρίσκεται στην φάση III των κλινικών δοκιμών, για την παραγωγή σκευάσματος από του στόματος για την θεραπεία σοβαρών ουρολοιμώξεων.

- Taniborbactam + cefepime: Η ένωση Taniborbactam αποτελεί αναστολέα β – λακταμασών με βάση το νο βορονικό οξύ. Η κεφεπίμη αποτελεί κεφαλοσπορίνη 4^{ης} γενιάς με ευρύ αντιμικροβιακό φάσμα. Μελετάται για την θεραπεία της οξείας πυελονεφρίτιδας και των πολύπλοκων ουρολοιμώξεων. Βρίσκεται στην φάση III των κλινικών μελετών.
- Benaprenem: Αποτελεί νέα καρβαπενέμη, η οποία έχει περάσει την φάση II των κλινικών μελετών.
- Παράγοντας ARX – 1796: αποτελεί πόσιμο προϊόν της αβιβακτάμης. Δεν έχουν γίνει πιθανοί συνδυασμοί του παρασκευάσματος με β – λακταμικά αντιμικροβιακά. Βρίσκεται στην φάση I των κλινικών δοκιμών.
- ETX0282 + ceftrodoxim: ο παράγοντας ETX0282, αποτελεί αναστολέα β – λακταμασών τύπου DBO. Αντίστοιχα η ceftrodoxim αποτελεί κεφαλοσπορίνη 3^{ης} γενιάς. Ο συνδυασμός τους εμφανίζει δράση έναντι των ESBL, OXA – 48 και KPC. Έχει ολοκληρώσει την φάση I των κλινικών δοκιμών.
- Nacubactam + meropenem: Ο συνδυασμός της νακουβακτάμης, που αποτελεί αναστολέα των β – λακταμασών, με την μεροπενέμη, η οποία ανήκει στις καρβαπενέμες, δοκιμάζεται για την αντιμετώπιση λοιμώξεων που προκύπτουν από εντεροβακτήρια, συμπεριλαμβανομένων των οργανισμών που παράγουν MBL. Ο συνδυασμός αυτός έχει ολοκληρώσει την φάση I των κλινικών δοκιμών.
- QPX7728 + QPX2014: Ο παράγοντας QPX7728 αποτελεί έναν αναστολέα β – λακταμασών, με βάση το βορονικό οξύ. Αναστέλλει την δράση των β – λακταμασών των κλάσεων A, B, C και D. Αντίστοιχα ο παράγοντας QPX2014 αποτελεί άγνωστη β – λακτάμη. Ο συνδυασμός τους βρίσκεται στην φάση I των κλινικών δοκιμών.
- QPX7728 + QPX2015: Ο συνδυασμός τους βρίσκεται στην φάση I των κλινικών δοκιμών, όμοια με τον συνδυασμό QPX7728 + QPX2014.
- XNW4107 + imipenen + cilastatin: Ο παράγοντας XNW4107 είναι ένας αναστολέας β – λακταμασών, ο οποίος αναπτύσσεται σε συνδυασμό με την ιμιπενέμη και την σιλαστατίνη. Όπως έχει αναφερθεί, η σιλαστατίνη αποτελεί έναν αναστολέα της νεφρικής αφυδροπεπτιδάσης, ώστε να αναστέλλεται η ταχύτατη αποικοδόμηση της ιμιπενέμης. Αντίστοιχα η ιμιπενέμη αποτελεί β – λακταμικό αντιμικροβιακό και ανήκει στις καρβαπενέμες. Ο συνδυασμός τους ελέγχεται για την θεραπεία ενδονοσοκομειακής πνευμονίας που προέρχεται από βακτηριακή λοίμωξη. Η φάση I της κλινικής δοκιμής ξεκίνησε τον Μάρτιο του 2021 και βρίσκεται ακόμα σε εξέλιξη.

- VNRX – 7145 + ceftibuten: Ο παράγοντας VNRX – 7145 αποτελεί αναστολέα β – λακταμασών των κλάσεων A, C και ορισμένων D και αποκαθιστά την δραστικότητα της κεφτιμπουτένης σε ποσοτό 90%. Η κεφτιμπουτένη αποτελεί κεφαλοσπορίνης 3^{ης} γενιάς. Ο Συνδυασμός τους βρίσκεται στην φάση 1 των κλινικών δοκιμών.
- Zidebactam + cefepime: Η ένωση Zidebactam αποτελεί ενισχυτή β – λακταμικών αντιμικροβιακών και ανήκει στην κατηγορία των δίκυκλο – άκυλο υδραζιδίων (BCH – Bicyclo – acyl Hydrazides). Αντίστοιχα η κεφεπίμη αποτελεί κεφαλοσπορίνη 4^{ης} γενιάς. Η συνεργατική τους δράση ελέγχεται έναντι των εντεροβακτηριδίων που παράγουν ESBL και KPC. Αυξάνονται όμως οι τιμές των MICs για την αντιμετώπιση των παραγωγών MBLs. Για τον συνδυασμό αυτών μόλις έχουν ολοκληρωθεί οι μελέτες της φάσης I των κλινικών δοκιμών.

Εκτός από τα νέα β – λακταμικά αλλά και τους συνδυασμούς με αναστολείς β – λακταμασών, τα οποία βρίσκονται σε συνεχή εξέλιξη και έρευνα, φαίνεται να προκύπτει ότι ο συνδυασμός φαρμάκων που δεν σχετίζονται με την αντιμετώπιση λοιμώξεων, συμβάλλουν και υποβοηθούν την δράση των γνωστών μέχρι σήμερα αντιμικροβιακών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αντιμετώπιση του MRSA. Ο *S. aureus*, εμφανίζει ανθεκτικότητα στην πενικιλίνη και την μεθυκυλλίνη. Στελέχη του *S.aureus* απέκτησαν μέσω οριζόντιας μεταφοράς γονίδιο που κωδικοποιούν την PBP2a, την οποία τα β – λακταμικά αντιμικροβιακά δεν μπορούν να δεσμεύσουν και να διασπάσουν. Πρόσφατες μελέτες έχουν υποδείξει την παρουσία λιπιδίων στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, τα οποία εκτός του ρόλου τους ως ικρίωμα για την συναρμολόγηση των πρωτεϊνικών συμπλόκων, φαίνεται να συμβάλουν στην ακεραιότητα των PBP2a στα στελέχη MRSA. Τελευταίες έρευνες υποδεικνύουν ότι η χρήση στατινών, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση της υπερλιπιδαιμίας, οδηγούν στην αναστολή της λειτουργίας, μικροδομών των κυταρικών μεβρανών στα στελέχη του MRSA. Το γεγονός αυτό καθιστά τις στατίνες εξαιρετικά συστατικά για συνδυαστική χρήση με β – λακταμικά αντιμικροβιακά για την αντιμετώπιση των MRSA (Timothy J. Foster, 2019).

Ακόμα τα β – λακταμικά φαίνεται να ανακτούν την δραστικότητά τους έναντι των MRSA στελεχών όταν χρησιμοποιούνται με αναστολείς που σχετίζονται με λειτουργικά μόρια της πλασματικής μεμβράνης όπως (Timothy J. Foster, 2019):

- ◆ Αναστολείς των πρωτεϊνών FtsZ: Παρεμποδίζουν την δημιουργία του Z – δαχτυλίου, για την κυτταρική διαίρεση των βακτηρίων. Αποτέλεσμα της δράσης αυτής είναι το κύτταρο να αυξάνεται αλλά να μην μπορεί να ολοκληρώσει την κυτταρική διαίρεση και στην συνέχεια να λύεται.

