



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΟ ΤΜΗΜΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
«ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ (ΒΒΕ)»
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ (ΜΔΕ)

Αντοχή της *Klebsiella pneumoniae* στα αντιβιοτικά



ΚΟΥΠΙΔΟΥ ΓΕΩΡΓΙΑ

Επιβλέπων Καθηγητής: Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα,
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

Ιωάννινα 2019



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΟ ΤΜΗΜΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
«ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ (ΒΒΕ)»
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ (ΜΔΕ)

Αντοχή της *Klebsiella pneumoniae* στα αντιβιοτικά



ΚΟΥΠΙΔΟΥ ΓΕΩΡΓΙΑ

Επιβλέπων Καθηγητής: Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

Ιωάννινα 2019

«Η έγκριση της Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

Μεταπτυχιακός φοιτητής: Κουπίδου Γεωργία

«Αντοχή της *Klebsiella pneumoniae* στα αντιβιοτικά»

Επιβλέπων Καθηγητής:

Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Ιατρικό Τμήμα,

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ημερομηνία παρουσίασης: 17-4-2019

Εξεταστική Επιτροπή:

- Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα, Αναπλ. Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Ιατρικό Τμήμα,
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
- Λεβειδιώτου-Στεφάνου Σταματίνα, Ομ. Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Ιατρικό Τμήμα,
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
- Σακκάς Ηρακλής, Λέκτορας Μικροβιολογίας, Ιατρικό Τμήμα, Πανεπιστήμιο
Ιωαννίνων

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα κ. Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα, Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του τμήματος Ιατρικής Ιωαννίνων, για την επίβλεψη, την καθοδήγηση και την υποστήριξη καθ' όλη την διάρκεια της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας. Ήταν πάντα διαθέσιμη να μου προσφέρει τις γνώσεις της και την ευχαριστώ για την επικοινωνιακή συνεργασία μας.

Θερμές ευχαριστίες απευθύνω σε όλους τους καθηγητές του μεταπτυχιακού προγράμματος Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες (BBE), και ιδιαίτερα στην κ. Πάτρα Βεζυράκη, Καθηγήτρια Φυσιολογίας του τμήματος Ιατρικής Ιωαννίνων, για την στήριξή της σε όλη την πορεία μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα.

Επίσης θερμές ευχαριστίες απευθύνω στα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής κ. Λεβειδιώτου-Στεφάνου Σταματίνα, Ομότιμη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας τμήματος Ιατρικής Ιωαννίνων και τον κ. Σακκά Ηρακλή, Λέκτορα Μικροβιολογίας τμήματος Ιατρικής Ιωαννίνων για την πολύτιμη βοήθειά τους, την μετάδοση γνώσεων και την καθοδήγησή τους στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος BBE.

Θα ήθελα επίσης να απευθύνω τις ευχαριστίες μου και την αγάπη μου στους γονείς μου Κουπίδη Κοσμά και Κουπίδου Ισμήνη, καθώς και στα αδέρφια μου Χρύσα-Κωστή-Ιωάννη-Σάκη οι οποίοι με στηρίζουν, με εμπυχώνουν και είναι πάντα δίπλα μου με την αγάπη τους και την συμπαράστασή τους.

Γεωργία Κουπίδου, Ιωάννινα, 2019

Πρόλογος

Η ανακάλυψη και εφαρμογή των αντιβιοτικών στη θεραπεία των λοιμώξεων αποτέλεσε σταθμό της ιατρικής επιστήμης. Εντούτοις, ως επακόλουθο κυρίως της ευρείας χρήσης τους, αναπτύχθηκε μικροβιακή αντοχή, η οποία δημιούργησε σοβαρά εμπόδια στην αποτελεσματική θεραπεία. Η μικροβιακή αντοχή στα αντιβιοτικά αποτελεί μείζον πρόβλημα για τη δημόσια υγεία διεθνώς, αλλά και στην Ελλάδα. Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται η εμφάνιση και διασπορά στα νοσοκομεία στελεχών μικροβίων, ανθεκτικών στα διάφορα είδη αντιβιοτικών και κυρίως στις καρβαπενέμες (που αποτελούν την ισχυρότερη ομάδα αντιβιοτικών), εξαιτίας της παραγωγής β-λακταμασών (καρβαπενεμασών) καθώς επίσης και στην τιγκεκυκλίνη και κολιστίνη, οι οποίες αποτελούν αντιβιοτικά τελευταίας επιλογής για τις λοιμώξεις από την *Klebsiella pneumoniae*, που είναι ανθεκτικές σε καρβαπενέμες.

Οι επιπτώσεις της αντοχής είναι πολλαπλές:

- ❖ περιορισμός των θεραπευτικών επιλογών
- ❖ αύξηση της θνητότητας και νοσηρότητας
- ❖ αύξηση κόστους νοσηλείας και πολλαπλασιασμός του κόστους στις υπηρεσίες υγείας.

Η *K.pneumoniae* είναι ένα σημαντικό παθογόνο βακτήριο, ανθεκτικό σε πολλά αντιβιοτικά και αποτελεί σημαντική πηγή νοσοκομειακών λοιμώξεων που συνδέονται με υψηλή νοσηρότητα και θνητότητα λόγω περιορισμένων επιλογών θεραπείας. Η παρούσα μελέτη έχει ως στόχο την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας που αφορά την διερεύνηση της μικροβιακής αντοχής στα αντιβιοτικά της *K.pneumoniae*.

«Δεν υπάρχει πιθανώς κανένα χημικοθεραπευτικό φάρμακο στο οποίο, σε κατάλληλες περιπτώσεις, τα βακτήρια δεν μπορούν να αντιδράσουν αποκτώντας αντοχή».
Alexander Fleming, 1946

Πίνακας περιεχομένων

Πρόλογος.....	8
Πίνακας περιεχομένων	10
Πίνακας εικόνων.	13
Πίνακες.....	15
Σχήματα	15
1. Εισαγωγή	16
1.1 Ιστορική αναδρομή	16
2. <i>Klebsiella spp</i> : Ταξινόμηση και επιδημιολογία	17
2.1. Χαρακτηριστικά.....	20
2.2 Βιοχημικές ιδιότητες.....	21
2.3 Αντιγονική δομή	21
2.4 Παθογόνος δράση	23
2.5 Παθογενετικοί μηχανισμοί	24
2.6 Διάγνωση	25
2.7 Θεραπεία.....	26
3. Αντιβιοτικά-Ιστορική αναδρομή	27
3.1 Ομάδες αντιβιοτικών	29
3.2. Ιδιότητες αντιβιοτικών.....	30
3.3 β-λακταμικά αντιβιοτικά	30
3.3.1 Κατηγορίες β-λακταμικών αντιβιοτικών	32
3.3.2 Πενικιλίνες	32
3.3.3 Κεφαλοσπορίνες	33
3.3.4 Καρβαπενέμες	34

3.3.5 Άλλα β-λακταμικά	34
3.3.6 Αναστολείς β-λακταμασών που δεν διαθέτουν β-λακταμικό δακτύλιο	35
3.4 Αμινογλυκοσίδες	35
3.5 Κινολόνες.....	37
3.6. Πολυμυξίνες	37
3.7 Τετρακυκλίνες	38
3.8 Μηχανισμοί δράσης αντιβιοτικών	39
3.9 Μηχανισμοί αντοχής της <i>K.pneumoniae</i> στα αντιβιοτικά	41
3.9.1 Μειωμένη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης	42
3.9.2 Τροποποιημένος στόχος, αλλαγή διαμόρφωσης των σημείων δράσης των αντιβιοτικών	43
3.9.3 Ενεργητική απέκκριση μέσω της αντλίας εκροής αντιβιοτικού	43
3.9.4 Παραγωγή ενζύμων και ενζυμική αδρανοποίηση των αντιβιοτικών	44
3.10 Μεταβίβαση μικροβιακής αντοχής.....	45
3.11. Τρόποι μεταβίβασης γονιδίων αντοχής	46
3.12 Αντοχή στις πενικιλίνες και τις κεφαλοσπορίνες	49
3.13 Κατάταξη β λακταμασών	49
3.13.1 Κατηγορία Α	50
3.13.2 Κατηγορία Β	53
3.13.3 Κατηγορία C	54
3.13.4 Κατηγορία D	55
3.14. Αντοχή στις καρβαπενέμες.....	55
3.15 Αντοχή στις αμινογλυκοσίδες.....	57
3.16. Αντοχή στις κινολόνες.....	58

3.17. Αντοχή στις πολυμυξίνες.....	58
3.18 Αντοχή στις τετρακυκλίνες.....	60
4. Τρόποι ελέγχου αντοχής.....	63
4.1 Φαινοτυπικές δοκιμασίες.....	63
4.2 Μοριακές τεχνικές.....	66
4.3 Διερεύνηση αντοχής της <i>K.pneumoniae</i> σε β-λακταμάσες.....	66
4.3.1 Φαινοτυπικές μέθοδοι.....	70
4.4 Διερεύνηση αντοχής της <i>K.pneumoniae</i> στις καρβαπενέμες.....	72
4.4.1 Μοριακή ανίχνευση των γονιδίων της καρβαπενεμάσης.....	79
4.5 Διερεύνηση αντοχής της <i>K.pneumoniae</i> σε AmpC.....	81
5. Επιδημιολογικά δεδομένα.....	82
5.1 Υπερβολική κατανάλωση αντιβιοτικών.....	82
5.2 Επιδημιολογικά δεδομένα για στελέχη <i>K.pneumoniae</i> ανθεκτικά σε β-λακτάμες, κυρίως αυτών που παράγουν καρβαπενεμάσες.....	85
5.3 Επιδημιολογία αντοχής της <i>K.pneumoniae</i> στα αντιβιοτικά: φθοριοκινολόνες, κεφαλοσπορίνες τρίτης γενεάς και αμινογλυκοσίδες.....	96
5.4 Επιδημιολογία αντοχής της <i>K.pneumoniae</i> στα αντιβιοτικά: πολυμυξίνες.....	101
5.5 Πρόβλεψη της μελλοντικής αντιμικροβιακής αντοχής της <i>K.pneumoniae</i> σε κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς και καρβαπενέμες έως το 2030.....	104
6. Εξάπλωση της <i>K.pneumoniae</i> και διασπορά ανθεκτικών στελεγχών.....	105
7. Περίληψη.....	107
8. Abstract.....	108
9. Βιβλιογραφία.....	109

Πίνακας εικόνων.

ΕΙΚΟΝΑ 1. THEODOR ALBRECHT EDWIN KLEBS.....	16
ΕΙΚΟΝΑ 2. ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΣΑΡΩΣΗΣ ΠΟΥ ΑΠΟΚΑΛΥΠΤΕΙ ΤΑ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ <i>K.pneumoniae</i>	20
ΕΙΚΟΝΑ 3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΚΑΨΑΣ ΣΤΗΝ ΛΟΙΜΟΓΟΝΟ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ <i>K.pneumoniae</i>	22
ΕΙΚΟΝΑ 4. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΛΙΠΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΗ ΣΤΗΝ ΛΟΙΜΟΓΟΝΟ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ <i>K.pneumoniae</i>	24
ΕΙΚΟΝΑ 5. ΤΕΣΣΕΡΙΣ ΚΑΛΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΕΝΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΛΟΙΜΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΚΛΑΣΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ <i>K.pneumoniae</i>	25
ΕΙΚΟΝΑ 6. SELMAN-WALKSMAN (1888-1973).	27
ΕΙΚΟΝΑ 7.ΤΟ ΧΑΣΜΑ ΣΤΗΝ ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ.	28
ΕΙΚΟΝΑ 8. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΟΥ ΤΟΙΧΩΜΑΤΟΣ ΠΕΠΤΙΔΟΓΛΥΚΑΝΗΣ.....	31
ΕΙΚΟΝΑ 9. ΒΑΣΙΚΕΣ ΔΟΜΕΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΟΙΝΩΣ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ Β-ΛΑΚΤΑΜΗΣ.	32
ΕΙΚΟΝΑ 10. ΓΕΝΙΚΗ ΔΟΜΗ ΠΕΝΙΚΙΛΛΙΝΩΝ.....	33
ΕΙΚΟΝΑ 11 ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΙΝΗΣ.	36
ΕΙΚΟΝΑ 12. ΔΡΑΣΕΙΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΑΝΑ ΕΙΔΟΣ.	39
ΕΙΚΟΝΑ 13. ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ.	42
ΕΙΚΟΝΑ 14. ΔΙΑΣΠΑΣΗ ΤΟΥ Β-ΛΑΚΤΑΜΙΚΟΥ ΔΑΚΤΥΛΙΟΥ ΑΠΟ ΤΗΝ Β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΗ.....	44
ΕΙΚΟΝΑ 15. ΑΠΟΚΤΗΣΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ.....	46
ΕΙΚΟΝΑ 16. ΧΑΡΤΗΣ ΕΝΟΣ ΦΥΣΙΚΟΥ R ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ R100.	47
ΕΙΚΟΝΑ 17. ΥΠΟΤΙΘΕΜΕΝΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΑΝΤΟΧΗΣ ΑΠΟ ΙΝΤΕΓΚΡΟΝΙΟ.	48
ΕΙΚΟΝΑ 18. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ.....	65
ΕΙΚΟΝΑ 19. ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΑΝΟΣΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΔΟΚΙΜΗ ΠΛΕΥΡΙΚΗΣ ΡΟΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΩΝ ΤΥΠΟΥ NDM(N), KPC(K) ΚΑΙ OXA-48(O).....	79
ΕΙΚΟΝΑ 20. ΓΡΑΦΗΜΑ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΑΝΑ ΕΤΟΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ.....	82
ΕΙΚΟΝΑ 21. ΓΡΑΦΗΜΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΙΚΗ ΧΡΗΣΗ ΣΤΗΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΣΤΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑΚΟ ΧΩΡΟ ΣΤΗΝ ΕΥΡΩΠΗ.	83
ΕΙΚΟΝΑ 22. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΙ ΣΕ 37 ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑ ΤΟ 2011-2012. ...	84
ΕΙΚΟΝΑ 23. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΙ ΣΕ 30 ΧΩΡΕΣ ΤΗΣ ΕΥΡΩΠΑΙΚΗΣ ΈΝΩΣΗΣ(ΕΕ) ΚΑΙ ΣΕ ΧΩΡΕΣ ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΙΚΟΥ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΟΥ ΧΩΡΟΥ (ΕΟΧ),2011-2012).	84
ΕΙΚΟΝΑ 24. ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑΣ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΩΝ 2017.....	86
ΕΙΚΟΝΑ 25. ΧΑΡΤΗΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑΣ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΩΝ ΤΟ 2017.	86
ΕΙΚΟΝΑ 26. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΧΑΡΤΗΣ ΤΩΝ <i>K.pneumoniae</i> ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΥΝ ΚΡC.....	88

ΕΙΚΟΝΑ 27. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΤΩΝ <i>K.pneumoniae</i> ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΥΝ ΚΡC ΑΝΑ ΧΩΡΕΣ/ΗΠΕΙΡΟΥΣ.....	89
ΕΙΚΟΝΑ 28. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΧΑΡΤΗΣ ΤΩΝ <i>K.pneumoniae</i> ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΥΝ NDM.	92
ΕΙΚΟΝΑ 29. ΠΑΓΚΟΣΜΙΑ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΗΣ <i>K.pneumoniae</i> ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΕΙ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ ΚΡC, ΟΧΑ, NDM. ...	95
ΕΙΚΟΝΑ 30. ΧΑΡΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΓΙΑ ΤΙΣ 3ΗΣ ΓΕΝΕΑΣ ΚΕΦΑΛΟΣΠΟΡΙΝΕΣ ΣΤΗΝ ΕΥΡΩΠΗ.....	97
ΕΙΚΟΝΑ 31. ΓΡΑΦΗΜΑ ΑΝΤΟΧΗΣ ΓΙΑ ΤΙΣ 3ΗΣ ΓΕΝΕΑΣ ΚΕΦΑΛΟΣΠΟΡΙΝΕΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ, (2005-2017).....	97
ΕΙΚΟΝΑ 32. ΧΑΡΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΓΙΑ ΤΙΣ ΦΘΟΡΙΟΚΙΝΟΛΟΝΕΣ ΣΤΗΝ ΕΥΡΩΠΗ.	98
ΕΙΚΟΝΑ 33. ΓΡΑΦΗΜΑ ΑΝΤΟΧΗΣ ΓΙΑ ΤΙΣ ΦΘΟΡΙΟΚΙΝΟΛΟΝΕΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ (2005-2017).	98
ΕΙΚΟΝΑ 34. ΧΑΡΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΓΙΑ ΤΙΣ ΑΜΙΝΟΓΛΥΚΟΣΙΔΕΣ ΣΤΗΝ ΕΥΡΩΠΗ.	99
ΕΙΚΟΝΑ 35. ΓΡΑΦΗΜΑ ΑΝΤΟΧΗΣ ΓΙΑ ΤΙΣ ΑΜΙΝΟΓΛΥΚΟΣΙΔΕΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ (2005-2017).	99
ΕΙΚΟΝΑ 36. ΧΑΡΤΗΣ «ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ» ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΟΜΑΔΕΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ (ΚΕΦΑΛΟΣΠΟΡΙΝΕΣ 3ΗΣ ΓΕΝΙΑΣ, ΦΘΟΡΙΟΚΙΝΟΛΟΝΕΣ ΚΑΙ ΑΜΙΝΟΓΛΥΚΟΣΙΔΕΣ) ΣΤΗΝ ΕΥΡΩΠΗ.....	100
ΕΙΚΟΝΑ 37. ΓΡΑΦΗΜΑ «ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ» ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΟΜΑΔΕΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ (ΚΕΦΑΛΟΣΠΟΡΙΝΕΣ 3ΗΣ ΓΕΝΙΑΣ, ΦΘΟΡΙΟΚΙΝΟΛΟΝΕΣ ΚΑΙ ΑΜΙΝΟΓΛΥΚΟΣΙΔΕΣ) ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ (2005-2017).	100
ΕΙΚΟΝΑ 38. ΣΧΗΜΑΤΙΚΟ ΧΡΟΝΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΟΧΗ ΤΗΣ <i>K.pneumoniae</i> ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ Β ΛΑΚΤΑΜΗΣ.	103
ΕΙΚΟΝΑ 39. ΟΔΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΤΗΣ <i>K.pneumoniae</i>	106

Πίνακες

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ	29
ΠΙΝΑΚΑΣ 2. ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΚΑΤΑ BUSH ET AL ΚΑΙ ΚΑΤΑ AMBLER.....	50
ΠΙΝΑΚΑΣ 3. Β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΕΣ ΑΝΑ ΟΜΑΔΑ, ΕΙΔΗ ΚΑΙ ΑΝΤΟΧΗ ΚΑΤΑ AMBLER.	52
ΠΙΝΑΚΑΣ 4. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΖΟΝΤΑΙ ΣΤΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΤΗΣ <i>K.pneumoniae</i>	56
ΠΙΝΑΚΑΣ 5. ΣΥΧΝΟΤΕΡΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΓΛΥΚΟΣΙΔΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΟΧΗ.....	57
ΠΙΝΑΚΑΣ 6. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ ΜΕ ΤΑ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΑ ΓΟΝΙΔΙΑ tet ΚΑΙ otr ^α	61
ΠΙΝΑΚΑΣ 7. ΔΕΙΚΤΕΣ ΚΕΦΑΛΟΣΠΟΡΙΝΗΣ ΓΙΑ ΕΛΕΓΧΟ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ, (EUCAST, 2017).	67
ΠΙΝΑΚΑΣ 8. ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗΣ ESBLS, (EUCAST, 2017).	69
ΠΙΝΑΚΑΣ 9. ΚΛΙΝΙΚΑ breakpoints ΚΑΙ ΤΙΜΕΣ cut-off ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΗΣ ΣΤΑ <i>ENTEROBACTERIACEAE</i> (EUCAST, 2017).	73
ΠΙΝΑΚΑΣ 10. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΩΝ ΔΟΚΙΜΑΣΙΩΝ (ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ ΜΕ ΕΝΤΟΝΟΥΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΕΣ) ΜΕ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΔΙΑΧΥΣΗΣ (EUCAST, 2017).	75

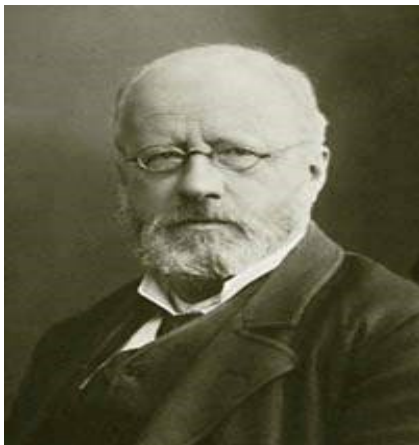
Σχήματα

ΣΧΗΜΑ 1 ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΣ ΓΙΑ ΤΗ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ESBLS (EUCAST, 2017).	68
ΣΧΗΜΑ 2. ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΗΣ (EUCAST, 2017).....	76
ΣΧΗΜΑ 3. ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΤΗΣ <i>K pneumoniae</i> ΣΕ ΚΕΦΑΛΟΣΠΟΡΙΝΕΣ ΤΡΙΤΗΣ ΓΕΝΙΑΣ (3G) ΚΑΙ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΕΣ (95% CI)	104

1. Εισαγωγή

Τα βακτήρια είναι μικροσκοπικοί, μονοκύτταροι (σπάνια πολυκύτταροι), προκαρυωτικοί οργανισμοί που συναντώνται σε κάθε είδους βióτοπο και σε πολύ μεγάλους αριθμούς. Έχουν απλή κυτταρική δομή, με κυτταρόπλασμα που περιέχει χρωμοσωμικό DNA, mRNA, ριβοσώματα, μεταβολίτες, κυτταροπλασματική μεμβράνη, κυτταρικό τοίχωμα και εξωτερικές δομές (π.χ. κάψα, βλεφαρίδες κ.τ.λ). Πολλά βακτήρια περιέχουν επίσης μικρά και αυτόνομα κυκλικά μόρια, τα πλασμίδια, τα οποία προσδίδουν το πλεονέκτημα της αντοχής σε ένα ή περισσότερα αντιβιοτικά (Greenwood, et al, 2010). Ανάλογα με την δομή του κυτταρικού τοιχώματος, τα βακτήρια κατατάσσονται σε Gram θετικά και Gram αρνητικά. Η οικογένεια των *Enterobacteriaceae* είναι η μεγαλύτερη ομάδα Gram-αρνητικών βακτηρίων στην οποία συμπεριλαμβάνεται η *Klebsiella pneumoniae*, ένα βακτήριο ιδιαίτερης ιατρικής σημασίας (Murray, et al, 2016).

1.1 Ιστορική αναδρομή



Εικόνα 1. Theodor Albrecht Edwin Klebs.

Στον **Edwin Klebs** (Εικόνα 1) οφείλει το όνομά της η *K.pneumoniae*, που προς τιμήν του ονομάστηκε έτσι, καθώς ήταν ο πρώτος που παρατήρησε το συγκεκριμένο βακτήριο. Ο **Carl Friedlander** το 1883 έκανε την περιγραφή του για το βακτήριο *Diplococcus* (τόρα *Klebsiella pneumoniae* Friedlander) ως αιτία μιας σπάνιας μορφής πνευμονίας, η οποία σήμερα φέρει το όνομά του (πνευμονία Friedlander) και γι' αυτό για πολλά χρόνια ονομαζόταν βάκιλος Friedlander (Friedlander, 1983).

2. *Klebsiella spp*: Ταξινόμηση και επιδημιολογία

Το γένος *Klebsiella* βρίσκεται παντού και είναι κοινό ευκαιριακό παθογόνο για τους ανθρώπους και τα ζώα, μπορεί επίσης να βρίσκεται ως μόνιμη ή παροδική χλωρίδα (ιδιαίτερα στο γαστρεντερικό σωλήνα). Μπορεί να βρεθεί σε λύματα, πόσιμο νερό, εδάφη, επιφανειακά ύδατα, βιομηχανικά απόβλητα και βλάστηση (Bagley, 1985). Πρόσφατες μελέτες με πάνω από 300 στελέχη της *K.pneumoniae*, υποστηρίζουν το διαχωρισμό αυτού του είδους σε τρία ξεχωριστά είδη, δηλαδή *K.pneumoniae*, *K.quasipneumoniae* και *K.variicola*. Μαζί με την *K.michiganensis* και την *K.oxytoca*, το γένος σήμερα αποτελείται από 5 είδη. Η *K.ozzaenae* και η *K.rhinoscleromatis* έχουν αναταξινομηθεί ως υποείδος της *K.pneumoniae* (Janda, 2015).

Η *Klebsiella pneumoniae* (*K.pneumoniae* subsp. *pneumoniae*) είναι ένα ευκαιριακό παθογόνο βακτήριο, που παρατηρείται με μεγάλη συχνότητα στον πληθυσμό, ενώ επιπλέον φέρει μεγάλο αριθμό γονιδίων που της προσδίδουν αντιμικροβιακή αντοχή (antimicrobial resistance, AMR). Είναι το είδος στο οποίο ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά αρκετά νέα γονίδια αντοχής πριν εξαπλωθούν σε άλλα παθογόνα (π.χ. γονίδια αντοχής σε καρβαπενέμη, όπως KPC, OXA-48 και NDM-1) (Wyres and Holt, 2018). Η αλληλουχία του γονιδιώματος της *K.pneumoniae* σχετίζεται στενά με αυτό της *Escherichia coli* K-12 (McClelland, et al, 2000) και το πλήρες γονιδίωμα της προσδιορίστηκε το 2006 στο Genome Sequencing Center στο Πανεπιστήμιο της Ουάσιγκτον στο St. Louis και ονομάστηκε *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* MGH 78578. Περιλαμβάνει ένα χρωμόσωμα 5,3 Mbp με το ποσοστό σε GC να ανέρχεται στο 57%. Διαθέτει επίσης πέντε πλασμίδια: pKPN3, pKPN4, pKPN5, pKPN6 και pKPN7 και κάθε μήκος πλασμιδίου είναι αντίστοιχα 0,18 Mbp, 0,11 Mbp, 0,089 Mbp, 0,0043 Mbp και 0,0035 Mbp. Το DNA είναι κυκλικό (Herzibah, et al, 2012). Συνολικά το γονιδίωμα περιλαμβάνει περίπου 5.300 γονίδια, από αυτά τα 5.184 είναι γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, 111 είναι γονίδια που κωδικοποιούν RNA και 3 είναι ψευδογονίδια. Όλα τα γονίδια RNA βρίσκονται στο χρωμόσωμα, ενώ 1 ψευδογονίδιο κωδικοποιείται στο χρωμόσωμα και τα άλλα στα pKPN3 και pKPN4 (Herzibah, et al, 2012).

Από τα πολλά είδη του γένους *Klebsiella*, η *K.pneumoniae* θεωρείται το πιο σημαντικό από ιατρική άποψη, προκαλώντας το 75% έως 86% των κλινικών λοιμώξεων από *Klebsiella* (Broberg, et al, 2014). Αποτελεί ένα ευκαιριακό παθογόνο σχετιζόμενο με ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις, υπεύθυνο για το 1/3 των λοιμώξεων γενικά από Gram αρνητικά βακτήρια. Είναι υπεύθυνη επίσης για την πρόκληση λοιμώξεων όπως ουρολοιμώξεις, σηψαιμία, περιτονίτιδα, ηπατικά αποστήματα, μηνιγγίτιδα, λοιμώξεις μαλακών μορίων, χειρουργικών τραυμάτων ενδοκαρδίτιδα, σηψαιμία και λοιμώξεις σχετιζόμενες με κεντρικούς φλεβικούς καθετήρες (Podschun and Ullmann, 1998). Ως ευκαιριακό παθογόνο, προσβάλλει πρωτίτως ανοσοκατασταλμένους ασθενείς που νοσηλεύονται με σοβαρά υποκείμενα νοσήματα, όπως σακχαρώδης διαβήτης, χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, νεοπλασίες υπό χημειοθεραπευτική αγωγή, αλλά και πρόωρα νεογνά νοσηλευόμενα σε Μονάδες Εντατικής Νοσηλείας Νεογνών. Ανευρίσκεται ως σαπρόφυτο στο ρινοφάρυγγα, τα χέρια του προσωπικού του νοσοκομείου και το γαστρεντερικό σύστημα (Podschun and Ullmann, 1998). Το ποσοστό ανίχνευσης στα κόπρανα ποικίλλει από 5% έως 38%, ενώ στο ρινοφάρυγγα από 1% έως 6%. Τα ποσοστά αλλάζουν δραματικά στο νοσοκομειακό περιβάλλον και αυξάνονται ανάλογα με τη διάρκεια νοσηλείας, ιδίως σε Μονάδες Εντατικής Θεραπείας. Σε συγκεκριμένες μελέτες σε νοσηλευόμενους ασθενείς τα ποσοστά φορέας ανέρχονταν σε 77 % στα κόπρανα, 19 % στο ρινοφάρυγγα και 42 % στα χέρια των ασθενών (Podschun and Ullmann, 1998). Έχει βρεθεί επίσης ότι τα λαχανικά και διάφορα τρόφιμα ζωικής προέλευσης στα οποία απομονώνεται *K.pneumoniae*, μπορεί να αποτελέσουν μια πιθανή δεξαμενή για νοσοκομειακή διασπορά ή άλλες μολύνσεις (Brown and Seidler, 1973), με αποτέλεσμα να διαδίδεται μέσα από νέες οδούς μετάδοσης, όπως η σύγχρονη τροφική αλυσίδα (Davis, et al, 2015). Η ικανότητα του μικροοργανισμού να μεταδίδεται γρήγορα και να «εφοδιάζεται» με γονίδια αντοχής σε αντιμικροβιακά φάρμακα, μέσω πλασμιδίων, οδηγεί σε νοσοκομειακές επιδημίες, ιδίως σε μονάδες νεογνών που πολλές φορές μπορεί να αποβούν μοιραίες (Kumar, et al, 2017). Οι ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις που οφείλονται σε πολυανθεκτικά στελέχη εμφανίζουν υψηλά ποσοστά θνητότητας. Η ορθολογική χρήση των αντιβιοτικών, η αυστηρή τήρηση των κανόνων διαχείρισης ουροκαθετήρων, τραχειοστομιών και τραυμάτων, η σωστή συντήρηση του νοσοκομειακού εξοπλισμού και το τακτικό πλύσιμο των χεριών του ιατρονοσηλευτικού

προσωπικού, αποτρέπουν την ενδονοσοκομειακή εξάπλωση του μικροοργανισμού (Montgomerie, 1979, Rock, et al, 2014).

Hypervirulent *K.pneumoniae* (hvKP). Έχει εμφανιστεί μια νέα υπερλοιμογόνος ποικιλία της *Klebsiella*, η hvKP (hypervirulent KP), η οποία αρχικά περιγράφηκε στην Ασιατική Pacific Rim, αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο στις δυτικές χώρες και αναμένεται να αποτελέσει σοβαρή απειλή (Diago-Navarro, et al, 2017). Προκαλεί σοβαρές και απειλητικές για τη ζωή λοιμώξεις της κοινότητας, προσβάλλει κυρίως νεαρούς υγιείς ξενιστές προκαλώντας ηπατικό απόστημα, πνευμονία, μηνιγγίτιδα, ενδοφθαλμίτιδα και εμφανίζει σημαντική νοσηρότητα και θνησιμότητα σε άτομα χωρίς υποκείμενα νοσήματα. Αν και εξακολουθούν να καθορίζονται τα επιδημιολογικά χαρακτηριστικά της, φαίνεται πως ο εντερικός αποικισμός είναι ένα κρίσιμο στάδιο, που οδηγεί σε λοίμωξη. Ωστόσο, η πύλη εισόδου παραμένει ασαφής. Τα χαρακτηριστικά που ενισχύουν τη μεγαλύτερη, συγκριτικά με τα άλλα στελέχη της *K.pneumoniae*, λοιμογόνο δύναμή της, είναι η ικανότητα του στελέχους να δεσμεύει αποτελεσματικότερα τον σίδηρο και να εκφράζει πολυσακχαριδική κάψα με υπερπαραγωγή βλέννης (Shon, et al, 2013).

Klebsiella oxytoca. Έχει απομονωθεί από διαφορετικά κλινικά δείγματα, κυρίως από αίμα και αναπνευστικές εκκρίσεις. Έχει κλινική σημασία σε ανοσοκατεσταλμένους και εξασθενημένους ασθενείς στις Μονάδες Εντατικής Θεραπείας (Singh, et al, 2016).

Klebsiella michiganensis sp.nov. Νέο στέλεχος που απομονώθηκε από οδοντόβουρτσα (Saha, et al, 2013).

Klebsiella quasipneumoniae sp.nov. Τα στελέχη έχουν απομονωθεί από καλλιέργειες ανθρώπινου αίματος (Brisse, et al, 2014).

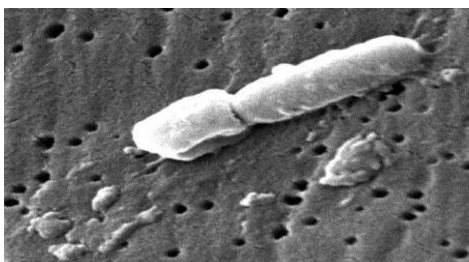
Υποείδη του γένους *K.pneumoniae*

Klebsiella ozaenae. Έχει απομονωθεί από ρινικό βλεννογόνο ασθενών με όζαινα νόσο που σχετίζεται με ατροφική ρινίτιδα (Dudley, 1987).

Klebsiella hinoscleromatis. Έχει απομονωθεί από ρινοσκλήρωμα -χρόνια κοκκιωματώδη νόσο της ρινός- ενδημική σε ορισμένες χώρες (Fusconi, et al, 2018).

2.1. Χαρακτηριστικά

Τα μέλη που ανήκουν στο είδος *K.pneumoniae* είναι Gram- αρνητικά βακτήρια μήκους 1-2 cm και φέρουν έλυτρο. Τα στελέχη διαφοροποιούνται με απλές βιοχημικές δοκιμασίες. Το έλυτρο παράγεται σε μεγαλύτερες ποσότητες, όταν τα μικρόβια αναπτύσσονται σε θρεπτικά υλικά που είναι πλούσια σε υδατάνθρακες. Υπό αυτές τις συνθήκες, σχηματίζουν πλούσιες γκριζωπές και εξαιρετικά βλενώδεις αποικίες στο άγαρ. Οι πολυσακχαρίτες των διαφόρων οροτύπων είναι πολύπλοκοι όξινοι πολυσακχαρίτες, και συνήθως περιέχουν γλυκουρονικό και πυροσταφυλικό οξύ (Greenwood, et al, 2010).



Εικόνα 2. Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης που αποκαλύπτει τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της *K.pneumoniae*.

ΠΗΓΗ: *Encyclopædia Britannica*.
<https://www.britannica.com/science/Klebsiella/media/319927/116889>

Είναι ακίνητες, αλλά τα περισσότερα στελέχη εκφράζουν ινίδια (Εικόνα 2). Οι οργανισμοί αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες μεταξύ 12° και 43°C (βέλτιστη στους 37°C) και καταστρέφονται από υγρή θερμότητα στους 55 °C για 30 λεπτά. Μπορούν να επιβιώσουν της ξηρασίας για μήνες, και εάν διατηρηθούν σε θερμοκρασία δωματίου, οι καλλιέργειες παραμένουν βιώσιμες για πολλές εβδομάδες. Είναι δυνητικώς αναερόβιες, ωστόσο η ανάπτυξή τους υπό αυστηρώς αναερόβιες συνθήκες είναι πτωχή. Δεν προκαλούν αιμόλυση των ερυθροκυττάρων αλόγου ή προβάτου (Podschun and Ullmann, 1998, Greenwood, et al, 2010).

2.2 Βιοχημικές ιδιότητες

Η *K.pneumoniae* είναι πολύ ενεργό βακτήριο. Οι βιοχημικές ιδιότητες που την χαρακτηρίζουν, είναι η ζύμωση διάφορων σακχάρων (όπως της γλυκόζης, της λακτόζης και άλλων) με ταυτόχρονη παραγωγή οξέος και αερίου.

Είναι αρνητική σε: Ινδόλη, Ορνιθίνη, Φαινυλαλανίνη, Κινητικότητα, H₂S, M.R (Methyl Red) και θετική σε: Ουρία, Λυσίνη, Αέριο από Γλυκόζη, Κιτρικό, VP (Voges-Proskauer) (Αρσένη, 1994).

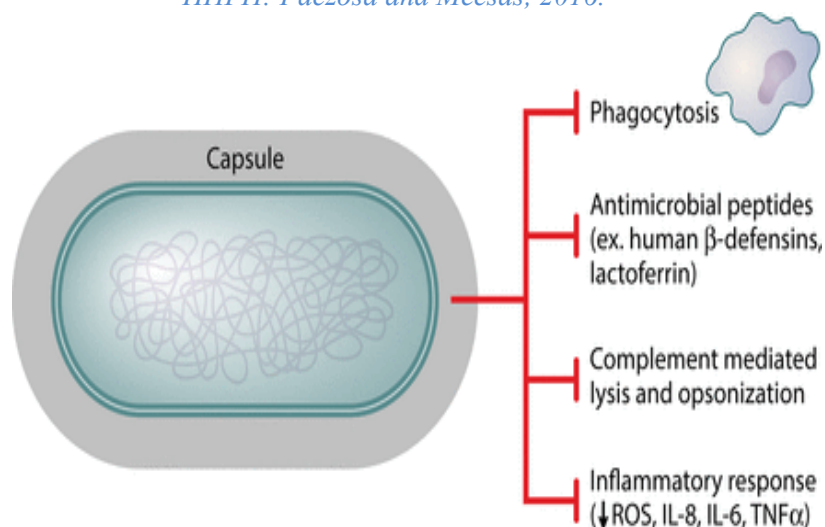
2.3 Αντιγονική δομή

Το αντιγόνο K της εξωτερικής μεμβράνης σχηματίζει την κάψα η οποία περιβάλλει εξωτερικά το βακτήριο. Ο σχηματισμός της κάψας επιδρά στην λοιμογόνο δύναμη της *K.pneumoniae* (Εικόνα 3), ενώ τα στελέχη που δεν φέρουν κάψα, δεν είναι ικανά να προκαλέσουν ασθένεια σε μοντέλα μόλυνσης ποντικών (Cortés, et al, 2002, Lawlor, et al, 2005) καθώς η κάψα:

- Αποτρέπει τη φαγοκυττάρωση των βακτηριδίων από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.
- Εμποδίζει την βακτηριοκτόνο δράση των αντιμικροβιακών πεπτιδίων.
- Μπλοκάρει τα συστατικά του συμπληρώματος, όπως το C3 κλάσμα, από την αλληλεπίδραση με τη μεμβράνη, εμποδίζοντας έτσι τη λύση και την καταστροφή του βακτηρίου με τη μεσολάβηση του συμπληρώματος.
- Αποτρέπει την ενεργοποίηση ανοσοαπόκρισης λόγω φλεγμονής, όπως φαίνεται από την μειωμένη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS, Reactive Oxygen Species), IL-8, IL-6 και TNF-α (Paczosa and Mecsas, 2016).

Εικόνα 3. Ο ρόλος της κάψας στην λοιμογόνο δράση της *K.pneumoniae*.

ΠΗΓΗ: Paczosa and Meccas, 2016.



Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί περίπου 79 καψιδικά αντιγόνα και έχουν παρατηρηθεί συσχετισμοί συγκεκριμένων οροτύπων με ασθένειες που προκαλούνται από την *K.pneumoniae*. Τα γονίδια που απαιτούνται για την παραγωγή κάψας σε στελέχη *K.pneumoniae* βρίσκονται στο χρωμοσωμικό οπερόνιο *cps* (Paczosa and Meccas, 2016). Τα στελέχη που εκφράζουν τους τύπους K1 ή K2 μπορεί να είναι ιδιαίτερα μολυσματικά. Έχει αποδειχτεί η υψηλή παρουσία του ορότυπου K1 σε ηπατικό απόστημα (63,4%) και σε ενδοφθαλμίτιδες (85,7%) (Fung, et al, 2002). Μελέτες έδειξαν ότι τα στελέχη που προκαλούν πυογόνα ηπατικά αποστήματα (PLA) ανήκουν στους ορότυπους K1 (~ 80%), K2, K5, K20, K54, K57. Στην Ταϊβάν, το K1 βρέθηκε συχνότερα μεταξύ απομονώσεων από βακτηριαμίες και το K2 βρέθηκε ως επί το πλείστον σε δείγματα της αναπνευστικής οδού. Στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική είναι συνηθισμένοι οι ορότυποι K2, K21 και K55. Η κατανομή των οροτύπων φαίνεται ότι διαφέρει σε παγκόσμιο επίπεδο (Hsu, et al, 2013). Για τα στελέχη hνKP μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί οκτώ καψιδικοί ορότυποι K1, K2, K5, K16, K20, K54, K57 και ο KN (Shon, et al, 2013).

2.4 Παθογόνος δράση

Η *K.pneumoniae* είναι γνωστός αιτιολογικός παράγοντας της πνευμονίας της κοινότητας και της νοσοκομειακής πνευμονίας, της βακτηριαιμίας και των λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος (UTIs). Έχει συσχετιστεί με πρόκληση κάποιες φορές σοβαρής βρογχοπνευμονίας, ενίοτε με χρόνιες καταστροφικές βλάβες και σχηματισμό πολλαπλών αποστημάτων στους πνεύμονες, όπως επίσης και με σηψαιμία, αλλά και ως αίτιο πυογόνων αποστημάτων του ήπατος (PLA) (Broberg, et al, 2014). Σε πολλές περιπτώσεις των λοιμώξεων από *K.pneumoniae* συνυπάρχει βακτηριαιμία και η θνητότητα είναι υψηλή (Chetcuti, et al, 2014). Η κατάσταση αυτή συνήθως, αλλά όχι πάντοτε, σχετίζεται με τους καψιδικούς τύπους 1-5. Ωστόσο μεγαλύτερη κλινική σημασία έχουν τα στελέχη *Klebsiella* ως αίτια ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων. Προκαλούν σηπτικές λοιμώξεις χειρουργικών τραυμάτων και λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος. Ο αποικισμός του αναπνευστικού συστήματος είναι συχνό φαινόμενο σε νοσοκομειακούς ασθενείς, οι οποίοι βρίσκονται σε αντιβιοτική αγωγή, αλλά η κλινική τους σημασία είναι συχνά δύσκολο να εκτιμηθεί. Η *K.pneumoniae* είναι από τη φύση της ανθεκτική σε πολλά αντιβιοτικά και αποκτά εύκολα αντοχή στα περισσότερα αντιβιοτικά από τα υπόλοιπα βακτήρια (Greenwood, et al, 2010).

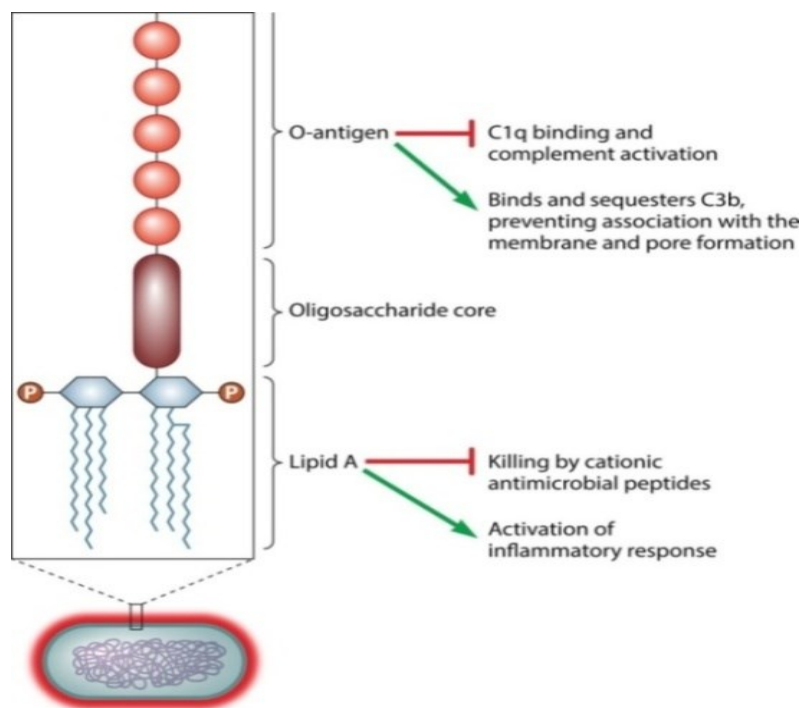
Το σύνδρομο Lemierre (LS) είναι μια σπάνια ασθένεια που προκαλείται συνήθως από *Fusobacterium spp*, χαρακτηρίζεται από φαρυγγική λοίμωξη με θρόμβωση της έσω σφαγίτιδας φλέβας και ακολουθείται από μεταστατικές λοιμώξεις σε άλλα όργανα. Μέχρι το 2006 είχαν περιγραφεί μόνο δύο περιπτώσεις LS που οφείλονταν σε *K.pneumoniae* και έως το 2012 έχουν δημοσιευθεί οκτώ ακόμη περιπτώσεις LS (σε ενήλικες μέσης ηλικίας), όπου η *K.pneumoniae* ήταν ο μοναδικός αιτιολογικός παράγοντας της νόσου ή συν-παθογόνος παράγοντας σε μεικτή καλλιέργεια. Από αυτούς τους ασθενείς με LS, 7 στους 10 είχαν σακχαρώδη διαβήτη ως υποκείμενο νόσημα και το ποσοστό θνητότητας των ασθενών με KLS ήταν 11% (Chuncharunee and Khawcharoenporn, 2015).