- ◆ Αναστολείς πεπτιδασών σήματος: Στόχος των αναστολέων αποτελεί μια βασική σηματοδοτική πεπτιδάση η SpsB. Μέσω τν σηματοδοτικών μονοπατιών και την δράση των μορίων αυτών, μειώνεται η έκκριση της PBP2a. Οι αναστολείς αυτοί φαίνεται να έχουν συνεργατική δράση με την ιμιπενέμη.
- ◆ Αναστολείς WTA: Ο WTA αποτελεί πολυμερές φωσφορικής ριβιτόλης, το οποίο συνδέται ομοιοπολικά με την πεπτιδογλυκάνη κατά την διάρκεια της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος. Όταν αυτό απουσιάζει, δεν επηρεάζει την επιβίωση του κυττάρου, παρεμποδίζει όμως την κυτταρική διαίρεση συμβάλλοντας στον περιορισμό του πολλαπλασιασμού του στελέχους.
- ◆ Αναστολείς των πρωτεϊνών MurJ: Οι πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής αποτελεί διατηρημένες πρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Δρουν ως σήμα στην πρόληψη της πρωτεΐνης PBP2 στην διαδικασία της κυτταρικής διαίρεσης. Έπειτα από μελέτες φαίνεται να έχουν αντιμικροβιακή δράση συνδυαστικά με τις β – λακταμάσες, στα στελέχη MRSA.
- ◆ Δαπτομυκίνη: αποτελεί κυκλικό διπεπτίδιο και είναι φυσικό προϊόν. Προκαλεί αποπόλωση της πλασματικής μεμβράνης και οδηγεί σε ταχεία αναστολή της σύνθεσης των πρωτεϊνών, του DNA και του RNA. Η χρήση του συνδυαστικά με τα β – λακταμικά ενισχύει την αντιμικροβιακή τους δράση. Ο συνδυασμός τους έχει χρησιμοποιηθεί κλινικά για την θεραπεία βακτηριαιμίας.

Τέλος πρέπει να σημειωθεί ότι για τα ανθεκτικά στελέχη MRSA, χρησιμοποιούνται και συνδυασμοί β – λακταμικών αντιμικροβιακών, τα οποία στοχεύουν διαφορετική PBP πρωτεΐνη. Έτσι έχουν χρησιμοποιηθεί οι εξής συνδυασμοί (Timothy J. Foster, 2019):

- ◆ Oxacilin – Cefoxitin: Η Oxacilin, μια πενικιλίνη, έχει ως στόχο την PBP4, ενώ αντίστοιχα η Cefoxitin, κεφαλοσπορίνη 2^{ης} γενιάς, μπλοκάρει την δράση της PBP2. Ο συνδυασμός των δυο αυτών αντιμικροβιακών που στοχεύουν διαφορετικές PBP πρωτεΐνες, είναι δραστήσιος έναντι των CA – MRSA (Community-Associated MRSA).
- ◆ Meropenem – Tazobactam – Piperacilin: Η meropenem ανήκει στις καρβαπενέμες, η Tazobactam αποτελεί αναστολέα β – λακταμασών ενώ αντίστοιχα η Piperacilin αποτελεί μια ημισυνθετική πενικιλίνη με ευρύ φάσμα δράσης. Οι ενώσεις αυτές εμφανίζουν συνεργιστική δράση έναντι της HA – MRSA. Η μεροπενέμη αναστέλλει την PBP1. Ταυτόχρονα προβάλλει την ενεργό θέση της PBP2a ώστε να είναι εκτεθειμένη στην δεύτερη δραστήσια την καρβαπενέμη ή/και την πιπερακιλίνη.

Αντίστοιχα η ταζομπακτάμη αναστέλλει την β – λακταμάση, ώστε η πιπερακιλλίνη να είναι ελεύθερη να μπλοκάρει την δράση της PBP2.

Πίνακας 6: Συγκεντρωτικός πίνακας νέων συνδυασμών αναστολέων β – λακταμασών και β – λακταμικών αντιμικροβιακών, αλλά και νέων β – λακταμικών αντιμικροβιακών, που βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές.

<i>Νέοι συνδυασμοί β – λακταμικών αντιμικροβιακών & αναστολέων β - λακταμασών</i>		
<i>Στάδιο Μελετών</i>	<i>Συνδυασμός</i>	<i>Χρήση</i>
<i>Κλινική Φάση I</i>	Παράγοντας ARX – 1796	-
<i>Κλινική Φάση I</i>	ETX0282 + cefpodoxim	-
<i>Κλινική Φάση I</i>	Nacubactam + meropenem	αντιμετώπιση λοιμώξεων που προκύπτουν από εντεροβακτήρια
<i>Κλινική Φάση I</i>	QPX7728 + QPX2014	-
<i>Κλινική Φάση I</i>	QPX7728 + QPX2015	-
<i>Κλινική Φάση I</i>	XNW4107 + imipenen + cilastatin	θεραπεία ενδονοσοκομειακής πνευμονίας από βακτηριακή λοίμωξη
<i>Κλινική Φάση I</i>	VNRX – 7145 + ceftibuten	
<i>Κλινική φάση III</i>	Durlobactam (ETX7728 2514) + Sulbactam	θεραπεία ενδονοσοκομειακής πνευμονίας
<i>Κλινική φάση III</i>	Taniborbactam + cefepime	θεραπεία της οξείας πυελονεφρίτιδας και των πολύπλοκων ουρολοιμώξεων
<i>Νέα β - λακταμικά</i>		
<i>Κλινική Φάση III</i>	Sulopenem	θεραπεία ουρολοιμώξεων
<i>Κλινική Φάση II</i>	Benapenem	-

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

5. Συμπεράσματα - Συζήτηση

Τα τελευταία χρόνια, ολοένα και περισσότεροι μικροοργανισμοί, εμφανίζουν αντίσταση έναντι των παραδοσιακών αντιμικροβιακών φαρμάκων, με αποτέλεσμα, ασθένειες που έχουν ως αιτιολογία μόλυνση από κάποιο μικροοργανισμό, να μην μπορούν να αντιμετωπιστούν με την χρήση των συνηθισμένων φαρμάκων. Επιπρόσθετα οι λοιμώξεις των ασθενών στις δομές υγείας, αυξάνονται με εκθετικό βαθμό και συχνά παρατηρείται το γεγονός, ασθενείς να οδηγούνται στον θάνατο έπειτα από κάποια ενδονοσοκομειακή λοίμωξη. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε σύντομη ανάλυση μιας συγκεκριμένης κατηγορίας αντιμικροβιακών, των β – λακταμικών.

Τα β – λακταμικά αντιμικροβιακά, αποτελούν τα πλέον διαδεδομένα και πολυχρησιμοποιούμενα αντιμικροβιακά φάρμακα. Ο μηχανισμός δράσης τους στηρίζεται στην δέσμευση αυτών, σε μόρια όπως οι PBP's που σχετίζονται με την σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων. Η αυξημένη χρήση τους ωστόσο, έχει οδηγήσει σε υγειονομικό ζήτημα καθώς ολοένα και περισσότεροι μικροοργανισμοί αποκτούν ανθεκτικότητα στην δράση τους. Οι μηχανισμοί ανάπτυξης αντίστασης έναντι της δράσης των αντιμικροβιακών φαρμάκων, περιλαμβάνουν είτε τη διαφοροποίηση των PBP's, την μείωση της διαπερατότητας της μεμβράνης των μικροοργανισμών από τα β – λακταμικά αντιμικροβιακά, μέσω υπερέκφρασης αντλιών εκροής στην μεμβράνη των μικροοργανισμών, ώστε να αντλείται το χρησιμοποιούμενο αντιμικροβιακό στο εξωτερικό του κυττάρου, είτε, τέλος, με την παραγωγή β – λακταμασών οι οποίες αποτελούν ένζυμα που υδρολύουν τα β – λακταμικά αντιμικροβιακά. Οι τελευταίες, αποτελούν και τον κλινικά σημαντικότερο μηχανισμό εμφάνισης αντίστασης, γεγονός που οφείλεται στην μεγάλη ποικιλία των ενζύμων αυτών στους διάφορους μικροοργανισμούς. Οι β - λακταμάσες, στα πλαίσια της μελέτης και ανάλυσής τους, μπορούν να κατηγοριοποιηθούν, ανάλογα με την συγγένεια στην αλληλουχία τους αλλά και σύμφωνα με την λειτουργία τους σε διαφορετικές κατηγορίες. Έτσι με βάση την συγγενεία τους στην αμινοξική τους αλληλουχία, διαιρούνται στις κλάσεις A, B, C και D. Από τις κλάσεις αυτές οι A, C και D φαίνεται να μοιράζονται τον ίδιο μηχανισμό δράσης, όπου πρόκειται για μια αντίδραση ακυλίωσης – αποακυλίωσης. Αντίθετα οι β – λακταμάσες της κατηγορίας B, διαφοροποιούνται από τις άλλες κλάσεις και ο μηχανισμός δράσης τους, στηρίζεται σε μια αντίδραση υδρόλυσης.

Όπως είναι λογικό και από τα όσα αναλύθηκαν παραπάνω, οι προσπάθειες αντιμετώπισης του φαινομένου της αντίστασης, επικεντρώθηκαν γύρω από τους μηχανισμούς, που τα βακτήρια αναπτύσσουν, ώστε να ξεφεύγουν της δράσης των αντιμικροβιακών. Έτσι λοιπόν, στα πλαίσια της αντιμετώπισης της αντίστασης, αναπτύχθηκαν και εναλλακτικές προσεγγίσεις. Στις προσεγγίσεις αυτές ανήκει η στόχευση παραγόντων μόλυνσης, όπου στην περίπτωση αυτή, ο στόχος δεν

σχετίζεται με την δράση των αντιμικροβιακών. Αντίθετα η στόχευση αφορά τις μεταβολικές λειτουργίες που χρησιμοποιούν οι μικροοργανισμοί ώστε να επιβιώσουν σε εχθρικά περιβάλλοντα. Έτσι, μονοπάτια σύνθεσης αμινοξέων, οι μηχανισμοί ελέγχου απαρτίας των βακτηρίων αλλά και ο σχηματισμός βιοϋμενίων, αποτέλεσαν σημαντικές διαδικασίες – στόχους για τον περιορισμό της ανάπτυξης των βακτηρίων. Ακόμα μια εναλλακτική προσέγγιση, αποτέλεσαι και η χρήση νανοσωματιδίων ώστε να βελτιώνεται η βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου και να αυξάνεται η ειδικότητα ως προς την περιοχή εμφάνισης της μόλυνσης.

Πέραν όμως των εναλλακτικών αυτών μεθόδων και με γνώμονα τους μηχανισμούς που χρησιμοποιούν τα βακτήρια για να διαφύγουν της δράσης των αντιμικροβιακών φαρμάκων, όπως αυτοί αναφέρθηκαν παραπάνω, μια σημαντική προσέγγιση υπήρξε η χρήση των αντιμικροβιακών συνδυαστικά με ανοσοενισχυτικές ενώσεις. Οι ενώσεις αυτές βοηθούν την αύξηση της διαπερατότητας των μεμβρανών των κυττάρων αλλά και στην εξασφάλιση ικανοποιητικής συγκέντρωσης των αντιμικροβιακού στο εσωτερικό του κυττάρου. Εξετάστηκαν επίσης και αναστολείς των αντλιών εκροής, πρωτεϊνών μεταφοράς, οι οποίες εμπλέκονται στην εξώθηση υποστρωμάτων από το εσωτερικό του κυττάρου στο εξωτερικό περιβάλλον. Αποτέλεσμα της λειτουργίας τους, η εξώθηση του αντιμικροβιακού φαρμάκου από το εσωτερικό του κυττάρου στο εξωτερικό του περιβάλλον. Σηματικά βήματα γίνονται και στον επανασχεδιασμό αντιμικροβιακών φαρμάκων ώστε να μην αναγνωρίζονται από τα μόρια δέσμευσής τους στις αντλίες εκροής. Οι αναστολείς αυτοί εμφανίζουν πληθώρα εφαρμογών σε άλλες κατηγορίες αντιμικροβιακών, δεν εμφανίζουν όμως αντίστοιχες εφαρμογές στην κατηγορία των β – λακταμικών αντιμικροβιακών.

Παρά την ανάπτυξη των παραπάνω προσεγγίσεων, σημαντικότερη και πολλά υποσχόμενη μέθοδος υπήρξε η συνδυαστική χορήγηση αντιμικροβιακού και αναστολέα β – λακταμάσης. Η χρήση του αντιμικροβιακού συνδυαστικά με τον αναστολέα β – λακταμασών, οδήγησε στην ανάκτηση της αντιμικροβιακής δράσης φαρμάκων. Η χρήση των αναστολέων οδήγησε σε δυο βασικά πλεονεκτήματα: αφενός μεν επαναχρησιμοποιήθηκαν αντιμικροβιακά, των οποίων η πολύχρονη χρήση τους έχει αποδείξει ότι είναι ασφαλή και αποτελεσματικά στην κλινική πράξη και αφετέρου δε αποφεύχθηκε η αναγκαιότητα για ανακάλυψη και πιστοποίηση νέων θεραπευτικών στόχων.

Όπως είναι αναμενόμενο οι αναστολείς που αναπτύχθηκαν, έφεραν στην δομή τους β – λακταμικό δακτύλιο καθότι αρχικά προορίζονταν για την χρήση τους ως νέα β – λακταμικά αντιμικροβιακά. Στην πορεία όμως προέκυψε ότι η ανασταλτική τους δράση, είναι μεγαλύτερη εν συγκρίσει με την αντιμικροβιακή. Πράγματι η θεώρηση αυτή επιβεβαιώθηκε, με την χρήση του

κλαβουλανικού οξέος, ενός φυσικού παράγωγου, ο μηχανισμός δράσης του οποίου, έδωσε το ερέθισμα για την ανακάλυψη της σουλβακτάμη και της ταζομπακτάμης. Δυο σημαντικούς αναστολείς β – λακταμασών οι οποίοι φέρουν στην δομή του β – λακταμικό δακτύλιο.

Οι ανάγκες όμως σε αντιμικροβιακά φάρμακα καθώς και αναστολείς β – λακταμασών, υπήρξαν μεγάλες ώστε να αντιμετωπιστεί το φαινόμενο της αντίστασης. Στον αγώνα αντιμετώπισης του φαινομένου αυτού, επιστρατεύτηκαν ενώσεις, οι οποίες διαθέτουν ορισμένα σημαντικά χαρακτηριστικά. Αξιοποιήθηκε έτσι το βορονικό οξύ, το οποίο εμφανίζει ανασταλτική δράση έναντι των σέρινο – πρωτεασών. Η βαμπορβακτάμη όπως και η τανιμπορβακτάμη αποτελούν σημαντικούς αναστολείς της κατηγορίας αυτής. Ακόμα χρησιμοποιήθηκαν ενώσεις οι οποίες διέθεταν στην δομή τους δακτύλιο, με την ιδέα να αποτελέσουν ανάλογα των β – λακταμικών αντιμικροβιακών. Τέτοιοι αναστολείς είναι οι DBO, οι οποίοι διαθέτουν ένα δίκυκλο καρβαμολικό τμήμα στη δομή τους. Αντίστοιχα σημαντικός αναστολέας της κατηγορίας αυτής αποτελεί η αβιβακτάμη, ενώ νέα μόρια ανάλογά της έχουν παραχθεί και βρίσκονται σε διαφορετικές φάσεις των κλινικών δοκιμών. Ακόμα μια ένωση με χαρακτηριστικά προς εκμετάλλευση, για την αντιμετώπιση της αντίστασης αποτέλεσαν οι θειόλες. Σε ότι αφορά τα παράγωγα θειολών, η ανάπτυξή τους στηρίχθηκε στο γεγονός ότι, οι θειόλες αποτελούν χηλικούς παράγοντες του ψευδαργύρου (Zn). Για τον λόγο αυτόν χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες για την πιθανή τους χρήση ως αναστολείς των μέταλλο – β – λακταμασών, οι οποίες έχουν χαρακτηριστικά άτομα ψευδαργύρου στο ενεργό τους κέντρο. Εδώ συναντάμε μια σειρά αναστολέων όπως η Καπτοπρίλη, η Θιορφάνη και η Διμερκαπρόλη. Τέλος τα δικαρβοξυλικά παράγωγα αποτελούν ακόμα μια περίπτωση ενώσεων, που εμφανίζουν συνεργατική δράση με β – λακταμικά αντιμικροβιακά όπως η μιπενέμη. Παρόλα αυτά δεν αποτέλεσαν αντικείμενο για περαιτέρω μελέτες καθώς διαθέτουν ένα τμήμα με ανιλίνη, το οποίο ενδεχομένως να σχετίζεται με καρκινική δράση. Στο σημείο αυτό είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι αναστολείς των β – λακταμασών που αναφέραμε και παραπάνω, δεν είναι λειτουργικοί έναντι των β – λακταμασών όλων των κλάσεων. Ορισμένοι από αυτούς εμφανίζουν δράση μόνο έναντι ορισμένων κλάσεων ή αντίστοιχα, ορισμένων οικογενειών ενζύμων μιας κλάσης. Για παράδειγμα οι σέρινο – β – λακταμάσες αναστέλλονται με ομοιοπολική κατάλυση, μέσω σχηματισμού ομοιοπολικών δεσμών, ενώ αντίθετα οι μέταλλο – β – λακταμάσες με μη ομοιοπολική κατάλυση. Παρόλα αυτά, στα τετραεδρικά ενδιάμεσα που προκύπτουν στις δυο αυτές διεργασίες, οι ομοιότητες είναι πολλές. Στο χαρακτηριστικό αυτό στηρίχτηκαν οι προσπάθειες σχηματισμού αναστολέων εκτεταμένου εύρους.