2.5 Παθογενετικοί μηχανισμοί

Οι κύριοι λοιμογόνιοι παράγοντες της *K.pneumoniae* που συμβάλλουν στην παθογένεια και έχουν χαρακτηριστεί μέχρι πρόσφατα είναι: ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS) Ο (Εικόνα 4), το αντιγόνο Κ της εξωτερικής μεμβράνης συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής υπερκαυσουλών σε στελέχη hν, τα ινίδια και οι μεταφορείς σιδήρου (Εικόνα 5) (Paczosa and Mecsas, 2016). Μία σημαντική παρατήρηση το 2011 από τον Wu MC, et al. ήταν ότι τα στελέχη hνKP παράγαν περισσότερο biofilms (βιο-υμενία) από τα κλασικά στελέχη ΚΡ, υποδηλώνοντας έτσι ότι ο σχηματισμός βιο-υμενίων μπορεί να συνεισφέρει στην αυξημένη λοιμογόνο δράση του (Shon, et al, 2013).

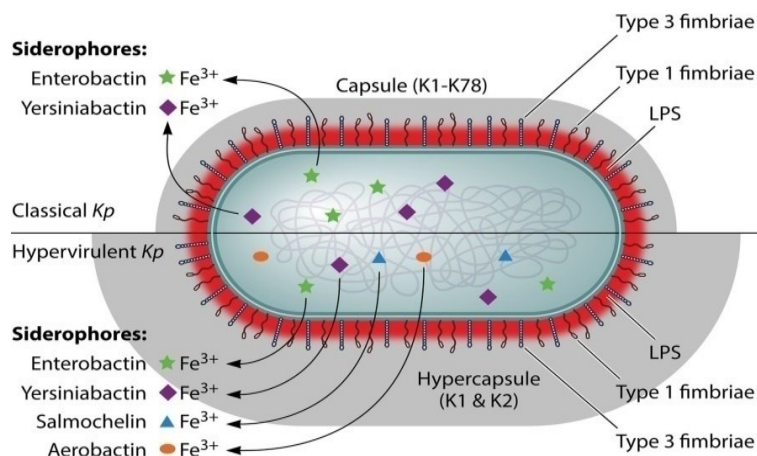
Εικόνα 4. Ο ρόλος του λιποπολυσακχαρίτη στην λοιμογόνο δράση της *K.pneumoniae*.

ΠΗΓΗ: Paczosa and Mecsas, 2016.



Εικόνα 5. Τέσσερις καλά χαρακτηρισμένοι παράγοντες λοιμογονικότητας σε κλασικά και ανθεκτικά στελέχη *K.pneumoniae*.

ΠΗΓΗ: Paczosa and Mecsas, 2016.



2.6 Διάγνωση

Η διάγνωση γίνεται ελέγχοντας διάφορα δείγματα, όπως αίματος, πυώδους υλικού, ούρων, υλικό τραύματος, δειγμάτων του αναπνευστικού κ.τ.λ. Οι συμβατικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση της *K.pneumoniae* περιλαμβάνουν συνήθως τη μικροσκοπική εξέταση, την καλλιέργεια των δειγμάτων, την βιοχημική ταυτοποίηση με εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια ή/και τη χρήση αυτοματοποιημένων συστημάτων όπως το σύστημα VITEK®2. Ωστόσο, είναι χρονοβόρες και απαιτούν συνήθως αρκετές ημέρες για την έκδοση του αποτελέσματος (Dong, et al, 2015). Πρόσφατα, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες τεχνικές μοριακής βιολογίας για την ανίχνευση της *K.pneumoniae*, όπως μέθοδοι PCR, τεχνικές με βάση τον υβριδισμό, μικροσυστοιχίες DNA (DNA microarrays) και η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος (WGS) (Al-Zahrani, 2018).

2.7 Θεραπεία

Οι λοιμώξεις από την *K.pneumoniae* που δεν παρουσιάζουν αντοχή στα αντιβιοτικά μπορούν να αντιμετωπιστούν με διάφορους τύπους αντιβιοτικών. Όμως, κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, υπήρξε αύξηση της αντοχής στελεχών *K.pneumoniae* σε ένα ευρύ φάσμα αντιβιοτικών. Ως συνέπεια αυτής της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, οι απλές λοιμώξεις, όπως οι λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος έχουν γίνει ανθεκτικές στη θεραπεία και οι πιο σοβαρές λοιμώξεις, όπως οι πνευμονίες και οι βακτηριαμίες έχουν γίνει πιο απειλητικές για τη ζωή (Boucher, et al, 2009). Αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται για την θεραπεία λοιμώξεων από *K.pneumoniae* είναι τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, όπως κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες, μόνα τους ή σε συνδυασμό με αναστολείς των β-λακταμασών, καθώς επίσης η τιγκεκυκλίνη, οι πολυμυξίνες, οι κινολόνες και οι αμινογλυκοσίδες. Η συνδυασμένη θεραπεία συνδέεται με υψηλότερα ποσοστά επιτυχίας της θεραπείας σε σύγκριση με τη μονοθεραπεία κατά την καταπολέμηση λοιμώξεων που οφείλονται σε βακτήρια που διαθέτουν γονίδια αντοχής (Lee and Burgess, 2012). Η συνδυασμένη θεραπεία κυρίως με κολιστίνη και με πολυμυξίνη Β έχει συσχετισθεί με μειωμένη θνησιμότητα σε στελέχη *K.pneumoniae* που είναι ανθεκτικά στις καρβαπενέμες (Medeiros, et al, 2019). Νεότερα αντιβιοτικά, όπως ο συνδυασμός κεφταζιδίμης με αβιμπακτάμη και κεφτολοζάνης με ταζομπακτάμη παρουσιάζουν εξαιρετική αποτελεσματικότητα σε σοβαρές λοιμώξεις *K.pneumoniae* με αντοχή στα αντιβιοτικά (Pflusa, 2018).

3. Αντιβιοτικά-Ιστορική αναδρομή

Το αντιβιοτικά είναι χημικές ενώσεις που εμποδίζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, όπως τα βακτήρια, οι μύκητες, ή τα πρωτόζωα χωρίς να προκαλούν βλάβες στον ξενιστή. Η πρώτη γνωστή χρήση αντιβιοτικών προέρχεται από τους αρχαίους Κινέζους πριν από περίπου 2.500 χρόνια. Ωστόσο και άλλοι αρχαίοι πολιτισμοί, όπως των αρχαίων Αιγυπτίων και των αρχαίων Ελλήνων, χρησιμοποιούσαν μύκητες και φυτά για τη θεραπεία διάφορων μολύνσεων, λόγω



Εικόνα 6. Selman-Walksman (1888-1973).

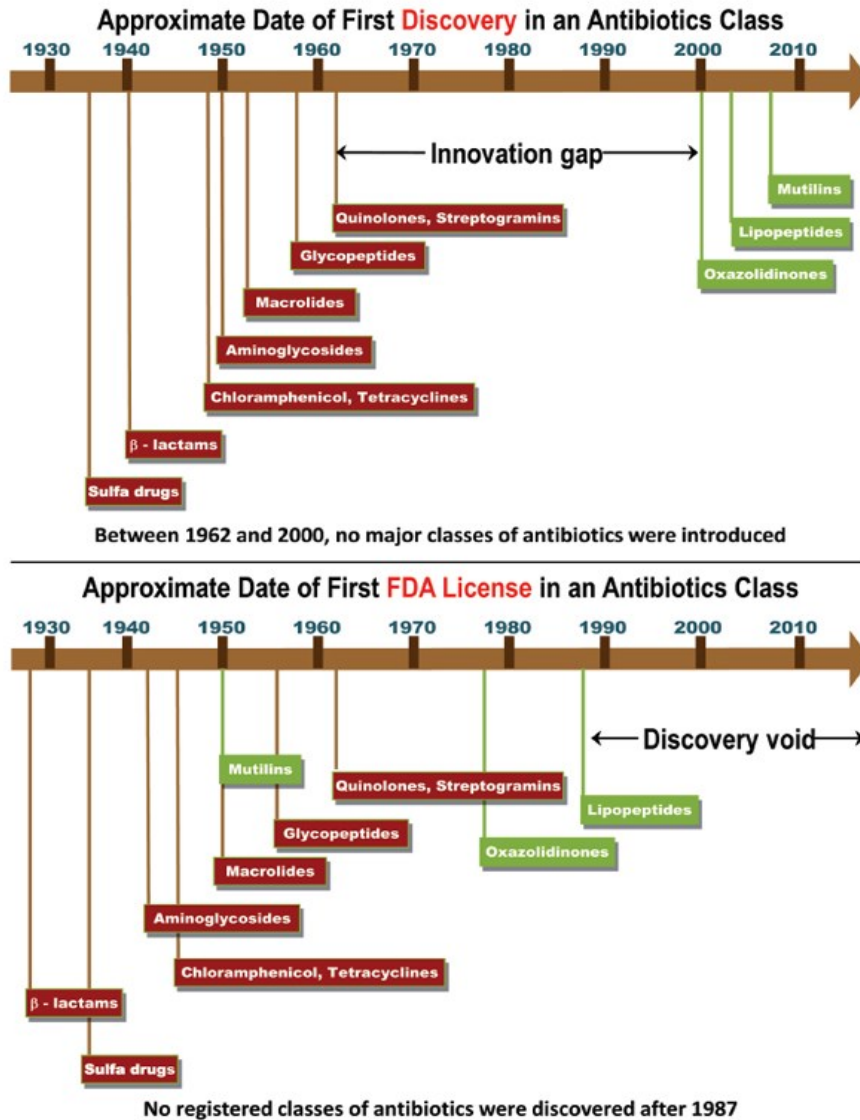
παραγωγής αντιβιοτικών ουσιών από αυτούς τους οργανισμούς δίχως να είναι γνωστό ποιες ενώσεις αναπτύσσουν την αντιβιοτική δράση. Ο όρος αντιβιοτικό (antibiotic) εισήχθη το 1942 από τον Αμερικανό βιοχημικό και μικροβιολόγο Selman Walksman (1888-1973), ο οποίος ανακάλυψε και τη στρεπτομυκίνη το 1944 (Gould, 2016). Άλλες σημαντικές ανακαλύψεις στην ιστορία των αντιβιοτικών αποτελούν η σουλφοναμίδη (το 1932 από τον Domagk) και η ανακάλυψη της πενικιλίνης από τον Alexander Fleming το 1928, η οποία ήρθε στο φως το 1941 από μια ομάδα επιστημόνων με επικεφαλή τον H.W. Florey (Gould, 2016). Η ανακάλυψη περαιτέρω κατηγοριών φαρμάκων π.χ. αμινογλυκοσίδες, τετρακυκλίνες, κεφαλοσπορίνες, μακρολίδες, γλυκοπεπτίδια, κινολόνες και καρβαπενέμες, η λεγόμενη χρυσή εποχή της ανακάλυψης αντιβακτηριακών φαρμάκων έχει οδηγήσει στην ευρεία θεραπευτική χρήση των αντιβακτηριακών φαρμάκων (Gould, 2016). Εντούτοις, μέχρι πρόσφατα σταμάτησαν να ανακαλύπτονται νέα αντιβιοτικά (Εικόνα 7), και κάθε νέο αντιβιοτικό που έχει πάρει έγκριση για ανθρώπινη χρήση, είναι μέλος μιας ομάδας αντιβιοτικών που είχε ανακαλυφθεί παλιότερα. Παρόλα αυτά, έχουν ξεκινήσει νέες πρωτοβουλίες για την αποκατάσταση της υπάρχουσας κατάστασης, η πρώτη από τις οποίες ήταν η έκκληση για τη εξέλιξη της έρευνας, την προώθηση της ανάπτυξης και την εισαγωγή 10 νέων συστημικών

αντιβακτηριακών φάρμακων έως το 2020 από την Infectious Diseases Society of America (IDSA) (Chopra, 2013).

Εικόνα 7. Το χάσμα στην ανακάλυψη και την ανάπτυξη αντιβιοτικών.

ΠΗΓΕΣ: Πάνω: Fischbach and Walsh, CT (2009) με άδεια από την AAAS.

Κάτω: Lynn, 2014.



3.1 Ομάδες αντιβιοτικών

Τα σημαντικότερα αντιβακτηριακά φάρμακα είναι τα εξής: β-λακταμικά αντιβιοτικά (πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, κ.τ.λ), Γλυκοπεπτίδια, Τετρακυκλίνες, Χλωραμφενικόλη, Αμινογλυκοσίδες, Μακρολίδες, Λινκοσαμίδες, Φουσιδικό οξύ, Οξαζολιδινόνες, Στρεπτογραμίνες, Ριφαμικίνες, Σουλφοναμίδες, Διαμινοπυριμιδίνες, Κινολόνες, Νιτροφουράνια, Νιτροϊμιδαζόλες.

Στον πίνακα 1 φαίνονται τα αντιβακτηριακά φάρμακα, ο τρόπος δράσης τους και ποια είναι αποτελεσματικά στην οικογένεια των εντεροβακτηριακών και της *K.pneumoniae* (Greenwood, et al, 2010), ενώ τα σημαντικότερα εκ των οποίων θα αναλυθούν παρακάτω.

*Πίνακας 1. Τρόπος δράσης αντιβιοτικών στην οικογένεια των Εντεροβακτηριακών.
ΠΗΓΗ: Greenwood, et al, 2010.*

ΦΑΡΜΑΚΟ	ΣΤΟΧΟΣ ΔΡΑΣΗΣ	ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ
Πενικιλίνες	Κυτταρικό τοίχωμα	Η δραστικότητα ποικίλει στα μέλη της ομάδας
Κεφαλοσπορίνες	Κυτταρικό τοίχωμα	+
Άλλες β λακτάμες	Κυτταρικό τοίχωμα	+
Τετρακυκλίνες	Ριβόσωμα	+
Χλωραμφαινικόλη	Ριβόσωμα	+
Αμινογλυκοσίδες	Ριβόσωμα	+
Ριφαμικίνες	Σύνθεση RNA	+
Σουλφοναμίδες,	Μεταβολισμός φυλλικών	+
Διαμινοπυριμιδίνες	Μεταβολισμός φυλλικών	+
Κινολόνες	Σύνθεση DNA	+
Νιτροφουράνια	Σύνθεση DNA	+

3.2. Ιδιότητες αντιβιοτικών

Τα αντιβιοτικά χαρακτηρίζονται από τρεις βασικές ιδιότητες, την *εκλεκτική τοξικότητα*, το *φάσμα δράσης* και τον *τρόπο δράσης* (Walsh, 2003b).

Τρόπος δράσης. Τα αντιβιοτικά είναι δυνατόν να προκαλέσουν το θάνατο των μικροβίων ή απλώς να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό τους. Με βάση αυτή τους την ιδιότητα, διακρίνονται σε:

- Βακτηριοκτόνα. Τα αντιβιοτικά που προκαλούν γρήγορα το θάνατο των βακτηρίων. Στα βακτηριοκτόνα υπάγονται οι πενικιλίνες, οι κεφαλοσπορίνες κ.α.
- Βακτηριοστατικά. Τα αντιβιοτικά αυτά προκαλούν αναστολή της ανάπτυξης των βακτηρίων. Στα βακτηριοστατικά αντιβιοτικά υπάγονται π.χ. οι σουλφοναμίδες και οι τετρακυκλίνες (Soares, et al, 2012).

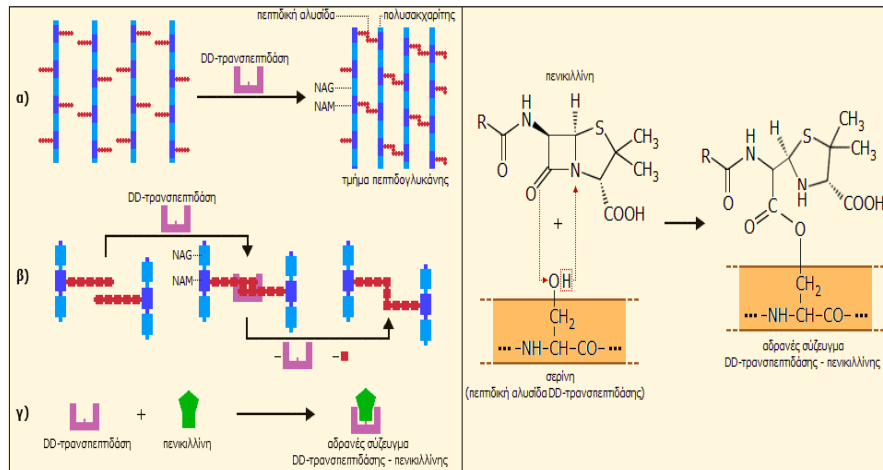
3.3 β-λακταμικά αντιβιοτικά

Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν ενώσεις που διαθέτουν στη δομή τους ένα β-λακταμικό δακτύλιο. Αυτές οι ενώσεις συνδέονται με πρωτεΐνες που εντοπίζονται στο όριο κυτταρικού τοιχώματος και κυτταρικής μεμβράνης, και εμπλέκονται στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος καθώς και στην δημιουργία των διασυνδέσεων μεταξύ των αλυσίδων πεπτιδογλυκάνης, που προσδίδουν στο τοίχωμα την σταθερότητά του. Η διάνοιξη του β-λακταμικού δακτυλίου αυτών των αντιβιοτικών από υδρολυτικά ένζυμα, γνωστά ως **β-λακταμάσες**, καταργεί την αντιβακτηριδιακή δράση των β-λακταμικών αντιβιοτικών (Greenwood, et al, 2010).

Ο τρόπος δράσης των β-λακταμικών αντιβιοτικών είναι η αναστολή της διαδικασίας βιοσύνθεσης του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος (Suarez and Gudiol, 2009). Δρουν ως ανταγωνιστικά υποστρώματα για τις πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες, (Penicillin Binding Proteins-PBPs), οι οποίες είναι ένζυμα που καταλύουν το τελικό στάδιο σχηματισμού της πεπτιδογλυκάνης του βακτηριακού τοιχώματος. Οι β-λακτάμες συνδέονται ομοιοπολικά με τις PBPs με αποτέλεσμα να παρεμποδίζουν έτσι τη λειτουργία τους και να αναστέλλουν τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης (Εικόνα 8).

Εικόνα 8. Μηχανισμός σύνθεσης του τοιχώματος πεπτιδογλυκάνης.

ΠΗΓΗ: Βαλαβανίδης και Ευσταθίου, 2012.



α) Οι αλυσίδες πολυσακχαριτών ενώνονται με πεπτιδικές αλυσίδες μέσω του ενζύμου DD-τρανσπεπτιδάση.

β) Στάδια του μηχανισμού.

γ) Η πενικιλίνη συνδέεται σταθερά με το ένζυμο DD-τρανσπεπτιδάση, καθιστώντας απαραίτητη προϋπόθεση για να δράσουν όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, είναι να ενωθούν με τις πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες (Penicillin-Binding Proteins, PBPs), που βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Ο κύριος ρόλος αυτών είναι να βοηθούν στη σύνθεση πεπτιδογλυκάνης, συνδέοντας στέρεα τις αλυσίδες των αμινοσακχάρων. Η δράση των πενικιλινών στηρίζεται στο γεγονός ότι, από χημική άποψη, ο β-λακταμικός δακτύλιος αποτελεί ανάλογο του διπεπτιδίου της D-αλανίνης, με αποτέλεσμα να επέρχεται ισοστερική αναστολή των ενζύμων που αναφέρθηκαν. Με τη σύνδεση των πενικιλινοδεσμευτικών πρωτεϊνών με τα β-λακταμικά αντιβιοτικά αναστέλλεται η χιαστί σύνδεση της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος. Το κυτταρικό τοίχωμα είναι ασταθές και η λύση των βακτηριακών κυττάρων επέρχεται λόγω της αυξημένης ωσμωτικής πίεσης του κυτταροπλάσματος.

3.3.1 Κατηγορίες β-λακταμικών αντιβιοτικών

Οι β λακτάμες είναι μια οικογένεια αντιβιοτικών που αποτελείται από τέσσερις κύριες ομάδες: πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, μονοβακτάμες και καρβαπενέμες (Εικόνα 9). Οι κύριες ομάδες περιγράφονται συνοπτικά στις παρακάτω ενότητες (Samaha-Kfoury and Aradj, 2003).

Εικόνα 9. Βασικές δομές και παραδείγματα κοινώς χρησιμοποιούμενων αντιβιοτικών β-λακτάμης.

*Ο δακτύλιος β-λακτάμης επισημαίνεται με κίτρινο χρώμα σε κάθε δομή.
ΠΗΓΗ: Bailey and Scott's, 2017.*

Beta-lactam class	Examples	Base molecular structure
Penicillins	Penicillin Ampicillin Piperacillin Mezlocillin	
Cephalosporins	Cefazolin Cefuroxime Cefotetan Cefotaxime Ceftriaxone Ceftazidime Cefepime	
Monobactams	Aztreonam	
Carbapenems	Imipenem Meropenem Doripenem	

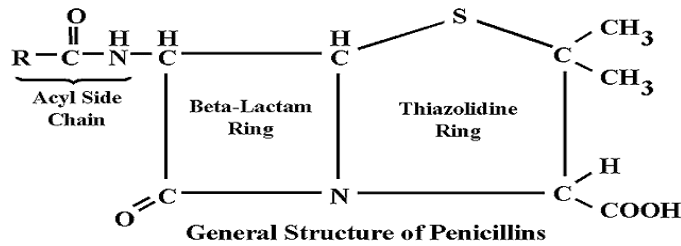
3.3.2 Πενικιλίνες

Η ανακάλυψη της πενικιλίνης αποδίδεται στον Sir Alexander Fleming (1928), διότι πρώτος υπέθεσε την ύπαρξή της, δοκίμασε τις θεραπευτικές της ιδιότητες και επιχείρησε την απομόνωσή της, αν και η θεραπευτική δράση της ήταν γνωστή πριν από αιώνες και ο μύκητας που την παρήγαγε είχε χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία λοιμώξεων από πολλούς ιατρούς πριν από τον Fleming. Οι πενικιλίνες μπορούν να χωριστούν σε φυσικές πενικιλίνες, ημισυνθετικές [ανθεκτικές σε πενικιλινάση και πενικιλίνες εκτεταμένου φάσματος (αμινοπενικιλίνες, καρβοξυπενικιλίνες και ουρεϊδοπενικιλίνες)]. Ο γενικός τύπος τους έχει

τη μορφή που απεικονίζεται στην εικόνα 10. Στον λακταμικό δακτύλιο συνδέεται μια αμιδική ομάδα (RCONH), η οποία χαρακτηρίζει την πενικιλίνη, αφού οι διάφοροι τύποι πενικιλινών διαφέρουν κυρίως ως προς το είδος της οργανικής ομάδας R (Hoerprich, 1968).

Εικόνα 10. Γενική δομή πενικιλινών.

ΠΗΓΗ: Rollins and Joseph, 2000.



3.3.3 Κεφαλοσπορίνες

Η κεφαλοσπορίνη-C απομονώθηκε το 1945 από τον Giuseppe Brotzu και η χημική δομή της εξακριβώθηκε το 1953 (Abraham, 1979). Η απομόνωση του πυρήνα της κεφαλοσπορίνης C (7-ACA) επέτρεψε στους κατασκευαστές φαρμακευτικών προϊόντων να παράγουν πολλές κεφαλοσπορίνες, μερικές από τις οποίες ήταν αποτελεσματικές στη θεραπεία σοβαρών λοιμώξεων από πολλά είδη Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων (Abraham, 1987). Οι κεφαλοσπορίνες είναι βακτηριοκτόνα αντιβιοτικά και έχουν παραχθεί μέχρι και τέταρτης γενεάς. Τα σημαντικότερα παράγωγα των κεφαλοσπορινών είναι: κεφαζολίνη, κεφαλοθίνη, κεφαλεξίνη, κεφουροξίμη, κεφαμανδόλη, κεφακλόρη, κεφαμυκίνες (cefotetan, cefoxitin), κεφοταξίμη, κεφτριαξόνη, κεφποδοξίμη, κεφταζιδίμη, κεφεπίμη, κεφπιρόμη (Samaha-Kfoury and Araj, 2003). Οι κεφαλοσπορίνες χρησιμοποιούνται εξίσου με τις διάφορες πενικιλίνες και καταλαμβάνουν περίπου το 30% της αγοράς των αντιβιοτικών (Campagna, et al, 2012).

3.3.4 Καρβαπενέμες

Οι καρβαπενέμες (κυρίως ιμιπενέμη, μεροπενέμη, δοριπενέμη, ερταπενέμη) πρωτοεμφανίστηκαν στα τέλη της δεκαετίας του 1970 και είναι παράγωγα της θειαναμυκίνης (Papp-Wallace, et al, 2011). Χρησιμοποιούνται συνήθως ως η τελευταία επιλογή στη θεραπεία σοβαρών λοιμώξεων που προκαλούνται από ανθεκτικά στελέχη Gram-αρνητικών βακτηρίων (Dahiya, et al, 2015). Η ανθεκτικότητα στις καρβαπενέμες αναπτύσσεται όταν τα βακτήρια αποκτούν ή αναπτύσσουν δομικές αλλαγές εντός των PBP's τους, όταν αποκτούν μέταλλο-βήτα-λακταμάσες ικανές να αποικοδομούν τις καρβαπενέμες ή όταν προκύπτουν μεταβολές στη διαπερατότητα της μεμβράνης, ως αποτέλεσμα της απώλειας πορινών της εξωτερικής μεμβράνης (Zhanel, et al, 2007). Η αντοχή της *Klebsiella* έναντι των καρβαπενεμών αυξάνεται ραγδαία τις τελευταίες δεκαετίες, όπως φαίνεται με την αύξηση από 1,6% σε 10,4% μεταξύ 2001 και 2011 (Broberg, et al, 2014).

3.3.5 Άλλα β-λακταμικά

Διάφορα αντιβιοτικά φέρουν στο μόριο τους β-λακταμικό δακτύλιο όπως:

Οι **Μονομπακτάμες** π.χ. αζτρεονάμη έχει δραστηριότητα έναντι των περισσότερων κατά Gram αρνητικών βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένης της *K.pneumoniae* (Hellinger and Brewer, 1999).

Οι **Οξακεφέμες** (π.χ. λαταμοξέφη) είναι ευρέος φάσματος.

Αναστολείς των β-λακταμασών που διαθέτουν β-λακταμικό δακτύλιο, όπως το κλαβουλανικό οξύ, η σουλμπακτάμη και η ταζομπακτάμη, είναι αποτελεσματικά έναντι πολλών βακτηρίων που εκφράζουν β-λακταμάσες κατηγορίας A (συμπεριλαμβανομένου του

CTX-M και των TEM-1, TEM-2 και SHV-1) και είναι λιγότερο αποτελεσματικές έναντι των β-λακταμάσεων των κατηγοριών B, C και D (Drawz and Bonomo, 2010).

3.3.6 Αναστολείς β-λακταμασών που δεν διαθέτουν β-λακταμικό δακτύλιο

Η αβιμπακτάμη (avibactam) ανήκει σε αυτήν την κατηγορία αναστολέων β-λακτάμης, που ενώ δεν περιέχουν δακτύλιο β-λακτάμης διατηρούν την ικανότητα ομοιοπολικής ακυλίωσης των στόχων της β-λακταμάσης. Έχει ένα ευρύτερο φάσμα δράσης από τους κλασικούς αναστολείς των β-λακταμασών. Ο αναστολέας βορικών οξέων, RPX7009, αντιπροσωπεύει μια άλλη κατηγορία συνθετικών αναστολέων β-λακταμάσης, που ενώ δεν περιέχουν δακτύλιο β-λακτάμης σε συνδυασμό με μεροπενέμη είναι δραστικός έναντι παθογόνων που παράγουν καρβαπενεμάσες κατηγορίας A (Bush and Bradford, 2016).

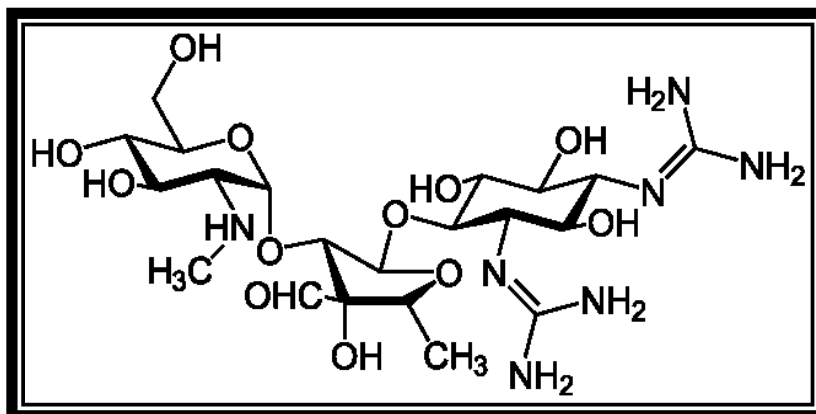
3.4 Αμινογλυκοσίδες

Οι αμινογλυκοσίδες είναι ισχυρά αντιβιοτικά ευρέως φάσματος που δρουν μέσω αναστολής της πρωτεϊνικής σύνθεσης. Μέχρι σήμερα, πάνω από 25 αμινογλυκοζιτικές ενώσεις έχουν καθαριστεί ή συντεθεί (O'Sullivan, et al, 2017). Στην ομάδα αυτή ανήκουν: η Αμικασίνη, Γενταμικίνη, Καναμυκίνη, Νεομυκίνη, Νετιλμικίνη, Σισομικίνη, Στρεπτομυκίνη και Τομπραμυκίνη. Η στρεπτομυκίνη (Εικόνα 11), είναι το πρώτο αντιβιοτικό που ανακαλύφθηκε τυχαία κατά τον έλεγχο μικροοργανισμών του εδάφους και η πρώτη αμινογλυκοσίδα. Ωστόσο, η αύξηση της ανθεκτικότητας σε αυτές τις κατηγορίες φαρμάκων, σε συνδυασμό με την γνώση της βάσης της αντοχής των αμινογλυκοσίδων, έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων αμινογλυκοσίδων, όπως η αρβεκασίνη και η πλαζομικίνη, οι οποίες σχεδιάστηκαν για να

ξεπεράσουν τους κοινούς μηχανισμούς αντίστασης στις αμινογλυκοσίδες, διατηρώντας έτσι τη αποτελεσματική δραστηριότητα έναντι παθογόνων ανθεκτικών σε πολλαπλά φάρμακα (Krause, et al, 2016).

Εικόνα 11 Χημική δομή Στρεπτομυκίνης.

ΠΗΓΗ: Wikimedia Commons



Οι αμινογλυκοσίδες αναστέλλουν το σχηματισμό του ριβοσωμικού συμπλέγματος έναρξης, και επιπλέον μπορεί να προκαλέσουν λανθασμένη ανάγνωση του αγγελιοφόρου RNA (mRNA). Συγκεκριμένα, αναστέλλουν την πρωτεϊνική σύνθεση δεσμεύοντας, με υψηλή συγγένεια, την A-θέση στο ριβοσωματικό RNA 16S του ριβοσώματος 30S (Kotra, et al, 2000). Αυτά τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται ευρέως, συχνά σε συνδυασμό με β-λακτάμες, με τις οποίες εμφανίζουν συνέργεια. Η ανάπτυξη αντοχής οφείλεται σε μεταβολές του ριβοσώματος ή μεταβολές στην πρόσληψη του φαρμάκου. Ωστόσο, συνήθως οφείλεται σε βακτηριακά ένζυμα που φωσφορυλιώνουν, ακετυλιώνουν ή αδεθυλιώνουν τις εκτεθειμένες αμινομάδες ή υδροξυλομάδες. Τα ένζυμα αυτά έχουν διαφορετική επίδραση σε κάθε αμινογλυκοσίδα ανάλογα το ποιες εκτεθειμένες ομάδες προσβάλλονται από το αντίστοιχο ένζυμο (Krause, et al, 2016).

3.5 Κινολόνες

Τα αντιβιοτικά της ομάδας αυτής έχουν ως στόχο την α'-υπομονάδα της DNA γυράσης. Οι κινολόνες παρεμβαίνουν στη σύνθεση του DNA αναστέλλοντας την τοποϊσομεράση IV και την γυράση II (DNA γυράση), ένζυμα που εμπλέκονται στον αναδιπλασιασμό του DNA (Ebimieowei and Ibemologi, 2016).

Ταξινομούνται ως πρώτης γενιάς που περιλαμβάνουν την κινολοξασίνη και το ναλιδιξικό οξύ, οι οποίες είναι οι παλαιότερες και λιγότερο χρησιμοποιούμενες κινολόνες. Η χρήση αυτών των φαρμάκων έχει περιοριστεί στη θεραπεία λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος. Δεύτερης γενιάς που περιλαμβάνουν κυρίως την σιπροφλοξασίνη, νορφλοξασίνη, οφλοξακίνη και έχουν δράση έναντι των Gram αρνητικών βακτηρίων. Οι κινολόνες τρίτης γενιάς περιλαμβάνουν την λεβοφλοξασίνη, γκατιφλοξασίνη, μοξιφλοξασίνη και σπαρφλοξακίνη. Η τροβαφλοξασίνη, είναι μέλος της τάξης τέταρτης γενιάς (Oliphant and Green, 2002).

3.6. Πολυμυξίνες

Η αντιβιοτική ιδιότητα των πολυμυξινών αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά στη δεκαετία του 1940. Η κολιστίνη αναγνωρίστηκε το 1950 και αργότερα ταυτοποιήθηκε ότι είναι η ίδια με την πολυμυξίνη E. Είναι κυκλικά πεπτιδικά αντιβιοτικά προερχόμενα από διάφορα είδη *Paimibacillus (Bacillus) polymyxa*. Από τις πέντε πολυμυξίνες (πολυμυξίνες A έως E) που περιγράφηκαν αρχικά, δύο έχουν χρησιμοποιηθεί στην κλινική πράξη, η πολυμυξίνη B και η κολιστίνη (πολυμυξίνη E) (Landman, et al, 2008). Η πολυμυξίνη B και η κολιστίνη δρουν σαν κατιονικά απορρυπαντικά, διασπώντας τις κυτταρικές μεμβράνες. Είναι μία από τις τελευταίες ομάδες των αντιμικροβιακών φαρμάκων για την αντιμετώπιση των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά Gram-αρνητικών βακτηρίων και ιδιαίτερα των πολυανθεκτικών στελεχών *K.pneumoniae*. Η κολιστίνη είναι σήμερα, συχνά, ο μοναδικός αποτελεσματικός αντιβιοτικός

παράγοντας κατά των μικροοργανισμών MDR (Multi-Drug Resistant), ιδιαίτερα των στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες. Ωστόσο, με την αυξημένη χρήση πολυμυξινών τα τελευταία χρόνια, οι αναφορές αντοχής έναντι και αυτών των αντιβιοτικών αυξάνονται (Rossi, et al, 2017).

3.7 Τετρακυκλίνες

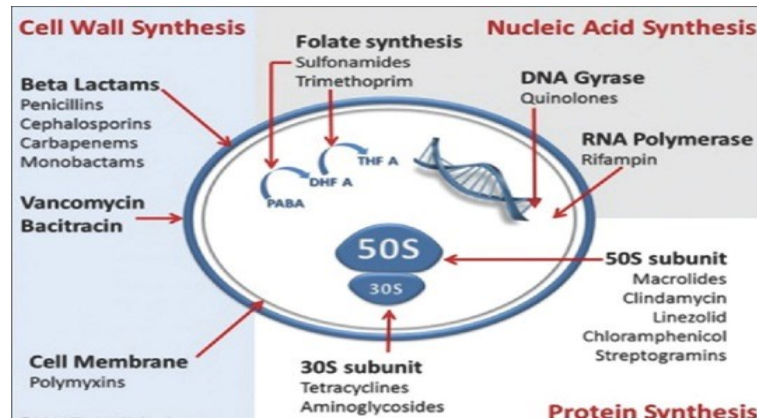
Οι τετρακυκλίνες αναστέλλουν την πρωτεϊνική σύνθεση, δεσμεύοντας το βακτηριακό ριβόσωμα 30S, εμποδίζοντας έτσι την πρόσβαση του αμινοακυλο t-RNA στη θέση δέκτη στο σύμπλοκο mRNA-ριβοσώματος (Chopra and Roberts, 2001). Τα περισσότερα από τα γονίδια ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη βρίσκονται σε τραπεζοζόνια, πλασμίδια ή ιντεγκρόνια (Roberts, 2003). Η τιγκεκυκλίνη είναι μια νεότερη σχετικά τετρακυκλίνη με δραστηριότητα τόσο έναντι αρνητικών κατά Gram όσο και θετικών κατά Gram βακτηρίων. Θεωρείται θεραπεία τελευταίας χρήσης για τις λοιμώξεις από την *K.pneumoniae*, που είναι ανθεκτικές σε καρβαπενέμες [CRKP (Carbapenem-Resistant *K.pneumoniae*)], αλλά έχουν αναφερθεί στελέχη της *K.pneumoniae* ανθεκτικά στην τιγκεκυκλίνη (Chiu, et al, 2017).

3.8 Μηχανισμοί δράσης αντιβιοτικών

Οι κύριοι μηχανισμοί δράσης έναντι της *K.pneumoniae* ανά κατηγορία αντιβιοτικών (Εικόνα 12) περιλαμβάνουν την αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος, των νουκλεϊκών οξέων, της πρωτεϊνοσύνθεσης, της σύνθεσης απαραίτητων μεταβολιτών (ανταγωνιστικά εμποδίζουν μεταβολικές οδούς), ή την πρόκληση βλάβης της κυτταρικής μεμβράνης (Grenni, et al, 2018).

Εικόνα 12. Δράσεις αντιβιοτικών ανά είδος.

ΠΗΓΗ: Sahare, et al, 2013.



1. Αναστολή σύνθεσης κυτταρικού τοιχώματος

Κύριος μηχανισμός δράσης των αντιβιοτικών αποτελεί η αναστολή σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος. Μέσω αυτού του μηχανισμού δρούν τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, τα οποία είναι τα πιο δραστικά και περισσότερο χρησιμοποιούμενα έναντι της *K.pneumoniae* (Karoo, et al, 2017). Ο β λακταμικός δακτύλιος μιμείται το τμήμα D-Ala-D-Ala της πεπτιδικής αλυσίδας που είναι φυσιολογικά συνδεδεμένο με PBP. Η PBP αλληλεπιδρά με τον δακτύλιο της β-λακτάμης και δεν είναι διαθέσιμη για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας πεπτιδογλυκάνης, με αποτέλεσμα τη διάσπαση του στρώματος πεπτιδογλυκάνης και επακόλουθο την κυτταρόλυση του βακτηρίου (Karoo, et al, 2017).

2. Αναστολή σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων

Οι μεταβολικοί οδοί που οδηγούν στη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων είναι πολύ σημαντικοί για την επιβίωση των βακτηρίων. Τα αντιβιοτικά αναστέλλουν την σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων καθώς εμποδίζουν την διαδικασία της αντιγραφής ή διακόπτοντας την μεταγραφή. Οι κινολόνες, αντιβιοτικά δραστικά έναντι της *K.pneumoniae*, στοχεύουν στην αναστολή της δράσης της α'-υποομάδας της γυράσης του DNA και της τοποϊσομεράσης IV, με αποτέλεσμα την αναστολή της υπερελίκωσης του DNA και κατ' επέκταση της σύνθεσης του DNA (Ebimieowei and Ibemologi, 2016).

3. Αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης

Η βιοσύνθεση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται στο βακτηριακό ριβόσωμα που αποτελείται από δύο υπομονάδες ριβονουκλεοπρωτεΐνης, τις υπομονάδες 30S και 50S. Οι αντιμικροβιακές ουσίες αναστέλλουν τη βιοσύνθεση πρωτεϊνών με στόχο την υπομονάδα 30S ή 50S του βακτηριακού ριβοσώματος (Karoor, et al, 2017). Αντιβιοτικά που δρουν με το μηχανισμό αυτό έναντι της *K.pneumoniae* είναι κυρίως οι αμινογλυκοσίδες, οι τετρακυκλίνες και η χλωραμφαινικόλη. Αναστολείς της υπομονάδας 30S είναι οι αμινογλυκοσίδες και οι τετρακυκλίνες, ενώ της υπομονάδας 50S είναι η χλωραμφαινικόλη (Karoor, et al, 2017).

4. Αναστολή ανταγωνιστικά της σύνθεσης απαραίτητων μεταβολιτών

Ένας άλλος μηχανισμός δράσης των αντιβιοτικών είναι να δρουν ως αντιμεταβολίτες αναστέλλοντας ανταγωνιστικά την ενζυμική δραστηριότητα. Εκπρόσωποί τους είναι η σουλφοναμίδη και τριμεθοπρίμη. Κάθε ένα από αυτά τα φάρμακα αναστέλλει τα διαφορετικά στάδια του μεταβολισμού του φυλλικού οξέος. Ένας συνδυασμός σουλφα- φαρμάκων και τριμεθοπρίμης που δρουν σε διαφορετικά στάδια στην ίδια βιοσυνθετική οδό οδηγεί σε συνέργεια και σε μειωμένο ρυθμό μετάλλαξης για αντοχή (Karoor, et al, 2017).

5. Αναστολή της λειτουργίας της κυτταρικής μεμβράνης

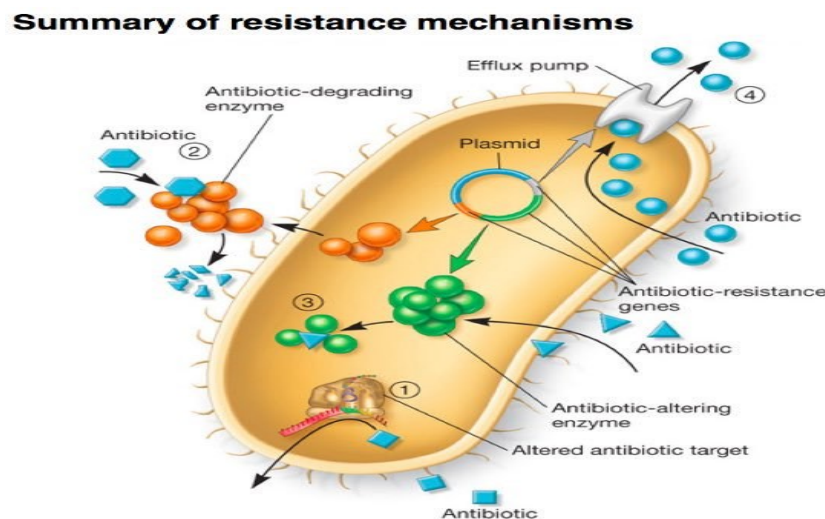
Ένας άλλος μηχανισμός δράσης των αντιβιοτικών είναι να αναστέλλουν την λειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης. Στην ομάδα αυτή ανήκουν οι πολυμυξίνες (B και E). Η διαταραχή της λειτουργίας της κυτταρικής μεμβράνης οδηγεί στην καταστροφή του μικροβιακού κυττάρου. Ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS) αποσταθεροποιείται, αυξάνοντας έτσι τη διαπερατότητα της βακτηριακής μεμβράνης, οδηγώντας σε διαρροή του κυτταροπλασματικού περιεχομένου και προκαλώντας τελικά κυτταρικό θάνατο. Οι πολυμυξίνες ασκούν την αντιμικροβιακή τους δράση μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με το συστατικό λιπιδίο A του LPS (Velkov, et al, 2013).