Είναι γνωστό ότι, τα βακτήρια έχουν την δυνατότητα συνεχών μεταλλαγών ώστε να καταφέρνουν να επιβιώνουν παρουσία αντιμικροβιακών φαρμάκων, πόσο μάλλον των παραδοσιακών για τα οποία ήδη έχουν αναπτύξει μηχανισμούς αντίστασης. Για τον λόγο αυτόν

συνεχείς είναι οι προσπάθειες για την ανεύρεση νέων β – λακταμικών αντιμικροβιακών. Μια διαδικασία αρκετά δύσκολη, όπου σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), μέχρι και τον Νοέμβριο του 2021, 45 αντιμικροβιακά με νέες θεραπευτικές δράσεις, βρίσκονται σε διαφορετικές φάσεις των κλινικών δοκιμών. Από τα 45 αυτά αντιβιοτικά, τα 27 έχουν στόχο τα παθογόνα υψηλής προτεραιότητας όπως αυτά έχουν επισημανθεί από τον WHO. Οι αριθμοί αυτοί αντιστοιχούν σε αντιμικροβιακά φάρμακα όλων των κατηγοριών και όχι αποκλειστικά σε β – λακταμικά αντιμικροβιακά. Τα τελευταία έτη, μία μόνο νέα κεφαλοσπορίνη έχει πάρει έγκριση από τον FDA. Πρόκειται για μια σιδηροφόρο κεφαλοσπορίνη, την cefiderocol, η οποία εμφανίζει δυνατότητα μετακίνησης διαμέσου της εξωτερικής μεμβράνης των κατά Gram αρνητικών βακτηρίων, με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται στον περιπλασματικό χώρο. Η κεφαλοσπορίνη αυτή εμφανίζει ισχυρή δράση έναντι των παθογόνων εκείνων τα οποία παράγουν καρβαπενεμάσες.

Οι νέες στρατηγικές οι οποίες βρίσκονται ακόμα στο στάδιο των κλινικών μελετών, αποτελούν ιδιαίτερα ενθαρρυντικές προοπτικές για το σοβαρό υγειονομικό ζήτημα της εμφάνισης αντίστασης στα αντιμικροβιακά που είναι πλέον γεγονός και απασχολεί την επιστημονική κοινότητα ιδιαίτερα την τελευταία δεκαετία. Ήδη για την αντιμετώπιση της αντίστασης στα β – λακταμικά αντιμικροβιακά, έχει χρησιμοποιηθεί ο συνδυαστικός μηχανισμός δράσης των αντιμικροβιακών αυτών με αναστολείς β – λακταμασών. Πέραν αυτού του μηχανισμού όμως, είδαμε ότι με τον ίδιο τρόπο χρησιμοποιούνται και άλλα μόρια – αναστολείς, των οποίων στόχο αποτελούν, λειτουργικά μόρια των κυτταρικών μεμβρανών, οδηγώντας στην αυξημένη δράση των β – λακταμικών αντιμικροβιακών. Βλέπουμε συνεπώς ότι οι έρευνες για την συνδυαστική χρήση των β – λακταμικών αντιμικροβιακών με αναστολείς β – λακταμασών καθώς επίσης και με αναστολείς άλλων λειτουργικών μορίων της πλασματικής μεμβράνης, αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο συνεχούς έρευνας και μελέτης. Παρά το γεγονός αυτό περαιτέρω βήματα βελτίωσης σε όλα τα επίπεδα διάγνωσης και αντιμετώπισης των λοιμώξεων, οφείλουν να γίνουν. Για παράδειγμα η ανάπτυξη γρήγορων μεθόδων αναγνώρισης του βακτηρίου που προκαλεί την μόλυνση στον ασθενή αλλά και των μηχανισμών αντίστασης που εμφανίζει είναι μεγάλης σημασίας. Η μοριακή διάγνωση έχει προχωρήσει αρκετά παρόλα αυτά τα βακτηριακά διαγνωστικά έχουν παραμείνει παγιδευμένα σε παλαιές μεθοδολογίες. Συνδυαστικά με τις παλαιές μεθοδολογίες βακτηριακών διαγνωστικών, στην επιστημονική κοινότητα εξακολουθεί να υπάρχει σύγχυση ως προς την ορολογία που αφορά την αντίσταση στα αντιμικροβιακά φάρμακα. Σημαντικό επίσης ζήτημα αποτελεί το γεγονός ότι στην επιστημονική κοινότητα εξακολουθεί να υπάρχει σύγχυση ως προς την ορολογία που αφορά στην αντίσταση στα αντιμικροβιακά φάρμακα, όπως οι όροι MDR, XDR, PDR. Οι όροι αυτοί συγχέονται και συχνά χρησιμοποιούνται εσφαλμένα με άλλους όρους όπως «Υπερβακτήρια» ως συνώνυμοι.

Επιπρόσθετα, υπάρχει διαστρεβλωμένη αντίληψη μεταξύ του ρόλου που μπορούν να διαδραματίσουν νέες κατηγορίες φαρμάκων, τα οποία εμφανίζουν νέους μηχανισμούς δράσης, με την ανάπτυξη νέων ανθεκτικών φαρμάκων, τα οποία όμως εμφανίζουν ίδιο μηχανισμό δράσης με τα παραδοσιακά αντιμικροβιακά. Έτσι τα νέα φάρμακα, είναι μεν ανθεκτικά έναντι των παθογόνων, οι μηχανισμοί δράσης τους όμως είναι γνωστοί στα βακτήρια, τα οποία έχουν αναπτύξει ήδη μηχανισμούς αντίστασης εναντίον τους. Έτσι σε σύντομο χρόνο θα εμφανίσουν ανθεκτικότητα και έναντι στα νέα φάρμακα. Η ανεύρεση όμως νέων κατηγοριών φαρμάκων, τα οποία θα εμφανίζουν νέους μηχανισμούς δράσης, θα αποτελούσε ουσιαστική λύση για την αντιμετώπιση της αντίστασης.