3.9 Μηχανισμοί αντοχής της *K.pneumoniae* στα αντιβιοτικά

Η μικροβιακή αντοχή είναι μια φυσική βιολογική απόκριση των μικροβίων σε επιλεκτική πίεση, όπως οι καιρικές συνθήκες, η διαθεσιμότητα τροφίμων, οξυγόνου, νερού ή η παρουσία ενός αντιμικροβιακού φαρμάκου (Soares, et al, 2012). Τα βακτήρια που ανθίστανται σε πολλά αντιβιοτικά ονομάζονται πολυανθεκτικά βακτήρια (MDR) ή superbugs. Όταν εισάγεται μια νέα κατηγορία αντιβιοτικών, είναι αποτελεσματική στην αρχή, αλλά τελικά ένας μικρός αριθμός των βακτηριακών πληθυσμών θα επιβιώσει λόγω του ότι θα έχει έναν εγγενή ή επίκτητο μηχανισμό αντοχής (Walsh, 2003a). Η ανθεκτικότητα της *K.pneumoniae* και γενικότερα των μικροβίων έναντι των αντιβιοτικών οφείλεται σε διάφορους μηχανισμούς (Εικόνα 13), οι οποίοι περιγράφονται παρακάτω.

Εικόνα 13. Σχηματική απεικόνιση των μηχανισμών αντοχής στα αντιβιοτικά.

ΠΗΓΗ: Downofilebp.ga



3.9.1 Μειωμένη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης

Τα αντιβιοτικά μπορούν να μεταφερθούν μέσα σε ένα κύτταρο με διάχυση μέσω διαύλων πορίνης, με διάχυση μέσω της διπλοστοιβάδας και με αυτό-πρόσληψη. Τα κανάλια πορίνης εντοπίζονται στην εξωτερική μεμβράνη των Gram-αρνητικών βακτηρίων. Οι πορίνες (πρωτεΐνες εξωτερικής μεμβράνης, Outer Membrane Proteins, OMPs), είναι διαμεμβρανικοί διάυλοι που εμπλέκονται στη μεταφορά, την πρόσληψη ή την εκροή μιας μεγάλης ποικιλίας χημικών ενώσεων συμπεριλαμβανομένων και των διαφόρων τάξεων αντιβιοτικών (Pages, et al, 2008). Η απώλεια των πορινών προσδίδει φαινότυπους αντοχής. Οι OmpK35 (η απώλεια των οποίων δίνει αντοχή σε κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες, φθοριοκινολόνες και χλωραμφενικόλη) και OmpK36 (αντοχή σε καρβαπενέμες) (Fernández and Hancock, 2012) είναι πορίνες που συχνά δεν εκφράζονται σε ανθεκτικά στα αντιβιοτικά στελέχη *K.pneumoniae*. Η απώλεια αυτών των πορινών φαίνεται να παρέχει ένα πλεονέκτημα σε αυτά τα στελέχη ενάντια στα αντιβιοτικά (Chen JH, et al, 2010).

3.9.2 Τροποποιημένος στόχος, αλλαγή διαμόρφωσης των σημείων δράσης των αντιβιοτικών

Η αλληλεπίδραση του αντιβιοτικού με το μόριο στόχο είναι ειδική και μικρές τροποποιήσεις του στόχου δράσης είναι ικανές να οδηγήσουν σε σημαντική μικροβιακή αντοχή. Ορισμένα βακτήρια καθίστανται ανθεκτικά τροποποιώντας τον στόχο στον οποίο δεσμεύονται και δρουν τα αντιβιοτικά. Το αντιβιοτικό μπορεί να εισέλθει στο κύτταρο, δεν μπορεί όμως να συνδεθεί στο στόχο δράσης του και χάνει τη δραστικότητά του. Για παράδειγμα, όταν μεταβάλλεται η δομή της πενικιλιοδεσμευτικής πρωτεΐνης (PBP) στα βακτήρια, η πενικιλίνη δεν μπορεί πλέον να δεσμεύεται με αυτή την πρωτεΐνη. Αυτό καθιστά την πενικιλίνη αναποτελεσματική (Nikaido, 2009).

3.9.3 Ενεργητική απέκκριση μέσω της αντλίας εκροής αντιβιοτικού

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες που εξάγουν αντιβιοτικά από το κύτταρο και διατηρούν τις ενδοκυτταρικές τους συγκεντρώσεις χαμηλές ονομάζονται αντλίες εκροής. Σε ορισμένα βακτήρια, η αντλία εκροής αναπτύσσεται όταν εισέρχεται στο κύτταρο κάποιο αντιβιοτικό, τότε μέσω της αντλίας οδηγείται το αντιβιοτικό έξω από το κύτταρο (Nikaido, 2009). Οι αντλίες εκροής μπορεί να είναι ειδικές για τα αντιβιοτικά αλλά οι περισσότερες είναι μεταφορείς πολλαπλών αντιβιοτικών και είναι σε θέση να αντλούν ένα ευρύ φάσμα αντιβιοτικών π.χ. μακρολίδες, τετρακυκλίνες και φθοριοκινολόνες και έτσι να καθιστούν ανθεκτικούς τους οργανισμούς σε πολλά είδη αντιβιοτικών (Kapoor, et al, 2017). Συχνά, οι μη ειδικές αντλίες εκροής συνδέονται με την πολυαντοχή (Sanchez, 2003). Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες αυτές, μπορούν να εντοπιστούν σε χρωμοσώματα ή σε πλασμίδια (Poole, 2007, Piddock, 2006). Σύμφωνα με τη σύνθεσή τους, τον αριθμό των διαμεμβρανικών περιοχών, τις πηγές ενέργειας και τα υποστρώματα, οι αντλίες ταξινομούνται σε πέντε οικογένειες (Sun, et al. 2014).

Κάποιες από τις καλύτερα μελετημένες αντλίες εκροής είναι: το σύστημα AcrAB/TolC, μέλος της υπερικογένειας RND, που συναντάται ευρέως στα Gram αρνητικά και προσδίδει αντοχή σε β-λακτάμες, τετρακυκλίνες και σιπροφλοξασίνη. Σχετικά πρόσφατα, εμφανίστηκε ένα νέο σύστημα εκροής τύπου RND σε στελέχη *K.pneumoniae* (το KexD) που συμβάλλει στην επίκτητη αντοχή της *K.pneumoniae* (Ogawa, et al, 2012).

3.9.4 Παραγωγή ενζύμων και ενζυμική αδρανοποίηση των αντιβιοτικών

Ένας σημαντικότερος μηχανισμός για την αντιμετώπιση της παρουσίας αντιβιοτικών είναι η παραγωγή ενζύμων που αδρανοποιούν τα αντιβιοτικά. Η αδρανοποίηση του αντιβιοτικού είναι ο κύριος μηχανισμός έναντι των αντιβιοτικών β-λακτάμης και βασίζεται στην καταστροφή με τη δράση των β-λακταμασών (Ebimieowei and Ibemologi, 2016) (Εικόνα 14). Αυτά τα ένζυμα καταστρέφουν τον αμιδικό δεσμό του δακτυλίου β-λακτάμης, καθιστώντας το αντιβιοτικό αναποτελεσματικό (Munita and Arias, 2016). Μπορεί να είναι ενδογενή σε κάποια είδη, στις πιο πολλές περιπτώσεις όμως είναι επίκτητα (Dever and Dermody, 1991). Η *K.pneumoniae* παράγει β-λακταμάσες εκτεταμένου φάσματος [extended spectrum β-lactamases (ESBLs)], μέσω των οποίων προκαλείται αντοχή σε ευρύ φάσμα β-λακταμών, συμπεριλαμβανομένων συχνά των πενικιλινών και των κεφαλοσπορινών 3^{ης} γενεάς (Shaikh, et al, 2015).

Εικόνα 14. Διάσπαση του β-λακταμικού δακτυλίου από την β-λακταμάση.

ΠΗΓΗ: Ebimieowei and Ibemologi, 2016.



3.10 Μεταβίβαση μικροβιακής αντοχής

Η μικροβιακή αντοχή μπορεί να ταξινομηθεί ανάλογα με τον τρόπο που αποκτιέται και μεταβιβάζεται: ενδογενής και επίκτητη (αντοχή λόγω μετάλλαξης ή οριζόντιας μεταφοράς).

- Η **ενδογενής αντοχή (φυσική)** αναφέρεται στην εγγενή αντοχή σε ένα αντιβιοτικό που είναι ένα φυσικό χαρακτηριστικό του μικροοργανισμού (Soares, et al, 2012).
- Η **αντοχή λόγω μετάλλαξης** οφείλεται σε μια χρωμοσωμική μετάλλαξη που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός γενετικά τροποποιημένου βακτηριακού πληθυσμού που είναι ανθεκτικός στο αντιβιοτικό (Soares, et al, 2012).
- Η **αντοχή** που σχετίζεται με οριζόντια μεταφορά ενός γενετικού στοιχείου από άλλο μικροοργανισμό μπορεί να συμβεί με **μεταγωγή, μετασχηματισμό ή σύζευξη** (Levy and Marshall, 2004). Στην επίκτητη αντοχή, στην ουσία υπάρχουν αλλαγές στο γενετικό υλικό του μικροοργανισμού που είναι είτε μεταλλάξεις σε κάποιο ή κάποια γονίδια ή, συνηθέστερα, σε εμπλουτισμό με το νέο ή νέα γονίδια μέσω της «μόλυνσης» του μικροοργανισμού με πλασμίδια, μεταθετά στοιχεία, ιντεγκρόνια, και φάγους (Davies, 1994).

Η ενδογενής αντοχή της *K.pneumoniae* αφορά την πενικιλίνη, ενώ η αυξανόμενη επίκτητη αντοχή της *K.pneumoniae* στα αντιβιοτικά, μπορεί να προκαλέσει απειλητικές λοιμώξεις για τη ζωή και έχει εξαπλωθεί σε όλες τις χώρες του κόσμου (WHO, 2018).

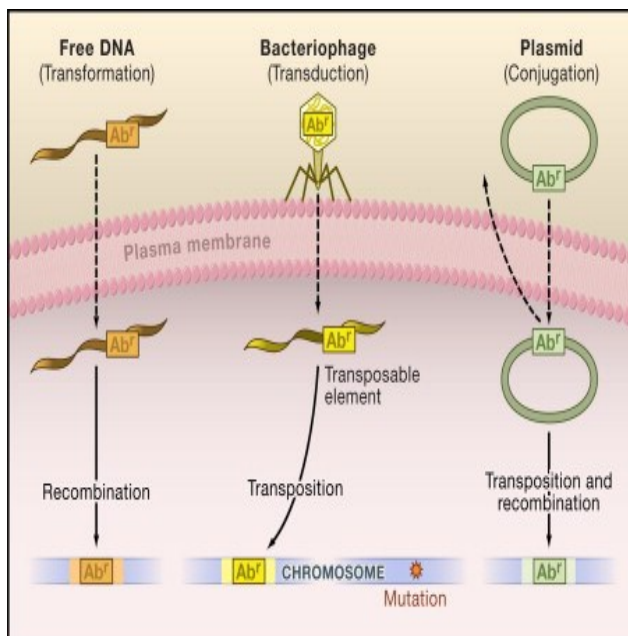
3.11. Τρόποι μεταβίβασης γονιδίων αντοχής

Η μεταφορά της αντοχής παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στην Ιαπωνία τη δεκαετία του 1950 (Davies, 2006), και μπορεί να προκύψει είτε από κάθετη είτε από οριζόντια μεταφορά.

Στην **κάθετη μεταφορά** γονιδίων το ανθεκτικό γονίδιο μεταφέρεται από γενιά σε γενιά με τον πολλαπλασιασμό του πληθυσμού (Lorenzo-Díaz, et al, 2017).

Στην **οριζόντια μεταφορά** γονιδίων, τα βακτήρια μεταφέρουν το ανθεκτικό γονίδιο σε ευαίσθητα βακτήρια μεταξύ των ίδιων ειδών ή ακόμη και μεταξύ διαφορετικών ειδών και γένους. Οι αλληλουχίες του γονιδίου ανθεκτικότητας ενσωματώνονται με ανασυνδυασμό σε διάφορες κατηγορίες γονιδιακών κασετών που υπάρχουν φυσιολογικά και διαχέονται εντός του μικροβιακού πληθυσμού (Εικόνα 15) με μηχανισμούς γονιδιακής μεταφοράς όπως: μετασχηματισμό, σύζευξη ή μεταγωγή (Lorenzo-Díaz, et al, 2017, Alekshun and Levy, 2007).

Εικόνα 15. Απόκτηση αντιβιοτικής αντοχής.



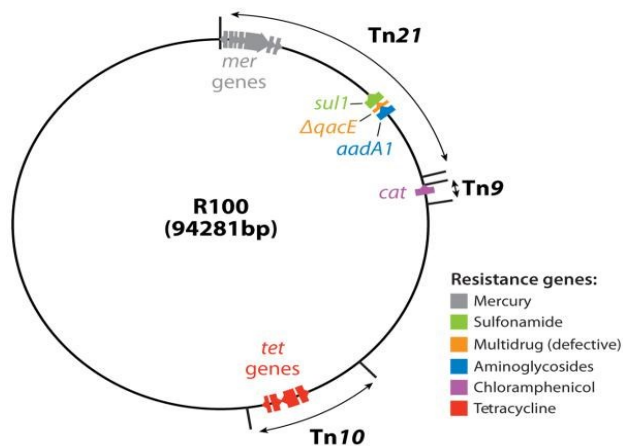
Τα βακτήρια μπορούν να καταστούν ανθεκτικά στα αντιβιοτικά (Ab^r) με μετάλλαξη του γονιδίου στόχου στο χρωμόσωμα. Μπορούν να αποκτήσουν ξένο γενετικό υλικό ενσωματώνοντας ελεύθερα τμήματα DNA στο χρωμόσωμά τους (μετασχηματισμό). Τα γονίδια μεταφέρονται επίσης μετά από μόλυνση από βακτηριοφάγο (μεταγωγή) και μέσω πλασμιδίων και συζευκτικών τρανσποζονίων κατά τη διάρκεια της σύζευξης. Ο γενικός όρος μεταβλητό στοιχείο έχει χρησιμοποιηθεί για να δηλώσει

- (1) μια αλληλουχία εισαγωγής
- (2) συζευκτικό τρανσποζόνιο
- (3) μεταφορά βακτηριοφάγου ή
- (4) ιντεγκρόνιο

ΠΗΓΗ: Alekshun and Levy, 2007.

Πλασμίδια. Στα βακτήρια μπορούν να υπάρχουν ένα ή περισσότερα πλασμίδια, σε πολλά από τα οποία βρίσκονται γονίδια που κωδικοποιούν σημαντικές ιδιότητες, όπως η παραγωγή εξωτοξινών και η αντοχή στα αντιβιοτικά (Smillie, et al, 2010). Τα πλασμίδια τα οποία φέρουν γονίδια που κωδικοποιούν την αντοχή έναντι ενός ή περισσότερων αντιβιοτικών ονομάζονται **πλασμίδια αντοχής** (R πλασμίδια). Τα πλασμίδια αντοχής διακρίνονται σε συζευκτικά ή αυτομεταφερόμενα (conjugative ή self-transmissible) και σε μη-συζευκτικά (non-conjugative) (Frost and Koraimann, 2010).

Εικόνα 16. Χάρτης ενός φυσικού R πλασμιδίου R100.



Αυτό το σχήμα βασίζεται στην ακολουθία νουκλεοτιδίων από την GenBank NC 002134, που υποβλήθηκε από τους G. Sempri και K. Mizobuchi.

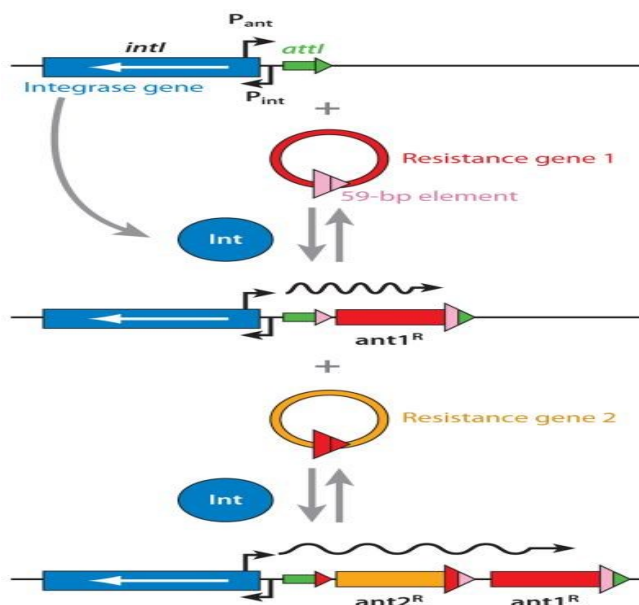
ΠΗΓΗ: Nikaido, 2009.

Στην εικόνα 16 παρατηρούμε τη σχηματική απεικόνιση ενός φυσικού R πλασμιδίου, R100. Το γονίδιο ανθεκτικότητας στην Τετρακυκλίνη *tetA* βρίσκεται στο τρανσποζόνιο 10, η ακετυλοτρανσφεράση της χλωραμφενικόλης (*cat*) είναι μέρος του Tn9, το γονίδιο αντίστασης σε σουλφοναμίδιο *sul1* και γονίδιο αδενυλοτρανσφεράσης για την αμινογλυκοσίδη *aadA1* είναι μέρος του μεγάλου τρανσποζόνιου Tn21.

Μεταθετά στοιχεία. Είναι κινητές γενετικές μονάδες που καταλαμβάνουν ένα σημαντικό τμήμα προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών γονιδιωμάτων. Τα μεταθετά στοιχεία διακρίνονται σε:

1. **Αλληλουχίες εισδοχής.** Είναι ο πιο απλός τύπος μεταθετών στοιχείων και περιλαμβάνουν μικρές τερματικές αλληλουχίες ISs στα άκρα και ένα κεντρικό τμήμα που κωδικοποιεί την τρανσποζάση (Partridge, et al, 2018).
2. **Τρανσποζόνια.** Στα βακτηριακά τρανσποζόνια ανήκουν τα σύνθετα τρανσποζόνια και τα μη σύνθετα τρανσποζόνια (Aziz, et al, 2010). Τα τρανσποζόνια είναι τα απλούστερα από τα αυτόνομα μεταφερόμενα στοιχεία (Hickman, et al, 2010).

Τα **ιντεγκρόνια** ορίστηκαν από τους Hall RM και Collis CM ως γενετικά στοιχεία που περιέχουν τους γενετικούς καθοριστές ενός συστήματος ανασυνδυασμού που αναγνωρίζει και δεσμεύει κινητές γονιδιακές κασέτες. Οι γονιδιακές κασέτες δεν είναι απαραίτητα μέρος του ιντεγκρονίου, αλλά γίνονται μέρος του όταν ενσωματωθούν σε αυτό (Fluit and Schmitz, 2004). Η πλειοψηφία τους περίπου 60 γνωστές κασέτες γονιδίων κωδικοποιούν αντοχή στα αντιβιοτικά (Εικόνα 17). Μέχρι τουλάχιστον πέντε κασέτες μπορεί να υπάρχουν σε ένα



ιντεγκρόνιο, γεγονός που οδηγεί σε πολλαπλή αντοχή (Fluit and Schmitz, 1999). Τα ιντεγκρόνια μπορούν να χωριστούν σε δύο κύριες ομάδες: resistance integrons (RI) και super-integrons (SI). Έχουν περιγραφεί διάφορες νέες κασέτες γονιδίων πολλές από τις οποίες κωδικοποιούν την αντοχή έναντι αντιβιοτικών, όπως οι κεφαλοσπορίνες και οι καρβαπενέμες (Fluit and Schmitz, 2004).

Εικόνα 17. Υποτιθέμενος μηχανισμός δέσμευσης γονιδίου αντοχής από ιντεγκρόνιο.

Το ιντεγκρόνιο περιέχει το γονίδιο για την ενσωμάτωση ειδικής θέσης (μπλε) και το ειδικό σημείο ενσωμάτωσης attI (πράσινο). Όταν είναι διαθέσιμο το γονίδιο αντοχής 1 (κόκκινο), ενσωματωμένο στην θέση attI, δημιουργεί μια ελαφρώς αλλαγμένη αλληλουχία attI (τώρα σε πράσινο και ροζ). Αυτό μπορεί στη συνέχεια να δεχθεί τη δεύτερη κασέτα γονιδίου αντοχής και η διαδικασία μπορεί να συνεχιστεί με αυτό τον τρόπο.

ΠΗΓΗ: Nikaido, 2009.

3.12 Αντοχή στις πενικιλίνες και τις κεφαλοσπορίνες

Οι πενικιλίνες και οι κεφαλοσπορίνες αδρανοποιούνται από τις **β-λακταμάσες**. Ο κυριότερος μηχανισμός είναι η παρουσία συνήθως β-λακταμάσης εκτεταμένου φάσματος (ESBLs) που εδράζεται σε πλασμίδιο, κυρίως τύπου CTX-M, SHV ή TEM. Η ανθεκτικότητα στις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς σε είδη *Klebsiella* προκαλείται κυρίως από ESBLs. Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, ο CTX-M έχει γίνει ο πιο διαδεδομένος τύπος ESBL παγκοσμίως (Peirano and Pitout, 2010). Η ευρεία και υπερβολική χρήση των κεφαλοσπορινών τρίτης γενιάς συνέβαλε στην εμφάνιση και την ευρεία διασπορά των γονιδίων ESBLs στην *K.pneumoniae* (Banerjee, et al, 2016).

3.13 Κατάταξη β λακταμασών

Οι β-λακταμάσες είναι βακτηριακά ένζυμα τα οποία με τη διάσπαση του δακτυλίου που προκαλούν, αδρανοποιούν τα β-λακταμικά αντιβιοτικά (Pallavi, et al, 2013). Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις β-λακταμάσες μπορούν να έχουν χρωμοσωμική ή πλασμιδιακή προέλευση (Samaha-Kfoury and Araj GF, 2003).

Οι β-λακταμάσες ταξινομούνται χρησιμοποιώντας συστήματα βασισμένα στη λειτουργία τους (σύστημα του Bush-Jacoby-Medeiros) ή στη δομή τους (ταξινόμηση κατά Ambler), ενώ γενικά διαχωρίζονται σε εκείνα που είναι ένζυμα με δραστική θέση σερίνης και εκείνα που απαιτούν σαν συμπάραγοντα μεταλλικά ιόντα. Η λειτουργική ταξινόμηση (1995) κατά Bush-Jacoby-Medeiros διαιρεί τα ένζυμα σε ομάδες (groups) 1, 2, 3, 4 και υποομάδες (subgroups) 2a, 2b, 2be, 2br, 2c, 2d, 2e, 2f, και η μοριακή ταξινόμηση (1980) κατά Ambler σε τάξεις (classes) A, B, C, D, κατά τις οποίες τα ένζυμα κατηγορίας A, C και D είναι πρωτεΐνες με υπόλειμμα σερίνης στις δραστικές τους θέσεις και οι πρωτεΐνες κατηγορίας B είναι

μεταλλοένζυμα εξαρτώμενα από ψευδάργυρο (Ambler, 1980, Ambler, et al, 1991, Bush, 1989, Bush, et al, 1995) (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Κατάταξη κατά Bush et al και κατά Ambler.

Bush et al	Ambler	Αναστολή Clav/EDTA	Βασικά χαρακτηριστικά
1	C	-	Κεφαλοσπορινάσες - AmpC
2a	A	Clav	Πενικιλινάσες (Σταφυλοκοκκικές/Εντεροκοκ)
2b	A	Clav	TEM-1,-2 & SHV-1
2be	A	Clav	ESBL (TEM- & SHV-)
2br	A	Clav μικρή	Inhibitor Resistant TEM (IRT)
2c	A	Clav	Καρμπενικιλινάσες PSE-
2e	A	Clav	Κεφουροξιμάσες
2f	A	Clav	Καρβαπενεμάσες -KPC
2d	D	Clav ποικίλη	Οξακιλ/άσες –ESBL- Καρβ/σες
3	B	EDTA	Μεταλλο-Καρβαπενεμάσες

A, C, D: Σερινοτρανσφεράσες B: Μεταλλοένζυμα (Zn)

3.13.1 Κατηγορία A

Στην κατηγορία A ανήκουν ένζυμα με εστέρα σερίνης στο ενεργό τους κέντρο. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν **οι ευρέως φάσματος β-λακταμάσες, οι εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (ESBLs) και οι καρβαπενεμάσες** (Πίνακας 3).

Στις **ευρέως φάσματος β-λακταμάσες της κατηγορίας A** κατατάσσονται οι β-λακταμάσες της ομάδας 2b κατά Bush-Jacoby-Medieros TEM-1, TEM-2 και SHV-1 (Tzouveleki and Bonomo, 1999). Είναι κυρίως πλασμιδιακές, υδρολύουν τις πενικιλίνες και 1ης γενιάς κεφαλοσπορίνες. Αναστέλλονται από τους αναστολείς β-λακταμασών, κλαβουλανικό οξύ και ταζομπακτάμη (Paterson and Bonomo, 2005).

Οι **ESBLs** (extended spectrum β -lactamases) ανήκουν στην λειτουργική ομάδα 2be κατά Bush-Jacoby-Medieros και στη μοριακή τάξη A κατά Ambler. Προέρχονται από την ομάδα 2b μετά από μεταλλάξεις. Υδρολύουν τις πενικιλίνες, τις κεφαλοσπορίνες και την αζτρεονάμη, αλλά δεν υδρολύουν τις κεφαμυκίνες (κεφοξιτίνη και κεφοτετάνη), τις καρβαπενέμες, ενώ αναστέλλονται από τους αναστολείς κλαβουλανικό, σουλμπακτάμη, ταζομπακτάμη (Bradford, 2001).

- **SHV-2**: Η πρώτη ESBL βρέθηκε σε στέλεχος *K.ozzaenae* που απομονώθηκε στη Γερμανία το 1983 (Knothe, et al, 1983). Η αλληλουχία έδειξε ότι αυτή η β -λακταμάση διαφέρει από την SHV-1 (που πρωτοαπομονώθηκε από στέλεχος *K.pneumoniae*) σε ένα αμινοξύ. Η μετάλλαξη αυτή έδωσε εκτεταμένου εύρους υδρολυτικές ιδιότητες στο ένζυμο, το οποίο ονομάστηκε SHV-2 (Paterson, et al, 2003). Οι SHV τύπου ESBLs ανιχνεύονται σήμερα σε μια μεγάλη ποικιλία *Enterobacteriaceae* (Liakopoulos, et al, 2016).
- Οι **TEM**-τύπου ESBLs προέρχονται από την TEM-1 και TEM-2. Κάποιες β -λακταμάσες, οι **CTX-M**, οι οποίες υδρολύουν την κεφοταξίμη και λόγω αυτού πήραν και το όνομά τους, έχουν την ικανότητα να υδρολύουν τις ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες. Ο αριθμός των ESBL τύπου CTX-M διευρύνεται ταχέως παγκοσμίως (Paterson and Bonomo, 2005).

Οι **καρβαπενεμάσες** της κατηγορίας A διακρίνονται στα χρωμοσωμικά κωδικοποιούμενα ένζυμα **SME**, **NMC**, και **IMI** και τα πλασμιδιακά **KPC** και **GES**: έχουν περιγραφεί τουλάχιστον 9 ποικιλίες **GES/ IBC** (Guiana Extended Spectrum / Integron-Borne Cephalosporinase). Ανιχνεύτηκαν πρώτη φορά το 1998 σε στέλεχος *Enterobacter cloacae* στην Ελλάδα και σε στέλεχος *K.pneumoniae* στη Γαλλική Γουιάνα (Poirel, et al, 2000).

Η ομάδα των KPC καρβαπενεμασών (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) περιλαμβάνει πάνω από 24 ενζυμικές ποικιλίες (KPC-1/2, KPC-3 κ.τ.λ) (Vera-Leiva, et al, 2017). Η καρβαπενεμάση KPC-1/2 εμφανίστηκε το 1996 στη Βόρεια Καρολίνα, σε στέλεχος

K.pneumoniae (Yigit, et al, 2001). Ονομάστηκε έτσι, καθώς βρέθηκε πως η KPC-1 και η -2 είχαν ταυτόσημες αλληλουχίες. Οι KPC καρβαπενεμάσες υδρολύουν όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά (Yigit, et al, 2001). Οι τύπου KPC είναι οι πιο σημαντικές καρβαπενεμάσες της κατηγορίας A, καθώς έχουν αναφερθεί αρκετές περιπτώσεις σε νοσοκομεία, οι οποίες συνήθως παράγονται από στελέχη *K.pneumoniae* με τα γονίδια *bla_{KPC-2}* και *bla_{KPC-3}* στη Βόρεια Αμερική (κυρίως στις Ηνωμένες Πολιτείες), τη Νότια Αμερική (Κολομβία και Αργεντινή), την Ευρώπη (Ελλάδα, Πολωνία), την Ασία (Κίνα), και τη Μέση Ανατολή (Ισραήλ) (Mathers, et al, 2015). Τα βακτήρια που παράγουν καρβαπενεμάσες έχουν μειωμένη ευαισθησία στην ιμιπενέμη (MICs ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$) μέχρι και πλήρη αντοχή. Υδρολύουν μια μεγάλη ποικιλία β-λακταμικών αντιβιοτικών, καρβαπενέμες, πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες και αζτρεονάμη, και αναστέλλονται ασθενώς από τους αναστολείς β-λακταμασών κλαβουλανικό οξύ και ταζομπακτάμη (Naas, et al, 2016).

Πίνακας 3. β-λακταμάσες ανά ομάδα, είδη και αντοχή κατά Ambler.
ΠΗΓΗ: Souha and Zeina, 2011.

Β ΛΑΚΤΑΜΑΣΕΣ		
Ομάδα	Είδη	Αντοχή*
A	TEM, SHV, CTX-M KPC, GES, SME	Πενικιλίνες, κεφαλοσ 3 ^{ης} γεν Όλα τα β λακταμικά
B	NDM-1, VIM, IMP, GIM, SPM (μεταλο-β-λακταμάσες)	Όλα τα β λακταμικά (?εξαιρείται η αζτρεονάμη;)
C	AmpC cephamycinases (AmpC)	Όλα τα β λακταμικά, εκτός καρβαπενέμες, κεφεπίμη
D	OXA (OXA-23, -24, -58, -143)	Όλα τα β λακταμικά
	Extended-spectrum β- lactamases (ESBLs)	Όλα τα β λακταμικά, εκτός καρβαπενέμες, κεφαμυκίνες
• Συνήθως συνυπάρχει αντοχή σε φθοριοκινολόνες, αμινογλυκοσίδες και TMP-SMX (γονίδια αντοχής στα ίδια πλασμίδια)		
1. Kanj SS, Kanafani ZA. Mayo Clin Proc. 2011;86:250-9.		

3.13.2 Κατηγορία B

Στην κατηγορία B ανήκουν ένζυμα με ιόντα δισθενών μετάλλων στο ενεργό τους κέντρο. Οι μεταλλο-β-λακταμάσες (**MBL**) είναι β-λακταμάσες που υδρολύουν τις καρβαπενέμες. Οι MBL ανήκουν στη λειτουργική ομάδα 3 κατά Bush-Jacoby-Medeiros και στη μοριακή τάξη B κατά Ambler. Έχουν διαιρεθεί σε 3 υποομάδες (B1, B2, B3) με βάση τα δομικά τους χαρακτηριστικά, τη συγγένεια με το ιόν ψευδαργύρου και τα χαρακτηριστικά της υδρόλυσης (Rasmussen and Bush, 1997, Galleni, et al, 2001). Οι MBL έχουν τα εξής χαρακτηριστικά (Codjoe and Donkor, 2017):

- Υδρολύουν τα β-λακταμικά αντιβιοτικά.
- Δεν υδρολύουν τη μονοβακτάμη αζτρεονάμη.
- Δεν αναστέλλονται από τους αναστολείς των β-λακταμασών (κλαβουλανικό, σουλμπακτάμη, ταζομπακτάμη), αναστέλλονται όμως από τη χηλική ουσία αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA), η οποία δεσμεύει τα δισθενή ιόντα του Zn^{2+} και άλλα δισθενή κατιόντα.
- Απαιτούν την ύπαρξη ιόντων ψευδαργύρου για την υδρολυτική τους δράση έναντι των β-λακταμών.

Τα πιο κοινά MBL ένζυμα περιλαμβάνουν τις οικογένειες **VIM**, **IMP**, **GIM**, **SPM** και **SIM**. Τα αντίστοιχα γονίδια εντοπίζονται σε ιντεγκρόνια όπου ενσωματώνονται ως κασέτες γονιδίων (Codjoe and Donkor, 2017). Το 2008 περιγράφηκε η **NDM-1** μεταλλο-β-λακταμάση (**New Delhi metallo-beta-lactamase**). Πήρε το όνομά της από το Νέο Δελχί της Ινδίας, και περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Yong et al. σε έναν Σουηδό υπήκοο (Yong, et al, 2009). Το γονίδιο που κωδικοποιεί την NDM-1 βρέθηκε σε πλασμίδιο, σε ένα μεταβιβάσιμο γενετικό στοιχείο μεγέθους 180-kb που περιέχει μια ποικιλία ανθεκτικών γονιδίων (Yong, et al, 2009). Η NDM-1 έχει μικρή ομοιότητα με άλλα MBL και είναι πιο στενά συνδεδεμένη με το VIM-1 / VIM-2, με το οποίο έχει μόνο 32,4% ομοιότητα. Στελέχη που παράγουν NDM-1 σχεδόν πάντα έχουν μια 16S rRNA μεθυσία, η οποία προσφέρει αντοχή σε όλες τις αμινογλυκοσίδες. Η NDM-1 έχει ανιχνευθεί κυρίως σε *K.pneumoniae* και τα στελέχη που παράγουν NDM-1 είναι πολυανθεκτικά (Yong D, et al, 2009).

3.13.3 Κατηγορία C

Οι AmpC β-λακταμάσες, ή αλλιώς κεφαλοσπορινάσες είναι χρωμοσωμικά ή πλασμιδιακά ένζυμα που απαντώνται σε πολλά είδη *Enterobacteriaceae*. Οι AmpC β-λακταμάσες ανήκουν στην λειτουργική ομάδα 1 κατά Bush-Jacoby-Medeiros και την μοριακή κλάση C κατά Ambler. Τα περισσότερα συνήθη Gram-αρνητικά βακτήρια φέρουν χρωμοσωμικό bla_{AmpC} γονίδιο. Χαρακτηριστική είναι η απουσία χρωμοσωμικών AmpC από το γένος *Klebsiella spp* (Jacoby, 2009). Πλασμιδιακές AmpC β-λακταμάσες έχουν τυποποιηθεί κυρίως σε στελέχη που στερούνται του χρωμοσωμικού επαγωγίμου γόνου όπως στην *K.pneumoniae* και την *K.oxytoca* (Philippon, et al, 2002).

Οι πλασμιδιακά κωδικοποιούμενες AmpC β-λακταμάσες:

- Υδρολύουν πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες (εκτός κεφαλοσπορινών 4^{ης} γενιάς) και τη μονοβακτάμη αζτρεονάμη (Liu XQ and Liu YR, 2016).
- Δεν αναστέλλονται από τους αναστολείς των β-λακταμασών.
- Δεν υδρολύουν τις καρβαπενέμες.

Η υπερπαραγωγή των AmpCs μπορεί να συνδέεται με απώλεια ή αλλαγή μια πορίνης στην εξωτερική μεμβράνη, η οποία οδηγεί σε υψηλού επιπέδου αντοχή όχι μόνο σε όλες τις πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες και μονομπακτάμες, αλλά επίσης και στις καρβαπενέμες, λόγω ελαττωμένης διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης και συνεπώς ελαττωμένης πρόσληψης του αντιβιοτικού (Suh B, et al, 2010).

Οι κεφαλοσπορινάσες που έχουν καταγραφεί ως σήμερα είναι οι διάφοροι τύποι των οικογενειών CMY, FOX, ACC, LAT, MI, ACT, MOX, DHA (Jacoby, 2009).

3.13.4 Κατηγορία D

Οι τύπου-OXA β-λακταμάσες ονομάζονται έτσι διότι υδρολύουν την οξακιλλίνη και κλοξακιλλίνη και ανήκουν στην λειτουργική ομάδα 2d κατά Bush-Jacoby-Medeiros και στη μοριακή κλάση D κατά Ambler. Οι περισσότερες τύπου-OXA β-λακταμάσες δεν υδρολύουν τις ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες και δεν είναι ESBLs. Γενικά τα τύπου-OXA ένζυμα είναι ανθεκτικά στην αναστολή από κλαβουλανικό οξύ, σουλμπακτάμη και ταζομπακτάμη με μερικές εξαιρέσεις (π.χ η OXA-2 και OXA-32 αναστέλλονται από την ταζομπακτάμη αλλά όχι από το κλαβουλανικό οξύ και τη σουλμπακτάμη και η OXA-53 αναστέλλεται από το κλαβουλανικό οξύ). Ανιχνεύονται κυρίως στην *P.aeruginosa* αλλά και σε άλλα Gram-αρνητικά βακτήρια (Codjoe and Donkor, 2017).

Η OXA-48 είναι μία πολύ διαδεδομένη β-λακταμάση, έχει δράση καρβαπενεμάσης και πρώτη φορά παρατηρήθηκε σε στέλεχος *K.pneumoniae* στην Τουρκία (Poirel, et al, 2004). Υδρολύει την κεφοταξίμη, αλλά δεν υδρολύει την κεφταζιδίμη και την κεφεπίμη (Poirel, et al, 2012) Σύμφωνα με μελέτες παρατηρείται εξάπλωση της OXA-48 στην Ευρώπη και τη Μέση Ανατολή (Potron, et al, 2013).

3.14. Αντοχή στις καρβαπενέμες

Η αντοχή στις καρβαπενέμες μεταξύ Gram-αρνητικών βακτηρίων προκύπτει από έναν ή περισσότερους ενζυμικούς ή μη ενζυμικούς μηχανισμούς (Codjoe and Donkor, 2017). Στους ενζυμικούς μηχανισμούς ανήκουν η παραγωγή καρβαπενεμάσης και η υπερπαραγωγή των β-λακταμασών κατηγορίας AmpC ή ESBLs, μόνα τους ή σε συνδυασμό με μη ενζυμικούς μηχανισμούς όπως η απώλεια ή μειωμένη έκφραση πορίνης και η υπερέκφραση της αντλίας εκροής με αποτέλεσμα την αυξημένη εκροή φαρμάκου (Patel and Bonomo, 2011).

Καρβαπενεμάσες τάξης A (**KPC, GES / IBC, IMI / NMC-A, SFC-1**), καρβαπενεμάσες τάξης B (**IMP, VIM, NDM, SPM, GIM, SIM, AIM, DIM, FIM, POM**) και καρβαπενεμάσες τάξης D (τύπου **OXA**), έχουν την ικανότητα να υδρολύουν τουλάχιστον μερικώς τις καρβαπενέμες. Έχει αποδειχθεί όμως ότι η υπερπαραγωγή τους μπορεί να συνεισφέρει στην αντοχή στις καρβαπενέμες (Meletis, 2016). Στον πίνακα 4, παρατηρούμε τους τύπους των ενζύμων που έχουν δράση καρβαπενεμάσης, την γεωγραφική τους κατανομή και γενετικά στοιχεία εντόπισης των αντίστοιχων γονιδίων για την *K.pneumoniae*.

Πίνακας 4. Χαρακτηριστικά των καρβαπενεμασών που προσδιορίζονται στα στελέχη της K.pneumoniae
ΠΗΓΗ: Vera-Leiva, et al, 2017.

Λειτουργική ομάδα/ κλάση Ambler	Τύποι ενζύμων	Φάσμα δραστηριότητας	Αναστολείς	Γεωγραφική κατανομή	Μοριακός Εντοπισμός
2f / A	KPC: KPC-2 έως >24	Πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, κεφαμυκίνες, καρβαπενέμες	Κλαβουλανικό, ταζομπακτάμη, σουλβακτάμη, βορονικό οξύ	Ηνωμένες Πολιτείες, Ελλάδα, Ιταλία, Ισραήλ, Κίνα, Βραζιλία, Κολομβία, Αργεντινή, Χιλή	πλασμίδια τύπου Tn4401, IncFII, CC258
3 / B	MBL: NDM-1, IMP, VIM	Πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, κεφαμυκίνες, καρβαπενέμες	EDTA, διπικολινικό οξύ	Ιαπωνία (IMP), Ταϊβάν (IMP), Ινδία (NDM), Ελλάδα (VIM), Χιλή (NDM)	πλασμίδια τύπου IncA / C, N (NDM), integron κλάσης I (VIM, IMP)
2d / D	OXA-48, 181, 204, 232	Οι πενικιλίνες, οι αναστολείς των β-λακταμάσεων, οι καρβαπενέμες (ασθενείς)	NaCl	Τουρκία, Βόρεια Αφρική, Ευρώπη (Ισπανία, Βέλγιο), Χιλή	πλασμίδια τύπου IoI / M

3.15 Αντοχή στις αμινογλυκοσίδες

Οι μηχανισμοί αντοχής στις αμινογλυκοσίδες περιλαμβάνουν ελαττωμένη πρόσληψη του αντιβιοτικού, τροποποίηση του ριβοσωμικού στόχου, αποβολή του αντιβιοτικού από τις αντλίες εκροής και τροποποίηση των άμινο- ή υδρόξυλ-ομάδων των αμινογλυκοσιδών από περισσότερα από 50 τροποποιητικά ένζυμα [aminoglycoside-modifying enzymes (AMEs)]. Τα AMEs αποτελούν τον κύριο μηχανισμό αντοχής για τις αμινογλυκοσίδες. Ανάλογα με τον τύπο της τροποποίησης των ομάδων, τα ένζυμα ταξινομούνται ως:

- Ακετυλτρανσφεράσες [aminoglycoside acetyltransferases (AAC)].
- Νουκλεοτιδυλτρανσφεράσες [aminoglycoside nucleotidyltransferases (ANT)].
- Φωσφοτρανσφεράσες [aminoglycoside phosphotransferases (APH)].

Οι αμινογλυκοσίδες καθίστανται όλο και πιο σημαντικά για την θεραπεία ασθενών με λοίμωξη από παθογόνα MDR, όπως τα ανθεκτικά στις καρβενέμες *Enterobacteriaceae* (Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae-CRE), για τα οποία παραμένουν λίγες επιλογές θεραπείας (Gonzalez-Padilla, et al, 2015). Στον πίνακα 5 παρουσιάζονται τα συχνότερα τροποποιητικά ένζυμα των αμινογλυκοσιδών και οι αμινογλυκοσίδες έναντι των οποίων εμφανίζεται αντοχή.

*Πίνακας 5. Συχνότερα τροποποιητικά ένζυμα των αμινογλυκοσιδών και αντοχή.
ΠΗΓΗ: Ramirez and Tolmasky, 2010.*

Είδος AME	Είδος αμινογλυκοσίδης που προκαλείται αντοχή
AAC(6)-I	Tobramycin, netilmicin, amikacin, kanamycin (T, N, A, K)
ANT(2 ^{''})-I	Gentamicin, tobramycin, kanamycin (G, T, K)
AAC(3)-I	Gentamicin (G)
AAC(3)-II	Gentamicin, tobramycin netilmicin (G, T, N)
AAC(3)-III	Gentamicin, tobramycin, kanamycin (G, T, K)
AAC(3)-IV	Gentamicin, tobramycin, netilmicin (G, T, N)
AAC(3)-VI	Gentamicin, tobramycin, netilmicin (G, T, N)

3.16. Αντοχή στις κινολόνες

Ο πιο σημαντικός μηχανισμός στις κινολόνες είναι μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα που έχουν στόχο οι κινολόνες (DNA γυράση, τοποϊσομεράση IV). Ο δεύτερος μηχανισμός που είναι χρωμοσωμικός, αφορά την μειωμένη συγκέντρωση του φαρμάκου, που οφείλεται σε απώλεια ή μειωμένη έκφραση των πορινών, είτε στην μεταφορά από τις αντλίες εκροής και ο τρίτος μηχανισμός αφορά την αντοχή που μεταβιβάζεται από πλασμίδια (Correia, et al, 2017). Η ανθεκτικότητα στις κινολόνες που σχετίζεται με πλασμίδια, ανακαλύφθηκε σε ένα στέλεχος *K.pneumoniae* στην Αλαμπάμα. Το πλασμιδιακό γονίδιο αντοχής ονομάστηκε "*qnr*". Η πρωτεΐνη QnrI αποδείχθηκε ότι δεσμεύεται και προστατεύει την DNA γυράση και την τοποϊσομεράση IV από τη δράση των κινολονών (Jacoby, 2005).

3.17. Αντοχή στις πολυμυξίνες

Ο συνηθέστερος μηχανισμός επίκτητης αντοχής στις πολυμυξίνες γίνεται μέσω τροποποίησης του λιποπολυσακχαρίτη της εξωτερικής μεμβράνης του βακτηρίου. Οι παγκόσμιες επιδημιολογικές μελέτες αναφέρουν ότι η εμφάνιση της ανθεκτικότητας στην πολυμυξίνη είναι πιο συνηθισμένη στα *Enterobacteriaceae*. Στρατηγικές για την μείωση της ανάπτυξης ανθεκτικότητας σε πολυμυξίνες περιλαμβάνουν τη βελτιστοποίηση της δόσης και τη χρήση πολυμυξίνης σε συνδυασμό με άλλους πολύ δραστικούς αντιμικροβιακούς παράγοντες (Srinivas and Rivard, 2017). Τα Gram αρνητικά βακτήρια χρησιμοποιούν μηχανισμούς για να προστατευθούν από τα αντιβιοτικά της πολυμυξίνης (πολυμυξίνη Β και κολιστίνη), όπως

- Τροποποιήσεις λιποπολυσακχαριτών (LPS), όπως τροποποιήσεις του λιπιδίου Α.
- Χρήση αντλιών εκροής.
- Σχηματισμός κάψας.

Οι κύριοι μηχανισμοί που οδηγούν στην αντοχή στις πολυμυξίνες είναι τροποποιήσεις του λιποπολυσακχαριδίου της εξωτερικής μεμβράνης (LPSs) των βακτηρίων, όπως τροποποιήσεις του λιπιδίου A (Velkov, et al, 2013). Μοριακός χαρακτηρισμός των δομικών μεταβολών των LPSs, ανθεκτικών στις πολυμυξίνες στελεχών *K.pneumoniae* έδειξε την εμπλοκή των rhoP/rhoQ και pmrA/pmrB ρυθμιστικών συστημάτων. Έχει παρατηρηθεί ότι τα rhoP/rhoQ και pmrA/pmrB ρυθμιστικά συστήματα αποκαταστέλλονται ύστερα από έκθεση στελεχών *K.pneumoniae* σε πολυμυξίνες (Kim, et al, 2014), υποδηλώνοντας την εμπλοκή αυτών των συστημάτων στην αντοχή στη συγκεκριμένη κατηγορία αντιβιοτικών. Η συνεχής ενεργοποίηση του pmrA/pmrB συστήματος μπορεί να προκληθεί από μεταλλάξεις, καταλήγοντας στη σύνθεση και την προσθήκη φωσφοαιθανολαμίνης (PEtN) και 4-άμινο-4-δεόξυ-L-αραβινόζης (L-Ara4N) αντίστοιχα, στο λιπίδιο A. Επίσης, έχουν παρατηρηθεί μεταλλάξεις και στα rhoQ γονίδια σε ανθεκτικά στην κολιστίνη στελέχη *K.pneumoniae* (Olaitan, et al, 2014).

Η μετάλλαξη/απενεργοποίηση του *mgrB* γονιδίου, το οποίο κωδικοποιεί ένα αρνητικό ρυθμιστή του συστήματος σηματοδότησης rhoP / rhoQ, οδηγεί σε αύξηση της ρύθμισης αυτού του συστήματος, που οδηγεί σε αυξημένη ρύθμιση του *pmrHFIJKLM* οπερονίου και σε σύνθεση της 4-άμινο-4-δεόξυ-L-αραβινόζης, και τελικά σε αντοχή στην κολιστίνη (Poirel, et al, 2015). Η απενεργοποίηση του *mgrB* γονιδίου έχει αναγνωριστεί ως μια κοινή πηγή επίκτητης αντοχής της κολιστίνης στην *K.pneumoniae*. Επιπλέον, πρόσφατα, έχει ταυτοποιηθεί μηχανισμός ανθεκτικότητας διαμεσολαβούμενος από πλασμίδιο, που αντιστοιχεί σε μία τρανσφεράση φωσφοαιθανολαμίνης (*mcr-1* γονίδιο), σε εντεροβακτηριακά στελέχη σε όλο τον κόσμο, και επίσης σε προϊόντα διατροφής (Liu YY, et al, 2016).

Έχει αναφερθεί ότι η *K.pneumoniae* είναι ικανή να αποβάλλει τους καψιδικούς πολυσακχαρίτες (CPSs) από την επιφάνειά της. Οι απελευθερωμένοι CPSs είναι ικανοί να παγιδεύουν ή να προσδένονται στις πολυμυξίνες, μειώνοντας έτσι την ποσότητα του φαρμάκου που φτάνει στην επιφάνεια του βακτηριακού κυττάρου, με αποτέλεσμα την αυξημένη αντοχή στις πολυμυξίνες. Ο υποκείμενος μηχανισμός αποδίδεται σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κατιονικών πολυμυξινών και των ανιονικών CPSs (Llobet, et al, 2008).

Μερικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι αντλίες εκροής μπορούν επίσης να συμβάλλουν στην αντίσταση στην πολυμυξίνη. Οι αντλίες εκροής που έχουν μελετηθεί περιλαμβάνουν AcrAB και KpnEF. Έχει παρατηρηθεί ότι η *K.pneumoniae* με μετάλλαξη στο *acrB* είναι σημαντικά πιο ευαίσθητη στην πολυμυξίνη Β από το στέλεχος άγριου τύπου και ότι η πολυμυξίνη Β αποβάλλεται από την *K.pneumoniae* με ενεργειακό τρόπο (Padilla, et al, 2010).

3.18 Αντοχή στις τετρακυκλίνες

Οι τετρακυκλίνες, όπως προαναφέρθηκε δρουν αναστέλλοντας τη σύνθεση πρωτεϊνών, εμποδίζοντας την πρόσδεση του αμινοακυλο-tRNA στη θέση του ριβοσωμικού δέκτη (A). Η βακτηριακή αντοχή στις τετρακυκλίνες μπορεί να συμβεί:

- Μέσω της αντλίας εκροής.
- Μέσω προστασίας του ριβοσώματος.
- Με ενζυμική απενεργοποίηση.

Η αντοχή στην τετρακυκλίνη οφείλεται συχνά στην απόκτηση νέων γονιδίων, τυπικά μέσω οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς. Πολλά από αυτά τα γονίδια σχετίζονται με κινητά πλασμίδια ή τρανσποζόνια. Η αντοχή στις τετρακυκλίνες εμφανίστηκε σε πολλά παθογόνα βακτήρια λόγω της γενετικής απόκτησης γονιδίων *tet*. Διαφορετικά γονίδια ανθεκτικότητας σε τετρακυκλίνη (*tet*) και γονίδια ανθεκτικότητας στην οξυτετρακυκλίνη (*otr*) έχουν χαρακτηριστεί (Πίνακας 6). Στον πίνακα παρατίθενται τα χαρακτηριστικά γονίδια *tet* και *otr* (Chopra and Roberts, 2001). Οι πρωτεΐνες εκροής είναι οι καλύτερα μελετημένες πρωτεΐνες Tet. Στην *K.pneumoniae* έχουν βρεθεί τα παρακάτω γονίδια ***tet(A)***, ***tet(B)***, ***tet(C)***, ***tet(D)*** (Chopra and Roberts, 2001).

Πίνακας 6. Μηχανισμοί ανοχής με τα αντίστοιχα γονίδια *tet* και *otr*^a.
ΠΗΓΗ: Chopra and Roberts, 2001.

ΔΡΑΣΗ	ΓΟΝΙΔΙΑ
Αντλία εκροής	<i>tet(A),tet(B),tet(C),tet(D),tet(E),tet(G),tet(H),tet(I),tet(J),tet(Z), tet(30)^b,tet(31)^b tet(K),tet(L)otr(B),tcr3^c,tetP(A),tet(V),tet(Y)^d</i>
Ριβοσωμική προστασία	<i>tet(M),tet(O),tet(S),tet(W) tet(Q),tet(T),otr(A),tetP(B)^e,tef^f</i>
Ενζυματική	<i>tet(X)</i>
Άγνωστη ^f	<i>tet(U),otr(C)</i>

- a. Ομαδοποιημένο σύμφωνα με τους Mc Murry και Levy.
 b. Πρώτα αριθμημένα γονίδια.
 c. Στα γονίδια αυτά δεν έχουν δοθεί νέες ονομασίες.
 d. Η συγγένεια με τις ομάδες 1 έως 6 είναι ασαφής, καθώς το γονίδιο δεν έχει μελετηθεί εκτενώς.
 e. Το *tetP(B)* δεν βρίσκεται μόνο του και τα *tetP(A)* και *tetP(B)* μετρούνται ως ένα γονίδιο.
 f. Το *tet(U)* έχει προσδιοριστεί ως προς την αλληλουχία αλλά δεν φαίνεται να σχετίζεται ούτε με πρωτεΐνες εκροής ούτε με ριβοσωμικές πρωτεΐνες. Το *Otr(C)* δεν έχει αλληλουχηθεί.

Το 2012 απομονώθηκε από το αίμα ασθενούς στο Νοσοκομείο Ningbo First της Λαϊκής Δημοκρατίας της Κίνας, το στέλεχος NB60 της *K.pneumoniae* το οποίο ήταν ανθεκτικό σε πολλά αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν, συμπεριλαμβανομένων των β-λακταμών, των φθοριοκινολονών, των αμινογλυκοσιδών, της τριμεθοπρίμης-σουλφαμεθοξαζόλης, της κολιστίνης, των μακρολιδών και της τετρακυκλίνης (Weng, et al, 2016). Το 2017, δύο στελέχη *K.pneumoniae* (MurTR-KL001 και MurTR-KL002) που ελήφθησαν δειγματοληπτικά από τον αυστριακό ποταμό Mur κατά τη διάρκεια μιας μελέτης, εμφάνισαν ανοχή μόνο στην τετρακυκλίνη και την τιγκεκυκλίνη, αλλά παρέμειναν ευαίσθητα σε όλα τα άλλα αντιβιοτικά που ελέγχθηκαν. Αυτή είναι μία από τις σπάνιες αναφορές σχετικά με την ανθεκτικότητα της *K.pneumoniae* στην τιγκεκυκλίνη από επιφανειακά νερά, οδηγεί όμως στο συμπέρασμα πως τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια εξαπλώνονται παγκοσμίως, όχι μόνο στο νοσοκομειακό, αλλά και στο φυσικό περιβάλλον (Hladicz, et al, 2017).

Η τιγκεκυκλίνη είναι παράγωγο της μινोकυκλίνης με δραστηριότητα τόσο έναντι των Gram αρνητικών, όσο και των Gram θετικών βακτηρίων και θεωρείται ως θεραπεία εκλογής για λοιμώξεις από στελέχη *K.pneumoniae* ανθεκτικά σε καρβαπενέμες. Υπάρχουν διάφοροι

μηχανισμοί που μπορούν να οδηγήσουν σε επίκτητη ανοχή στην τιγκεκυκλίνη, οι περισσότεροι από τις οποίες βασίζονται σε χρωμοσωμικές μεταλλάξεις. Το δίκτυο γονιδίων της αντλίας εκροής AcrAB-TolC συνδέεται με την ανοχή στην τιγκεκυκλίνη, συγκεκριμένα, υπεύθυνη είναι μετάλλαξη στους καταστολείς RamR, MarR και SoxR των ρυθμιστών (RamA, MarA και SoxS) της αντλίας εκροής (Hladicz, et al, 2017). Η ανοχή στην τιγκεκυκλίνη της *K. pneumoniae* πιστεύεται ότι μεσολαβείται κυρίως από την υπερέκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν την αντλία εκροής AcrAB-ToIO, η οποία ελέγχεται από τον τοπικό καταστολέα *acrR* καθώς και από μεταγραφικούς ενεργοποιητές, όπως ο *ramA*. Τα *oqxAB* γονίδια βρίσκονται στο χρωμόσωμα της *K.pneumoniae*. Η υπερέκφραση του γονιδίου *ragA* σχετίζεται με την αυξημένη έκφραση της *oqxAB* (αντλία εκροής η οποία επίσης συνδέεται με την αντίσταση στην τιγκεκυκλίνη) ενώ αντίθετα, η αυξημένη έκφραση του γειτονικού γονιδίου *oqxR*, οδηγεί σε μείωση της παραγωγής της. Εκτός από τους μηχανισμούς αντίστασης που προκαλούνται από την εκροή, έχει περιγραφεί μια αλλοίωση στη θέση στόχου της τιγκεκυκλίνης της ριβοσωματικής πρωτεΐνης S10, η οποία κωδικοποιείται από το *rpsJ* γονίδιο. Μια μετάλλαξη στην ριβοσωματική πρωτεΐνη RPS10, η οποία βρίσκεται κοντά στη ριβοσωμική θέση πρόσδεσης της τιγκεκυκλίνης, είναι πιθανό να επηρεάσει τις ιδιότητες πρόσδεσης μεταξύ του ριβοσώματος και της τιγκεκυκλίνης (Hladicz, et al, 2017). Υπάρχουν και άλλοι γνωστοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας στην τιγκεκυκλίνη που προσδίδονται από τις πρωτεΐνες Tet, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που σχετίζονται με το ένζυμο τροποποίησης της τιγκεκυκλίνης Tet (X), τις μεταλλαγμένες αντλίες εκροής των Tet (A) και Tet (L), καθώς και τις προστατευτικές πρωτεΐνες ριβοσώματος Tet (M), που δεν έχουν ακόμη ταυτοποιηθεί στην *K.pneumoniae* (Chiu, et al, 2017).

4. Τρόποι ελέγχου αντοχής

Ο έλεγχος ευαισθησίας της *K.pneumoniae* πραγματοποιείται με το αντιβιογράμμα, με αυτοματοποιημένα ή μη συστήματα, ενώ παράλληλα ο έλεγχος αντοχής της περιλαμβάνει φαινοτυπικές δοκιμασίες και μοριακούς ελέγχους.

4.1 Φαινοτυπικές δοκιμασίες

Ο έλεγχος ευαισθησίας της *K.pneumoniae* στους αντιμικροβιακούς παράγοντες, γίνεται με φαινοτυπικές μεθόδους, που είναι μέθοδοι αναφοράς, είναι γενικά αξιόπιστες, εύκολες στην εφαρμογή τους, με χαμηλό κόστος και είναι ποιοτικές ή ποσοτικές (Εικόνα 18). Αυτές είναι: Α) η ποιοτική μέθοδος διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών σε άγαρ (Kirby-Bauer disk diffusion test), και Β) η μέθοδος αραιώσης αντιβιοτικών σε υγρά ή στερεά θρεπτικά υλικά για τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας (Minimum Inhibitory Concentration-MIC) με: (i) E-test, (ii) δοκιμασία αραιώσεων σε ζωμό ή άγαρ (iii) αυτόματα συστήματα. Με αυτές τις μεθόδους μπορούν να χαρακτηριστούν τα στελέχη *K.pneumoniae* ως ευαίσθητα (S-όπου η αντιμικροβιακή δραστηριότητα συνδέεται με πιθανότητα θεραπευτικής επιτυχίας), ενδιάμεσης ευαισθησίας (I-όπου η αντιμικροβιακή δράση συνδέεται με ένα απροσδιόριστο ή αβέβαιο θεραπευτικό αποτέλεσμα) και ανθεκτικά (R-όπου η αντιμικροβιακή δράση συνδέεται με υψηλότερη από την αναμενόμενη πιθανότητα θεραπευτικής αποτυχίας) (EUCAST, 2019).

Α) Η διάχυση δίσκων (Kirby-Bauer) συνιστά την πιο διαδεδομένη μέθοδο για τον έλεγχο της ευαισθησίας. Σε τρυβλίο με θρεπτικό άγαρ ενοφθαλμίζεται προτυποποιημένη ποσότητα του εξεταζόμενου μικροβίου, τοποθετούνται δίσκοι εμποτισμένοι με γνωστές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών και προσδιορίζονται οι διάμετροι αναστολής. Η εκτέλεση της διαδικασίας και η ερμηνεία των αποτελεσμάτων γίνεται με προτυποποιημένες οδηγίες των CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) ή EUCAST (European Committee on Antimicrobial

Susceptibility Testing). Η διάμετρος της ζώνης συγκρίνεται με προτυποποιημένες διαμέτρους που υπάρχουν σε πίνακες αναφοράς για την *K.pneumoniae* σύμφωνα με τις οδηγίες της CLSI ή της EUCAST.

B) Η μέθοδος που προσδιορίζει την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC), δηλαδή τη μικρότερη συγκέντρωση αντιβιοτικού που αναστέλλει την ορατή ανάπτυξη του υπό εξέταση βακτηρίου αλλά και κάποιες φορές όταν απαιτείται την ελάχιστη βακτηριοκτόνο συγκέντρωση (MBC, Minimal Bactericidal Concentration) είναι η μέθοδος αραιώσεων σε ζωμό ή άγαρ. Η διαδικασία και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων βασίζεται στις οδηγίες των CLSI ή της EUCAST.

i) Ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιβιοτικού (E-test). Στο άγαρ στο οποίο ενοφθαλμίζεται το μικρόβιο τοποθετείται πλαστικοποιημένη ταινία εμποτισμένη με διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού για προσδιορισμό MIC. Έχει βρεθεί όμως ότι μπορεί να υποεκτιμούν την αντοχή κάποιων αντιβιοτικών, όπως της κολιστίνης στα Gram(-) βακτηρίδια (Matuschek, et al, 2018).

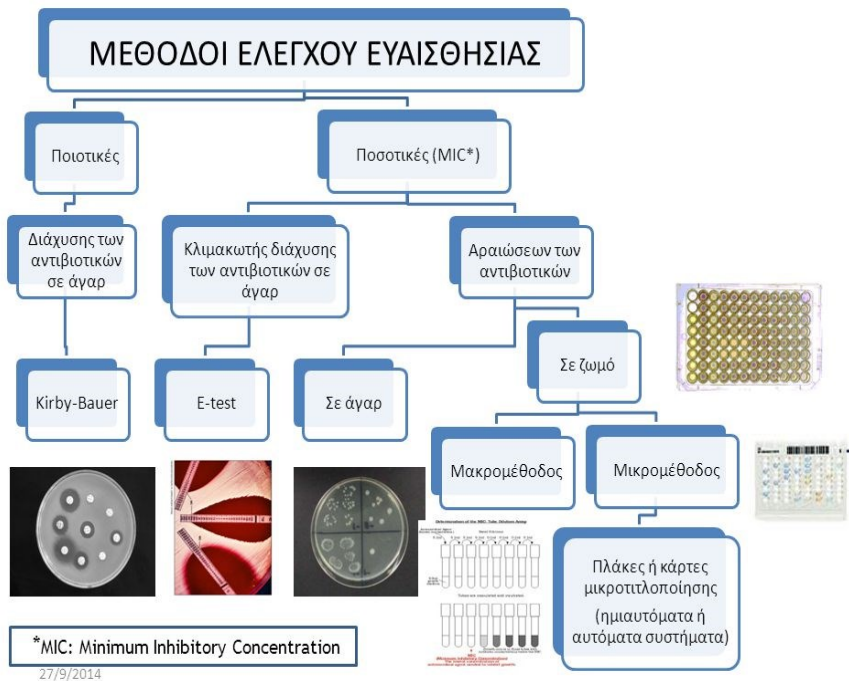
ii) Στην μέθοδο αραιώσεων σε ζωμό γίνονται σταδιακές αραιώσεις αντιβιοτικού στα διάφορα φιαλίδια που περιέχουν θρεπτικό ζωμό όπου ενοφθαλμίζεται το υπό εξέταση μικρόβιο, ώστε να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του αντιβιοτικού, όπου παρατηρείται η ανασταλτική δράση.

iii) Έλεγχος ευαισθησίας με αυτοματοποιημένα συστήματα, όπως π.χ. το αυτοματοποιημένο σύστημα Vitek-2 (bioMerieux). Ο αναλυτής δίνει τη δυνατότητα προσδιορισμού MIC και ανίχνευσης φαινοτύπων για πολλούς μικροοργανισμούς, όπως και για την *K.pneumoniae* (Wiegand, et al, 2007).

Επειδή οι παραπάνω μέθοδοι δεν προσδιορίζουν συνήθως τον μηχανισμό αντοχής, έχουν χρησιμοποιηθεί για την οικογένεια των Εντεροβακτηριακών και με ευρεία εφαρμογή ιδιαίτερα για την *K.pneumoniae* και άλλες φαινοτυπικές μέθοδοι. Τέτοιες κυρίως είναι το Modified Hodge Test (MHT), η ανίχνευση αντοχής με χρήση αναστολέων π.χ. EDTA, βορονικό οξύ, ή με τη χρήση χρωμογόνων θρεπτικών υποστρωμάτων, ή με την ανίχνευση με ενζυμική δράση π.χ. μέθοδος απενεργοποίησης καρβαπενέμης (Carbapenem Inactivation

Method-CIM) (Tsakris, et al, 2009, Tsakris, et al, 2010, Pierce, et al, 2017). Επίσης, έχουν χρησιμοποιηθεί ανοσοχρωματογραφικές μέθοδοι με εμπορικά πάνελ κυρίως για την ανίχνευση των καρβαπενεμασών, όπως είναι οι δοκιμές πλευρικής ροής (ICT) που έχουν μικρό χρόνο ανίχνευσης, μεγάλη ειδικότητα και ευαισθησία, βιοχημικές μέθοδοι, όπως η σπεκτρομετρία με το MALDI TOF MS (φασματοφωτομετρία μάζας) και χρωματομετρικές μέθοδοι που βασίζονται στην ενζυμική υδρόλυση του αντιβιοτικού ή σε μεταβολικά προϊόντα που οδηγούν σε αλλαγή χρώματος όπως π.χ. δοκιμή β-LACTA (Renoisé, et al, 2013), δοκιμή CarbaNP (Nordmann, Poirel, et al, 2012), δοκιμή ESBL NDP (Nordmann, Dortet, et al, 2012) και επίσης η δοκιμασία Rapid Polymyxin NP test για την ανίχνευση αντοχής στις πολυμυξίνες των Εντεροβακτηριακών που έχει ευαισθησία και ειδικότητα 100% (Poirel, et al, 2018).

Εικόνα 18. Μέθοδοι ελέγχου ευαισθησίας.



4.2 Μοριακές τεχνικές

Οι μοριακές τεχνικές αποτελούν μέθοδο αναφοράς (gold standard), καθώς αναγνωρίζουν με ακρίβεια τα υπεύθυνα γονίδια που προσδίδουν αντοχή και χρησιμοποιούνται συνήθως ως επιβεβαίωση των φαινοτυπικών μεθόδων.

4.3 Διερεύνηση αντοχής της *K.pneumoniae* σε β-λακταμάσες

Η ανίχνευση της παραγωγής των β-λακταμασών από πολυανθεκτικά στελέχη *K.pneumoniae* συμβάλλει στην επιλογή της κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής, αλλά και στην έγκαιρη εφαρμογή μέτρων ελέγχου λοιμώξεων για τον περιορισμό της διασποράς. Η εργαστηριακή ανίχνευση των ESBLs στην καθημερινή κλινική διαγνωστική πράξη, γίνεται με φαινοτυπικές δοκιμασίες επιβεβαίωσης, εφόσον έχει προηγηθεί ο αρχικός έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβιοτικά. Η υποψία ότι στέλεχος *K.pneumoniae* είναι πιθανόν να παράγει ESBL τίθεται όταν κατά τον αρχικό έλεγχο ευαισθησίας παρουσιάζει *in vitro* αντοχή σε μία κεφαλοσπορίνη (συνήθως χρησιμοποιείται η κεφοδοξίμη, αλλά και άλλες όπως η κεφταζιδίμη, η κεφτριαξόνη, η κεφοταξίμη) (EUCAST, 2017). Για την κεφοταξίμη, κεφτριαξόνη, κεφταζιδίμη, και κεφοδοξίμη, η συνιστώμενη τιμή MIC για περαιτέρω έλεγχο για ESBL είναι πάνω από 1mg/L, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές του EUCAST (Πίνακας 7). Η κεφοδοξίμη είναι η πιο ευαίσθητη ως δείκτης κεφαλοσπορίνη για την ανίχνευση της παραγωγής ESBL και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο. Ωστόσο, είναι λιγότερο ειδική από τον συνδυασμό κεφοταξίμης (ή κεφτριαξόνης) και κεφταζιδίμης, και στη δοκιμή επιβεβαίωσης χρησιμοποιούνται μόνο η κεφτριαξόνη και η κεφταζιδίμη. Στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται οι αντίστοιχοι διάμετροι των ζωνών αναστολής και οι MIC για τις κεφαλοσπορίνες για τον έλεγχο ευαισθησίας τους.

Πίνακας 7. Δείκτες κεφαλοσπορίνης για έλεγχο ευαισθησίας, (EUCAST, 2017).

Μέθοδος	Αντιβιοτικό	Έλεγχος για ESBL εάν
Αραίωση σε ζυμό ή άγαρ¹	Κεφοταξίμη / Κεφτριαζόνη και Κεφταζιδίμη	MIC > 1 mg/L για κάθε παράγοντα
	Κεφποδοξίμη	MIC > 1 mg/L
Διάχυση δίσκου¹	Κεφοταξίμη (5 μg) ή	Ζώνη αναστολής < 21 mm
	Κεφτριαζόνη (30 μg)	Ζώνη αναστολής < 23 mm
	και Κεφταζιδίμη (10 μg)	Ζώνη αναστολής < 22 mm
	Κεφποδοξίμη (10 μg)	Ζώνη αναστολής < 21 mm

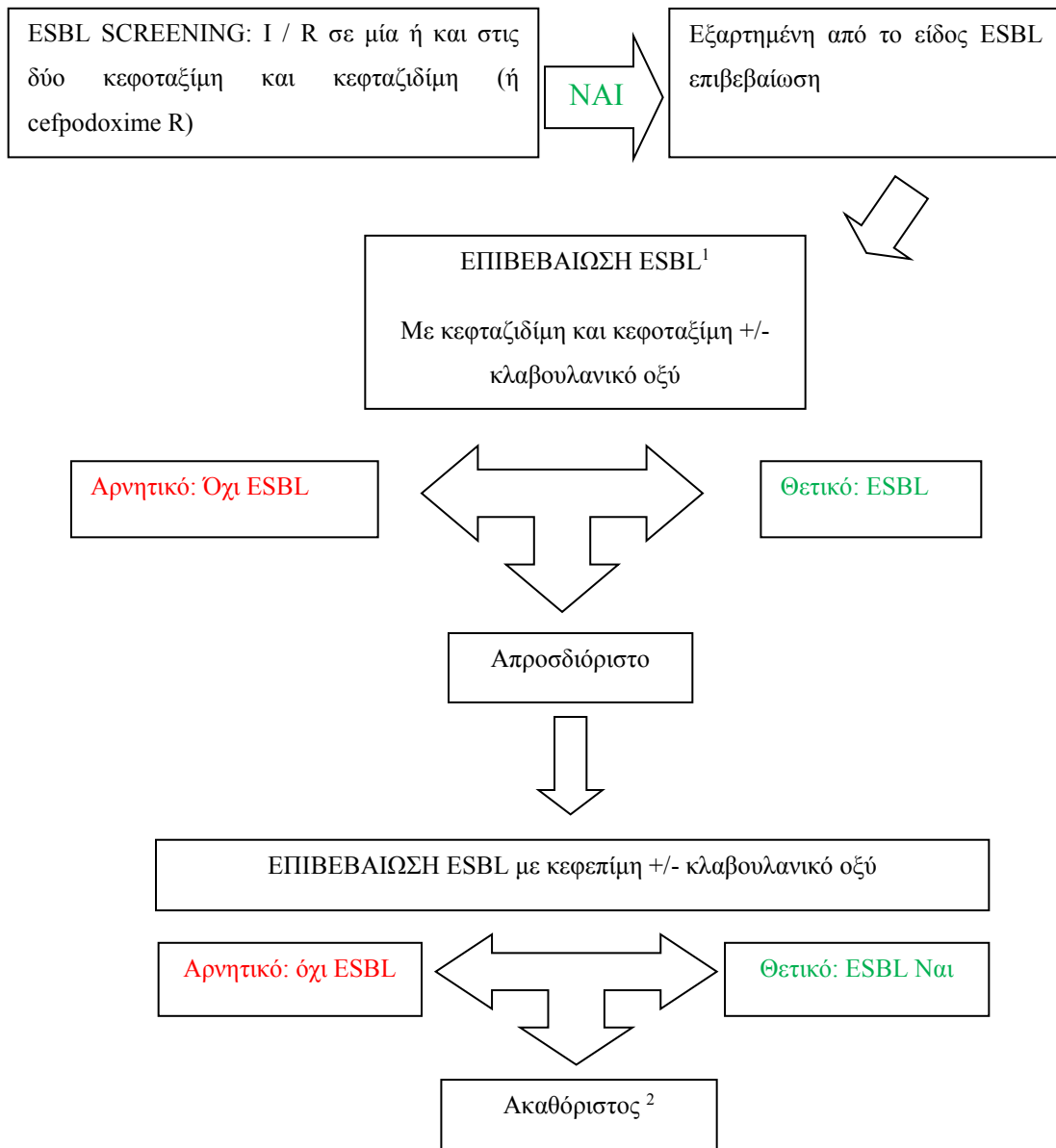
«

¹Με όλες τις μεθόδους μπορεί να γίνει δοκιμασία με:

(i) Κεφοταξίμη ή Κεφτριαζόνη και Κεφταζιδίμη

(ii) μόνο Κεφποδοξίμη.

Σχήμα 1 Αλγόριθμος για τη φαινοτυπική ανίχνευση των ESBLs (EUCAST, 2017).



¹ Εάν η κεφοξιτίνη έχει ελεγχθεί και έχει MIC > 8 mg/L, εκτελείται δοκιμή επιβεβαίωσης κεφεπίμης +/- κλαβουλανικού οξέος.

² Δεν μπορεί να προσδιοριστεί ως θετική ή αρνητική (π.χ. εάν δεν είναι δυνατή η ανάγνωση μιας ταινίας διαβαθμισμένης συγκέντρωσης ή δεν υπάρχει σαφής συνέργεια σε δοκιμές συνδυασμού δίσκου και διπλού δίσκου).

Για τις επιβεβαιωτικές φαινοτυπικές δοκιμασίες ανίχνευσης των ESBLs, πρέπει η κεφοταξίμη (ή η κεφτριαξόνη) και η κεφταζιδίμη να χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα ως δείκτες κεφαλοσπορίνης, καθώς μπορεί να υπάρχουν μεγάλες διαφορές στις MIC αυτών των αντιβιοτικών για τα διάφορα στελέχη που παράγουν διαφορετικές ESBLs (Oliver, et al, 2002, Hirakata, et al, 2005). Ο αλγόριθμος για την ανίχνευση περιγράφεται στο σχήμα 1 και οι φαινοτυπικές μέθοδοι επιβεβαίωσης ESBL για τα *Enterobacteriaceae* και την *K.pneumoniae*, παρουσιάζονται στον πίνακα 8.

Πίνακας 8. Φαινοτυπικές μέθοδοι επιβεβαίωσης ESBL, (EUCAST, 2017).

Μέθοδος	Αντιμικροβιακός παράγοντας (συγκέντρωση αντιβιοτικού)	Η επιβεβαίωση του ESBL είναι θετική εάν
Δοκιμή βαθμίδωσης ESBL(E-test)	Κεφοταξίμη +/- κλαβουλανικό οξύ	Αναλογία MIC \geq 8 ή παραμορφωμένη έλλειψη
	Κεφταζιδίμη +/- κλαβουλανικό οξύ	Αναλογία MIC \geq 8 ή παραμορφωμένη έλλειψη
Δοκιμή συνδυασμένων δίσκων (CDT)	Κεφοταξίμη (30 μ g) +/- κλαβουλανικό οξύ (10 μ g)	\geq 5 mm αύξηση στη ζώνη αναστολής
	Κεφταζιδίμη (30 μ g) +/-κλαβουλανικό οξύ (10 μ g)	\geq 5 mm αύξηση στη ζώνη αναστολής
Αραίωση σε ζωμό	Κεφοταξίμη +/- κλαβουλανικό οξύ (4 mg / L)	Αναλογία MIC \geq 8
	Κεφταζιδίμη +/- κλαβουλανικό οξύ (4 mg / L)	Αναλογία MIC \geq 8
	Cefepime +/- κλαβουλανικό οξύ (4 mg / L)	Αναλογία MIC \geq 8
Δοκιμή συνέργειας με διπλούς δίσκους (DDST)	Κεφοταξίμη, κεφταζιδίμη, κεφεπίμη και αμοξυκιλίνη-κλαβουλανικό οξύ	Επέκταση της ζώνης αναστολής της κεφαλοσπορίνης προς τον δίσκο αμοξυκιλίνης-κλαβουλανικού οξέος

4.3.1 Φαινοτυπικές μέθοδοι

Από τις διάφορες φαινοτυπικές μεθόδους που βασίζονται στην *in vitro* αναστολή της δράσης των ESBL ενζύμων από το κλαβουλανικό οξύ συνιστώνται τέσσερις (Πίνακας 8) για την επιβεβαίωση παραγωγής ESBL από στελέχη *Enterobacteriaceae* συμπεριλαμβανομένης και της *K.pneumoniae*: Α) η δοκιμή δίσκου συνδυασμού (CDT) Β) η δοκιμή συνέργειας διπλού δίσκου (DDST) Γ) η δοκιμασία βαθμίδωσης με ταινίες ESBL και Δ) η δοκιμή μικροαραιώσεων σε ζωμό (EUCAST, 2017). Σε μία πολυκεντρική μελέτη, συγκριτικά με CDT έδειξε καλύτερη ειδικότητα η δοκιμασία βαθμίδωσης ESBL, αλλά με συγκρίσιμη ευαισθησία (M'Zali, et al, 2000).

A. Δοκιμή συνδυασμένων δίσκων (CDT). Για κάθε δοκιμή, εφαρμόζονται δισκία που περιέχουν κεφαλοσπορίνη (κεφοταξίμη, κεφταζιδίμη, κεφεπίμη) μόνη της, και σε συνδυασμό με κλαβουλανικό οξύ. Η δοκιμή είναι θετική για το στέλεχος *K.pneumoniae* εάν η διάμετρος της ζώνης αναστολής γύρω από το δισκίο κεφαλοσπορίνης σε συνδυασμό με κλαβουλανικό οξύ είναι ≥ 5 mm από ότι χωρίς αυτό (EUCAST, 2017, Stürenburg, et al, 2004).

B. Δοκιμή συνέργειας διπλού δίσκου (DDST). Δισκία που περιέχουν κεφαλοσπορίνες (κεφοταξίμη, κεφταζιδίμη, κεφεπίμη) τοποθετούνται δίπλα σε ένα δίσκο με κλαβουλανικό οξύ (αμοξυκιλίνη-κλαβουλανικό οξύ). Ένα θετικό αποτέλεσμα υποδεικνύεται όταν η ζώνη αναστολής γύρω από οποιονδήποτε δισκίο κεφαλοσπορίνης αυξάνεται ή σχηματίζεται μια μορφή σαν «κλειδαρότρυπα» προς την κατεύθυνση του δίσκου που περιέχει κλαβουλανικό οξύ (EUCAST, 2017).

Γ. Μέθοδος βαθμίδωσης με ταινίες ESBL. Οι δοκιμές αυτές διαβάζονται και ερμηνεύονται σύμφωνα με τις οδηγίες του κάθε κατασκευαστή. Η δοκιμή είναι θετική αν παρατηρηθεί ≥ 8 φορές μείωση στη MIC της κεφαλοσπορίνης σε συνδυασμό με κλαβουλανικό οξύ σε σύγκριση με τη MIC μόνο της κεφαλοσπορίνης. Χρησιμοποιείται μόνο για την επιβεβαίωση της παραγωγής ESBL και δεν είναι αξιόπιστη για τον προσδιορισμό της MIC (EUCAST, 2017).

Δ. Μέθοδος μικροαραιώσεων σε ζωμό. Η δοκιμασία αραιώσης διεξάγεται σε Mueller-Hinton ζωμό που περιέχει αυξανόμενες αραιώσεις κεφοταξίμης, κεφταζιδίμης και κεφεπίμης σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 0,25 έως 512 mg/L, με και χωρίς κλαβουλανικό οξύ. Η δοκιμή είναι θετική εάν παρατηρηθεί ≥ 8 -πλάσια μείωση της MIC σε οποιασδήποτε από τις κεφαλοσπορίνες σε συνδυασμό με κλαβουλανικό οξύ σε σύγκριση με τη MIC της κεφαλοσπορίνης (EUCAST, 2017).

Φαινοτυπική ανίχνευση του ESBL παρουσία άλλων β-λακταμασών που δείχνουν συνέργεια. Επειδή μπορούν να προκύψουν απροσδιόριστα αποτελέσματα δοκιμών (Etest) και ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα (CDT, DDST, Etest, αραιώση σε ζωμό) λόγω υψηλού επιπέδου έκφρασης β-λακταμασών AmpC, οι οποίες αποκρύπτουν την παρουσία ESBLs (Paterson and Bonomo, 2005, Jacoby, et al, 2009), για να επιβεβαιωθεί η παρουσία ESBLs, συνίσταται η διενέργεια πρόσθετης δοκιμής επιβεβαίωσης ESBL με κεφεπίμη ως δείκτη κεφαλοσπορίνης (η κεφεπίμη γενικά δεν υδρολύεται από β-λακταμάσες AmpC) (Stürenburg, et al, 2004). Οι εναλλακτικές προσεγγίσεις περιλαμβάνουν τη χρήση κλοξακιλλίνης, η οποία είναι ένας καλός αναστολέας των ενζύμων AmpC (Drieux, et al, 2008).

Η παρουσία των ESBLs μπορεί επίσης να καλυφθεί από τις καρβαπενεμάσες, όπως MBLs ή KPCs (αλλά όχι από ένζυμα τύπου OXA-48) ή από μειωμένη διαπερατότητα. Στην περίπτωση αυτή της παραγωγής και άλλων β-λακταμασών, η εφαρμογή τροποποιημένου ESBL test μπορεί να μας βοηθήσει ικανοποιητικά στην ανίχνευση των ESBLs (Poulou, et al, 2014).

Βιοχημική (χρωματομετρική) δοκιμή. Στις βιοχημικές χρωματομετρικές δοκιμές περιλαμβάνεται α) η δοκιμή ESBL NDP, που χρησιμοποιεί την κεφοταξίμη ως δείκτη αντιμικροβιακής αντοχής, και την ταζομπακτάμη ως αναστολέα, όπου η αλλαγή χρώματος από κόκκινο σε κίτρινο θεωρείται θετικό αποτέλεσμα. Η δοκιμή μπορεί να χρησιμοποιηθεί εκτός από στελέχη και απευθείας σε δείγματα ασθενή και έχει εξαιρετική ευαισθησία και ειδικότητα (Nordmann, Dortet, et al, 2012). β) Η δοκιμασία β-LACTA είναι μια δοκιμή που χρησιμοποιεί ένα χρωμογόνο υπόστρωμα κεφαλοσπορίνης σε στελέχη ή απευθείας σε κλινικά

δείγματα. Σε μια πολυκεντρική μελέτη στο Βέλγιο και τη Γαλλία, βρέθηκε ότι παρουσιάζει εξαιρετική ευαισθησία και ειδικότητα για την *K.pneumoniae* (96% και 100% αντίστοιχα), ενώ έδειξε χαμηλότερη ευαισθησία (67%) για τα είδη που παράγουν επαγωγίμες β-λακταμάσες AmpC (Renois , et al, 2013).

Γονοτυπική ανίχνευση. Για τη γονοτυπική ανίχνευση ή επιβεβαίωση της παρουσίας των ESBL γονιδίων υπάρχουν διάφορες μέθοδοι, όπως PCR και αλληλούχιση ή αλληλούχιση πλήρους γονιδιώματος (WGS), ακολουθούμενη από in silico χαρτογράφηση των γονιδίων αντίστασης (EUCAST, 2017).

4.4 Διερεύνηση αντοχής της *K.pneumoniae* στις καρβαπενέμες

Τα στελέχη *K.pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάση συχνά διαθέτουν και άλλους μηχανισμούς αντοχής σε ευρύ φάσμα αντιμικροβιακών παραγόντων και σχετίζονται με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας (Souli, et al, 2010). Η ανίχνευση της παραγωγής καρβαπενεμάσης σε κλινικά δείγματα βασίζεται πρώτα σε μια προσεκτική ανάλυση των αποτελεσμάτων των δοκιμών ευαισθησίας που λαμβάνονται συνήθως με τα αυτοματοποιημένα συστήματα, τον προσδιορισμό της MIC και τις δοκιμασίες διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών. Τα αυτοματοποιημένα συστήματα μπορεί να μην ανιχνεύουν αξιόπιστα όλους τους τύπους καρβαπενεμασών (Woodford, et al, 2010).

Οι συνιστώμενες μέθοδοι για την ανίχνευση καρβαπενεμασών είναι:

1. Έλεγχος για την παραγωγή καρβαπενεμάσης. Υπολογίζονται οι MIC των στελεχών για τις καρβαπενέμες. Οι τιμές ECOFF (Epidemiologic cut-off values) όπως ορίζονται από το EUCAST μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση καρβαπενεμάσης. Η μεροπενέμη είναι ο καλύτερος δείκτης, για την ανίχνευση καρβαπενεμάσης, λόγω της ευαισθησίας και της ειδικότητάς της (Nordmann, Gniadkowski, et al, 2012). Η ερταπενέμη έχει μεγαλύτερη ευαισθησία, αλλά έχει χαμηλή ειδικότητα, [λόγω της περιορισμένης αστάθειάς της σε β-λακταμάσες εκτεταμένου φάσματος (ESBLs) και AmpC β-λακταμάσες σε συνδυασμό με απώλεια πορίνης] (Nordmann, Gniadkowski, et al, 2012). Οι κατάλληλες τιμές cut-off για πιθανή ανίχνευση καρβαπενεμασών παρουσιάζονται στον πίνακα 9 (EUCAST, 2017).

Πίνακας 9. Κλινικά breakpoints και τιμές cut-off για τον έλεγχο παραγωγής καρβαπενεμάσης στα Enterobacteriaceae (EUCAST, 2017).

Καρβαπενέμη	MIC (mg / L)		Διάμετρος ζώνης αναστολής (mm) με δίσκους 10 μg	
	Κλινικά breakpoints (S)	Screening cutoff	Κλινικά breakpoints (S)	Screening cutoff
Μεροπενέμη¹	≤2	>0.125	≥22	<28 ²
Ερταπενέμη³	≤0.5	>0.125	≥25	<25

¹ Καλύτερος συνδυασμός ευαισθησίας και ειδικότητας.

² Στελέχη με διάμετρο 25-27 mm πρέπει να διερευνηθούν για παραγωγή καρβαπενεμάσης αν είναι ανθεκτικά σε πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη και / ή τεμοκιλλίνη. Διερεύνηση για καρβαπενεμάσες πρέπει να εφαρμόζεται εάν η διάμετρος ζώνης της μεροπενέμης είναι <25 mm.

³ Υψηλή ευαισθησία αλλά χαμηλή ειδικότητα.

Μέθοδοι επιβεβαίωσης

Μετά την ανίχνευση μειωμένης ευαισθησίας σε καρβαπενέμες, εφαρμόζονται φαινοτυπικές μέθοδοι ανίχνευσης καρβαπενεμασών, όπως:

A. Δοκιμή συνδυασμού δίσκων αντιβιοτικών. Η μέθοδος δοκιμής συνδυασμού δίσκων είναι διαθέσιμη και σαν εμπορικά τεστ από διάφορους κατασκευαστές. Οι δίσκοι περιέχουν μεροπενέμη ± διάφορους αναστολείς, όπως τα παράγωγα του βορονικού οξέος, π.χ. 3-αμινο-φαινυλ-βορικό οξύ (APBA) που αναστέλλει τα ένζυμα καρβαπενεμάσης της κατηγορίας A (κυρίως των KPC), ή το διπικολινικό οξύ (DPA) και το αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) που αναστέλλουν τις καρβαπενεμάσες κατηγορίας B (Tsakris, et al, 2010). Επιπλέον, το OXA-48 αναστέλλεται από την αβιμπακτάμη (μη ειδικός αναστολέας), η οποία δεν έχει συμπεριληφθεί σε όλα τα φαινοτυπικά πάνελ (Porres-Osante, et al, 2014).