Είναι σημαντικό και πρέπει να αναφερθεί το γεγονός ότι, οι περισσότερες φαρμακευτικές εταιρείες, δεν αφιερώνουν πόρους σε μελέτες που να αφορούν την ανάπτυξη νέων φαρμάκων στα πλαίσια της αντιμετώπισης της αντίστασης. Συνεπώς είναι επιτακτική ανάγκη περισσότερες από τις εταιρείες αυτές να αφιερώνουν τμήμα των μελετών τους, για την αντιμετώπιση της αντίστασης στα αντιμικροβιακά, ζήτημα το οποίο έχει πάρει σοβαρές υγειονομικές διαστάσεις. Ήδη σειρά μελετών έχουν δείξει ότι, η προσέγγιση ανάπτυξης σκευασμάτων με στόχο τους μηχανισμούς της εμφανιζόμενης αντίστασης, αποτελεί πολλά υποσχόμενο τομέα. Η ανάπτυξη σκευασμάτων, τα οποία δεν θα αποτελούν αντιμικροβιακά φάρμακα αλλά θα στοχεύουν σε μηχανισμούς εγγενούς αντίστασης, θα συγχρηθούν με αντιμικροβιακά ώστε να λειτουργούν συνεργατικά και να οδηγούν στην αύξηση της δράσης των αντιμικροβιακών. Τέλος, σημαντικός στόχος των ερευνητικών ομάδων αποτελεί πλέον και ένα είδος πρωτεϊνών, η οποία ονομάζεται DsbA πρωτεΐνες, οι οποίες σύμφωνα με τελευταίες μελέτες, συμβάλουν στην σωστή αναδίπλωση διάφορων πρωτεϊνών όπως οι β – λακταμάσες, αλλά και άλλες λειτουργικές πρωτεΐνες της πλασματικής μεμβράνης, ώστε να είναι λειτουργικές. Απουσία των DsbA συχνά συσχετίζεται με ελαττωματική αναδίπλωση των πρωτεϊνών αυτών, γεγονός που συντελεί στην έλλειψη λειτουργικότητας και δραστηριότητάς τους (R Christopher D Furniss et al., 2022).

Ολοκληρώνοντας, πρέπει να τονίσουμε ότι, το ζήτημα της αντίστασης στα αντιμικροβιακά φάρμακα, αποτελεί ένα ιδιαίτερα σοβαρό ζήτημα, ο αντίκτυπος του οποίου είναι δυνατόν να επιφέρει σοβαρότερες συνέπειες και από την πανδημία του Covid – 19, που πρόσφατα δοκίμασε το σύστημα υγείας. Νέες εξελίξεις πρέπει να γίνουν στα σημεία αυτά που προαναφέρθηκαν, σε αντίθετη περίπτωση οι επιπτώσεις θα είναι σοβαρές. Ως κατακλείδα θα ήθελα να αναφερθώ στα προειδοποιητικά λόγια του Γενικού Διευθυντή της Διεθνούς Ομοσπονδίας Βιομηχανίας Φαρμάκου, Τόμας Κούνι, ο οποίος χαιρετίζοντας την συγκρότηση ομάδας εργασίας, αναφέρθηκε στο φαινόμενο με τα εξής λόγια « Η αντιμικροβιακή αντίσταση είναι μια επικείμενη παγκόσμια κρίση που μπορεί να επισκιάσει την Covid – 19 όσον αφορά τους θανάτους και τα οικονομικά κόσθη».

Βιβλιογραφία

1. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*. 1940;146:837.
2. Abuhussain, S. S. A.; Avery, L. M.; Abdelraouf, K.; Nicolau, D. P. (2019). “ In vivo efficacy of humanized WCK 5222 (cefepime-zidebactam) exposures against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in the neutropenic thigh model”. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 63, e01931-18.
3. Adams-Haduch, J.M.; Paterson, D.L.; Sidjabat, H.E.; Pasculle, A.W.; Potoski, B.A.; Muto, C.A.; Harrison, L.H.; Doi, Y. (2008). Genetic basis of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates at a tertiary medical center in Pennsylvania. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52, 3837–3843.
4. Akbar Mirsalehian, Davood Kalantar - Neyestanaki, Morovat Taherikalani, Fereshteh Jabalameli, and Mohammad Emaneini. (2017). Determination of carbapenem resistance mechanism in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients, in Tehran, Iran. *Journal of Epidemiology and Global Health* 7 (3), 155e159.
5. A. M. Egorov, M. M. Ulyashova , and M. Yu. Rubtsova. (2020). Inhibitors of b-Lactamases. *New Life of b-Lactam Antibiotics*. Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia. Published in *Biokhimiya*, 2020, Vol. 85, No. 11, pp. 1519-1539.
6. Ambler, R. P. 1980. The structure of -lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 289:321–331.
7. Ambler, R. P., A. F. W. Coulson, J.-M. Frère, J.-M. Ghuysen, B. Joris, M. Forsman, R. C. Levesque, G. Tiraby, and S. G. Waley. 1991. A standard numbering scheme for the class A -lactamases. *Biochem. J.* 276:269–272.
8. Adriana Silva, Vanessa Silva, Gilberto Igrejas, Patrícia Poeta. (2020). “Carbapenems and *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and epidemiology”. *Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes in the Environment*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818882-8.00017-6>. Elsevier Inc.
9. Atin Sharma, Vivek Kumar Gupta, and Ranjana Pathania. (2019). «Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside». *Indian J Med Res.* 149(2): 129–145.
10. B.A. Evans, S.G. Amyes. (2014). OXA beta-lactamases, *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 241–263.
11. Baumann, P.; Doudoroff, M.; Stanier, R.Y. (1968). A study of the *Moraxella* group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). *J. Bacteriol.*, 95, 1520–1541.
12. Beatriz Suay-García and María Teresa Pérez-Gracia. (2019). “ Present and Future of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae (CRE) Infections “. *Antibiotics.* 8,122, ; doi:10.3390/antibiotics8030122.

13. Beceiro A, Tomás M, Bou G. (2013). Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? *Clin Microbiol Rev.* 26:185–230.
14. Beesley, T.; Gascoyne, N.; Knott-Hunziker, V.; Petursson, S.; Waley, S. G.; Jaurin, B.; Grundström, T. (1983). “The inhibition of class C β lactamases by boronic acids”. *Biochem. J.* 209, 229–233.
15. Bhardwaj AK, Mohanty P. (2012). Bacterial efflux pumps involved in multidrug resistance and their inhibitors: Rejuvenating the antimicrobial chemotherapy. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 7:73–89.
16. Bhattacharyya T, Sharma A, Akhter J, Pathania R. (2017). The small molecule IITR08027 restores the antibacterial activity of fluoroquinolones against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* by efflux inhibition. *Int J Antimicrob Agents.* 50:219–26.
17. Bhave, D.P.; Muse, W.B.; Carroll, K.S. (2007). Drug targets in mycobacterial sulfur metabolism. *Infect. Disord. Drug Targets,* 7, 140–158.
18. Blair JM, Richmond GE, Piddock LJ. (2014). Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future Microbiol.* 9:1165–1177.
19. Brisou, J.; Prevot, A.R. (1954). Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Acromobacter* group. *Ann. Inst. Pasteur.* 86, 722–728.
20. Bohnert JA, Kern WV. (2005). Selected arylpiperazines are capable of reversing multidrug resistance in *Escherichia coli* overexpressing RND efflux pumps. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:849–52.
21. Bonnet, R. 2004. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:1–14.
22. Bradford, P. A. 2001. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:933–951.
23. Bush, K. 1988. Lactamase inhibitors from laboratory to clinic. *Clin. Microbiol. Rev.* 1:109–123.
24. Bush, K. 1989. Characterization of β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:259–263.
25. Bush, K., G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros. 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1211–1233.
26. Bush, K. Proliferation and significance of clinically relevant β lactamases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2013, 1277, 8.
27. Catherine L. Tooke, Philip Hinchliffe, Eilis C. Bragginton, Charlotte K. Colenso, Viivi H.A. Hirvonen, Yuiko Takebayashi and James Spencer. (2019). “ β -Lactamases and β -Lactamase