Η κλοξακιλλίνη, η οποία αναστέλλει τις β-λακταμάσες AmpC, έχει συμπεριληφθεί στις δοκιμασίες για την διαφοροποίηση από την μια της υπερπαραγωγής AmpC με την απώλεια πορίνης και από την άλλη της παραγωγής καρβαπενεμάσης (Πίνακας 10, Σχήμα 2) (EUCAST, 2017).

Η Temocillin (τεμοκιλλίνη) που έχει υψηλού επιπέδου αντοχή (MIC > 128 mg/L) σε στελέχη με OXA-48, έχει προταθεί ως φαινοτυπικός δείκτης για την πιθανή παραγωγή OXA-48 (van Dijk, et al, 2014). Ωστόσο, αυτός ο δείκτης δεν είναι ειδικός για τον τύπο OXA-48, καθώς και άλλοι μηχανισμοί αντίστασης θα μπορούσαν να προσδώσουν αυτόν τον φαινότυπο.

Η χρήση της τροποποιημένης δοκιμής (MHT) δεν συνιστάται προς το παρόν, καθώς τα αποτελέσματα ερμηνεύονται δύσκολα και σε ορισμένες περιπτώσεις η ευαισθησία και η ειδικότητα είναι χαμηλές (EUCAST, 2017).

Πίνακας 10. Ερμηνεία των φαινοτυπικών δοκιμασιών (καρβαπενεμάσες με έντονους χαρακτήρες) με μεθόδους διάχυσης (EUCAST, 2017).

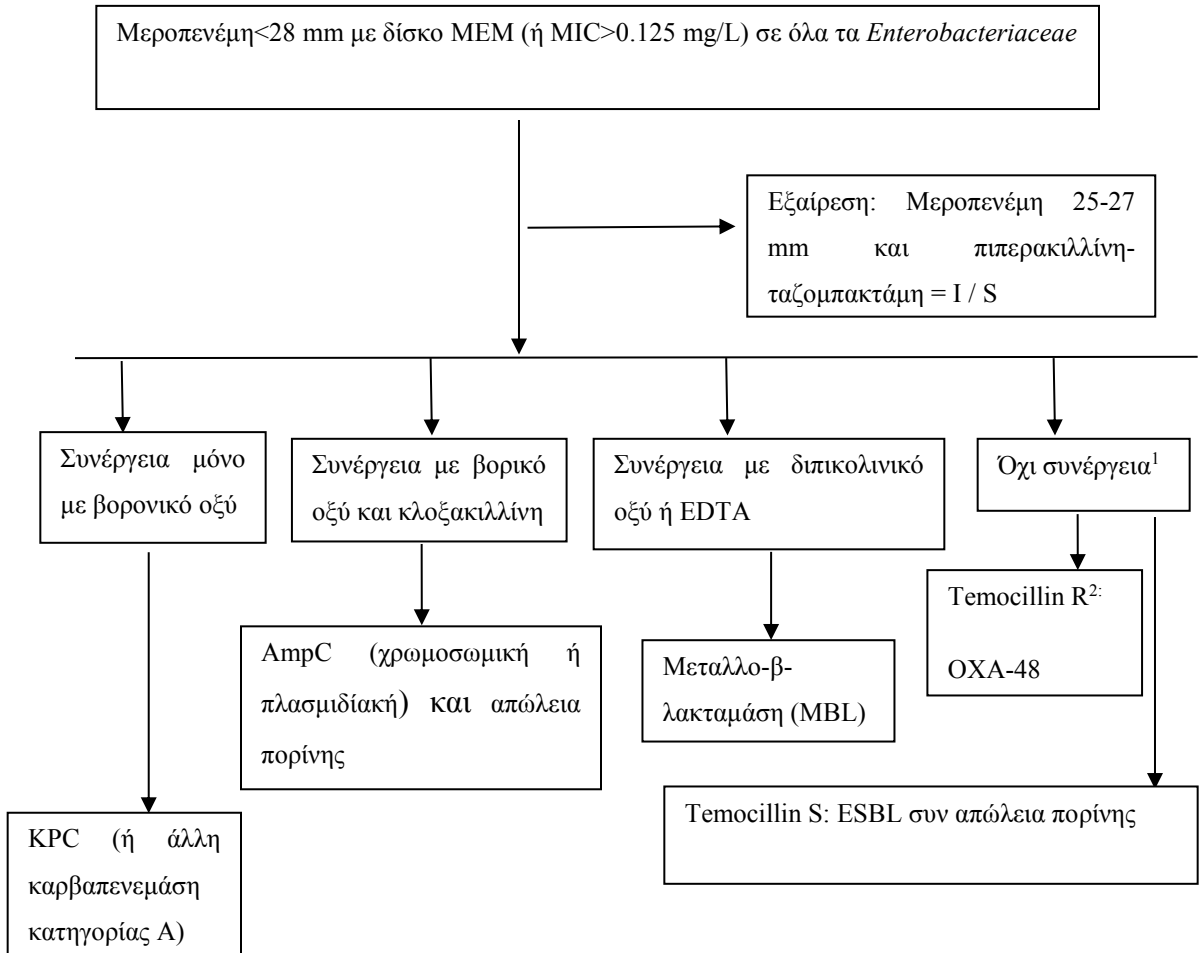
β-λακταμάση	Η συνέργεια παρατηρείται ως αύξηση στη διάμετρο ζώνης (mm) με 10 μg δισκίο / δισκίο μεροπενέμης				Temocillin MIC > 128 mg / L ή διάμετρο αναστολής < 11mm
	DPA/EDTA	APBA/PBA	DPA+APBA	CLX	
MBL	+	-	-	-	Μεταβλητός ¹
KPC	-	+	-	-	Μεταβλητός ¹
MBL + KPC	Μεταβλητός	Μεταβλητός	+	-	Μεταβλητός ¹
OXA-48-like	-	-	-	-	ναι
AmpC + porin loss	-	+	-	+	Μεταβλητός ¹
ESBL + porin loss	-	-	-	-	όχι

MBL=μεταλλο-β-λακταμάση, KPC=καρβαπενεμάση *Klebsiella pneumoniae*, DPA=διπικολινικό οξύ, EDTA=αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ, APBA=αμινοφαινυλ-βορονικό οξύ, PBA=φαινυλ-βορονικό οξύ, CLX=κλοζακιλλίνη.

¹ Η δοκιμή ευαισθησίας στην Temocillin συνιστάται μόνο σε περιπτώσεις όπου δεν ανιχνεύεται συνέργεια, προκειμένου να διαχωριστούν μεταξύ ESBL με απώλεια πορίνης και των ενζύμων τύπου OXA-48. Όταν υπάρχουν άλλα ένζυμα η ευαισθησία είναι μεταβλητή και δεν παρέχει περαιτέρω ένδειξη για β-λακταμάση (van Dijk, et al, 2014)

Ο παρακάτω αλγόριθμος (Σχήμα 2) διαφοροποιεί τις μεταλλο-β-λακταμάσες, τις καρβαπενεμάσες κατηγορίας A, καρβαπενεμάσες κατηγορίας D και μη καρβαπενεμάσες (ESBL ή AmpC και απώλεια πορίνης). Το μειονέκτημα αυτών των μεθόδων είναι ότι χρειάζονται 18 ώρες επώαση, γεγονός που οδήγησε στην εισαγωγή καινοτόμων ταχέων μεθόδων (EUCAST, 2017).

Σχήμα 2. Αλγόριθμος ανίχνευσης καρβαπενεμάσης (EUCAST, 2017).



¹ Ο συνδυασμός αρκετών καρβαπενεμασών μπορεί επίσης να μην οδηγήσει σε καμία συνέργεια - π.χ. συνδυασμός MBL και KPC. Οι μοριακές δοκιμές είναι συνήθως απαραίτητες σε τέτοιες περιπτώσεις.

² Η αντοχή υψηλού επιπέδου, τεμοκιλλίνη (> 128 mg / L, διάμετρος ζώνης < 11 mm) είναι ένας φαινοτυπικός δείκτης παραγωγής της OXA-48.

B. Βιοχημικές (χρωματομετρικές) δοκιμές. Η δοκιμασία CarbaNP είναι μία ταχεία δοκιμή (<2 h) για την ανίχνευση της υδρόλυσης της καρβαπενέμης. Ανιχνεύει ένζυμα από την κατηγορία A: KPC, κατηγορία B: μεταλλο β-λακταμάσες (MBL) NDM-1, VIM και IMP, κατηγορία D: καρβαπενεμάσες τύπου OXA. Η δοκιμή CarbaNP έχει δοκιμαστεί και ελεγχθεί σε βακτηριακές αποικίες που αναπτύσσονται σε άγαρ Mueller-Hinton, αιματούχο, Trypticase σόγια άγαρ και τα πλέον εκλεκτικά μέσα που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες (Nordmann, Poirel, et al, 2012). Η εμπορική παραλλαγή της μεθόδου έχει αποδειχθεί ικανοποιητική για την ανίχνευση καρβαπενεμάσης (Poirel and Nordmann, 2015). Μια παραλλαγή της δοκιμής CarbaNP, η δοκιμή Blue-Carba (BCT) είναι μια ταχεία βιοχημική δοκιμασία (<2 h) ανίχνευσης παραγωγής καρβαπενεμάσης. Βασίζεται στην in vitro υδρόλυση της μιπενέμης από βακτηριακά στελέχη, που ανιχνεύεται από αλλαγές στο pH. Σε μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Pasteran, et al, η δοκιμή βρέθηκε ότι έχει εξαιρετική ευαισθησία για ένζυμα τάξης A και B, αλλά μειωμένη ευαισθησία για ανίχνευση ενζύμων OXA-48 (Pasteran, et al, 2015). Μια άλλη βιοχημική εξέταση είναι το β CARBA test, το οποίο επίσης μπορεί να διεξαχθεί σε <2h. Σε μία μελέτη διαπιστώθηκε ότι ο χρόνος επώασης 0,5 ωρών που συνιστά ο κατασκευαστής είναι πολύ μικρό χρονικό διάστημα για τα στελέχη που παράγουν OXA-48 (Compain, et al, 2016). Ωστόσο, θα πρέπει να επαληθευτεί περαιτέρω η ικανότητα ανίχνευσης άλλων καρβαπενεμασών κατηγορίας A και κάποια ψευδώς θετικά αποτελέσματα που προήλθαν από άλλες β-λακταμάσες, όπως η υπερπαραγωγή του K1 β-λακταμάση από την *Klebsiella oxytoca* (Yildiz, et al, 2017).

Γ. Μέθοδος απενεργοποίησης καρβαπενέμης (CIM). Η αρχή αυτής της μεθόδου είναι η ανίχνευση της ενζυμικής υδρόλυσης μιας καρβαπενέμης, με επώαση σε βακτηριακό εναιώρημα (van der Zwaluw, et al, 2015). Η μέθοδος βασίζεται στα εξής: όταν ένας δίσκος μεροπενέμης 10-μg (MEM) επωάζεται για 2 ώρες σε ένα βακτηριακό εναιώρημα στελέχους που παράγει καρβαπενεμάση, η καρβαπενέμη στο δίσκο αποδομείται, ενώ αντίθετα, εάν ο μικροοργανισμός δεν παράγει καρβαπενεμάση, ο δίσκος MEM διατηρεί την αντιμικροβιακή του δράση. Ο δίσκος επανατοποθετείται σε Mueller-Hinton agar (MHA) που έχει ενοφθαλμιστεί με ένα εναιώρημα ενός δείκτη-πρότυπου στελέχους ευαίσθητου σε

καρβαπενέμη. Μετά την επώαση, μετράται η ζώνη αναστολής για να καθοριστεί εάν η MEM έχει υδρολυθεί (ανάπτυξη του δείκτη-στελέχους κοντά στο δίσκο) ή είναι ακόμα ενεργή (μεγάλη ζώνη αναστολής γύρω από το δίσκο). Είναι μια απλή, φθηνή, ακριβής και αναπαραγωγίμη μέθοδος για την ανίχνευση της παραγωγής καρβαπενεμάσης, και παραμένει μια πιθανή εναλλακτική μέθοδος (van der Zwaluw, et al, 2015). Ένα κύριο μειονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι ότι απαιτεί συνήθως τουλάχιστον 18 ώρες για την λήψη των αποτελεσμάτων (Pierce, et al, 2017).

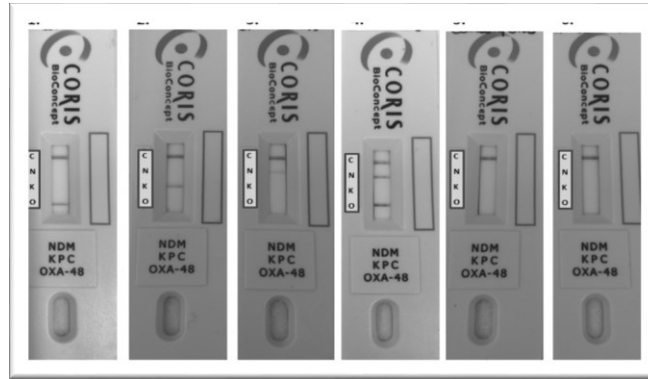
Δ. Ανίχνευση της υδρόλυσης της καρβαπενέμης με φασματομετρίας μάζας (MALDI-TOF).

Η αρχή βασίζεται στην ανίχνευση, στην μείωση ή εξαφάνιση ορισμένων συγκεκριμένων κορυφών, από συσκευή φασματομετρίας μάζας (MALDI TOF), των καρβαπενεμών σε ένα βακτηριακό εναιώρημα. Η μέθοδος βρέθηκε, σε μελέτες ότι έχει καλή ευαισθησία και ειδικότητα για την ανίχνευση καρβαπενεμασών, εκτός από την ανίχνευση OXA-48 (Papagiannitsis, et al, 2015).

Ε. Μέθοδοι ανοσοχρωματογραφίας (πλευρικής ροής -ICT). Πρόσφατα έχουν αναπτυχθεί ανοσοχρωματογραφικές δοκιμασίες (ICT) για την ανίχνευση CPE από καλλιέργειες σε στερεά μέσα (Εικόνα 19). Είναι ταχείες μέθοδοι (≤ 15 λεπτά) και έχουν εξαιρετική ευαισθησία και ειδικότητα για την ανίχνευση τύπου OXA-48, KPC και NDM καρβαπενεμάσες (Glupczynski, et al, 2017). Οι μέθοδοι ανιχνεύουν επιτόπους ειδικούς για μια καρβαπενεμάση, μπορούμε να έχουμε δηλαδή ταχεία ανίχνευση καρβαπενεμασών όπως NDM, KPC και OXA-48 (π.χ. RESIST-3 O.K.N. K-SeT, Coris BioConcept) (Hamprecht, et al, 2018). Το 2016 περιγράφηκε μια νέα δοκιμασία ανοσοχρωματογραφίας όπου μονοκλωνικά αντισώματα επιλέγονται ως ειδικά αντισώματα, για άμεση ανίχνευση των OXA-48, αλλά αυτή η μέθοδος δεν έχει αξιολογηθεί με αρκετές μελέτες. Ο προσδιορισμός διαρκεί περίπου τέσσερα λεπτά και μπορεί να εφαρμοστεί σε αποικίες και σε θετικές φιάλες αιμοκαλλιιεργειών (Pasteran, et al, 2016).

Εικόνα 19. Πολλαπλή ανοσοχρωματογραφική δοκιμή πλευρικής ροής για την ανίχνευση καρβαπενεμασών τύπου NDM(N), KPC(K) και OXA-48(O).

ΠΗΓΗ: Glupczynski, et al, 2017.



Για αρνητικό αποτέλεσμα εμφανίζεται μια γραμμή στη θέση της γραμμής ελέγχου(C). Παραδείγματα θετικών (1, 2, 3 και 4) και αρνητικών (5 και 6).

1. *K.pneumoniae* OXA-48
2. *K.pneumoniae* KPC-3
3. *Escherichia coli* NDM-1
4. *E. coli* NDM-1 + OXA-181
5. *K.pneumoniae* OXA-163
6. *K.pneumoniae* ESBL (CTX-M-15).

4.4.1 Μοριακή ανίχνευση των γονιδίων της καρβαπενεμάσης

Οι μοριακές τεχνικές είναι πιο αξιόπιστες για την ανίχνευση στελεχών *K.pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάσες από τις φαινοτυπικές μεθόδους. Αυτές οι τεχνικές περιλαμβάνουν μεθόδους που συνήθως βασίζονται σε PCR, τεχνικές υβριδισμού και WGS.

A. Ανίχνευση βασισμένη σε PCR μεθοδολογία. Αυτές οι προσεγγίσεις, είτε μονής ή πολλαπλής/πολυπλεκτικής PCR (multiplex-PCR), βασίζονται σε μεγάλο βαθμό στην ενίσχυση μιας ή περισσότερων συγκεκριμένων περιοχών-στόχων στο γενετικό υλικό. Το 2007 ο Ellington, et al. εισήγαγε μια τεχνική πολλαπλής PCR για την αναγνώριση και διαφοροποίηση των αλληλόμορφων που κωδικοποιούν 5 διαφορετικές οικογένειες

των γονιδίων MBL (IMP, GIM, VIM, SPM και SIM). Το 2011, αναπτύχθηκε μία άλλη πολλαπλεκτική PCR από τους Poirel, et al. για την ανίχνευση 11 γονιδίων καρβαπενεμάσης χρησιμοποιώντας τρεις διαφορετικές multiplex αντιδράσεις. Αυτά τα γονίδια ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες και περιλαμβάνουν τα κλινικά πιο σημαντικά γονίδια καρβαπενεμάσης (IMP, VIM, NDM, KPC, και OXA-48) και τα λιγότερο κλινικά σημαντικά (Poirel, Walsh, et al, 2011).

B. Τεχνικές με βάση τον υβριδισμό με χρήση μικροσυστοιχιών DNA (DNA microarrays). Πρόσφατα, έχουν αναπτυχθεί πολλές δοκιμασίες που βασίζονται σε μικροσυστοιχίες, συμπεριλαμβανομένων των εμπορικά διαθέσιμων Verigene BC-GN, bioFire και Check-Points. Για παράδειγμα, το Verigene (BC-GN) μπορεί να ανιχνεύσει 8 διαφορετικά gram (-) βακτήρια, συμπεριλαμβανομένης της *K.pneumoniae* άμεσα από θετικές καλλιέργειες αίματος και έξι βασικούς τύπους β-λακταμάσης (IMP, KPC, NDM, OXA, VIM και CTX-M). Το σύστημα Verigene (BC-GN) αξιολογήθηκε και βρέθηκε ότι παρουσιάζει εξαιρετική ευαισθησία και ειδικότητα (Al-Zahrani, 2018).

C. WGS-H αλληλούχιση επόμενης γενιάς ολόκληρου του γονιδιώματος. Η τεχνολογία "Next Generation Sequencing" (NGS) πάνω στην οποία βασίζεται η αλληλούχιση επιτυγχάνει μια ταχεία και αποτελεσματική ανάλυση της αλληλουχίας ολόκληρου του γονιδιώματος αποφεύγοντας τη χρήση βακτηριακών κλώνων. Επιπλέον, παρέχει δεδομένα σχετικά με τους τύπους των στελεχών, την ταυτότητα των ειδών και μπορεί να αναγνωρίσει και άλλους μηχανισμούς αντοχής που δεν αναγνωρίζονται εύκολα με τις φαινοτυπικές μεθόδους, όπως π.χ. μεταλλάξεις πορίνης και τύπους γονιδίων αντοχής που φέρονται σε πλασμίδια (Al-Zahrani, 2018, Osei, et al, 2015).

4.5 Διερεύνηση αντοχής της *K.pneumoniae* σε AmpC

Η αντοχή στις κεφαμυκίνες μπορεί να υποδεικνύει την παρουσία AmpC ενζύμου, αλλά μπορεί να δείχνει και απώλεια πορίνης στην *K.pneumoniae* με απώλεια OmpK35 και OmpK36 πορινών, ή παραγωγή μεταλλο-β-λακταμάσης (Wang XD, et al, 2009, Shin, et al, 2012). Η υποψία για την ανίχνευση AmpC τίθεται όταν η MIC κεφοξιτίνης είναι >8 mg/L (ή διάμετρος αναστολής <19 mm) σε συνδυασμό με αντίσταση σε κεφταζιδίμη ή κεφοταξίμη, αν και αυτή η στρατηγική δεν θα ανιχνεύσει ACC-1, μεσολαβούμενη από πλασμίδιο AmpC που δεν υδρολύει την κεφοξιτίνη (Bauernfeind, et al, 1999). Οι φαινοτυπικές δοκιμασίες επιβεβαίωσης AmpC βασίζονται γενικά στην αναστολή του AmpC από την κλοξακιλλίνη ή το βορονικό οξύ (Yagi, et al, 2005, Tan, et al, 2008). Οι εφαρμοζόμενες τεχνικές σε ένα κλινικό εργαστήριο για τις δοκιμασίες ανίχνευσης είναι (Yagi, et al, 2005):

(α) Δοκιμασία συνέργειας δίσκου κεφταζιδίμης ή κεφοταξίμης ή και των δύο με δίσκο που περιέχει κλοξακιλλίνη (αναστολέας της AmpC).

(β) Δοκιμασία συνδυασμού δίσκων. Χρησιμοποιούνται δίσκοι κεφταζιδίμης, κεφοταξίμης και κεφοξιτίνης με και χωρίς κλοξακιλλίνη. Αύξηση ≥ 5 mm της ζώνης αναστολής των κεφαλοσπορινών που συνδυάζονται με κλοξακιλλίνη συγκριτικά με χωρίς είναι ενδεικτική παραγωγής AmpC ενζύμου.

(γ) Δοκιμασία E-test με κεφοτετάνη ή κεφοξιτίνη χωρίς και με κλοξακιλλίνη. Ελάττωση της MIC κατά 3 τουλάχιστον αραιώσεις (πηλίκo MIC κεφοτετάνη / κεφοτετάνη+κλοξακιλλίνη ≥ 8) ή ύπαρξη μια δεύτερης έλλειψης (phantom zone) θεωρείται θετική.

(δ) Δοκιμασία συνέργειας ή συνδυασμού των δίσκων (κεφταζιδίμη, κεφοταξίμη, κεφοξιτίνη) με βορονικό οξύ (BA), το οποίο αναστέλλει την AmpC β-λακταμάση, αλλά και την KPC καρβαπενεμάση. Ελάττωση της αντοχής στην κεφταζιδίμη, κεφοταξίμη, ή κεφοξιτίνη από το BA, είναι ενδεικτική παραγωγής AmpC ενζύμου (αύξηση ≥ 5 mm της ζώνης αναστολής). Δεδομένου ότι η κλοξακιλλίνη αναστέλλει μόνο την AmpC, αναστολή με βορονικό οξύ και κλοξακιλλίνη δείχνει την παρουσία AmpC, ενώ αναστολή μόνο με βορονικό οξύ και όχι με κλοξακιλλίνη δείχνει την παρουσία KPC (Yagi, et al, 2005).

5. Επιδημιολογικά δεδομένα

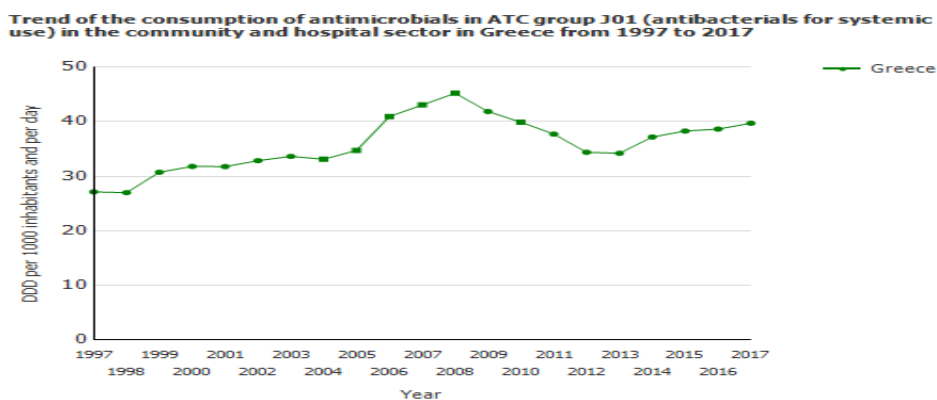
5.1 Υπερβολική κατανάλωση αντιβιοτικών

Η μη ενδεικνυόμενη συνταγογράφηση και η κατάχρηση των αντιβιοτικών οδηγεί σε αντοχή στα αντιβιοτικά, η οποία με τη σειρά της μπορεί να περιορίσει την ικανότητα ελέγχου των λοιμώξεων και σε αρκετές περιπτώσεις να οδηγήσει σε αυξημένη θνησιμότητα. Σύμφωνα με τον ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 33.000 άνθρωποι πεθαίνουν κάθε χρόνο λόγω βακτηριακών λοιμώξεων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά (ECDC, 2018). Στον ECDC, όπου συλλέγονται δεδομένα σχετικά με τη συνταγογράφηση σε διάφορες χώρες, χρησιμοποιώντας ένα σύστημα μέσω καθορισμένων ημερήσιων δόσεων (DDD) για τον υπολογισμό του όγκου των αντιβιοτικών που συνταγογραφούνται, εξάγονται διάφορα συμπεράσματα: στην εικόνα 20 παρατηρούμε ότι, από το 2000 έως το 2008, ο αριθμός των αντιβιοτικών που συνταγογραφήθηκε στην Ελλάδα αυξήθηκε, με την μέγιστη αύξηση να σημειώνεται το 2008 και να βρίσκεται στο 45,2/1.000 κατοίκους ημερησίως, με καθοδική στη συνέχεια τάση έως και το 2013, ενώ μετά το 2014 υπάρχει πάλι μια συνεχής αυξητική τάση. Το 2017 η Ελλάδα βρίσκεται στην 1η θέση στην Ευρώπη συγκρινόμενη με άλλες χώρες, με 39,7 DDD στην κατανάλωση αντιβιοτικών για συστηματική χρήση στην κοινότητα και στον νοσοκομειακό χώρο, ενώ στην χαμηλότερη θέση βρίσκεται η Ολλανδία (Εικόνα 21).

Εικόνα 20. Γράφημα κατανάλωσης αντιβιοτικών ανα έτος στην Ελλάδα.

ΠΗΓΗ: ECDC, 2017.

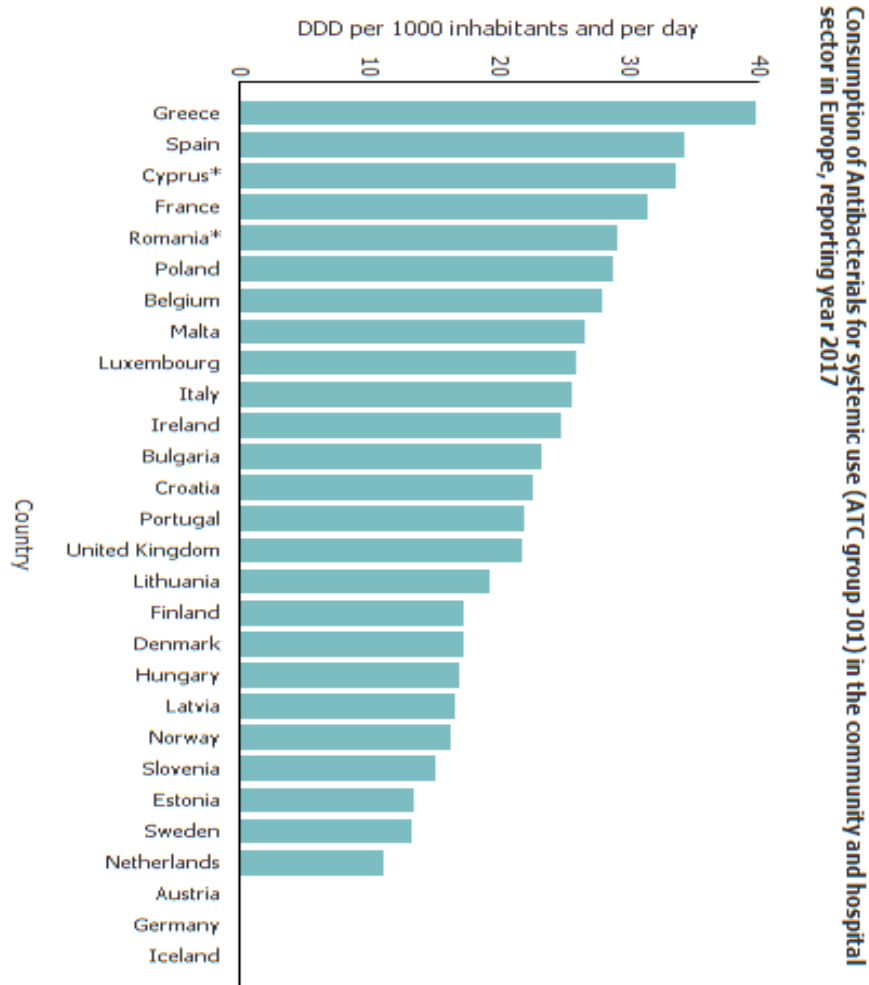
<https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-consumption/database/trend-country>



Εικόνα 21. Γράφημα για την κατανάλωση αντιβιοτικών για συστημακή χρήση στην κοινότητα και στο νοσοκομειακό χώρο στην Ευρώπη.

ΠΗΓΗ: ECDC, 2017.

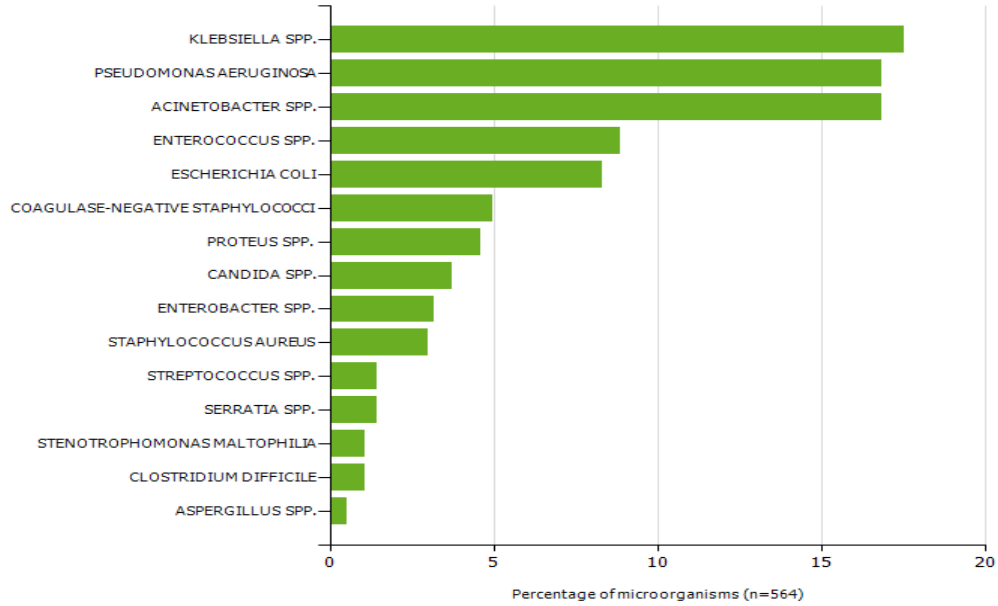
<https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-consumption/database/rates-country>



Σύμφωνα με μια μελέτη σημειακού επιπολασμού νοσοκομειακών λοιμώξεων του ECDC, όπου συμμετείχαν 37 ελληνικά νοσοκομεία, η *K.pneumoniae* βρισκόταν στην 1^η θέση ανάμεσα στους μικροοργανισμούς που είχαν απομονωθεί (Εικόνα 22) και στην 5^η θέση (Εικόνα 23) ανάμεσα σε 30 χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ) και σε χώρες του Ευρωπαϊκού Οικονομικού Χώρου (ΕΟΧ), κατά το 2011 και 2012 (ECDC, 2012).

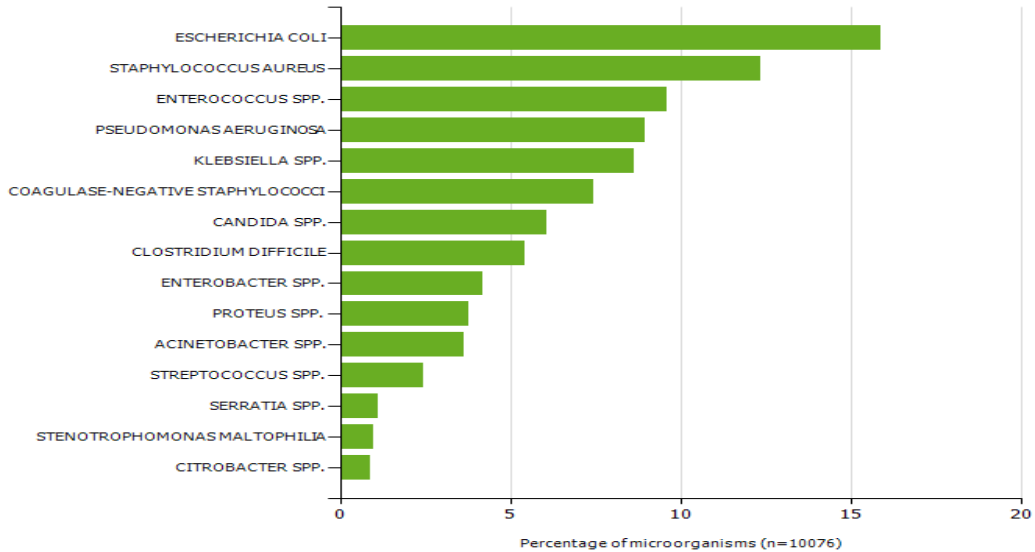
Εικόνα 22. Μικροοργανισμοί που έχουν απομονωθεί σε 37 ελληνικά νοσοκομεία το 2011-2012.

ΠΗΓΗ:ECDC, 2012. <https://ecdc.europa.eu/en/healthcare-associated-infections-acute-care-hospitals/database/microorganisms-and-antimicrobial-resistance/most-frequent>



Εικόνα 23. Μικροοργανισμοί που έχουν απομονωθεί σε 30 χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης(ΕΕ) και σε χώρες του Ευρωπαϊκού Οικονομικού Χώρου (ΕΟΧ),2011-2012).

ΠΗΓΗ:ECDC, 2012. <https://ecdc.europa.eu/en/healthcare-associated-infections-acute-care-hospitals/database/microorganisms-and-antimicrobial-resistance/most-frequent>

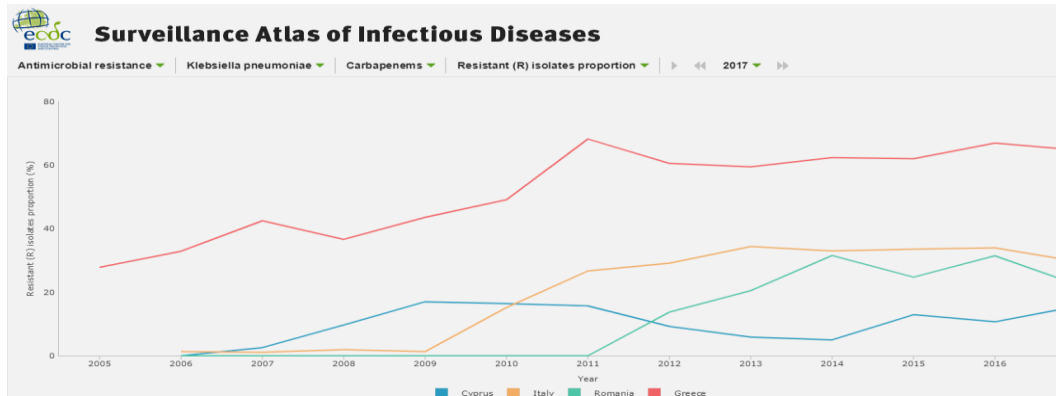


5.2 Επιδημιολογικά δεδομένα για στελέχη *K.pneumoniae* ανθεκτικά σε β-λακτάμες, κυρίως αυτών που παράγουν καρβαπενεμάσες

Μετά την πρώτη κλινική εφαρμογή των διαφόρων αντιβιοτικών β-λακτάμης, η χρονική εγκατάσταση της αντοχής σε στελέχη *K.pneumoniae* και ο μηχανισμός αντοχής έναντι αυτών, όπως αναφέρθηκε, ποικίλλαν (Εικόνα 24). Εντούτοις, οι λοιμώξεις από μέλη *Enterobacteriaceae* που παράγουν καρβαπενεμάσες (CRE), ιδιαίτερα της ανθεκτικής στην καρβαπενέμη *K.pneumoniae* (CRKP), αποτελούν σημαντική απειλή για τη δημόσια υγεία και απασχολούν ιδιαίτερος την παγκόσμια κοινότητα. Η ανθεκτικότητα στις καρβαπενέμες συνδέεται με διάφορους μηχανισμούς, ιδιαίτερα με την παραγωγή διαφόρων τύπων ενζύμων, συμπεριλαμβανομένων των κατηγοριών A (KPC), B (VIM, IMP, NDM) και D (OXA-48). Παρά τις αρκετές προσπάθειες για τον έλεγχο της εξάπλωσης αυτών των λοιμώξεων σε τοπικό και εθνικό επίπεδο, η επιδημιολογική κατάσταση για την CRKP επιδεινώθηκε τα τελευταία χρόνια στην περιοχή της Μεσογείου. Η *K.pneumoniae* που παράγει KPC διασπείρεται ιδιαίτερα στις ευρωπαϊκές χώρες που «συνορεύουν» με τη Μεσόγειο θάλασσα. Αντίθετα, η OXA-48 είναι ενδημική στην Τουρκία και διασπείρεται ιδιαίτερα σε ορισμένες χώρες της Βόρειας Αφρικής και της Μέσης Ανατολής. Η διάδοση αυτών των πολυανθεκτικών στελεχών στον κόσμο και στις μεσογειακές χώρες έχει σχέση με διάφορους επιδημιολογικούς παράγοντες, όπως η διεθνής μετακίνηση ασθενών (Girmenia, et al, 2016). Το 2017, όπως φαίνεται και στις εικόνες 24 και 25, η Ελλάδα είναι η χώρα με την μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης καρβαπενεμασών σε στελέχη *K.pneumoniae*, με ποσοστό 64,7%, ακολουθεί η Ιταλία με 29,7%, η Ρουμανία με 22,5% και η Κύπρος με 15,5%.

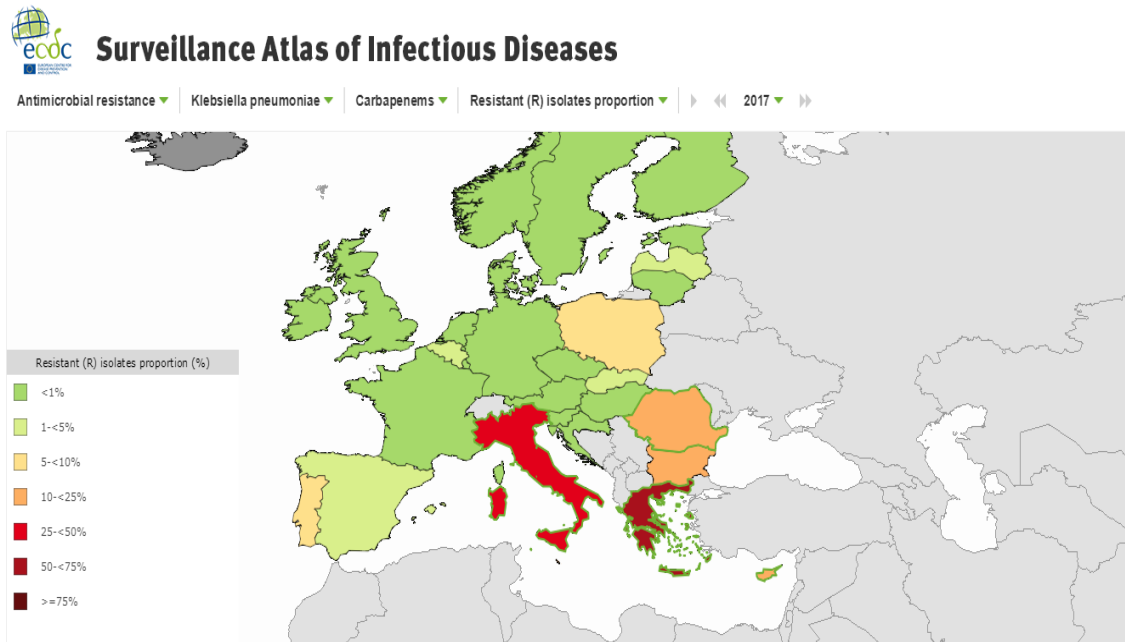
Εικόνα 24. Διάγραμμα συχνότητας εμφάνισης καρβαπενεμασών 2017.

ΠΗΓΗ: <https://ecdc.europa.eu/en/surveillance-atlas-infectious-diseases>



Εικόνα 25. Χάρτης συχνότητας εμφάνισης καρβαπενεμασών το 2017.

ΠΗΓΗ: <https://ecdc.europa.eu/en/surveillance-atlas-infectious-diseases>



Σήμερα η *K.pneumoniae* είναι παγκοσμίως η κύρια αιτία των λοιμώξεων που προκαλούνται από βακτήρια ανθεκτικά στις καρβαπενέμες καθώς τα υπεύθυνα γονίδια που προσδίδουν αντοχή σε καρβαπενέμες (μέσω παραγωγής καρβαπενεμάσης) έχουν ανιχνευθεί σε στελέχη της *K.pneumoniae*, καθιστώντας έτσι σχεδόν όλες τις διαθέσιμες θεραπείες αναποτελεσματικές (Karampatakis, et al, 2016). Ακόμη μεγαλύτερη ανησυχία προκαλούν τα

δεδομένα ότι οι λοιμώξεις με στελέχη ανθεκτικά στις καρβαπενέμες πρέπει να αντιμετωπιστούν με αντιβιοτικά τελευταίας επιλογής, όπως τιγκεκυκλίνη ή κολιστίνη, τα οποία ολόένα καθίστανται λιγότερο αποτελεσματικά λόγω της αυξανόμενης εμφάνισης αντοχής και σε αυτά, με αποτέλεσμα να μην υπάρχουν κλινικά αποτελεσματικές θεραπευτικές επιλογές. (Navon-Venezia, 2017).

Σύμφωνα με τον WHO (World Health Organization, 2017), στον κατάλογο με τα παθογόνα βακτήρια που παρουσιάζουν αντοχή στα αντιβιοτικά, στην 1^η κατηγορία, με υψηλή προτεραιότητα για την ανακάλυψη νέων αντιβιοτικών ανήκουν τα μέλη των *Enterobacteriaceae* που είναι ανθεκτικά σε καρβαπενέμες και σε κεφαλοσπορίνες 3ης γενιάς (WHO, 2017).