- Inhibitors in the 21st Century”. School of Cellular and Molecular Medicine, University of Bristol Biomedical Sciences Building, University Walk, Bristol BS8 1TD, United Kingdom. Elsevier. *Journal of Molecular Biology*. 431, 3472–3500.
28. C.A. Smith, Z. Nossoni, M. Toth, N.K. Stewart, H. Frase, S. B. Vakulenko. (2016). Role of the conserved disulfide bridge in class A carbapenemases, *J. Biol. Chem.* 291, 22196–22206.
 29. Cai, Y.; Chai, D.; Wang, R.; Liang, B.; Bai, N. (2012). Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: Clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *J. Antimicrob. Chemother.*, 67, 1607–1615.
 30. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 19th informational supplement. CLSI M100-S19. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
 31. Costello, A. L., N. P. Sharma, K. W. Yang, M. W. Crowder, and D. L. Tierney. 2006. X-ray absorption spectroscopy of the zinc-binding sites in the class B2 metallo- β -lactamase ImiS from *Aeromonas veronii* bv. *sobria*. *Biochemistry* 45:13650–13658.
 32. Cox G, Wright GD. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int J Med Microbiol.*;303:287–292.
 33. C.J. Easton, J.R. Knowles. (1982). Inhibition of the RTEM β -lactamase from *Escherichia coli*. Interaction of the enzyme with derivatives of olivanic acid, *Biochemistry*. 21.2857–2862.
 34. Crandon, J. L.; Nicolau, D. P. In vivo activities of simulated human doses of cefepime and cefepime-AAI101 against multidrugresistant Gram-negative Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015, 59, 2688–26.
 35. Davis, J. L. (2018). *Pharmacologic Principles. Equine Internal Medicine*, 79–137. doi:10.1016/b978-0-323-44329-6.00002-4.
 36. Ding, B.; Taotofa, U.; Orsak, T.; Chadwell, M.; Savage, P.B. (2004). Synthesis and Characterization of Peptide–Cationic Steroid Antibiotic Conjugates. *Org. Lett.* 6, 3433–3436.
 37. D.M. Livermore, W. Neil. (2000). *Carbapenemases: a problem in waiting?* *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 489-495. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(00\)00128-4](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(00)00128-4).
 38. Dolgin, E. Combating antibiotic resistance from ground up. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2016, 113, 11642–11643.
 39. D.T. King, S. Sobhanifar, N.C.J. Strynadka, The mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics, in: M. Gotte, A. Berghuis, G. Matlashewski, M. Wainberg, D. Sheppard (Eds.). (2017). *Handbook of Antimicrobial Resistance*, Springer, New York, NY.
 40. Epand, R.M.; Epand, R.F.; Savage, P.B. (2008). «Ceragenins (Cationic Steroid Compounds), a novel class of antimicrobial agents». *Drug News Perspect.* 21, 307.

41. Figueiredo, S.; Poirel, L.; Papa, A.; Koulourida, V.; Nordmann, P. (2009). Overexpression of the naturally occurring blaOXA-51 gene in *Acinetobacter baumannii* mediated by novel insertion sequence ISAbA9. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53, 4045–4047.
42. Frère JM, Joris B. (1985). Penicillin-sensitive enzymes in peptidoglycan biosynthesis. *CRC Crit Rev Microbiol* 11: 299–396.
43. Frère, J. M., M. Galleni, K. Bush, and O. Dideberg. 2005. Is it necessary to change the classification of β -lactamases? *J. Antimicrob. Chemother.* 55: 1051–1053.
44. G.A. Jacoby. (2009). “*AmpC beta-lactamases*”, *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 161–182.
45. Georgopapadakou NH, Liu FY. (1980). Penicillin-binding proteins in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 18: 148–157.
46. Georgopapadakou N, Hammarstrom S, Strominger JL. (1977). Isolation of the penicillin-binding peptide from d-alanine carboxypeptidase of *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci* 74: 1009–1012.
47. . (2019). “*Strategies to Overcome Antimicrobial Resistance (AMR) Making Use of Non-Essential Target Inhibitors: A Review*”. MDPI. *International Journal of Molecular Sciences*. 20, 5844; doi:10.3390/ijms20235844.
48. Giguere S, Prescott JF, Baggot JD, et al. (2006) *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. 4th ed. Ames: Blackwell Publishing.
49. Gonzales PR, Pesesky MW, Bouley R, Ballard A, Biddy BA, Suckow MA, Wolter WR, Schroeder VA, Burnham CA, Mobashery S, et al. (2015). Synergistic, collaterally sensitive β -lactam combinations suppress resistance in MRSA. *Nature Chem Biol* 11: 855–861.
50. Gupta S, Cohen KA, Winglee K, Maiga M, Diarra B, Bishai WR. (2014). Efflux inhibition with verapamil potentiates bedaquiline in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 58:574–6.
51. Hall BG, Salipante SJ, Barlow M. (2003). The metallo- β -lactamases fall into two distinct phylogenetic groups. *J Mol Evol.* 57:249–254.
52. Hall BG, Barlow M. (2005). Revised Ambler classification of β -lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 55:1050–1051.
53. Igbinosa, I., Igbinosa, E., 2015. The Pseudomonads as a versatile opportunistic pathogen in the environment, pp. 822e831.
54. Jacoby, G. A. 2009. AmpC β -lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 22:161–182.
55. Jason B.Sauberan and John S.Bradley. (2018). “*Principles and practice of Pediatric infectious disease – Antimicrobial Agents*”. Elsevier, pages 1499 – 1531.e3.
56. Karen Bush and George A. Jacoby. (2010). “*Updated Functional Classification of β -Lactamases*”. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, p. 969–976.

57. Karen Bush and Patricia A. Bradford. (2016). B-lactams and β -lactamase inhibitors: An Overview. Cold Spring Harb Perspect Med. doi: 10.1101/cshperspect.a025247.
58. Kazmierczak, K. M., Sharon Rabine, Meredith Hackel, Robert E McLaughlin, Douglas J Biedenbach, Samuel K Bouchillon, Daniel F Sahm, Patricia A Bradford (2016). Multiyear, multinational survey of the incidence and global distribution of metallo- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 60, 1067–1078.
59. K. Bush. (2018). “Past and present perspectives on betalactamases, Antimicrob. Agents Chemother”. 62.
60. Kernodle, D. S., C. W. Stratton, L. W. McMurray, J. R. Chipley, and P. A. McGraw. 1989. Differentiation of β -lactamase variants of *Staphylococcus aureus* by substrate hydrolysis profiles. J. Infect. Dis. 159:103–108.
61. Köhler, T.; Perron, G.G.; Buckling, A.; van Delden, C. (2010). Quorum Sensing Inhibition Selects for Virulence and Cooperation in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog.* 6, e1000883.
62. K.M. Papp-Wallace, A. Endimiani, M.A. Taracila, R.A. Bonomo. (2011). *Carbapenems: Past, Present and Future*. Ant. Agents Chem. 55, 4943–4960. <https://doi.org/10.1128/aac.00296-11>.
63. Krajnc, A.; Brem, J.; Hinchliffe, P.; Calvopiña, K.; Panduwawala, T. D.; Lang, P. A.; Kamps, J. J. A. G.; Tyrrell, J. M.; Widlake, E.; Seward, B. G.; Walsh, T. R.; Spencer, J.; Schofield, C. J. (2019). “Bicyclic boronate VNRX-5133 inhibits metallo- and serine- β -lactamases”. J. Med. Chem., 62, 8544–8556.
64. Kumar A, Schweizer HP. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliver Rev.* 57:1486–1513.
65. Kwon, D.H.; Lu, C.-D. (2006). Polyamines Increase Antibiotic Susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 1623–1627
66. Leimbach A., Hacker J., Dobrindt U.: (2013). “E. coli as an allrounder: the thin line between commensalism and pathogenicity”. *Curr Topics Microbiol Immunol*; 358:3-32.
67. Li, Y.-Q.; Sun, X.-X.; Feng, J.-L.; Mo, H.-Z. (2015). «Antibacterial activities and membrane permeability actions of glycinin basic peptide against *Escherichia coli*.» *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 31, 170–176.
68. Lidia Moreira Lima, Bianca Nascimento Monteiro da Silva, Gisele Barbosa, Eliezer J. Barreiro. (2020). “ β -Lactam antibiotics: an overview from a medicinal chemistry perspective”. *European Journal of Medicinal Chemistry*. S0223-5234(20)30801-1.