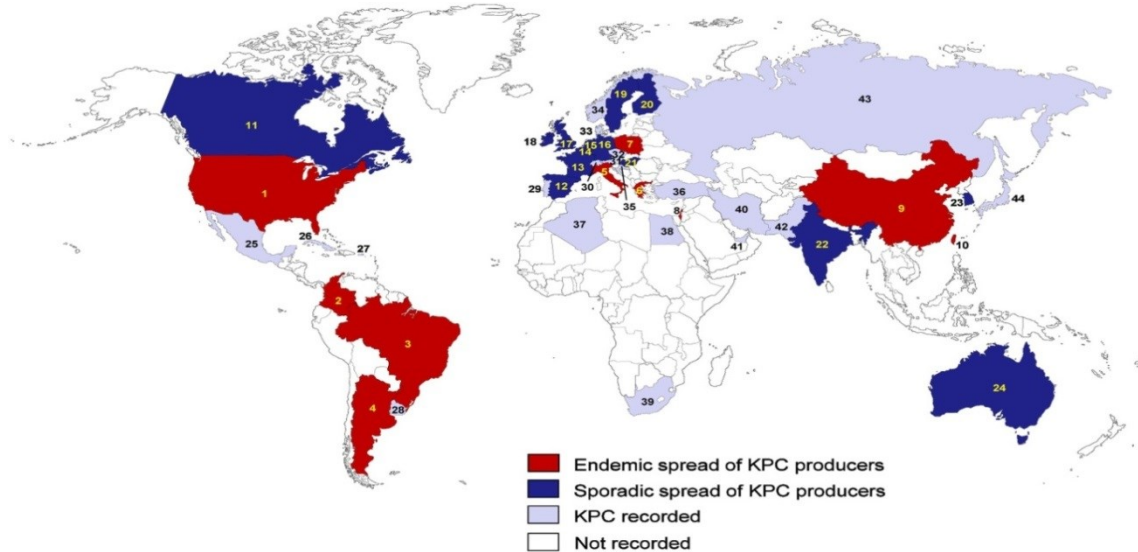
Η επιδημιολογία της *K.pneumoniae* που παράγει KPC ποικίλλει γεωγραφικά (Εικόνα 26). Ενδημική εξάπλωση έχει αναφερθεί στις ΗΠΑ, την Κίνα, την Ιταλία, την Πολωνία, την Ελλάδα, το Ισραήλ, τη Βραζιλία, την Αργεντινή, την Κολομβία και την Ταϊβάν. Σποραδική εξάπλωση έχει παρατηρηθεί επίσης σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες, όπως η Ισπανία, η Γαλλία, η Γερμανία, η Ολλανδία, οι Κάτω Χώρες, το Ηνωμένο Βασίλειο, η Ιρλανδία, το Βέλγιο, η Σουηδία και η Φινλανδία, και σε πολλές χώρες της Ασίας συμπεριλαμβανομένης της Ινδίας, της Νότιας Κορέας και της Αυστραλίας (Munoz-Price, et al, 2013, Nordmann and Poirel, 2014). Επίσης πρόσφατα ανιχνεύθηκαν στελέχη KPC στις χώρες της Ανατολικής Ευρώπης συμπεριλαμβανομένης της Τσεχικής Δημοκρατίας (Hrabak, et al, 2013) την Ουγγαρία (Toth, et al, 2010) και την Κροατία (Bedenic, et al, 2012).

Στην Ελλάδα, η *K.pneumoniae* που παράγει KPC απομονώθηκε για πρώτη φορά τον Αύγουστο του 2007 (Cuzon and Naas, 2008, Tsakris, et al, 2008) και ο επιπολασμός των στελεχών που παράγουν KPC αυξήθηκε σε μια μελέτη μεταξύ 2003 και 2010 από 0% σε 38,3% (Zagorianou, et al, 2012). Η ποικιλία KPC που επικρατεί στην Ελλάδα είναι το KPC-2 (Εικόνα 27) και κυρίαρχος κλώνος ο ST258 (sequence type) (Pournaras, et al, 2009, Zagorianou, et al, 2012). Πρόσφατα ανιχνεύθηκαν στελέχη KPC-9, τα οποία συνδέθηκαν με επιδημία σε νοσοκομείο της Ελλάδας και τα οποία ανήκαν στον επιδημικό κλώνο ST258 (Gartzonika et al, 2018).

Στις ΗΠΑ, ο επιπολασμός των KPC ήταν σχετικά σταθερός μεταξύ του 2007 και του 2009 (5,9% το 2007, 4,9% το 2008 και 5,7% το 2009) και οι KPC-2 και KPC-3 (Εικόνα 27) ήταν οι συχνότερα αναγνωρισμένες καρβαπενεμάσες (Kaiser, et al, 2013). Παρόλο που τα περισσότερα CRKP στελέχη στην Ελλάδα παράγουν KPC καρβαπενεμάσες (Zagorianou, et al, 2012), στην Ισπανία, ο επιπολασμός των KPC φτάνει το 2-3% (Lee CR, et al, 2016). Στην Ιταλία, η οποία είναι αντιπροσωπευτική νότια ευρωπαϊκή χώρα με ενδημικότητα σε KPC, έχει αναφερθεί ότι το 89,5% των στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες, έχουν ένζυμα τύπου KPC, ακολουθούμενα από VIM-1 (9,2%) και OXA-48 (1,3%) (Giani, et al, 2013).

Εικόνα 26. Επιδημιολογικός χάρτης των *K.pneumoniae* στελεχών που παράγουν KPC.

ΠΗΓΗ: Lee CR, et al, 2016.



(1)Η.Π.Α (2)Κολομβία (3)Βραζιλία (4)Αργεντινή (5)Ιταλία (6)Ελλάδα (7)Πολωνία (8)Ισραήλ (9)Κίνα (10)Ταϊβάν (11)Καναδάς (12)Ισπανία (13)Γαλλία (14)Βέλγιο (15)Κάτω Χώρες (16)Γερμανία (17)Ηνωμένο Βασίλειο (18)Ιρλανδία (19)Σουηδία (20)Φινλανδία (21)Ουγγαρία (22)Ινδία (23)Νότια Κορέα (24)Αυστραλία (25)Μεξικό (26)Κούβα (27)Πουέρτο Ρίκο (28)Ουρουγουάη (29)Πορτογαλία (30)Ελβετία (31)Αυστρία (32)Τσεχική Δημοκρατία (33)Δανία (34)Νορβηγία (35)Κροατία (36)Τουρκία (37)Αλγερία (38)Αίγυπτος (39)Νότια Αφρική (40)Ιράν (41)Ηνωμένα Αραβικά Εμιράτα (42)Πακιστάν (43)Ρωσία (44) Ιαπωνία.

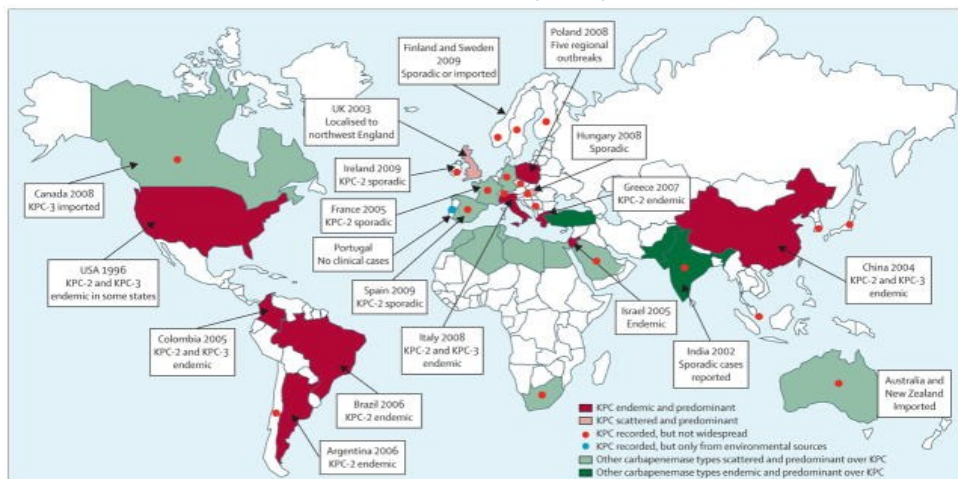
Στην Αμερική, κλωνική εξάπλωση έχει αναφερθεί στην Κολομβία, την Βραζιλία και την Αργεντινή (κλωνική εξάπλωση της *K.pneumoniae* ST258 που φέρει το bla_{KPC} στο Tn 4401a) (Lee CR, et al, 2016, Gomez, et al, 2011). Στην Ταϊβάν εντοπίστηκαν δύο νέες ποικιλίες KPC. Τα KPC-16 και KPC-17 διέφεραν από την KPC-2 λόγω δύο (P202S και F207L) ή μίας

αντικατάστασης αμινοξέων (F207L) αντίστοιχα (Yu, et al, 2015). Στελέχη *K.pneumoniae* με παραγωγή KPC ανιχνεύθηκαν πρόσφατα και στην Ιαπωνία (Saito, et al, 2014), το Πακιστάν (Pesesky, et al, 2015), το Ιράν (Nobari, et al, 2014), και τα Ηνωμένα Αραβικά Εμιράτα (Sonnevend, et al, 2015). Στην Αφρική, πολλές χώρες όπως η Νότια Αφρική (Brink, et al, 2012), η Αλγερία (Bakour, et al, 2014) και η Αίγυπτος (Metwally, et al, 2013) έχουν επίσης απομονώσει στελέχη *K.pneumoniae* που παράγει KPC.

Η συνύπαρξη της KPC και άλλων καρβαπενεμασών σε στελέχη *K.pneumoniae* αποτελεί ένα συχνό φαινόμενο σε όλο τον κόσμο. Συγκεκριμένα, τέτοια στελέχη έχουν εμφανιστεί στην Ιταλία (KPC-3 / VIM-2 και KPC-2 / VIM-1), στην Κολομβία (KPC-2 / VIM-24), στη Βραζιλία (KPC-2 / NDM-1), στην Κίνα (KPC-2 / NDM-1, KPC-2 / CMY-2, και KPC-2 / IMP-4), στον Καναδά (KPC-3 / CMY-2), και στην Ελλάδα (KPC-2 / VIM-1) (Lee CR, et al, 2016, Giakkouri, et al, 2009), υποδεικνύοντας την παγκόσμια επικράτηση των στελεχών *K.pneumoniae* που παράγουν δύο είδη καρβαπενεμασών. Η επικράτηση της *K.pneumoniae* που παράγει KPC στις περισσότερες χώρες, συμπεριλαμβανομένων των ΗΠΑ και των ευρωπαϊκών χωρών, οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην διάδοση ενός μόνο κυρίαρχου κλώνου, του ST258 (Giani, et al, 2013, Chen L, et al, 2014, Bowers, et al, 2015).

Εικόνα 27. Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά και ποικιλίες των K.pneumoniae στελεχών που παράγουν KPC ανά χώρες/ηπείρους.

Άλλοι τύποι καρβαπενεμάσης περιλαμβάνουν τα VIM, OXA-48 ή NDM.
ΠΗΓΗ: Munoz-Price, et al, 2013.



Η επιδημιολογία της *K.pneumoniae* που παράγει MBL καρβαπενεμάσες

Οι καρβαπενεμάσες της κατηγορίας B (MBL) περιλαμβάνουν κυρίως τα ένζυμα VIM, IMP και την αναδύομενη ομάδα NDM.

Στελέχη *K.pneumoniae* που παράγουν VIM έχουν εξαπλωθεί στην Ευρώπη, την Ασία, αλλά έχουν αναφερθεί και σε άλλες περιοχές, όπως η Αμερική και η Αφρική. Συγκεκριμένα είναι ενδημικά στην Ελλάδα, την Ισπανία, την Γαλλία, την Ιταλία, και σποραδικά σε διάφορες ευρωπαϊκές χώρες (συμπεριλαμβανομένης της Πορτογαλίας, Γαλλίας, Γερμανίας, Βελγίου, Πολωνίας, Ουγγαρίας, Νορβηγίας, Σουηδίας, Δανίας, Ηνωμένου Βασιλείου και Ιρλανδίας), Τουρκίας, Λιβάνου, Βραζιλίας, Αργεντινής, Κολομβίας, ΗΠΑ, Αφρική (συμπεριλαμβανομένης της Τυνησίας, της Αλγερίας και της Νότιας Αφρικής), την Ασία (συμπεριλαμβανομένης της Ιαπωνίας, της Κίνας, της Νότιας Κορέας και της Ινδίας) και της Αυστραλίας (van der BijAkke and Pitout, 2012).

Στην Ελλάδα η *K.pneumoniae* που παράγει VIM αναφέρθηκε για πρώτη φορά το Σεπτέμβριο του 2002 στις Μονάδες Εντατικής Θεραπείας τριών νοσοκομείων της Αθήνας (Giakkouri, et al, 2003). Ακολούθησε μία γενικευμένη επιδημία στα ελληνικά νοσοκομεία από στελέχη *K.pneumoniae* που παρήγαγαν ένζυμα VIM έως το 2008. Συνολικά, η απομόνωση στελεχών *K.pneumoniae* ανθεκτικών στην ιμιπενέμη, κυρίως VIM-1 στελεχών, αυξήθηκε από <1% σε 20% μεταξύ 2001-2006 σε κλινικές ελληνικών νοσοκομείων και στο 50% στις ΜΕΘ (Vatoroulos, 2008) και έφτασε στο 8,4% το 2016 (Galani, et al, 2018).

Η *K.pneumoniae* που παράγει IMP καρβαπενεμάση ενδημεί σε χώρες της Ασίας, όπως η Ιαπωνία, η Σιγκαπούρη, η Κίνα, η Ταϊβάν αλλά και στην Αυστραλία (Tzouveleki, et al, 2012).

Το ένζυμο τύπου NDM αποτελεί μία από τις πιο σημαντικές καρβαπενεμάσες, η οποία αρχικά ανιχνεύθηκε το 2008 σε στέλεχος *K.pneumoniae* και *E.coli* σε ασθενή που επέστρεψε στη Σουηδία από την Ινδία και έκτοτε έχει παγκόσμια διασπορά (Yong, et al, 2009). Μέχρι πρόσφατα έχουν βρεθεί 15 παραλλαγές NDM (Jeon, et al, 2015) και οι περισσότερες από αυτές προέρχονται από την Ασία (Nordmann and Poirel, 2014). Η παραγωγή NDM στην

K.pneumoniae (Εικόνα 28) θεωρείται ενδημική στη Ινδία, το Πακιστάν και το Μπαγκλαντές (Nordmann and Poirel, 2014, Nordmann, et al, 2011) και σποραδική σε άλλες χώρες, όπως στις ΗΠΑ, τον Καναδά, την Κολομβία, την Ισπανία, την Γαλλία, την Ελβετία, την Ιταλία, τη Μεγάλη Βρετανία, την Ελλάδα, την Τουρκία, το Μαρόκο την Νότια Αφρική την Σιγκαπούρη, την Σαουδική Αραβία, το Ομάν, τα Ηνωμένα Αραβικά Εμιράτα, το Κουβέιτ, την Κίνα, την Ιαπωνία, τη Ταϊβάν, την Νότια Κορέα και την Αυστραλία (Lee CR, et al, 2016).

Στην Ελλάδα, σε νοσοκομείο της Βορειοδυτικής Ελλάδας, μεταξύ 2010 και 2013 ανάμεσα σε 132 απομονωθέντα στελέχη CRE ύποπτα για παραγωγή MBL καρβαπενεμάσης, εντοπίστηκαν 78 στελέχη *K.pneumoniae* με το γονίδιο *bla_{NDM-1}*, τα οποία ενέχονταν σε επιδημία όπως αποδείχτηκε με την επιδημιολογική ανάλυση και συσχέτιση των στελεχών (Voulgari, et al, 2014).

Στην Ινδία, η NDM-1 καρβαπενεμάση είναι ο πιο συνηθισμένος τύπος καρβαπενεμάσης και αντιστοιχεί στο 75,22% των απομονωθέντων στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάση (Kazi, et al, 2015). Στη Σιγκαπούρη και στα Ηνωμένα Αραβικά Εμιράτα, ο NDM-1 είναι ο συνηθέστερος τύπος καρβαπενεμάσης με 44,4 και 100% αντίστοιχα (Dash, et al, 2014, Ling, et al, 2015). Στην Αραβική Χερσόνησο, η NDM-1 είναι η συχνότερη επίσης καρβαπενεμάση με ποσοστό 46,5% (Sonnevend, et al, 2015). Η ενδημική εξάπλωση της NDM που παράγει η *K.pneumoniae* έχει επίσης αναφερθεί στο Ηνωμένο Βασίλειο, το οποίο έχει στενές σχέσεις με την Ινδία και το Πακιστάν (Nordmann and Poirel, 2014).

Πρόσφατα στην Κίνα, απομονώθηκαν οκτώ στελέχη *K.pneumoniae* που παρήγαγαν NDM-1, από νεογνά που νοσηλεύτηκαν σε ένα νοσοκομείο (Zhang, et al, 2015), ενώ τέσσερις διαφορετικοί τύποι καρβαπενεμάσης (NDM-1, KPC-2, VIM- και IMP-4) *K.pneumoniae* ταυτοποιήθηκαν σε ένα μόνο νοσοκομείο στην Κίνα (Liu Y, et al., 2015).

Οι διεθνείς μεταφορές ασθενών μεταξύ των χωρών οδήγησαν πρόσφατα στην ανίχνευση της *K.pneumoniae* που παράγει NDM, στο Μεξικό, στη Γουατεμάλα, στη Βραζιλία, την Ολλανδία, την Ιρλανδία, την Πολωνία, την Δημοκρατία της Τσεχίας, την Κροατία, την Ρωσία, την Τυνησία, την Ρουμανία, την Αίγυπτο, την Κένυα, την Μαδαγασκάρη, το Ιράκ, την

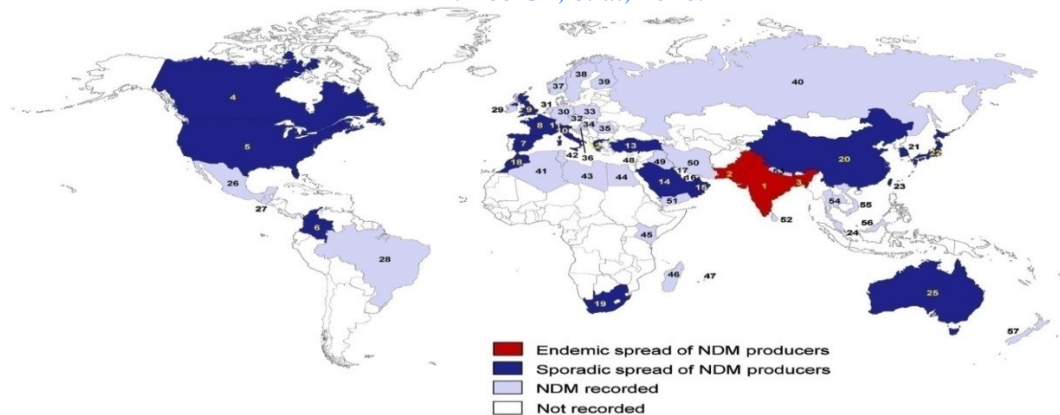
Υεμένη, το Ιράν, τον Μαυρίκιο, την Σρι Λάνκα, την Ταϊλάνδη, το Νεπάλ, το Βιετνάμ, την Μαλαισία και τη Νέα Ζηλανδία (Lee CR, et al, 2016).

Ο αποικισμός εγκύων γυναικών στην Μαδαγασκάρη από στελέχη *K.pneumoniae* που παρήγαγαν NDM επισήμανε τη δυνατότητα μετάδοσης από μητέρα σε παιδί (Chereau, et al, 2015).

Η συνύπαρξη της NDM και άλλων καρβαπενεμασών σε στελέχη *K.pneumoniae* αποτελεί συχνό φαινόμενο σε όλο τον κόσμο. Συγκεκριμένα, τέτοια στελέχη έχουν εμφανιστεί στη Βραζιλία (NDM-1 / KPC-2), στη Μαλαισία (NDM-1 / OXA-232), στη Νότια Κορέα (NDM-5/ OXA-181), στην Κίνα (NDM-1 / IMP-4), στην Ινδία (NDM-1 / OXA-232), στην Τουρκία (NDM-1 / OXA-48), στο Πακιστάν (NDM-1 / KPC-2), στην Ελβετία (NDM-1 / OXA-48), στα Ηνωμένα Αραβικά Εμιράτα (NDM-1 / OXA-48), στην Αυστραλία (NDM-1 / OXA-48), στο Μαρόκο (NDM-1 / OXA-48), στη Σιγκαπούρη (NDM-1 / OXA-181 και NDM 5 / OXA-181) και στις ΗΠΑ (NDM-1 / OXA-232) (Lee CR, et al, 2016).

Εικόνα 28. Επιδημιολογικός χάρτης των *K.pneumoniae* στελεχών που παράγουν NDM.

ΠΗΓΗ: Lee CR, et al, 2016.



(1)Ινδία (2)Πακιστάν (3)Μπαγκλαντές (4)Καναδάς (5)ΗΠΑ (6)Κολομβία (7)Ισπανία (8)Γαλλία (9)Ηνωμένο Βασίλειο (10)Ιταλία (11)Ελβετία (12)Ελλάδα (13)Τουρκία (14)Σαουδική Αραβία (15)Ομάν (16)Ηνωμένα Αραβικά Εμιράτα (17)Κουβέιτ (18)Μαρόκο (19)Νότια Αφρική (20)Κίνα (21)Νότια Κορέα (22)Ιαπωνία (23)Ταϊβάν (24)Σιγκαπούρη (25)Αυστραλία (26)Μεξικό (27)Γουατεμάλα (28)Βραζιλία (29)Ιρλανδία (30)Γερμανία (31)Κάτω Χώρες (32)Τσεχική Δημοκρατία (33)Πολωνία (34)Ουγγαρία (35)Ρουμανία (36)Κροατία (37)Νορβηγία (38)Σουηδία (39)Φινλανδία (40)Ρωσία (41)Αλγερία (42)Τυνησία (43)Λιβύη (44)Αίγυπτος (45)Κέννα (46)Μαδαγασκάρη (47)Μαυρίκιος (48)Ισραήλ (49)Ιράκ (50)Ιράν (51)Υεμένη (52)Σρι Λάνκα (53)Νεπάλ (54)Ταϊλάνδη (55)Βιετνάμ (56)Μαλαισία (57)Νέα Ζηλανδία.

Το γονίδιο *bla_{NDM}* της *K.pneumoniae* έχει αναφερθεί σε διάφορους τύπους πλασμιδίων, συμπεριλαμβανομένου του IncA/C (Hudson, et al, 2014), IncF (Hishinuma, et al, 2013), IncR (Studentova, et al, 2015), IncH (Villa, et al, 2012), IncN (Chen CJ, et al, 2014), IncL/M (Peirano, et al, 2014) και IncX (Wang X, et al, 2014). Ο κυρίαρχος τύπος πλασμιδίου που είναι υπεύθυνος για την εξάπλωση του *bla_{NDM}* είναι το πλασμίδιο τύπου IncA/C (Poirel, Dortet, et al, 2011, Pitout, et al, 2015). Τα γονίδια *bla_{NDM}* έχουν ανιχνευτεί σε διάφορους κλώνους της *K.pneumoniae*, στην Ασία και σε πολλές χώρες της Ευρώπης, όπως και στην Ελλάδα (Voulgari, et al, 2014). Ο κλώνος ST11, έχει κυρίαρχα συσχετιστεί με το γονίδιο *bla_{NDM-1}* (Voulgari, et al, 2014). Ανάλυση κλινικών απομονωθέντων στελεχών της *K.pneumoniae* που παράγουν NDM-1 από την Ινδία, το Ηνωμένο Βασίλειο και τη Σουηδία, έδειξε ότι οι συχνότερα ανιχνευόμενοι κλώνοι ήταν οι ST14, ST11, ST149, ST231 και ST147 (Giske, et al, 2012).

Η επιδημιολογία της *K.pneumoniae* που παράγει OXA καρβαπενεμάσες

Σε στελέχη της *K.pneumoniae* έχουν απομονωθεί: OXA-23, OXA-48, OXA-51 και OXA-58 (Evans and Amyes, 2014). Η OXA-48 είναι μία από τις πιο διαδεδομένες καρβαπενεμάσες τάξης D (Εικόνα 29) και αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά στην *K.pneumoniae* στην Τουρκία το 2003 (Poirel, et al, 2004) και μέχρι πρόσφατα έχουν βρεθεί 10 ποικιλίες του γονιδίου *bla_{OXA-48}* (Jeon, et al, 2015). Από το 2003, ενδημική εξάπλωση έχει αναφερθεί σε χώρες όπως η Τουρκία, το Μαρόκο, η Λιβύη, η Αίγυπτος, η Τυνησία και η Ινδία (Nordmann and Poirel, 2014). Σποραδική εξάπλωση έχει αναφερθεί στη Γαλλία, στην Ισπανία, στην Ιταλία, το Βέλγιο, την Ολλανδία, το Ηνωμένο Βασίλειο, τη Γερμανία, την Ελβετία, την Αργεντινή, το Ισραήλ, το Κουβέιτ, τη Σαουδική Αραβία και την Ιαπωνία (Lee, et al, 2016).

Στην Ελλάδα ο επιπολασμός του OXA-48 βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα με αναφερόμενο ποσοστό 3,6% το 2016 (Galani, et al, 2018).

Ο επιπολασμός της OXA-48 στην Ισπανία και τη Γαλλία είναι ιδιαίτερα υψηλός με ποσοστά 74% (Robert, et al, 2014) και 78% αντίστοιχα (Palacios-Baena, et al, 2016). Στην Αραβική

Χερσόνησο, ο επιπολασμός είναι επίσης υψηλός 32,5-56%, (Zowawi, et al, 2014, Sonnevend, et al, 2015). Στη Σαουδική Αραβία, σύμφωνα με μια μελέτη, στο 78% των απομονωθέντων στελεχών της *K.pneumoniae* που παρήγαγαν καρβαπενεμάση ανιχνεύτηκε το γονίδιο *bla*_{OXA-48}, και τρία στελέχη από τα 47 ήταν ανθεκτικά στην κολιστίνη, υποδεικνύοντας ότι η ανθεκτικότητα στην κολιστίνη εμφανίζεται και στη Σαουδική Αραβία (Shibl, et al, 2013). Η παραγωγή του OXA-48 ανιχνεύθηκε πρόσφατα και στον Καναδά, στις ΗΠΑ, στην Ιρλανδία, στην Πολωνία, στη Ουγγαρία, στην Ελλάδα, την Ρουμανία, την Βουλγαρία, τη Φινλανδία, την Ρωσία, την Αλγερία, τα Ηνωμένα Αραβικά Εμιράτα, το Ιράν, τη Νότια Αφρική, τη Σενεγάλη, την Ταϊβάν, την Σιγκαπούρη, την Νότια Κορέα και την Αυστραλία (Lee, et al, 2016).

Στη Βόρεια Αμερική, η συχνότητα των ενζύμων τύπου OXA-48 είναι σχετικά χαμηλή, στο 11% περίπου (Lascols, et al, 2013). Στη Ρουμανία μια πρόσφατη αναφορά έδειξε ότι μεταξύ των 65 στελεχών *K.pneumoniae* που απομονώθηκαν και παρήγαγαν καρβαπενεμάση, το γονίδιο που εντοπίστηκε συχνότερα ήταν το γονίδιο *bla*_{OXA-48} με ποσοστό 78% (Lixandru, et al, 2015).

Στη Νότια Αφρική, αναφέρθηκε το 2011 η εμφάνιση ενός στελέχους *K.pneumoniae* που παρήγαγε OXA-48 και στελέχους OXA-181 με *in vivo* ανάπτυξη αντοχής στην κολιστίνη μετά από χορήγησή της (Brink, et al, 2013). Η OXA-181 καρβαπενεμάση, είναι μια ποικιλία της OXA-48 που διαφέρει σε τέσσερις αντικαταστάσεις αμινοξέων και αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά στην Ινδία, και στη συνέχεια, εξαπλώθηκε σε πολλές διαφορετικές χώρες, όπως χαρακτηριστικά το Ηνωμένο Βασίλειο, το Ομάν και τη Νέα Ζηλανδία. Ωστόσο, σε πολλές περιπτώσεις, οι λοιμώξεις συνδέονται με την Ινδία (Potron A, et al, 2011, Williamson, et al, 2011, Dimou, et al, 2012). Επίσης έχουν αναφερθεί και άλλα παράγωγα της OXA-48 (OXA-204 στην Τυνησία, OXA-23 στην Γαλλία, OXA-163 στην Αργεντινή και OXA-244, OXA-245 στην Ισπανία), που δείχνουν ότι εκτός από την OXA-48, πολλά παράγωγά της έχουν εξαπλωθεί παγκοσμίως (Lee, et al, 2016).

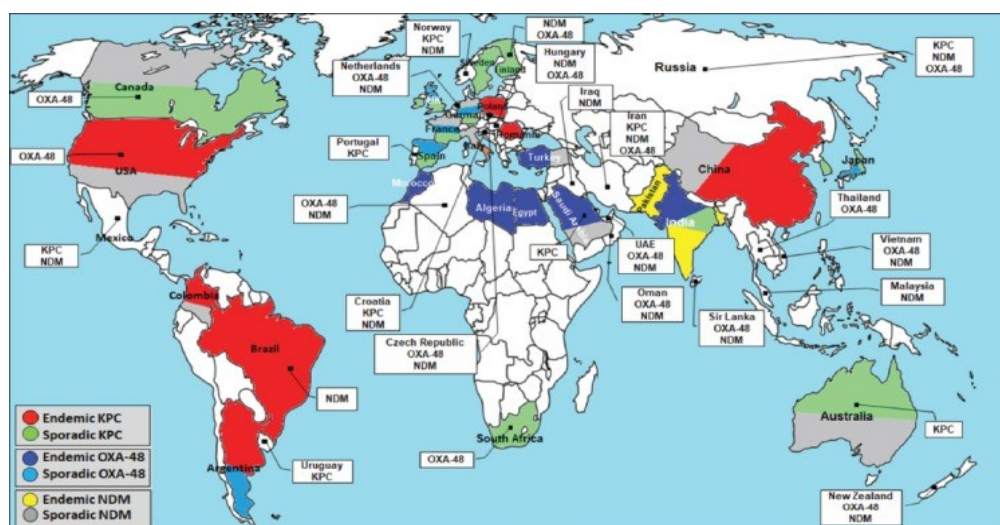
Η συνύπαρξη με την OXA-48 και άλλων καρβαπενεμασών στην *K.pneumoniae* είναι συχνή παγκοσμίως, όπως στην Τουρκία (OXA-48 / NDM-1) στην Ελβετία (OXA-48 / NDM-1), τα

Ηνωμένα Αραβικά Εμιράτα (OXA-48-LIKE / NDM-1), την Αυστραλία (OXA-48 / NDM-1), το Μαρόκο (OXA-48 / NDM-1), την Ινδία (OXA-181 / VIM-5 και OXA-232 / NDM-1), την Σιγκαπούρη (OXA-181 / NDM-1 και OXA-181 / NDM -5), τις ΗΠΑ (OXA-232 / NDM-1) (Lee, et al, 2016).

Στην εικόνα 29 φαίνεται συγκεντρωτικά η παγκόσμια κατανομή της *K.pneumoniae* που παράγει τις σημαντικότερες καρβαπενεμάσες KPC, OXA, NDM (Al-Zahrani, 2018).

Εικόνα 29. Παγκόσμια κατανομή της K.pneumoniae που παράγει καρβαπενεμάσες KPC, OXA, NDM.

ΠΗΓΗ: Al-Zahrani, 2018.



Η μοριακή επιδημιολογία της OXA-48 στις χώρες της Ευρώπης και της Βόρειας Αφρικής έδειξε ότι στο 92,5% των απομονωθέντων στελεχών, το γονίδιο *bla*_{OXA-48} εντοπίστηκε σε συζευκτικό πλασμίδιο τύπου IncL /M (Potron, et al, 2013). Ο κλώνος ST11 σχετίζεται συχνά με το γονίδιο *bla*_{OXA-48} σε πολλές χώρες, όπως η Ισπανία, η Ταϊβάν, η Λιβύη, η Τουρκία, η Αργεντινή και η Ελλάδα. Επιπλέον, σε πολλές χώρες έχουν αναφερθεί οι ST14, ST15, ST101, ST147 και ST405, όπως οι ΗΠΑ, η Ισπανία, η Τσεχία, η Λιβύη, η Ινδία, η Γερμανία, η Φινλανδία, η Γαλλία και η Ιαπωνία (Lee, et al, 2016). Η μοριακή επιδημιολογία των απομονωθέντων εντεροβακτηριακών στελεχών από την Ευρώπη και τη Βόρεια Αφρική (2001 με 2011), έδειξε ότι ο ST101 ήταν ο πιο συχνός κλώνος σε στελέχη *K.pneumoniae*, που

αντιστοιχούσαν σε 17 από 67 απομονωθέντα στελέχη (25,4 %), ακολουθούμενη από τον ST395 και τον ST15 (Potron, et al, 2013). Μεταξύ Ιανουαρίου και Απριλίου 2018, η Σουηδία και η Νορβηγία ανέφεραν έναν αριθμό ατόμων που επέστρεψαν από το εξωτερικό και είχαν μολυνθεί με στέλεχος *K.pneumoniae* ST392 που παρήγαγε OXA-48. Όλες οι περιπτώσεις σχετίζονταν με εισαγωγές σε νοσοκομείο στο Γκραν Κανάρια της Ισπανίας (ECDC, 2018).

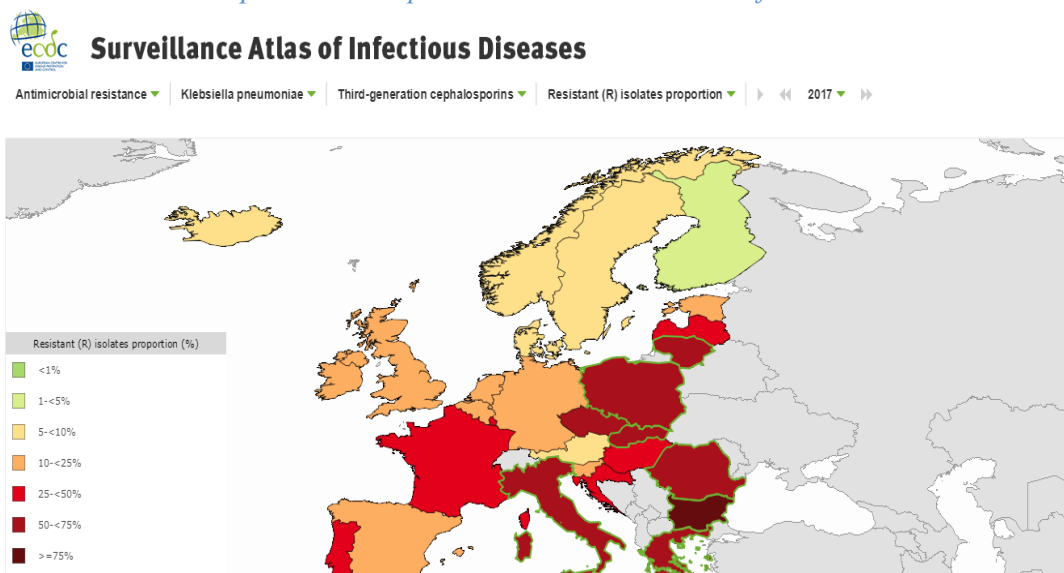
5.3 Επιδημιολογία αντοχής της *K.pneumoniae* στα αντιβιοτικά: φθοριοκινολόνες, κεφαλοσπορίνες τρίτης γενεάς και αμινογλυκοσίδες

Τα παρακάτω αποτελέσματα βασίζονται σε δεδομένα αντοχής στελεχών και έχουν καταγραφεί στο (EARS-Net) Δίκτυο για την Εποπτεία της Ευρωπαϊκής Αντιμικροβιακής Αντίστασης, από 30 χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ) και από 2 Χώρες (Ισλανδία και Νορβηγία) του ΕΟΧ, το 2018 (δεδομένα που αφορούν το 2017 και καταγράφηκαν πριν από το τέλος Αυγούστου 2018), και σε αναλύσεις τάσεων των δεδομένων που αναφέρθηκαν από τις συμμετέχουσες χώρες για την περίοδο 2014 έως 2017. Σε επίπεδο ΕΕ/ΕΟΧ, περισσότερο από το ένα τρίτο (34,1%) των στελεχών *K.pneumoniae* που αναφέρθηκαν για το 2017 ήταν ανθεκτικά σε τουλάχιστον μια από τις αντιμικροβιακές ομάδες, φθοριοκινολόνες, κεφαλοσπορίνες τρίτης γενεάς, αμινογλυκοσίδες και καρβαπενέμες. Το 2017, το υψηλότερο επίπεδο αντοχής αναφέρθηκε για φθοριοκινολόνες (31,5%), ακολουθούμενη από τις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς (31,2%), τις αμινογλυκοσίδες (24,1%) και καρβαπενέμες (7,2%). Η αντοχή σε μία ομάδα αντιβιοτικών ήταν λιγότερο συχνή απ ό τι η αντοχή σε δύο ή περισσότερες ομάδες αντιβιοτικών, με τον πιο κοινό φαινότυπο αντοχής σε φθοριοκινολόνες, κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς και αμινογλυκοσίδες. Η πλειοψηφία των ανθεκτικών στελεχών στην κεφαλοσπορίνη 3^{ης} γενεάς ήταν ESBL θετικά. Μεγάλες διαφορές μεταξύ των χωρών εντοπίζονται για όλες τις αντιβιοτικές ομάδες, με γενικά υψηλότερα ποσοστά αντοχής να αναφέρονται στα νότια και ανατολικά μέρη της Ευρώπης συγκριτικά με τη Βόρεια Ευρώπη (εικόνες 30, 32, 34, 36). Στην Ελλάδα το ποσοστό της αντοχής για το 2017 ήταν για τις 3^{ης}

γενεάς κεφαλοσπορίνες 69,2%, (Εικόνα 31), για τις φθοριοκινολόνες 66,9% (Εικόνα 33), για τις αμινογλυκοσίδες 53,2% (Εικόνα 35) και για την συνδυασμένη αντοχή 47,9% (Εικόνα 37) (<https://ecdc.europa.eu/en/surveillance-atlas-infectious-diseases>).

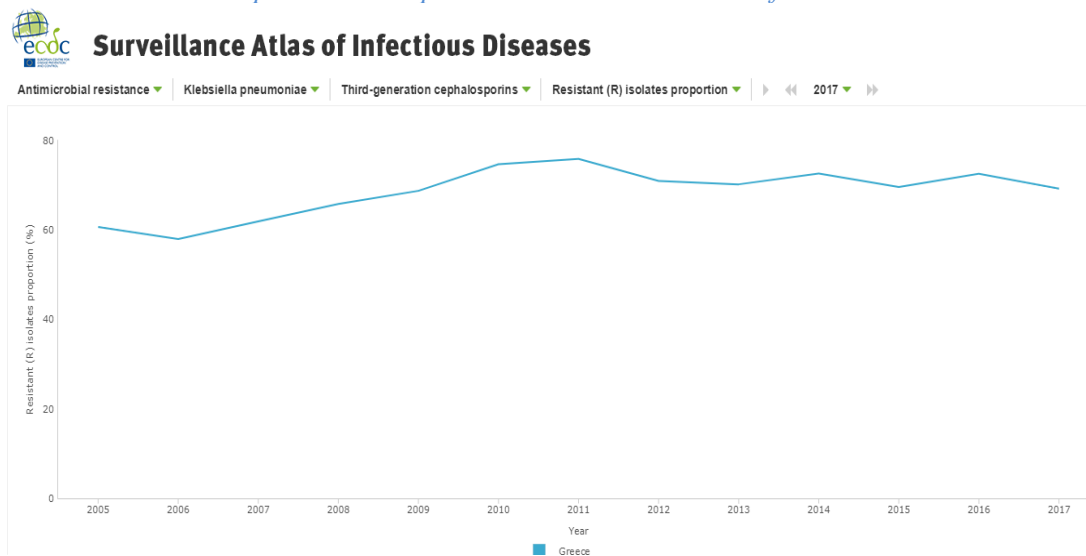
Εικόνα 30. Χάρτης αντοχής για τις 3ης γενεάς κεφαλοσπορίνες στην Ευρώπη.

ΠΗΓΗ: <https://ecdc.europa.eu/en/surveillance-atlas-infectious-diseases>



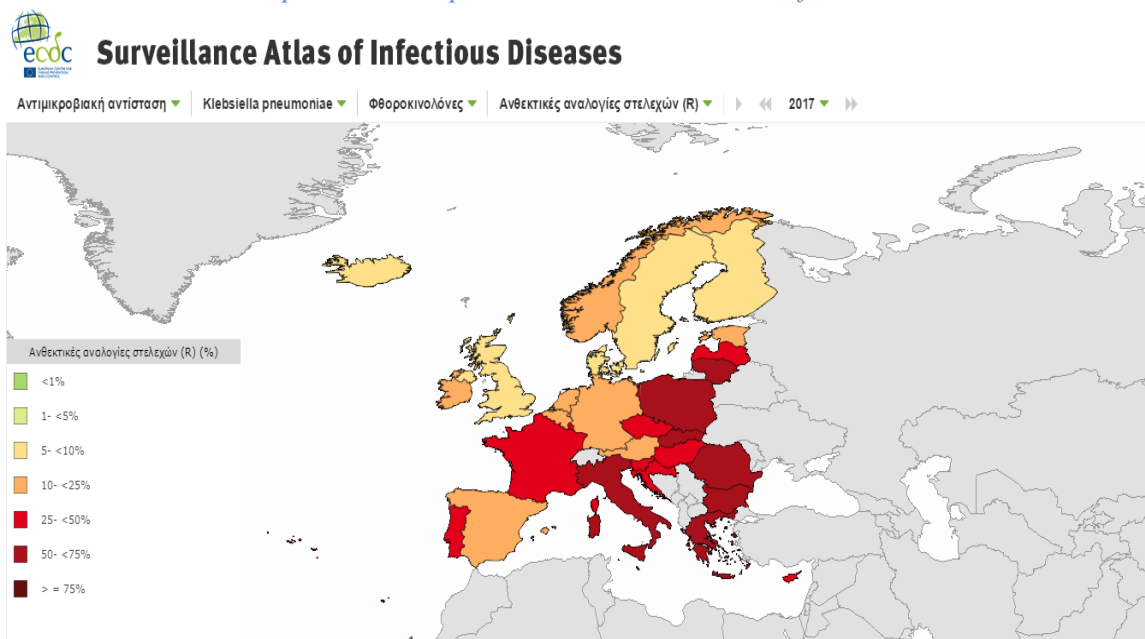
Εικόνα 31. Γράφημα αντοχής για τις 3ης γενεάς κεφαλοσπορίνες στην Ελλάδα, (2005-2017).

ΠΗΓΗ: <https://ecdc.europa.eu/en/surveillance-atlas-infectious-diseases>



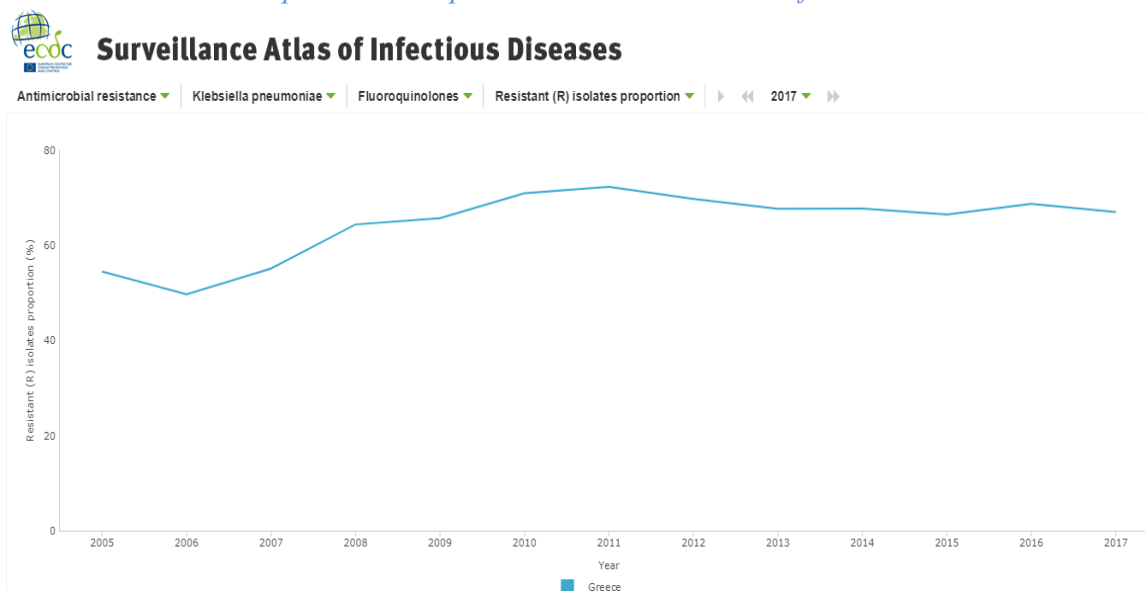
Εικόνα 32. Χάρτης αντοχής για τις φθοροκινολόνες στην Ευρώπη.

ΠΗΓΗ: <https://ecdc.europa.eu/en/surveillance-atlas-infectious-diseases>



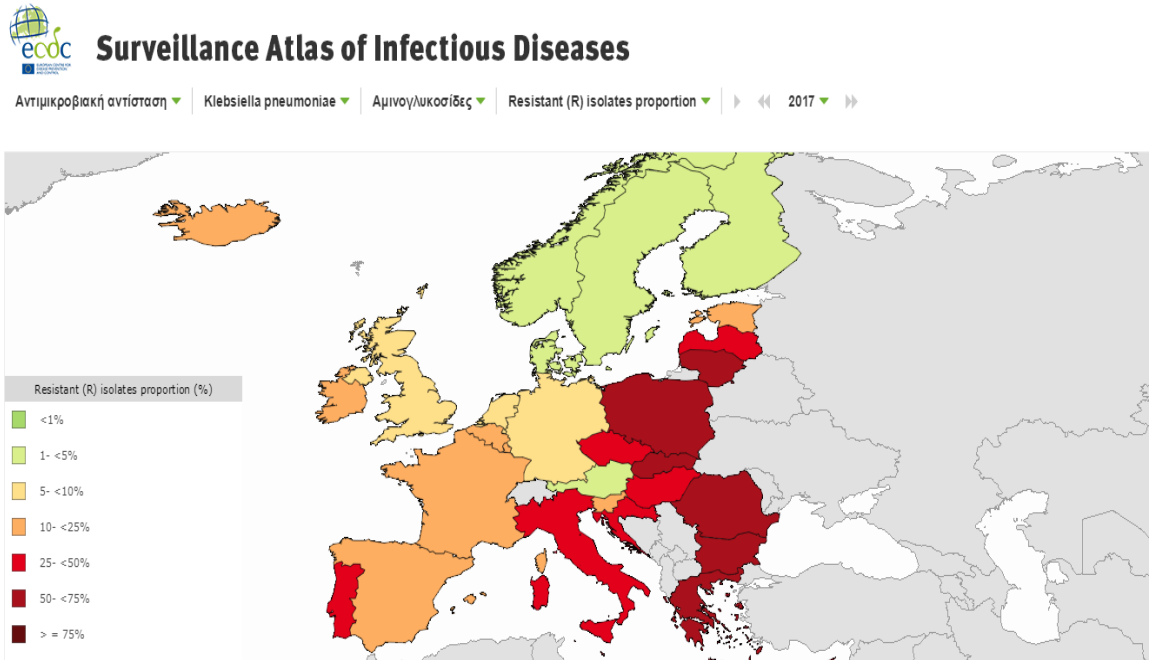
Εικόνα 33. Γράφημα αντοχής για τις φθοροκινολόνες στην Ελλάδα (2005-2017).

ΠΗΓΗ: <https://ecdc.europa.eu/en/surveillance-atlas-infectious-diseases>



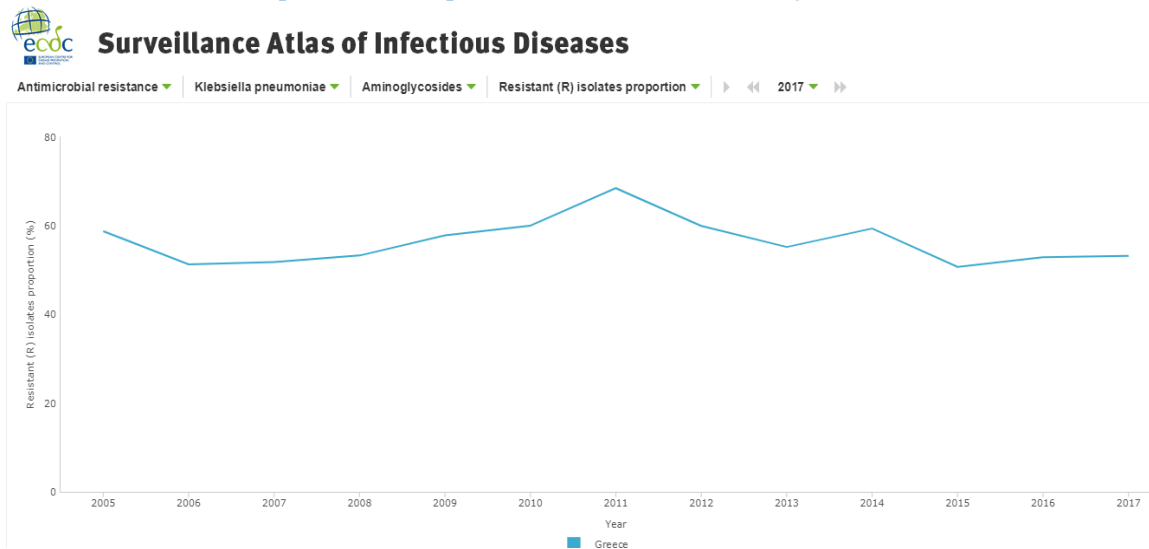
Εικόνα 34. Χάρτης αντοχής για τις αμινογλυκοσίδες στην Ευρώπη.

ΠΗΓΗ: <https://ecdc.europa.eu/en/surveillance-atlas-infectious-diseases>



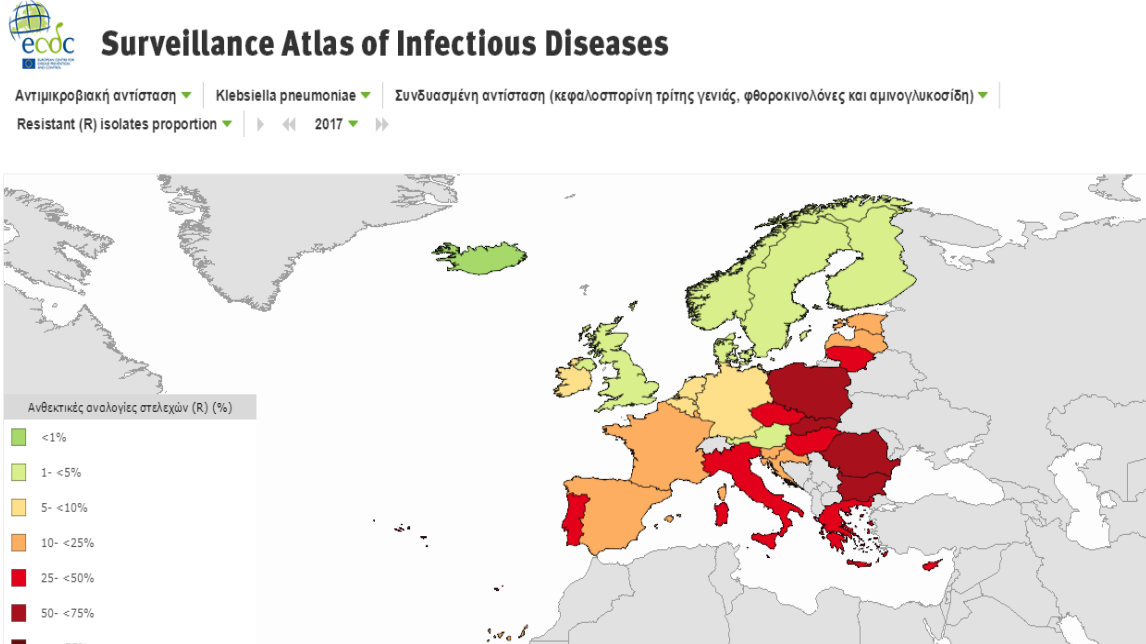
Εικόνα 35. Γράφημα αντοχής για τις αμινογλυκοσίδες στην Ελλάδα (2005-2017).

ΠΗΓΗ: <https://ecdc.europa.eu/en/surveillance-atlas-infectious-diseases>



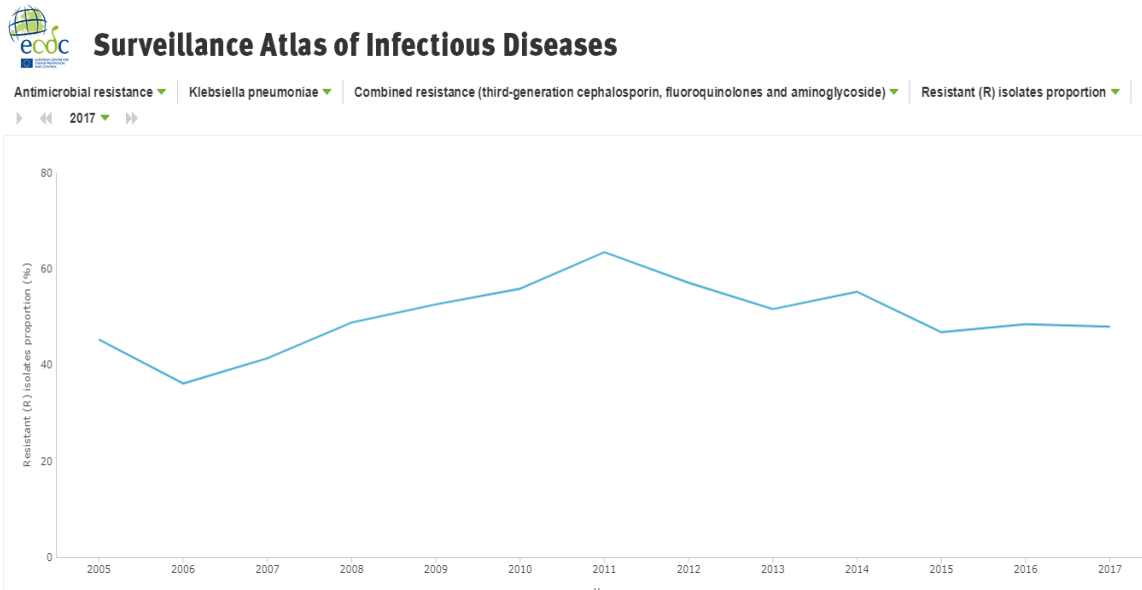
Εικόνα 36. Χάρτης «συνδυασμένης» αντοχής σε διάφορες ομάδες αντιβιοτικών (κεφαλοσπορίνες 3ης γενιάς, φθοριοκινολόνες και αμινογλυκοσίδες) στην Ευρώπη.

ΠΗΓΗ: <https://ecdc.europa.eu/en/surveillance-atlas-infectious-diseases>



Εικόνα 37. Γράφημα «συνδυασμένης» αντοχής σε διάφορες ομάδες αντιβιοτικών (κεφαλοσπορίνες 3ης γενιάς, φθοριοκινολόνες και αμινογλυκοσίδες) στην Ελλάδα (2005-2017).

ΠΗΓΗ: <https://ecdc.europa.eu/en/surveillance-atlas-infectious-diseases>



5.4 Επιδημιολογία αντοχής της *K.pneumoniae* στα αντιβιοτικά: πολυμυξίνες

Λόγω του αυξανόμενου επιπολασμού των πολυανθεκτικών Gram αρνητικών βακτηρίων (Magiorakos, et al, 2012), ιδιαίτερα των στελεχών *K.pneumoniae*, έχει επανέλθει συστηματικά ως θεραπευτική επιλογή η χρήση της πολυμυξίνης (Li, et al, 2006, Biswas, et al, 2012).

Με βάση παγκόσμια έρευνα του προγράμματος αντιμικροβιακής επιτήρησης SENTRY, το 2009, αναφέρεται αυξανόμενη τάση αντοχής (περίοδο μελέτης 2006-2009) σε στελέχη *K.pneumoniae* (ποσοστά αντοχής 1,2% το 2006 και 1,8% το 2009), πιθανώς λόγω της εκτεταμένης χρήσης πολυμυξινών παγκοσμίως για τη θεραπεία λοιμώξεων (Gales, et al, 2011).

Στη Νότια Αμερική, τα αποτελέσματα από το πρόγραμμα αντιμικροβιακής επιτήρησης SENTRY έδειξαν ένα μέτριο ποσοστό αντοχής (3%) στη Λατινική Αμερική το 2009 (Gales, et al, 2011). Ωστόσο, η εμφάνιση στελεχών *K.pneumoniae* ανθεκτικών στην κολιστίνη έχει αναφερθεί στην Αργεντινή (Arduino, et al, 2012), στην Κολομβία (Jayol, et al, 2014) και στη Βραζιλία (Perez, 2015).

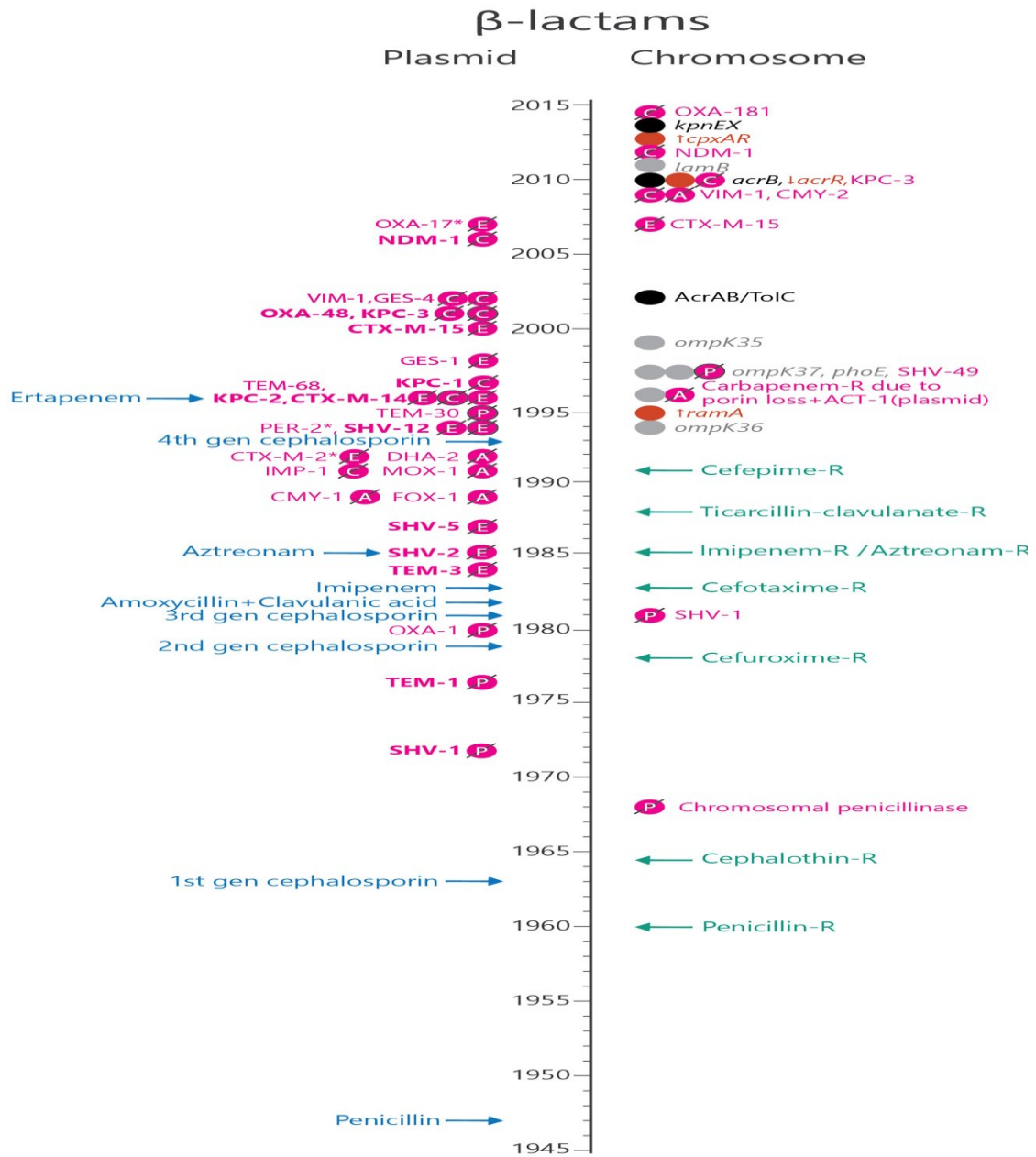
Στη Βόρεια Αμερική παρατηρήθηκαν σχετικά μέτρια ποσοστά ανθεκτικότητας, της τάξης του 2,9% και 4% σε στελέχη *K.pneumoniae* αντίστοιχα στον Καναδά (Walkty, et al, 2009) και στις Ηνωμένες Πολιτείες (Sutherland and Nicolau, 2015).

Στην Ευρώπη, έχουν αναφερθεί πολλές περιπτώσεις στελεχών *K.pneumoniae* που παρουσιάζουν αντοχή σε καρβαπενέμες και σε κολιστίνη στην Ολλανδία (Weterings, et al, 2015), στην Ουγγαρία (Tóth, et al, 2010) στην Ελλάδα (Kontopoulou, et al, 2010) και στην Ιταλία (Giani, et al, 2015).

Στην Ελλάδα, έχουν αναφερθεί αρκετά περιστατικά που προκαλούνται από στελέχη *K.pneumoniae* που παράγουν KPC, ανθεκτικά στην κολιστίνη. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε δύο ελληνικά νοσοκομεία ανέφεραν τεράστια αύξηση της αντοχής

στην κολιστίνη μέσα σε λίγα χρόνια (<3,5% επίπτωση πριν το 2010 και> 20% μετά το 2010) (Meletis, et al, 2015, Zagorianou, et al, 2012).

Κατά τη διάρκεια μιας διετούς περιόδου (2010 έως 2012) στην Ισπανία, μια μελέτη έδειξε αύξηση του επιπολασμού της αντοχής στην κολιστίνη στελεχών *K.pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάση από 13,5 σε 31,7%. (Pena, et al, 2014).



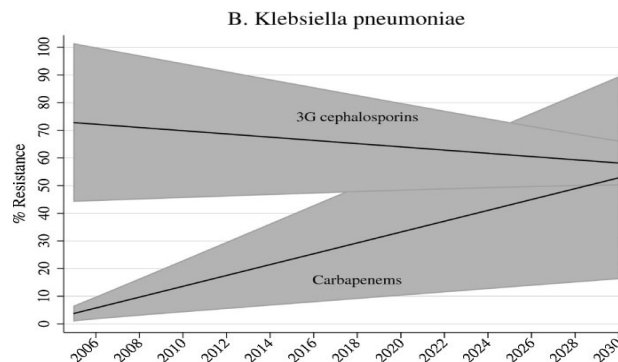
Εικόνα 38. Σχηματικό χρονοδιάγραμμα για την αντοχή της *K.pneumoniae* στα αντιβιοτικά β λακτάμης.

Τα βέλη στα αριστερά δείχνουν την πρώτη κλινική εφαρμογή των συγκεκριμένων αντιβιοτικών. Τα βέλη στα δεξιά της χρονικής γραμμής δείχνουν την πρώτη εμφάνιση αντοχής σε ένα κλινικό στέλεχος. ΠΗΓΗ: Navon-Venezia, 2017.

5.5 Πρόβλεψη της μελλοντικής αντιμικροβιακής αντοχής της *K.pneumoniae* σε κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς και καρβαπενέμες έως το 2030.

Σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε με σκοπό τον υπολογισμό της αντιμικροβιακής αντοχής (AMR) και χρησιμοποιώντας μεικτά γραμμικά μοντέλα, υπολογίστηκε (με 95% διάστημα εμπιστοσύνης-CI) η συνολική μικροβιακή αντοχή της *K.pneumoniae* σε κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς και καρβαπενέμες έως το 2030 (σχήμα 3). Η μελέτη περιελάμβανε 43 χώρες με δεδομένα AMR για την *K.pneumoniae*. Για την πρόβλεψη της μελλοντικής αντιμικροβιακής αντοχής ο εκτιμώμενος επιπολασμός της το 2015 ήταν 66,9% (95% CI 47,1-86,8%) για τις 3GcR (ανθεκτικές στην κεφαλοσπορίνη τρίτης γενιάς) *K.pneumoniae* και 23,4% (95% CI 7,4-39,4%) για CR *K.pneumoniae* (ανθεκτικά στις καρβαπενέμες). Ο προβλεπόμενος επιπολασμός AMR το 2030 ήταν 58,2% (95% CI 50,2-66,1%) για τις 3GcR *K.pneumoniae* και 52,8% (95% CI 16,3-89,3%) για CR *K.pneumoniae*. Τα μοντέλα υποδεικνύουν ότι οι κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς και οι καρβαπενέμες, θα μπορούσαν να αποδειχθούν αναποτελεσματικές έναντι ενός σημαντικού ποσοστού λοιμώξεων από *K.pneumoniae* στα περισσότερα μέρη του κόσμου έως το 2030 (Alvarez-Uria, et al, 2018).

Σχήμα 3. Εκτιμήσεις πρόβλεψης αντοχής της *K.pneumoniae* σε κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς (3G) και καρβαπενέμες (95% CI)
ΠΗΓΗ: G.Alvarez-Uria, et al, 2018.



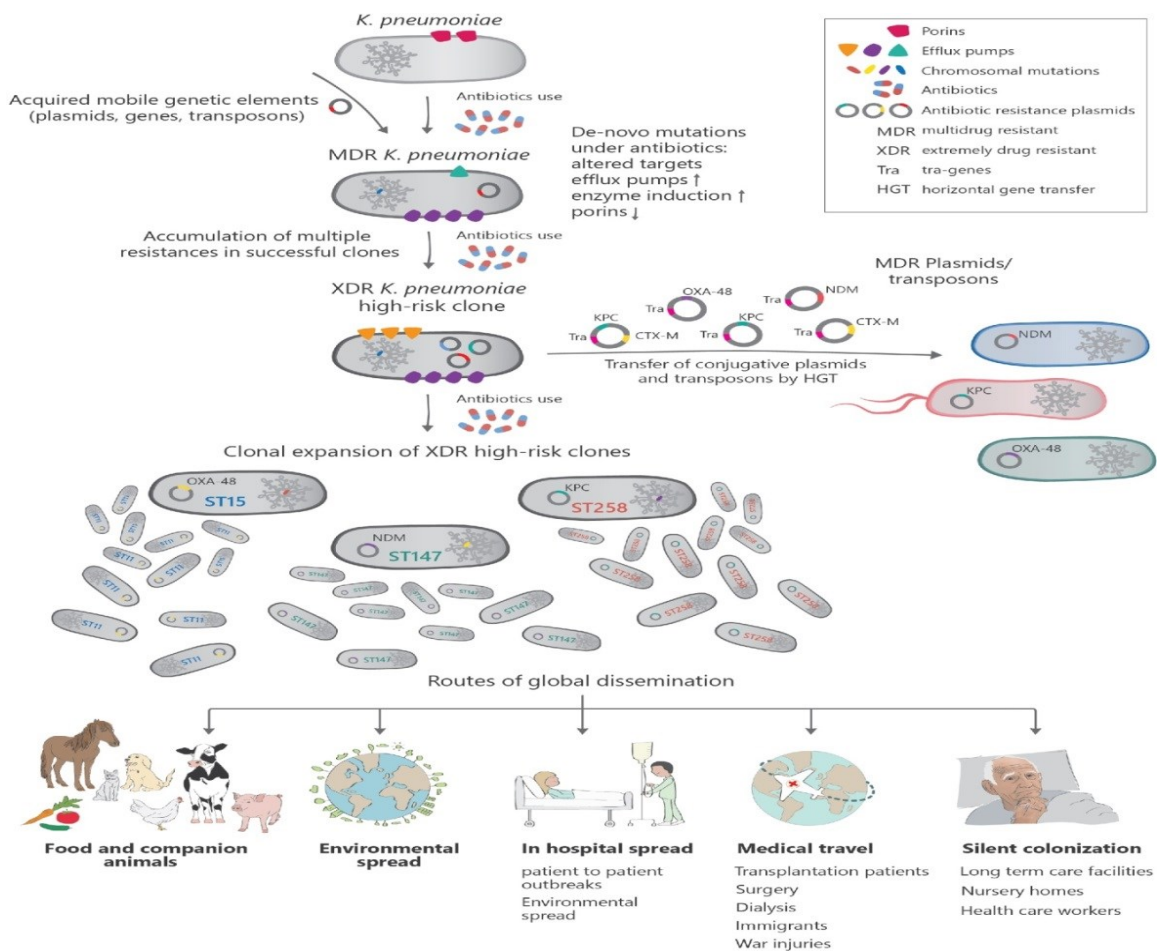
6. Εξάπλωση της *K.pneumoniae* και διασπορά ανθεκτικών στελεχών

Πολυάριθμες οδοί μετάδοσης της *K.pneumoniae* παρουσιάζονται σχηματικά στην εικόνα 39. Οι τρόποι μετάδοσης μπορεί να περιλαμβάνουν τη διασπορά από ασθενή σε ασθενή, από επαφή με φορείς των στελεχών, καθώς και τη μετάδοση μέσω ταξιδιών και ενδεχομένως μέσω της τροφικής αλυσίδας, των ζώων συντροφιάς και των περιβαλλοντικών πηγών (Navon-Venezia, 2017). Οι παράγοντες κινδύνου για λοίμωξη από *K.pneumoniae* αφορούν την ιατρική περίθαλψη και τις συνθήκες υγειονομικής περίθαλψης, με σημαντικότερους την πρόσφατη χρήση αντιβιοτικών, την χρήση καθετήρων και την παρατεταμένη νοσηλεία (Boyle and Zembower, 2015). Η ικανότητα της *K.pneumoniae* να επιβιώνει σε επιφάνειες χώρων του νοσοκομείου και εξοπλισμό, διευκολύνει την διάδοσή της (Hu, et al, 2016). Ως εκ τούτου, η *K.pneumoniae* αναγνωρίζεται ως τυπικό και κυρίαρχο νοσοκομειακό παθογόνο. Είναι ενδιαφέρον ότι το 20% των φορέων σε μία μελέτη ευθύνονταν για το 80% της διασποράς των CRE στελεχών στο νοσοκομειακό χώρο, διαδραματίζοντας έτσι σημαντικό ρόλο στη μετάδοσή τους (Lerner, et al, 2015). Η παγκόσμια εξάπλωση επίσης μπορεί να συμβεί λόγω του διεθνών ταξιδιών και του τουρισμού (van der BijAkke and Pitout, 2012). Αυτό μπορεί να περιλαμβάνει τα ιατρικά ταξίδια (Roger, et al, 2011), κατά τη διάρκεια των οποίων οι άνθρωποι περιστασιακά έρχονται σε «επαφή» με εγκαταστάσεις υγειονομικής περίθαλψης ή ταξίδια αναψυχής σε μια ενδημική χώρα (Navon-Venezia, et al, 2009, Peirano, et al, 2014). Πιθανές δεξαμενές επίσης είναι ζώα που μπορούν να «ανταλλάξουν» παθογόνους ανθεκτικούς παράγοντες με ανθρώπους μέσω της τροφικής αλυσίδας, της στενής επαφής ή της επαγγελματικής μετάδοσης. Οι υψηλού κινδύνου CR *K.pneumoniae* έχουν απομονωθεί σε διάφορα ζώα συντροφιάς στην κοινότητα, όπως για παράδειγμα, το στέλεχος *K.pneumoniae* ST15 που έφερε *bla_{OXA-48}* σε σκύλους στη Γερμανία (Stolle, et al, 2013) ή και σε άλλα ζώα από την Ιαπωνία, τη Γαλλία, τη Γερμανία και άλλες ευρωπαϊκές χώρες που είχαν μολυνθεί και αποικισθεί με *bla_{CTX-M-15}* (Ewers, et al, 2014, Harada, et al, 2016). Ο ρόλος των ζώων ως δεξαμενή και η επίδρασή τους στην ανθρώπινη υγεία εξακολουθεί να παραμένει ασαφής και πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω.

Η ταχεία διάδοση των στελεχών της *K.pneumoniae* και των γονιδίων αντοχής αποτελεί σοβαρή απειλή που απαιτεί άμεσες ενέργειες. Πρέπει να καθιερωθεί ενεργός έλεγχος σε όλες τις εγκαταστάσεις υγειονομικής περίθαλψης, πρέπει να αναπτυχθούν μέτρα για την πρόληψη της μόλυνσης του περιβάλλοντος και να εφαρμοστούν συστηματικά. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την κατανόηση της επιτυχίας διασποράς των κλώνων υψηλού κινδύνου και της μετάδοσής τους. Η αναγνώριση μοναδικών δεικτών για τέτοιους κλώνους θα βοηθήσει στην αποτελεσματική ανεύρεση των φορέων, στον έλεγχο της μετάδοσης και θα βελτιώσει τη διάγνωση (Navon-Venezia, 2017).

Εικόνα 39. Οδοί μετάδοσης της *K.pneumoniae*.

ΠΗΓΗ: Navon-Venezia. 2017.



7. Περίληψη

Η *Klebsiella pneumoniae* είναι ένα σημαντικό παθογόνο βακτήριο, ανθεκτικό σε πολλαπλά φάρμακα (MDR) και αποτελεί σημαντική πηγή νοσοκομειακών λοιμώξεων που συνδέονται με υψηλή νοσηρότητα και θνητότητα. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, υπήρξε αύξηση της αντοχής στελεχών *K.pneumoniae* σε ένα ευρύ φάσμα αντιβιοτικών με υπεύθυνα γονίδια τα εξής: KPC, NDM-1 ΚΑΙ OXA-48. Αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται για την θεραπεία λοιμώξεων είναι τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, μόνα τους ή σε συνδυασμό με αναστολείς των β-λακταμασών, όπως κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες, τιγκεκυκλίνη, πολυμυξίνες, κινολόνες και αμινογλυκοσίδες. Η διερεύνηση γίνεται με φαινοτυπικές και με μοριακές μεθόδους. Η επιδημιολογική μελέτη αποδεικνύει ότι υπάρχει παγκόσμια διασπορά, με σπορδική και με ενδημική εξάπλωση. Η αναγνώριση μοναδικών δεικτών για συγκεκριμένους κλώνους υψηλού κινδύνου θα βοηθήσει στην αποτελεσματική ανεύρεση των φορέων, στον έλεγχο της μετάδοσης και θα βελτιώσει τη διάγνωση.

8. Abstract

Klebsiella pneumoniae is a major multidrug-resistant pathogenic bacterium (MDR) and is an important source of hospital infections associated with high morbidity and mortality. Over the last few decades, there has been an increase in the resistance of *K. pneumoniae* strains to a wide range of antibiotics mainly due to acquired resistance genes: KPC, MBL, NDM and OXA-48. Antibiotics used to treat infections are β -lactam antibiotics, such as cephalosporins, carbapenems, alone or in combination with β -lactamase inhibitors, and others as tigecycline, polymyxins, quinolones and aminoglycosides. Diagnostic investigation is based on phenotypically and molecular methods. The epidemiological study proves that there is a worldwide spread, sporadic and/or endemic. Recognizing unique markers for specific high-risk clones will help to effectively identify carriers, prevent transmission, and to improve diagnosis.

9. Βιβλιογραφία

- Abraham, E.P. (1987) Cephalosporins 1945-1986. *Drugs* 34(2): 1-14.
- Abraham, E.P. (1979) A glimpse of the early history of the cephalosporins. *Rev Infect Dis* 1(1): 99-105.
- Al-Zahrani, I.A. (2018) Routine detection of carbapenem-resistant gram-negative bacilli in clinical laboratories. *Saudi Med J* 39(9): 861-872.
- Alekshun, M.N., Levy, S.B. (2007) Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* 128(6): 1037-50.
- Alvarez-Uria, G., Gandra, G., Mandal, S., Laxminarayan, R. (2018) Global forecast of antimicrobial resistance in invasive isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Intern Infect Dis* 68: 50-53.
- Ambler, R.P. (1980) The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B* 289: 321-331.
- Ambler, R.P., Coulson A.F., Frere, J.M., Ghuysen, J.M., Joris, B., Forsman, M., Levesque, R.C., Tiraby, G., Waley, S.G. (1991) A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. *Biochem J* 276(1): 269-270.
- Arduino, S.M., Quiroga, M.P., Ramírez, M.S. et al., (2012) Transposons and integrons in colistin-resistant clones of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* with epidemic or sporadic behaviour. *J Med Microbiol* 61(10): 1417-1420.
- Aziz, R.K., Breitbart, M., Edwards, R.A. (2010) Transposases are the most abundant, most ubiquitous genes in nature. *Nucleic Acids Res* 38(13): 4207-4217.
- Bagley, S.T. (1985) Habitat association of *Klebsiella* species. *Infect Control* 6(2): 52-58.
- Bailey & Scott's. (2017) *Diagnostic Microbiology*. St. Louis, Missouri: s.n., 2017. ISBN:978-0-323-35482-0.

- Bakour, S., Sahli, F., Touati, A., Rolain, J.M. (2014) Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST512 isolated from cerebrospinal fluid of a child in Algeria. *New Microbes New Infect* 8(3): 34-36.
- Banerjee, T., Bhattacharjee, A., Upadhyay, S., Mishra, S., Tiwari, K., Anupurba, S., Sen, MR., Basu, S., Kumar, A. (2016) Long-term outbreak of *Klebsiella pneumoniae* & third generation cephalosporin use in a neonatal intensive care unit in north India. *Indian J Med Res* 144(4): 622-629.
- Bauernfeind, A., Schneider, I., Jungwirth, R., Sahly, H., Ullmann, U. (1999) A Novel Type of AmpC β -Lactamase, ACC-1, Produced by a *Klebsiella pneumoniae* Strain Causing Nosocomial Pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* 43(8): 1924-1931.
- Bedenić, B., Mazzariol, A., Plečko, V., Bošnjak, Z., Barl, P., Vraneš, J., Cornaglia, G. (2012) First report of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Croatia. *J Chemother* 24(4): 237-239.
- Biswas, S., Brunel, J.M., Dubus, J.C., et al. (2012) Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. *Expert Rev Anti Infect Ther* 10(8): 917-934.
- Boucher, H.W., Talbot, G.H., Bradley, J.S., Edwards, J.E., Gilbert, D., Rice, L.B., Scheld, M., Spellberg, B., Bartlett, J. (2009) Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 48(1): 1-12.
- Bowers, J.R., Kitchel, B., Driebe, E.M., MacCannell, D.R., Roe, C., Lemmer, D., de Man, T., Rasheed, J.K., Engelthaler, D.M., Keim, P., Limbago, B.M. (2015) Genomic Analysis of the Emergence and Rapid Global Dissemination of the Clonal Group 258 *Klebsiella pneumoniae* Pandemic. *PLoS One* 10: 7.
- Boyle, D.P., Zembower, TR. (2015) Epidemiology and Management of Emerging Drug-Resistant Gram-Negative Bacteria: Extended-Spectrum β -Lactamases and Beyond. *Urol Clin North Am* 42(4): 493-505.

- Bradford, P.A. (2001) Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clin Microbiol Review* 14(4): 933-951.
- Brink, A.J., Coetzee, J., Clay, C.G., Sithole, S., Richards, G.A., Poirel, L., Nordmann, P. (2012) Emergence New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1) and *Klebsiella pneumoniae* of carbapenemase (KPC-2) in South Africa. *J Clin Microbiol* 50(2): 525-527.
- Brink, A.J., Coetzee, J., Corcoran, C., Clay, C.G., Hari-Makkan, D., Jacobson, R.K., Richards, G.A., Feldman, C., Nutt, L., van Greune, J., Deetlefs, J.D., Swart, K., Devenish, L., Poirel, L., Nordmann, P. (2013) Emergence of OXA-48 and OXA-181 carbapenemases among Enterobacteriaceae in South Africa and evidence of in vivo selection of colistin resistance as a consequence of selective decontamination of the gastrointestinal tract. *J Clin Microbiol* 51(1): 369-372.
- Brisse, S., Passet, V., Grimont, P.A. (2014) Description of *Klebsiella quasipneumoniae* sp. nov., isolated from human infections, with two subspecies, *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* subsp. nov. and *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* subsp. nov., and demonstration that *Klebsiella singaporensis* is a junior heterotypic synonym of *Klebsiella variicola*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64: 3146-3152.
- Broberg, C.A., Palacios, M., Miller, V.L. (2014) *Klebsiella*: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter. *F1000 Prime Reports* 6: 64.
- Brown, C., Seidler, R.J. (1973) Potential pathogens in the environment: *Klebsiella pneumoniae*, a taxonomic and ecological enigma. *Applied Microbiology* 25(6): 900-904.
- Bush, K. (1989) Characterization of β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother* 33: 259-263.
- Bush, K., Jacoby, G.A., Medeiros, A.A. (1995) A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother* 39: 1211-1233.

Bush, K., Bradford, P.A. (2016) β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine 6: 8.

Campagna, J.D., Bond, M.C., Schabelman, E., Hayes, B.D. (2012) The Use of Cephalosporins in Penicillin-allergic Patients: A Literature Review. The Journal of Emergency Medicine 42(5): 612-620.

Chen, C.J., Wu, T.L., Lu, P.L., Chen, Y.T., Fung, C.P., et al. (2014) Closely related NDM-1-encoding plasmids from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. PLoS One 9: 8.

Chen, J.H., Siu, L.K., Fung, C.P. (2010) Contribution of outer membrane protein K36 to antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother 65(5): 986-990.

Chen, L., Mathema, B., Chavda, K.D., DeLeo, F.R., Bonomo, R.A., Kreiswirth, B.N. (2014) Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. Trends Microbiol 22(12): 686-696.

Chereau, F., Herindrainy, P., Garin, B., Huynh, B.T., Randrianirina, F., Padget, M., Piola, P., Guillemot, D., Delarocque-Astagneau, E. (2015) Colonization of extended-spectrum- β -lactamase- and NDM-1-producing Enterobacteriaceae among pregnant women in the community in a low-income country: a potential reservoir for transmission of multiresistant Enterobacteriaceae to neonates. Antimicrob Agents Chemother 59(6): 3652-3655.

Chetcuti, Z.S., Azzopardi, N., Sant, J. (2014) Mortality risk score for *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia. Eur J Intern Med 25(6): 571-576.

Chiu, S.K., Huang, L.Y., Chen, H., Tsai, Y.K., Liou, C.H., Lin, J.C., Siu, L.K., Chang, F.Y., Yeh, K.M. (2017) Roles of ramR and tet(A) Mutations in Conferring Tigecycline Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates. Antimicrob Agents Chemother 61: 8.

- Chopra, I., Roberts, M. (2001) Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 65(2): 232-60.
- Chopra, I. (2013) The 2012 Garrod Lecture: Discovery of antibacterial drugs in the 21st century. *J Antimicrobial Chemother* 68(3): 496-505.
- Chuncharunee, A., Khawcharoenporn, T. (2015) Lemierre's Syndrome Caused by *Klebsiella pneumoniae* in a Diabetic Patient: A Case Report and Review of the Literature. *Hawaii J Med Public Health* 74(8): 260-266.
- Codjoe, F.S., Donkor, E.S. (2017) Carbapenem Resistance: A Review. *Med Sci (Basel)* 6(1).
- Compain, F., Gallah, S., Eckert, C., Arlet, G., Ramahefasolo, A., Decré, D., Lavollay, M., Podglajen, I. (2016) Assessment of Carbapenem Resistance in Enterobacteriaceae with the Rapid and Easy-to-Use Chromogenic β Carba Test. *J Clin Microbiol* 54(12): 3065-3068.
- Correia, S., Poeta, P., Hébraud, M., Capelo, J.L., Igrejas G. (2017) Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? *J Med Microbiol* 66(5): 551-559.
- Cortés, G., Borrell, N., de Astorza, B., Gómez, C., Sauleda, J., Albertí, S. (2002) Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia. *Infection Immunity* 70(5): 2583-2590.
- Cuzon, G., Naas, T. (2008) Plasmid-Mediated Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* Isolate from Greece. *Antimicrob Agents Chemother* 52(2): 796-797.
- Dahiya, S., Singla, P., Chaudhary, U., Singh, B. (2015) Carbapenemases: A Review. *International Journal of Advanced Health Sciences* 2(4).
- Dash, N., Panigrahi, D., Zarouni, M.A., Darwish, D., Ghazawi, A., Sonnevend, A., Pal, T., Yasin, F., Hadi, S.A. (2014) High incidence of New Delhi metallo-beta-lactamase-producing

Klebsiella pneumoniae isolates in Sharjah, United Arab Emirates. *Microb Drug Resistance* 20(1): 52-56.

Davies, J. (2006) Where have All the Antibiotics Gone? *Can J Infect Dis Med Microbiol* 17(5): 287-290.

Davies, J. (1994) Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* 264(5157): 375-382.

Davis, G.S., Waits, K., Nordstrom, L., Weaver, B., Aziz, M., Gauld, L., Grande, H., Bigler, R., Horwinski, J., Porter, S., Stegger, M., Johnson, JR., Liu, C.M., Price, L.B. (2015) Intermingled *Klebsiella pneumoniae* Populations Between Retail Meats and Human Urinary Tract Infections. *Clin Infect Dis* 61(6): 892-899.

Dever, L.A., Dermody, T.S. (1991). Mechanisms of Bacterial Resistance to Antibiotics. *Arch Intern Med* 151(5): 886-895.

Diago-Navarro, E., Calatayud-Baselga, I., Sun, D., Khairallah, C., Mann, I., Ulacia-Hernando, A., Sheridan, B., Shi, M., Fries, B.C. (2017) Antibody-Based Immunotherapy To Treat and Prevent Infection with Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clinical and Vaccine Immunology* 24(1).

Dimou, V., Dhanji, H., Pike, R., Livermore, D.M., Woodford, N. (2012) Characterization of Enterobacteriaceae producing OXA-48-like carbapenemases in the UK. *J Antimicrob Chemother.* 67(7): 1660-1665.

Dong, D., Liu, W., Li, H., Wang, Y., Li, X., Zou, D., Yang, Z., Huang, S., Zhou, D., Huang, L., Yuan, J. (2015) Survey and rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* in clinical samples targeting the *rcsA* gene in Beijing 6 (519)

Drawz, S.M., Bonomo, R.A. (2010) Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. *Clin Microbiol Rev* 23(1): 160–201.

- Drioux, L., Brossier, F., Sougakoff, W., Jarlier, V. (2008) Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect* 14(1): 90-103.
- Dudley, JP. (1987) Atrophic rhinitis: antibiotic treatment. *American Journal of Otolaryngology* 8(6): 387-390.
- Ebimieowi, E., Ibemologi, A. (2016) Antibiotics: Classification and mechanisms of action. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research* 4(6): 90-101.
- Ellington, M.J., Kistler, J., Livermore, D.M., Woodford, N. (2007) Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 59(2) : 321-322.
- Evans, B.A., Amyes, S.G. (2014) OXA β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 27(2): 241-63.
- Ewers, C., Stamm, I., Pfeifer, Y., Wieler, L.H., et al. (2014) Clonal spread of highly successful ST15-CTX-M-15 *Klebsiella pneumoniae* in companion animals and horses. *J Antimicrob Chemother* 69(10): 2676-2680 .
- Fernández, L., Hancock, R.E. (2012) Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. *Clin Microbiol Rev* 25(4): 661-681.
- Fischbach, M.A., Walsh, C.T. (2009) Antibiotics for emerging pathogens. *Science* 325(5944): 1089-93.
- Fluit, A.C., Schmitz, F.J. (1999) Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18(11): 761-70.
- Fluit, A.C., Schmitz F.J. (2004) Resistance integrons and super-integrons. *Clinical Microbiology and Infection* 10(4): 272-288.
- Friedlander, C. (1983) Die Mikrokokken der Pneumonie. *Fortschr Med*: 1715-1733.

Frost, L.S., Koraimann, G. (2010) Regulation of bacterial conjugation: balancing opportunity with adversity. *Future Microbiology* 5(7): 1057-1071.

Fung, C.P., Chang, F.Y., et al. (2002) A global emerging disease of *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: is serotype K1 an important factor for complicated endophthalmitis? *Gut* 50(3): 420-424.

Fusconi, M., Greco, A., Cattaneo, C.G., Ciofalo, A., Ralli, M., Vincentiis, M. (2018) Social geography of Rhinoscleroma and qualitatively and quantitatively abnormal cell-mediated immunity. *infection genetics and evolution* 62: 17-19.

Galani, I., Karaiskos, I., Karantani, I., et al. (2018) Epidemiology and resistance phenotypes of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece, 2014 to 2016. *Euro Surveill* 23(31).

Gales, A.C., Jones, R.N., Sader, H.S. (2011) Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). *J Antimicrob Chemother* 66(9): 2070-2074.

Galleni, M., Lamotte-Brasseur, J., Rossolini, G.M., Spencer, J., Dideberg, O., Frère, J.M. (2001) Standard numbering scheme for class B beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 45(3): 660-663.

Gartzonika, K., Rossen, J.W.A., Sakkas, H., Rosema, S., Priavali, E., Friedrich, A.W., Levidiotou, S., Bathoorn, E. (2018) Identification of a KPC-9-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 cluster among KPC-2-producing isolates of an ongoing outbreak in Northwestern Greece: a retrospective study. *Clin Microbiol Infect.* 24(5):558-560.