69. Lingzhi Li, Haojie Ge, Dan Gu, Hongmei Meng, Yang Li, Mengdie Jia, Chengkun Zheng, Xiaohui Zhou. (2018). “*The role of two-component regulatory system in β -lactam antibiotics resistance*”. Elsevier. Volume 215, October 2018, Pages 126-129.
70. Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M, et al. (2001). Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel agents for combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 45:105–16.
71. L. Poirel, P. Nordmann. (2006). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology, *Clin. Microbiol. Infect.* 12, 826–836.
72. Lynn Peters, Linus Olson, Dung T. K. Khu, Sofia Linnros, Ngai K. Le, Håkan Hanberger, Ngoc T. B. Hoang, Dien M. Tran, Mattias Larsson. (2019). “Multiple antibiotic resistance as a risk factor for mortality and prolonged hospital stay: A cohort study among neonatal intensive care patients with hospital-acquired infections caused by gram-negative bacteria in Vietnam. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215666>.”
73. Marchiaro, P., V. Ballerini, T. Spalding, G. Cera, M. A. Mussi, J. MoranBarrio, A. J. Vila, A. M. Viale, and A. S. Limansky. 2008. A convenient microbiological assay employing cell-free extracts for the rapid characterization of Gram-negative carbapenemase producers. *J. Antimicrob. Chemother.* 62:336–344.
74. Martinez JL. (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discov Today.* 11:33–39.
75. Matthew, M. 1979. Plasmid mediated β -lactamases of gram-negative bacteria: properties and distribution. *J. Antimicrob. Chemother.* 5:349–358.
76. Melise Chaves Silveira, Rangeline Azevedo da Silva, Fábio Faria da Mota, Marcos Catanho, Rodrigo Jardim, Ana Carolina R Guimarães and Antonio B de Miranda. (2018). Systematic Identification and Classification of β -Lactamases Based on Sequence Similarity Criteria: β -Lactamase Annotation. *Evolutionary Bioinformatics.* Volume 14: 1–11. Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil.
77. Meng Wang, Hongyan Wei, Yaxin Zhao, Linlin Shang, Linlin Di, Chuanfeng Lyu, and Jun Liu. (2019). “Analysis of multidrug-resistant bacteria in 3223 patients with hospital-acquired infections (HAI) from a tertiary general hospital in China”. *Bosn J Basic Med Sci.* 2019 Feb; 19(1): 86–93. doi: 10.17305/bjbms.2018.3826.
78. Mercuri, P. S., Y. Ishii, L. Ma, G. M. Rossolini, F. Luzzaro, G. Amicosante, N. Franceschini, J. M. Fre`re, and M. Galleni. 2002. Clonal diversity and metallo- β -lactamase production in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Microb. Drug Resist.* 8:193–200.

79. Miller WR, Munita JM, Arias CA. (2014). Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev Anti-Infe.* 12:1221–1236.
80. Miller RL, Shtessel M, Robinson LB, Banerji A. Advances in drug allergy, urticaria, angioedema, and anaphylaxis in 2018. *J Allergy Clin Immunol.* 2019 Aug;144(2):381-392.
81. Monogue, M. L.; Giovagnoli, S.; Bissantz, C.; Zampaloni, C.; Nicolau, D. P. (2018). “ In vivo efficacy of meropenem with a novel non- β -lactam- β -lactamase inhibitor, nacubactam, against Gram-negative organisms exhibiting various resistance mechanisms in a murine complicated urinary tract infection model”. *Antimicrob. Agents Chemother*, 62, e02596-17.
82. Moya, B.; Barcelo, I. M.; Bhagwat, S.; Patel, M.; Bou, G.; Papp-Wallace, K. M.; Bonomo, R. A.; Oliver, A. (2017). “Potent β -lactam enhancer activity of zidebactam and WCK 5153 against *Acinetobacter baumannii*, including carbapenemase-producing clinical isolates”. *Antimicrob. Agents Chemother*, 61, e01238-17.
83. Moya, B.; Barcelo, I. M.; Cabot, G.; Torrens, G.; Palwe, S.; Joshi, P.; Umkar, K.; Takalkar, S.; Periasamy, H.; Bhagwat, S.; Patel, M.; Bou, G.; Oliver, A. (2019).” In vitro and in vivo activities of β -lactams in combination with the novel β -lactam enhancers zidebactam and WCK 5153 against multidrug-resistant metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*”. *Antimicrob. Agents Chemother*, 63, e00128- 19.
84. M. Salouti and A. Ahangari, IntechOpen, 2014, DOI: 10.5772/58423.
85. Mugnier, P.D.; Poirel, L.; Naas, T.; Nordmann, P. (2009). Worldwide Dissemination of the *bla*_{OXA-23} Carbapenemase Gene of *Acinetobacter baumannii* 1. *Emerg. Infect. Dis.*, 16, 35–40.
86. Naylor NR, Atun R, Zhu N, Kulasabanathan K, Silva S, Chatterjee A, Knight GM, Robotham JV. 2018. Estimating the burden of antimicrobial resistance: a systematic literature review. *Antimicrob Resist Infect Control* 7:58.
87. Newton GGF, Abraham EP. 1956. Isolation of cephalosporin C, a penicillin-like antibiotic containing d- α amino adipic acid. *Biochem J* 62: 651–658.
88. Nikaido, H. (2003). Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 593–656.
89. Nordmann, P., and H. Mammeri. 2007. Extended-spectrum cephalosporinases: structure, detection and epidemiology. *Future Microbiol.* 2:297–307.
90. Otero LH, Rojas-Altuve A, Llarrull LI, Carrasco-Lopez C, Kumarasiri M, Lastochkin E, Fishovitz J, Dawley M, Hesek D, Lee M, et al. (2013). How allosteric control of *Staphylococcus aureus* penicillin binding protein 2a enables methicillin resistance and physiological function. *Proc Natl Acad Sci* 110: 16808–16813.

91. Pandey N, Cascella M. Beta Lactam Antibiotics. [Updated 2022 Feb 5]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-.
92. Papp-Wallace, K. M.; Bonomo, R. A. (2016). New β -lactamase inhibitors in the clinic. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, 30, 441–464.
93. Peleg, A.Y.; Seifert, H.; Paterson, D.L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.*, 21, 538–582.
94. Petroni, A., R. G. Melano, H. A. Saka, A. Garutti, L. Mange, F. Pasteran, M. Rapoport, M. Miranda, D. Faccone, A. Rossi, P. S. Hoffman, and M. F. Galas. 2004. CARB-9, a carbenicillinase encoded in the VCR region of *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 belongs to a family of cassette-encoded β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:4042–4046.
95. Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem-hydrolyzing β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41:223–232.
96. Podlecka D, Jerzynska J, Malewska-Kaczmarek K, Stelmach I. (2019). A Case of a Child With Several Anaphylactic Reactions to Drugs. *Glob Pediatr Health.*;6:2333794X19855287.
97. Potron, A., L. Poirel, J. Croize', V. Chanteperdrix, and P. Nordmann. 2009. Genetic and biochemical characterization of the first extended-spectrum CARB-type β -lactamase, RTG-4, from *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:3010–3016.
98. Poirel, L., C. Heritier, V. Tolun, and P. Nordmann. 2004. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:15–22.
99. Pottegard A, Broe A, Aabenhus R, Bjerrum L, Hallas J, Damkier P. 2015. Use of antibiotics in children: A Danish nationwide drug utilization study. *PediatrInfectDis J* 34: e16–e22.
100. Quale, J., S. Bratu, J. Gupta, and D. Landman. 2006. Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:1633–1641.
101. Queenan, A. M., B. Foleno, C. Gownley, E. Wira, and K. Bush. 2004. Effects of inoculum and β -lactamase activity in AmpC- and extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates tested by using NCCLS ESBL methodology. *J. Clin. Microbiol.* 42:269–275.
102. Queenan, A. M. & Bush, K. (2007). Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 440–458.
103. Reygaert WC. (2009). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): molecular aspects of antimicrobial resistance and virulence. *Clin Lab Sci.*22:115–119.
104. Rumbo, C.; Gato, E.; López, M.; Ruiz de Alegría, C.; Fernández-Cuenca, F.; Martínez-Martínez, L.; Vila, J.; Pachón, J.; Cisneros, J.M.; Rodríguez-Baño, J.; et al. (2013). Contribution

- of efflux pumps, porins, and β -lactamases to multidrug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 57, 5247–5257.
105. Rutherford, S.T.; Bassler, B.L. (2012). Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a012427.
 106. R.B. Sykes, D.P. Bonner, K. Bush, N.H. Georgopapadakou, Aztreonam. (1982). "A synthetic monobactam specifically active against aerobic gram-negative bacteria." *Antimicrob. Agents Chemother.* 21, (suppl 26, 776), 85-92. <https://doi.org/10.1128/aac.21.1.85M>.
 107. Reffuveille, F.; de la Fuente-Núñez, C.; Mansour, S.; Hancock, R.E.W. (2014). A Broad-Spectrum Antibiofilm Peptide Enhances Antibiotic Action against Bacterial Biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 58, 5363–5371.
 108. Robin, F., J. Delmas, C. Chanal, D. Sirot, J. Sirot, and R. Bonnet. 2005. TEM-109 (CMT-5), a natural complex mutant of TEM-1 β -lactamase combining the amino acid substitutions of TEM-6 and TEM-33 (IRT-5). *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:4443–4447.
 109. Roll, D. M.; Yang, Y.; Wildey, M. J.; Bush, K.; Lee, M. D. (2010). Inhibition of metallo- β -lactamases by pyridine monothiocarboxylic acid analogs. *J. Antibiot.*, 63, 255–257.
 110. Roy, C., A. Foz, C. Segura, M. Tirado, C. Fuster, and R. Reig. 1983. Plasmid-determined β -lactamases identified in a group of 204 ampicillin-resistant Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob. Chemother.* 12:507–510.
 111. Sayar MS, Altay FA. (2020). *Acinetobacter* spp. Enfeksiyonunda iki önemli risk faktörü: Hemodiyaliz ve hipoalbuminemi. *Phnx Med J*;2:25-34.
 112. Smoum, R.; Rubinstein, A.; Dembitsky, V. M.; Srebnik, M. (2012). "Boron containing compounds as protease inhibitors". *Chem. Rev.* 112, 4156–4220.
 113. S. Han, R.P. Zaniewski, E.S. Marr, B.M. Lacey, A.P. Tomaras, A. Evdokimov, J. R. Miller, V. Shanmugasundaram. (2010). "Structural basis for effectiveness of siderophore-conjugated monocarbams against clinically relevant strains of *Pseudomonas aeruginosa*". *PNAS, USA*, 107, 22002 – 22007. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013092107>.
 114. Shapiro, A. B. (2017). Kinetics of sulbactam hydrolysis by β -lactamases, and kinetics of β -lactamase inhibition by sulbactam. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 61, e01612-17.
 115. Stec, B., Holtz, K. M., Wojciechowski, C. L., and Kantrowitz, E. R. (2005) Structure of the wild-type TEM1 β -lactamase at 1.55 Å and the mutant enzyme Ser70Ala at 2.1 Å suggest the mode of noncovalent catalysis for the mutant enzyme, *Acta Cryst.*, 61, 1072-1079, doi: 10.1107/S09074444905014356.
 116. Sudo T, Murakami Y, Uemura K, Hashimoto Y, Kondo N, Nakagawa N, Ohge H, Sueda T. (2014). Perioperative antibiotics covering bile contamination prevent abdominal infectious

- complications after pancreatoduodenectomy in patients with preoperative biliary drainage. *World J Surg* 38: 2952–2959.
117. Towner, K.J. (2009). Acinetobacter: An old friend, but a new enemy. *J. Hosp. Infect.*, 73, 355–363.
 118. Thakuria B, Lahon K. The Beta Lactam Antibiotics as an Empirical Therapy in a Developing Country: An Update on Their Current Status and Recommendations to Counter the Resistance against Them. *J ClinDiagnRes*. 2013 Jun;7(6):1207-14.
 119. T. Palzkill. (2013). “Metallo-beta-lactamase structure and function”. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1277, 91–104.
 120. Turton, J. F., M. E. Ward, N. Woodford, M. E. Kaufmann, R. Pike, D. M. Livermore, and T. L. Pitt. 2006. The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 258:72–77.
 121. Usman Umar Zango, Munir Ibrahim, Sadiq Abdurrahman Abubakar Shawai, Ibrahim Muhammad Shamsuddin. (2019). “A review on β -lactam antibiotic drug resistance”. *MOJ Drug Design Development & Therapy*. Med Grave, Volume 3, issue 2.
 122. Yu, W. L., W. C. Ko, K. C. Cheng, H. E. Chen, C. C. Lee, and Y. C. Chuang. 2008. Institutional spread of clonally related *Serratia marcescens* isolates with a novel AmpC cephalosporinase (S4): a 4-year experience in Taiwan. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 61:460–467.
 123. Van Acker H, Van Dijck P, Coenye T. (2014). Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. *Trends Microbiol.*22:326–333.
 124. Walther-Rasmussen, J., and N. Hoiby. 2004. Cefotaximases (CTX-M-ases), an expanding family of extended-spectrum β -lactamases. *Can. J. Microbiol.* 50:137–165.
 125. Walther-Rasmussen, J., and N. Høiby. 2006. OXA-type carbapenemases. *J. Antimicrob. Chemother.* 57:373–383.
 126. Wanda C Reygaert. (2018). “An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria”. *AIMS Microbiol.* 4(3): 482–501.
 127. Wagner, S.; Sommer, R.; Hinsberger, S.; Lu, C.; Hartmann, R.W.; Empting, M.; Titz, A. (2016). Novel Strategies for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *J. Med. Chem.* 59, 5929–5969.
 128. W.E. Paul. (2016). *Meyler’s Side Effects of Drugs: Monobactams*. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 1097–1099. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-53717-1.01103-3>.
 129. W.H. Goessens, A.K. van der Bij, R. van Boxtel, J.D. Pitout, P. van Ulsen, D.C. Melles, et al. (2013). «Antibiotic trapping by plasmid-encoded CMY-2 beta-lactamase combined with reduced

- outer membrane permeability as a mechanism of carbapenem resistance in *Escherichia coli*», *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 3941–3949.
130. W. Ke, C.R. Bethel, J.M. Thomson, R.A. Bonomo, F. van den Akker. (2007). Crystal structure of KPC-2: insights into carbapenemase activity in class A beta-lactamases, *Biochemistry.* 46. 5732–5740.
131. Wong, D.; Nielsen, T.B.; Bonomo, R.A.; Pantapalangkoor, P.; Luna, B.; Spellberg, B. (2017). Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: A century of challenges. *Clin. Microbiol. Rev.*, 30, 409–447.
132. World Health Organization. 2017. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics.<http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL>. Accessed 2 November 2019.
133. Zheng Pang, Renee Raudonis, Bernard R. Glick, Tong-Jun Lin, Zhenyu Cheng. (2018). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances.* Elsevier 37 (1), 177e192.
134. Zheng Pang, Renee Raudonis, Bernard R. Glick, Tong-Jun Lin, Zhenyu Cheng. (2018). « Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies». *Biotechnology Advances* 37 (2019), 177 – 192.
135. Zscheck, K. K., and B. E. Murray. 1991. Nucleotide sequence of the β -lactamase gene from *Enterococcus faecalis* HH22 and its similarity to staphylococcal β -lactamase genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:1736–1740.

Λιαδικτυακές Πηγές

1. <https://www.galinos.gr>
2. Infectious Disease & antimicrobial agents – <http://www.antimicrobe.org>
3. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/antimicrobial-resistance-policy-brief-2022.pdf>.
4. Antimicrobial consumption Database ESAC – Net: <https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-consumption/surveillance-and-disease-data/database>.