Giakkoupi, P., Pappa, O., Polemis, M., Vatopoulos, A.C., Miriagou, V., Zioga, A., Papagiannitsis, C.C., Tzouvelekis, L.S. (2009) Emerging *Klebsiella pneumoniae* isolates coproducing KPC-2 and VIM-1 carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother* 53(9): 4048-4050.

Giakkoupi, P, Xanthaki, A, Kanelopoulou, M, Vlahaki, A, Miriagou, V, Kontou, S, Papafraggas, E, Malamou-Lada, H, Tzouvelekis, L.S, Legakis, NJ, Vatopoulos, A.C. (2003) VIM-1 Metallo- β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Greek Hospitals. *J Clin Microbiol* 41(8): 3893-3896.

Giani, T., Arena, F., Vaggelli, G., Conte, V., et al. (2015) Large Nosocomial Outbreak of Colistin-Resistant, Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Traced to Clonal Expansion of an *mgrB* Deletion Mutant. *J Clin Microbiol* 53(10): 3341-3344.

Giani, T., Pini, B., Arena, F., Conte, V., Bracco, S., Migliavacca, R., AMCLI-CRE Survey Participants, Pantosti, A., Pagani, L., Luzzaro, F., Rossolini, G.M. (2013) Epidemic diffusion of KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy: results of the first countrywide survey, 15 May to 30 June 2011. *Eurosurveillance* 30(18): 22.

Girmenia, C., Serrao, A., Canichella, M. (2016) Epidemiology of Carbapenem Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infections in Mediterranean Countries. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 8(1).

Giske, C.G., Fröding, I., Hasan, C.M., Turlej-Rogacka, A., et al. (2012) Diverse sequence types of *Klebsiella pneumoniae* contribute to the dissemination of bla_{NDM-1} in India, Sweden, and the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother* 56(5): 2735-2738.

Glupczynski, Y., Jousset, A., Evrard, S., Bonnin, R.A., Huang, T.D., Dortet, L., Bogaerts, P., Naas, T. (2017) Prospective evaluation of the OKN K-SeT assay, a new multiplex immunochromatographic test for the rapid detection of OXA-48-like, KPC and NDM carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 72(7): 1955-1960.

Gomez, S.A., Pasteran, F.G., Faccone, D., Tijet, N., Rapoport, M., Lucero, C., Lastovetska, O., Albornoz, E., Galas, M., KPC Group, Melano, R.G., Corso, A., Petroni, A. (2011) Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST258 harbouring KPC-2 in Argentina. *Clin Microbiol Infect* 17(10): 1520-1524.

Gonzalez-Padilla, M., Torre-Cisneros, J., Rivera-Espinar, F., Pontes-Moreno, A., López-Cerero, L., Pascual, A., Natera, C., Rodríguez, M., Salcedo, I., Rodríguez-López, F., Rivero, A., Rodríguez-Baño, J. (2015) Gentamicin therapy for sepsis due to carbapenem-resistant and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 70(3): 905-913.

Gould, K., (2016) Antibiotics: from prehistory to the present day *Antimicrob Chemother* 71(3): 572–575

Greenwood, D., et al. (2010). *ΙΑΤΡΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ*. 6. σ.λ.: Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης, επιμέλεια Αθανασιος Τσακρης, τομος 1 κεφαλαιο27.

Grenni, P., Anconab, V., Caracciolo, A. (2018) Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. *Microchemical Journal Science Direct* 136: 25-39.

Hamprecht, A., Vehreschild, J.J., Seifert, H., Saleh, A. (2018) Rapid detection of NDM, KPC and OXA-48 carbapenemases directly from positive blood cultures using a new multiplex immunochromatographic assay. *PLoS One* 13(9).

Harada, K., Shimizu, T., Mukai, Y., Kuwajima, K., et al. (2016). Phenotypic and Molecular Characterization of Antimicrobial Resistance in *Klebsiella* spp. Isolates from Companion Animals in Japan: Clonal Dissemination of Multidrug-Resistant Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Front Microbiol* 7: 1021.

Hellinger, W.C., Brewer, N.S. (1999) Carbapenems and monobactams: imipenem, meropenem, and aztreonam. *Mayo Clin Proc* 74(4): 420-434.

Hepzibah, W., John William, S., Balaji, M. (2012) Molecular Mechanics And Drug Docking Studies On *Klebsiella Pneumonia* (Multidrug Efflux System Protein) Using Insilico Protocols *Int J Novel Trends in Pharm* 2(2).

Hickman, A.B., Chandler, M., Dyda, F. (2010 Feb) Integrating prokaryotes and eukaryotes: DNA transposases in light of structure. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 45(1): 50-69.

- Hirakata, Y., Matsuda, J., Miyazaki, Y., Kamihira, S., Kawakami, S., et al. (2005) Regional variation in the prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region (SENTRY 1998-2002). *Diagn Microbiol Infect Dis* 52(4): 323-329.
- Hishinuma, A., Yoshida, A., Suzuki, H., Okuzumi, K., Ishida, T. (2013) Complete sequencing of an IncFII NDM-1 plasmid in *Klebsiella pneumoniae* shows structural features shared with other multidrug resistance plasmids. *J Antimicrob Chemother* 68(10): 2415-2417.
- Hladicz, A., Kittinger, C., Zarfel, G. (2017) Tigecycline Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Austrian River Water. *Int J Environ Res Public Health* 14(10): 1169.
- Hoeprich, P.D. (1968) The penicillins, old and new. Review and perspectives. *California Medicine* 109(4): 301-308.
- Hrabák, J., Papagiannitsis, C.C., Študentová, V., Jakubu, V., et al. (2013) Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the Czech Republic in 2011. *Euro Surveill* 18(45): 20626.
- Hsu, C.R., Lin, T.L., Pan, Y.J., Hsieh, P.F., Wang, J.T. (2013) Isolation of a Bacteriophage Specific for a New Capsular Type of *Klebsiella pneumoniae* and Characterization of Its Polysaccharide Depolymerase. *PLoS One* 8(8).
- Hu, L., Liu, Y., Deng, L., Zhong, Q., Hang, Y. (2016) Outbreak by Ventilator-Associated ST11 *K. pneumoniae* with Co-production of CTX-M-24 and KPC-2 in a SICU of a Tertiary Teaching Hospital in Central China. *Front Microbiol* 7: 1190.
- Hudson, C.M., Bent, Z.W., Meagher, R.J., Williams, K.P. (2014) Resistance determinants and mobile genetic elements of an NDM-1-encoding *Klebsiella pneumoniae* strain. *PLoS One* 9(6).
- Jacoby, G.A. (2009) AmpC β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev* 22(1): 161-182.
- Jacoby, G.A. (2005) Mechanisms of Resistance to Quinolones. *Clin Infectious Diseases*. 41(2): 120-126.

Janda, J.M. (2015) The Genus *Klebsiella*: An Ever-Expanding Panorama of Infections, Disease-Associated Syndromes, and Problems. *Clinical Microbiology & Case Reports* 1(4).

Jayol, A., Poirel, L., Brink, A., et al. (2014) Resistance to colistin associated with a single amino acid change in protein PmrB among *Klebsiella pneumoniae* isolates of worldwide origin. *Antimicrob Agents Chemother* 58(8): 4762-4766.

Jeon, J.H., Lee, J.H., Lee, J.J., Park, K.S., Karim, A.M., Lee, C.R., Jeong, B.C., Lee, S.H. (2015) Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. *Int J Molecular Sciences* 16(5): 9657-9692.

Kaiser, R.M., Castanheira, M., Jones, R.N., Tenover, F., Lynfield, R. (2013) Trends in *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-positive *K.pneumoniae* in US hospitals: report from the 2007-2009 SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 76(3): 356-360.

Kapoor, G., Saigal, S., Elongavan, A. (2017) Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol* 33(3): 300-305.

Karampatakis, T., Antachopoulos, C., Iosifidis, E., Tsakris, A., Roilides, E. (2016) Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Greece. *Future Microbiol* 11: 809-23.

Kazi, M., Drego, L., Nikam, C., Ajbani, K., Soman, R., Shetty, A., Rodrigues, C. (2015) Molecular characterization of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae at a tertiary care laboratory in Mumbai. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 34(3): 467-472.

Kim, S.Y., Choi, H.J., Ko, K.S. (2014) Differential expression of two-component systems, pmrAB and phoPQ, with different growth phases of *Klebsiella pneumoniae* in the presence or absence of colistin. *Curr Microbiol* 69(1): 37-41.

Knothe, H., Shah, P., Krcmery, V., Antal, M., Mitsuhashi, S. (1983) Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 11(6): 315-327.

Kontopoulou, K., Protonotariou, E., Vasilakos, K., et al., (2010) Hospital outbreak caused by *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 beta-lactamase resistant to colistin. *J Hosp Infect* 76(1): 70-73.

Kotra, L.P., Haddad, J., Mobashery, S. (2000) Aminoglycosides: Perspectives on Mechanisms of Action and Resistance and Strategies to Counter Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 44(12): 3249-3256.

Krause, K.M., Serio, A.W., Kane, T.R., Connolly, L.E. (2016) Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6(6).

Kumar, P., Mohan, J., Rakesh, P.S., Prasad, J., Joseph, L. (2017) Bacteriological profile of neonatal sepsis in a secondary care hospital in rural Tamil Nadu, Southern India. *J Family Med Prim Care* 6(4): 735-738.

Landman, D., Georgescu, C., Martin, D.A., Quale, J. (2008) Polymyxins Revisited. *Clin Microbiol Rev* 21(3): 449-465.

Lascols, C., Peirano, G., Hackel, M., Laupland, K.B., Pitout, J.D. (2013) Surveillance and molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* isolates that produce carbapenemases: first report of OXA-48-like enzymes in North America. *Antimicrob Agents Chemother* 57(1): 130-136.

Lawlor, M.S., Hsu, J., Rick, P.D., Miller, V.L. (2005) Identification of *Klebsiella pneumoniae* virulence determinants using an intranasal infection model. *Mol Microbiol* 58(4): 54-73.

Lee, G.C., Burgess, D.S. (2012) Treatment of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) infections: a review of published case series and case reports. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 11: 32.

Lee, C.R., Lee, J.H., Park, K.S., Kim, Y.B., Jeong, B.C, Lee, S.H. (2016) Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Front Microbiol.* 13(7): 895.

- Lerner, A., Adler, A., Abu-Hanna, J., Cohen Percia, S., Kazma Matalon, M., Carmeli, Y. (2015) Spread of KPC-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: the importance of super-spreaders and rectal KPC concentration. *Clin Microbiol Infect.* 21(5): 470.
- Levy, S.B., Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med* 10(12): 122-129.
- Li, J., Nation, R.L., Turnidge, J.D., Milne, R.W., et al. (2006) Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet Infect Dis* 6(9): 589-601.
- Liakopoulos, A., Mevius, D., Ceccarelli, D. (2016) A Review of SHV Extended-Spectrum β -Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. *Front Microbiol* 7: 1374.
- Ling, M.L., Tee, Y.M., Tan, S.G., Amin, I.M., How, K.B., Tan, K.Y., Lee, L.C. (2015) Risk factors for acquisition of carbapenem resistant Enterobacteriaceae in an acute tertiary care hospital in Singapore. *Antimicrob Resist Infect Control* 4(26).
- Liu, X.Q., Liu, Y.R. (2016) Detection and genotype analysis of AmpC β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from tertiary hospitals. *Exp Ther Med* 12(1): 480-484.
- Liu, Y., Wan, L.G., Deng, Q., Cao, X.W., Yu, Y., Xu, Q.F. (2015) First description of NDM-1-, KPC-2-, VIM-2- and IMP-4-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in a single Chinese teaching hospital. *Epidemiol Infect* 143(2):376-384.
- Liu, Y.Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L.F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J.H., Shen, J. (2016) Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 16(2): 161-168.
- Lixandru, B.E., Cotar, A.I., Straut, M., Usein, C.R., Cristea, D., Ciontea, S., Tatu-Chitoiu, D., Codita, I., Rafila, A., Nica, M., Buzea, M., Baicus, A., Ghita, M.C., Nistor, I., Tuchiluş, C., Indreas, M., Antohe, F., Glasner, C., Grundmann, H., Jasir, A., Damian, M. (2015)

Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Romania: A Six-Month Survey. *PLoS One* 10(11).

Llobet, E., Tomás, J.M., Bengoechea, J.A. (2008) Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. *Microbiology* 154(12): 3877-3886.

Lorenzo-Díaz, F., Fernández-López, C., Lurz, R., Bravo, A., Espinosa, M. (2017) Crosstalk between vertical and horizontal gene transfer: plasmid replication control by a conjugative relaxase. *Nucleic Acids Res* 45(13): 7774-7785.

Lynn, L.S. (2014). Challenges In Overcoming Antibiotic Resistance Technological Challenges in Antibiotic Discovery and Development.:A Workshop Summary 2: 7-34

Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., et al. (2012) Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 18(3): 268-281.

Mathers, A.J., Peirano, G., Pitout, J.D. (2015) The Role of Epidemic Resistance Plasmids and International High-Risk Clones in the Spread of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev* 28(3): 565–591.

Matuschek, E., Ahman, J., Webster, C., Kahlmeter, G. (2018) Antimicrobial susceptibility testing of colistin - evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp. *Clin Microbiol Infect* 24(8): 865-870.

McClelland, M., Florea, L., Sanderson, K., Clifton, S.W., Parkhill, J., Churcher, C., Dougan, G., Wilson, R.K., Miller, W. (2000) Comparison of the *Escherichia coli* K-12 genome with sampled genomes of a *Klebsiella pneumoniae* and three *Salmonella enterica* serovars, Typhimurium, Typhi and Paratyphi. *Nucleic Acids Res* 28(24): 4974-4986.

Medeiros, G.S., Rigatto, M.H., Falci, D.R., Zavascki, A.P. (2019) Combination therapy with polymyxin B for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection. *Int J Antimicrob Agents* 53(2): 152-157.

- Meletis, G. (2016) Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Ther Adv Infect Dis* 3(1): 15-21.
- Meletis, G., Oustas, E., Botziori, C., et al. (2015) Containment of carbapenem resistance rates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in a Greek hospital with a concomitant increase in colistin, gentamicin and tigecycline resistance. *New Microbiol* 38(3): 417-421.
- Metwally, L., Gomaa, N., Attallah, M., Kamel, N. (2013) High prevalence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-mediated resistance in *K. pneumoniae* isolates from Egypt. *East Mediterr Health J* 19(11): 947-952.
- Montgomerie, J.Z. (1979) Epidemiology of *Klebsiella* and hospital-associated infections. *Rev Infect Dis* 1(5): 736-753.
- Munita, J.M., Arias, C.A. (2016) Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr* 4(2).
- Munoz-Price, L.S., Poirel, L., Bonomo, R.A., Schwaber, M.J., Daikos, G.L., Cormican, M., Cornaglia, G., Garau, J., Gniadkowski, M., Hayden, M.K., Kumarasamy, K., Livermore, D.M., Maya, J.J., Nordmann, P., Patel, J.B., Paterson, D.L., Pitout, J., Villegas, M.V., Wang, H., Woodford, N., Quinn, J.P. (2013) Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis* 13(9): 785-796.
- Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A. (2016) *Medical Microbiology*. 2016. Eighth Edition.
- M'Zali, F.H., Chanawong, A., Kerr, K.G., Birkenhead, D., Hawkey, P.M. (2000) Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family enterobacteriaceae: comparison of the MAST DD test, the double disc and the Etest ESBL. *J Antimicrob Chemother* 45(6): 881-885.
- Naas, T., Dortet, L., Iorga, B.I. (2016) Structural and Functional Aspects of Class A Carbapenemases. *Current Drug Targets* 17(9): 1006-1028.

- Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., Carattoli, A. (2017) *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 41(3): 252-275
- Navon-Venezia, S., Leavitt, A., Schwaber, M.J., Rasheed, J.K., et al. (2009) First Report on a Hyperepidemic Clone of KPC-3-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Israel Genetically Related to a Strain Causing Outbreaks in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 53(2): 818-820.
- Nikaido, H. (2009) Multidrug Resistance in Bacteria. *Annu Rev Biochem* 78: 119-146.
- Nobari, S., Shahcheraghi, F., Rahmati, Ghezelgeh, F., Valizadeh, B. (2014) Molecular characterization of carbapenem-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated from Iranian patients: first identification of blaKPC gene in Iran. *Microb Drug Resist* 20(4): 285-293.
- Nordmann, P., Poirel, L. (2014) The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect* 20(9): 821-830.
- Nordmann, P., Gniadkowski, M., Giske, C.G., Poirel, L., Woodford, N., Miriagou, V. (2012) Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect* 18(5): 432-438.
- Nordmann, P., Poirel, L., Dortet, L. (2012) Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 18(9): 1503-1507.
- Nordmann, P., Dortet, L., Poirel, L. (2012) Rapid detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 50(9):3016-3022.
- Nordmann, P., Poirel, L., Walsh, T.R., Livermore, D.M. (2011) The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol* 19(12): 588-595.
- Ogawa, W., Onishi, M., Ni, R., Tsuchiya, T., Kuroda, T. (2012) Functional study of the novel multidrug efflux pump KexD from *Klebsiella pneumoniae*. *Gene* 498(2): 177-182.

- Olaitan, A.O., Morand, S., Rolain, J.M. (2014) Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol* 5: 643.
- Oliphant, C.M., Green, G.M. (2002) Quinolones: a comprehensive review. *Am Fam Physician* 65(3): 455-464.
- Oliver, A., Weigel, L.M., Rasheed, J.K., McGowan, J.E. Jr., Raney, P., Tenover, F.C. (2002) Mechanisms of decreased susceptibility to cefpodoxime in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 46(12): 3829-3836.
- Osei, S.J., Govinden, U., Essack, S.Y. (2015) Review of established and innovative detection methods for carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *J Appl Microbiol* 119 (5):1219-1233.
- O'Sullivan, M.E., Perez, A., Lin, R., Sajjadi, A., Ricci, A.J., Cheng, A.G. (2017). Towards the Prevention of Aminoglycoside-Related Hearing Loss. *Front Cell Neurosci* 11: 325.
- Paczosa, M.K., Mecsas, J.P. (2016) *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol Biol Rev* 80(3): 629-661.
- Padilla, E., Llobet, E., Doménech-Sánchez, A., Martínez-Martínez, L., Bengoechea, J.A., Albertí, S. (2010) *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother* 54(1): 177-183.
- Pagès, J.M., James, C.E., Winterhalter, M. (2008) The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* 6(12): 893-903.
- Palacios-Baena, Z.R., Oteo, J., Conejo, C., Larrosa, M.N., Bou, G., Fernández-Martínez, M., et al. (2016) Comprehensive clinical and epidemiological assessment of colonisation and infection due to carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Spain. *J Infection* 72(2): 152-160.

- Pallavi, S., Archana, M., Shinde, G.B. (2013) Emergence of drug resistance in bacteria: An insight into molecular mechanism. *International Journal of Scientific & Engineering Research* 4 (9).
- Papagiannitsis, C.C., Študentová, V., Izdebski, R., Oikonomou, O., Pfeifer, Y., Petinaki, E., Hrabák, J. (2015) Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Meropenem Hydrolysis Assay with NH_4HCO_3 , a Reliable Tool for Direct Detection of Carbapenemase Activity. *J Clin Microbiol* 53(5): 1731-1735.
- Papp-Wallace, K.M., Endimiani, A., Taracila, M.A., Bonomo, R.A. (2011) Carbapenems: Past, Present, and Future. *Antimicrob Agents Chemother* 55(11): 4943-4960.
- Partridge, S.R., Kwong, S.M., Firth, N., Jensen, S.O. (2018) Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev* 31(4).
- Pasteran, F., Denorme, L., Ote, I., Gomez, S., De Belder, D., Glupczynski, Y., Bogaerts, P., Ghiglione, B., Power, P., Mertens, P., Corso, A. (2016) Rapid Identification of OXA-48 and OXA-163 Subfamilies in Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacilli with a Novel Immunochromatographic Lateral Flow Assay. *J Clinical Microbiology* 54(11): 2832-2836.
- Pasteran, F., Veliz, O., Ceriana, P. et al. (2015) Evaluation of the Blue-Carba test for rapid detection of carbapenemases in gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 53(6): 1996-1998.
- Patel, G., Bonomo, R.A., (2011) Status report on carbapenemases: challenges and prospects. *Expert Rev Anti Infect Ther* 9(5): 555-70.
- Paterson, D.L., Bonomo, R.A. (2005) Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 18(4): 657-686.
- Paterson, D.L., Hujer, K.M., Hujer, A.M., Yeiser, B., Bonomo, M.D., Rice, L.B., Bonomo, R.A. (2003) Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 47(11): 3554-3560.

- Peirano, G., Ahmed-Bentley, J., Fuller, J., Rubin, J.E., Pitout, J.D. (2014) Travel-related carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Alberta, Canada: the first 3 years. *J Clin Microbiol* 52(5): 1575-1581.
- Peirano, G., Pitout, J.D. (2010) Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M beta-lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. *Int J Antimicrob Agents* 35(4): 316-321.
- Pena, I., Picazo, J.J., Rodríguez-Avial, C., Rodríguez-Avial, I. (2014) Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a tertiary hospital in Madrid, Spain: high percentage of colistin resistance among VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 isolates. *Int J Antimicrob Agents* 43(5): 460-464.
- Perez, L.R. (2015) Evaluation of polymyxin susceptibility profile among KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* using Etest and MicroScan WalkAway automated system. *APMIS* 123(11): 951-954.
- Pesesky, M.W., Hussain, T., Wallace, M., Wang, B., Andleeb, S., Burnham, C.A., Dantas, G. (2015) KPC and NDM-1 genes in related Enterobacteriaceae strains and plasmids from Pakistan and the United States. *Emerg Infect Dis* 21(6): 1034-1037.
- Philippon, A., Arlet, G., Jacoby, G.A. (2002) Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 46(1): 1-11.
- Piddock, L.J.V. (2006) Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clin Microbiol Rev* 19(2): 382-402.
- Pierce, V.M., Simner, P.J., Lonsway, D.R., Roe-Carpenter, D.E., Johnson, J.K., Brasso, W.B., Bobenchik, A.M., Lockett, Z.C., Charnot-Katsikas, A., Ferraro, M.J., Thomson, R.B.Jr., Jenkins, S.G., Limbago, B.M., Das, S. (2017) Modified Carbapenem Inactivation Method for Phenotypic Detection of Carbapenemase Production among Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 55(8): 2321-2333.

- Pitout, J.D., Nordmann, P., Poirel, L. (2015) Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrob Agents Chemother* 59(10): 5873-5884.
- Plusa, T. (2018) [New antibiotics in infection treatment]. *Pol Merkur Lekarski* 45(270): 213-219.
- Podschun, R., Ullmann, U. (1998) *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* 11(4): 589-603.
- Poirel, L., Larpin, Y., Dobias, J., Stephan, R., Decousser, J.W., Madec, J.Y., Nordmann, P. (2018) Rapid Polymyxin NP test for the detection of polymyxin resistance mediated by the *mcr-1/mcr-2* genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 90(1): 7-10.
- Poirel, L., Nordmann, P. (2015) Rapidec Carba NP Test for Rapid Detection of Carbapenemase Producers. *J Clin Microbiol* 53(9): 3003-3008.
- Poirel, L., Jayol, A., Bontron, S., Villegas, M.V., Ozdamar, M., Türkoglu, S., Nordmann, P. (2015) The *mgrB* gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrobial Chemother* 70(1): 75-80.
- Poirel, L., Potron, A., Nordmann, P. (2012) OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother* 67(7): 1597-606.
- Poirel, L., Walsh, T.R., Cuvillier, V., Nordmann, P. (2011) Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 70(1): 119-123.
- Poirel, L., Dortet, L., Bernabeu, S., Nordmann, P. (2011) Genetic features of bla_{NDM-1}-positive Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*. 55(11): 5403-5407.
- Poirel, L., Héritier, C., Tolün, V., Nordmann, P. (2004) Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 48(1): 15-22.

- Poirel, L., Le Thomas, I., Naas, T., Karim, A., Nordmann, P. (2000) Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 44(3): 622-632.
- Poole, K. (2007) Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Annals of medicine* 39(3): 162-176.
- Porres-Osante, N., de Champs, C., Dupont, H., Torres, C., Mammeri, H. (2014) Use of avibactam to detect Ambler class A carbapenemases and OXA-48 β -lactamases in Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis* 79(3): 399-400.
- Potron, A., Poirel, L., Rondinaud, E., Nordmann, P. (2013) Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae over a 11-year period, 2001 to 2011. *Euro Surveill* 18(31).
- Potron, A., Nordmann, P., Lafeuille, E., Al Maskari, Z., Al Rashdi, F., Poirel, L. (2011) Characterization of OXA-181, a carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 55(10): 4896-4899.
- Poulou, A., Grivakou, E., Vrioni, G., Koumaki, V., Pittaras, T., Pournaras, S., Tsakris, A. (2014) Modified CLSI extended-spectrum β -lactamase (ESBL) confirmatory test for phenotypic detection of ESBLs among Enterobacteriaceae producing various β -lactamases. *J Clin Microbiol* 52(5): 1483-1489.
- Pournaras, S., Protonotariou, E., Voulgari, E., Kristo, I., Dimitroulia, E., Vitti, D., Tsalidou, M., Maniatis, A.N., Tsakris, A., Sofianou, D. (2009) Clonal spread of KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greece. *J Antimicrob Chemother* 64(2): 348-352.
- Ramirez, M.S., Tolmasky, M.E. (2010) Aminoglycoside Modifying Enzymes. *Drug Resist Updat* 13(6): 151-171.
- Rasmussen, B.A., Bush, K. (1997) Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 41(2): 223-232.

- Renvoisé, A., Decré, D., Amarsy-Guerle, R., Huang, T.D., Jost, C., et al. (2013) Evaluation of the β Lacta Test, a Rapid Test Detecting Resistance to Third-Generation Cephalosporins in Clinical Strains of Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 51(12): 4012-4017.
- Robert, J., Pantel, A., Mérens, A., Lavigne, J.P., Nicolas-Chanoine, M.H. (2014) Incidence rates of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae clinical isolates in France: a prospective nationwide study in 2011-12. *J Antimicrob Chemother* 69(10): 2706-2712.
- Roberts, M.C. (2003) Tetracycline Therapy: Update. *Clin Infect Dis* 36(4): 462-467.
- Rock, C., Kerri A.T., Masnick, M., Johnson, K., Harris, A.D., Morgan, D.J. (2014) Frequency of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) and non-KPC-producing *Klebsiella* contamination of Healthcare workers and the environment. *Infect Control Hosp Epidemiol* 35(4): 426-429.
- Rogers, B.A., Aminzadeh, Z., Hayashi, Y., Paterson, D. (2011) Country-to-country transfer of patients and the risk of multi-resistant bacterial infection. *Clin Infect Dis* 53(1): 49-56.
- Rossi, F., Girardello, R., Cury, A.P., Di Gioi, T.S., Almeida, J.N.Jr., Duarte, A.J. (2017) Emergence of colistin resistance in the largest university hospital complex of São Paulo, Brazil, over five years. *The Brazilian J Inf Dis* 21(1): 98-101.
- Saha, R., Farrance, C.E., Verghese, B., Hong, S., Donofrio, R.S. (2013) *Klebsiella michiganensis* sp. nov., A New Bacterium Isolated from a Tooth Brush Holder. *Current Microbiology* 66(1): 72-78.
- Sahare, P., Moon, A., Shinde, G.B. (2013) Emergence of drug resistance in bacteria: An insight into molecular mechanism. *International Journal of Scientific & Engineering Research* 4(9).
- Saito, R., Takahashi, R., Sawabe, E., Koyan, o S., Takahashi, Y., Shima, M., Ushizawa, H., Fujie, T., Tosaka, N., Kato, Y., et al. (2014) First report of KPC-2 Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 58(5): 2961-2963.

Samaha-Kfoury, J.N., Araj, G.F. (2003) Recent developments in β lactamases and extended spectrum β lactamases. *BMJ* 327(7425): 1209–1213.

Sánchez Díaz, P. (2003) MDR efflux pumps and antimicrobial resistance. *Rev Esp Quimioter* 16(2): 172-187.

Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S.M., Kamal, M.A (2015) Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J Biol Sci* 22(1): 90-101.

Shibl, A., Al-Agamy, M., Memish, Z., Senok, A., Khader, S.A., Assiri, A. (2013) The emergence of OXA-48- and NDM-1-positive *Klebsiella pneumoniae* in Riyadh, Saudi Arabia. *Int J Infect Dis* 17(12): 1130-1133.

Shin, S.Y., Bae, I.K., Kim, J., Jeong, S.H., Yong, D., Kim, J.M., Lee, K. (2012) Resistance to carbapenems in sequence type 11 *Klebsiella pneumoniae* is related to DHA-1 and loss of OmpK35 and/or OmpK36. *J Med Microbiol* 61(2): 239-245.

Shon, A.S., Bajwa Rajinder, P.S., Russo, T.A. (2013) Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* A new and dangerous breed. *Journal Virulence* 4(2): 107-118.

Singh, L., Cariappa, M.P., Kaur, M. (2016) *Klebsiella oxytoca*: An emerging pathogen? *Medical Journal Armed Forces India* 72(1): 59–61.

Smillie, C., Garcillán-Barcia, M.P., Francia, M.V., Rocha, E.P., de la Cruz, F. (2010) Mobility of Plasmids. *Mic and Mol Biol Rev* 74(3): 434-452.

Soares, G.M., Figueiredo, L.C., Faveri, M., Cortelli, S.C., Duarte, P.M., Feres, M. (2012) Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. *J Appl Oral Sci* 20(3): 295-304.

Sonnevend, Á., Ghazawi, A.A., Hashmey, R., Jamal, W., Rotimi, V.O., Shibl, A.M., Al-Jardani, A., Al-Abri, S.S., Tariq, W.U., Weber, S., Pál, T. (2015) Characterization of

Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae with High Rate of Autochthonous Transmission in the Arabian Peninsula. PLoS One 10(6).

Souha, S.K., Zeina, A.K. (2011) Current Concepts in Antimicrobial Therapy Against Resistant Gram-Negative Organisms: Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae, Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae, and Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Mayo Clin Proc 86(3): 250-259.

Souli, M., Galani, I., Antoniadou, A., Papadomichelakis, E., Poulakou, G., Panagea, T., Vourli, S., Zerva, L., Armaganidis, A., Kanellakopoulou, K., Giamarellou, H. (2010) An outbreak of infection due to beta-Lactamase *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase 2-producing *K.pneumoniae* in a Greek University Hospital: molecular characterization, epidemiology, and outcomes. Clin Infect Dis 50(3): 364-373.

Srinivas, P., Rivard, K. (2017) Polymyxin Resistance in Gram-negative Pathogens. Current Infectious Disease Reports 19(11): 38.

Stolle, I., Prenger-Berninghoff, E., Stamm, I., Scheufen, S., Hassdenteufel, E., Guenther, S., Bethe, A., Pfeifer, Y., Ewers, C. (2013) Emergence of OXA-48 carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in dogs. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 68(12): 2802-2808.

Studentova, V., Dobiasova, H., Hedlova, D., Dolejska, M., Papagiannitsis, C.C., Hrabak, J. (2015) Complete nucleotide sequences of two NDM-1-encoding plasmids from the same sequence type 11 *Klebsiella pneumoniae* strain. Antimicrob Agents Chemother 59(2): 1325-1328.

Stürenburg, E., Sobottka, I., Noor, D., Laufs, R., Mack, D. (2004) Evaluation of a new cefepime-clavulanate ESBL Etest to detect extended-spectrum beta-lactamases in an *Enterobacteriaceae* strain collection. J Antimicrob Chemother 54(1): 134-138.

Suárez, C., Gudiol, F. (2009) Beta-lactam Antibiotics. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 27(2): 116-129.

- Suh, B, Bae, I.K., Kim, J., Jeong, S.H., Yong, D., Lee, K. (2010) Outbreak of Meropenem-Resistant *Serratia marcescens* Comediated by Chromosomal AmpC β -Lactamase Overproduction and Outer Membrane Protein Loss. *Antimicrob Agents Chemother* 54(12): 5057-5061.
- Sun, J., Deng, Z., Yan, A. (2014) Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem Biophys Res Commun* 453(2): 254-267.
- Sutherland, C.A., Nicolau, D.P. (2015) Susceptibility Profile of Ceftolozane/Tazobactam and Other Parenteral Antimicrobials Against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa* From US Hospitals. *Clin Ther* 37(7): 1564-1571.
- Tan, T.Y., Ng, S.Y., Teo, L., Koh, Y., Teok, C.H. (2008) Detection of plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis*. *J Clin Pathol* 61(5): 642-644.
- Tóth, A., Damjanova, I., Puskás, E., Jánvári, L., Farkas, M., Dobák, A., Böröcz, K., Pászti, J. (2010) Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone in Hungary. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29(7): 765-769.
- Tsakris, A., Poulou, A., Pournaras, S., Voulgari, E., Vrioni, G., Themeli-Digalaki, K., Petropoulou, D., Sofianou, D. (2010) A simple phenotypic method for the differentiation of metallo-beta-lactamases and class A KPC carbapenemases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 65(8): 1664-1671.
- Tsakris, A., Kristo, I., Poulou, A., Themeli-Digalaki, K., Ikonomidis, A., Petropoulou, D., Pournaras, S., Sofianou, D. (2009) Evaluation of Boronic Acid Disk Tests for Differentiating KPC-Possessing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in the Clinical Laboratory. *J Clin Microbiol* 47(2): 362-367.
- Tsakris, A., Kristo, I., Poulou, A., Markou, F., Ikonomidis, A., Pournaras, S. (2008) First occurrence of KPC-2-possessing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek hospital and

recommendation for detection with boronic acid disc tests. *J Antimicrob Chemother* 62(6): 1257-1260.

Tzouvelekis, L.S., Markogiannakis, A., Psychogiou, M., Tassios, P.T., Daikos, G.L. (2012) Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and Other *Enterobacteriaceae*: an Evolving Crisis of Global Dimensions. *Clin Microbiol Rev* 25(4): 682-707.

Tzouvelekis, L.S., Bonomo, R.A. (1999) SHV-type beta-lactamases. *Curr Pharm Des* 5(11): 847-864.

van der Bij Akke, K., Pitout, J.D.D. (2012) The role of international travel in the worldwide spread of multiresistant *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67(9): 2090-2100.

van der Zwaluw, K., de Haan, A., Pluister, G.N., Bootsma, H.J., de Neeling, A.J., Schouls, L.M. (2015) The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PLoS One* 10(3).

van Dijk, K., Voets, G.M., Scharringa, J., Voskuil, S., Fluit, A.C., Rottier, W.C., Leverstein-Van Hall, M.A., Cohen Stuart, J.W. (2014) A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in *Enterobacteriaceae* using phenyl boronic acid, dipicolinic acid and temocillin. *Clin Microbiol Infect* 20(4): 345-349.

Vatopoulos, A. (2008) High rates of metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece--a review of the current evidence. *Euro Surveill* 13(4).

Velkov, T., Roberts, K.D., Nation, R.L., Thompson PE. and Li J. (2013) Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics. *Future Microbiol* 8(6): 711-724.

Vera-Leiva, A., Barría-Loaiza, C., Carrasco-Anabalón, S., et al. (2017) [KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, main carbapenemase in *Enterobacteriaceae*]. *Rev Chilena Infectol* 34(5): 476-484.

- Villa, L., Poirel, L., Nordmann, P., Carta, C., Carattoli, A. (2012) Complete sequencing of an IncH plasmid carrying the blaNDM-1, blaCTX-M-15 and qnrB1 genes. *J Antimicrob Chemother* 67(7): 1645-1650.
- Voulgari, E., Gartzonika, C., Vrioni, G., Politi, L., Priavali, E., Levidiotou-Stefanou, S., Tsakris, A. (2014) The Balkan region: NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 clonal strain causing outbreaks in Greece. *J Antimicrob Chemother* 69(8): 2091-2097.
- Walkty, A., DeCorby, M., Nichol, K., Karlowsky, J.A., et al., (2009) In vitro activity of colistin (polymyxin E) against 3,480 isolates of gram-negative bacilli obtained from patients in Canadian hospitals in the CANWARD study, 2007-2008. *Antimicrob Agents Chemother* 53(11): 4924-4926.
- Walsh, C. (2003a) Where will new antibiotics come from? *Nature Reviews Microbiology* 1: 65-70.
- Walsh, C. (2003b) "Antibiotics: actions, origins, resistance". Washington: American Society for Microbiology. ISBN:1-55581-254-6.
- Wang, X., Xu, X., Li, Z., Chen, H., Wang, Q., Yang, P., Zhao, C., Ni, M., Wang, H. (2014) An outbreak of a nosocomial NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST147 at a teaching hospital in mainland China. *Microb Drug Resist* 20(2): 144-149.
- Wang, X.D., Cai, J.C., Zhou, H.W., Zhang, R., Chen, G.X. (2009) Reduced susceptibility to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates associated with plasmid-mediated beta-lactamase production and OmpK36 porin deficiency. *J Med Microbiol* 58(9): 1196-1202.
- Weng, Xing-bei., Mi, Zu-huangi., Wang, Chun-xin., Zhu, Jian-ming. (2016) Draft Genome Sequence of a *Klebsiella pneumoniae* Strain (New Sequence Type 2357) Carrying Tn3926. *Genome Announcements* 4(5).
- Weterings, V., Zhou, K., Rossen, J.W., et al. (2015) An outbreak of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the Netherlands

(July to December 2013), with inter-institutional spread. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 34(8): 1647-1655.

Wiegand, I., Geiss, H.K., Mack, D., Stürenburg, E., Seifert, H. (2007) Detection of extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* by use of semiautomated microbiology systems and manual detection procedures. *Clin Microbiol* 45(4): 1167-1174.

Williamson, D.A., Heffernan, H., Sidjabat, H., Roberts, S.A., Paterson, D.L., Smith, M., Freeman, J.T. (2011) Intercontinental transfer of OXA-181-producing *Klebsiella pneumoniae* into New Zealand. *J Antimicrob Chem* 66(12): 2888-2890.

Woodford, N., Eastaway, A.T., Ford, M., Leanord, A., Keane, C., Quayle, R.M., Steer, J.A., Zhang, J., Livermore, D.M. (2010) Comparison of BD Phoenix, Vitek 2, and MicroScan automated systems for detection and inference of mechanisms responsible for carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol* 48(8): 2999-3002.

Wu, M.C., Lin, T.L., Hsieh, P.F., Yang, H.C., Wang, J.T. (2011) Isolation of genes involved in biofilm formation of a *Klebsiella pneumoniae* strain causing pyogenic liver abscess. *PLoS One* 6(8).

Wyres, K.L., Holt, K.E. (2018) *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 45: 131-139.

Yagi, T., Wachino, J., Kurokawa, H., Suzuki, S., Yamane, K., Doi, Y., Shibata, N., Kato, H., Shibayama, K., Arakawa, Y. (2005) Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 43(6): 2551-2558 .

Yigit, H., Queenan, A.M., Anderson, G.J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J.W., Steward, CD., Alberti, S., Bush, K., Tenover, F.C. (2001) Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 45(4): 1151-1161.

Yıldız, S.S., Kaşkatepe, B., Avcıküçük, H., Öztürk, Ş. (2017) Performance of CarbaNP and CIM tests in OXA-48 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 64(1): 9-16.

Yong, D., Toleman, M.A., Giske, C.G., Cho, H.S., Sundman, K., Lee, K., Walsh, T.R. (2009) Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 53(12): 5046-5054.

Yu, W.L., Lee, M.F., Tang, H.J., Chang, M.C., Walther-Rasmussen, J., Chuang, Y.C. (2015) Emergence of KPC new variants (KPC-16 and KPC-17) and ongoing outbreak in southern Taiwan. *Clin Microbiol Infect* 21(4): 347.

Zagorianou, A., Sianou, E., Iosifidis, E., Dimou, V., Protonotariou, E., Miyakis, S., Roilides, E., Sofianou, D. (2012) Microbiological and molecular characteristics of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* endemic in a tertiary Greek hospital during 2004-2010. *Euro Surveill* 16(17): 7.

Zhanel, G.G., Wiebe, R., Dilay, L., Thomson, K., Rubinstein, E., Hoban, D.J., Noreddin, A.M., Karlowsky, J.A. (2007) Comparative review of the carbapenems. *Drugs* 67(7): 1027-1052.

Zhang, X., Li, X., Wang, M., Yue, H., Li, P., Liu, Y., Cao, W., Yao, D., Liu, Y., Zhou, X., Zheng, R., Bo, T. (2015) Outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* causing neonatal infection in a teaching hospital in mainland China. *Antimicrob Agents Chemother* 59(7): 4349-4351.

Zowawi, H.M., Sartor, A.L., Balkhy, H.H., Walsh, T.R., Al Johani, S.M., AlJindan, R.Y., Alfaresi, M., Ibrahim, E Al-Jardani A., Al-Abri, S., Al Salman, J., Dashti, A.A., Kutbi, A.H., Schlebusch, S., Sidjabat, H.E., Paterson, D.L. (2014) Molecular characterization of carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in the countries of the Gulf cooperation council: dominance of OXA-48 and NDM producers. *Antimicrob Agents Chemother* 58(6): 3085-3090.

Ελληνική βιβλιογραφία

Αρσένη, Α. Κλινική μικροβιολογία και εργαστηριακή διάγνωση λοιμώξεων. Τόμος 1 σελ.278-297.

Ιστοσελίδες

1. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed, CLSI (2016) supplement M100S, Wayne, PA, USA,. Ανακτήθηκε 5 Νοεμβρίου 2018, από: <http://ljzx.cqrmhospital.com/upfiles/201601/20160112155335884.pdf>
2. Downofilebp.ga. Ampicillin resistance mechanism in bacteria. Ανακτήθηκε 10 Οκτωβρίου 2018, από: <http://downofilebp.ga/peja/ampicillin-resistance-mechanism-in-bacteria-2257.php>
3. Encyclopædia Britannica. Janice Carr/Centers for Disease Control and Prevention (Image Number: 6834). Ανακτήθηκε 10 Σεπτεμβρίου 2018, από: <https://www.britannica.com/science/Klebsiella/media/319927/116889>
4. European Centre for Disease Control and Prevention. Most frequently isolated microorganisms in HAIs (2011-2012). Ανακτήθηκε 15 Νοεμβρίου 2018, από: <https://ecdc.europa.eu/en/healthcare-associated-infections-acute-care-hospitals/database/microorganisms-and-antimicrobial-resistance/most-frequent>
5. European Centre for Disease Control and Prevention. Trend of antimicrobial consumption by country (2017). Ανακτήθηκε 15 Νοεμβρίου 2018, από: <https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-consumption/database/trend-country>
6. European Centre for Disease Control and Prevention. Rates by country (2017). Ανακτήθηκε 15 Νοεμβρίου 2018, από: <https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-consumption/database/rates-country>

7. European Centre for Disease Control and Prevention. Surveillance Atlas of Infectious Diseases. Ανακτήθηκε 15 Νοεμβρίου 2018, από:
<https://ecdc.europa.eu/en/surveillance-atlas-infectious-diseases>
8. European Centre for Disease Control and Prevention. 33000 people die every year due to infections with antibiotic-resistant bacteria. 6 Nov 2018. Ανακτήθηκε 8 Νοεμβρίου 2018, από:
<https://ecdc.europa.eu/en/news-events/33000-people-die-every-year-due-infections-antibiotic-resistant-bacteria>
9. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. EUCAST (2017), s.l.: version 2.0. Ανακτήθηκε 5 Νοεμβρίου 2018, από:
http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf
10. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST reading guide for broth microdilution. EUCAST (2019), version 1.0. Ανακτήθηκε 5 Μαρτίου 2019, από:
http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2019_manuals/Reading_guide_BMD_v_1.0_2019.pdf
11. World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. WHO (2017). Ανακτήθηκε 18 Οκτωβρίου 2018, από:
<https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>.
12. World Health Organization. Antimicrobial resistance. WHO (2018). Ανακτήθηκε 22 Οκτωβρίου 2018, από:
<https://www.who.int/antimicrobial-resistance/en/>
13. Rollins DM and Joseph RW. General Structure of Penicillins. University of Maryland. 2000. Ανακτήθηκε 15 Σεπτεμβρίου 2018, από:
<http://www.life.umd.edu/classroom/bsci424/Images/PathogenImages/Penicillin.gif>

14. Wikimedia Commons. File:Streptomycin2.svg. 21 October 2008. Ανακτήθηκε 15 Νοεμβρίου 2018, από:
<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Streptomycin2.svg>
15. Βαλαβανίδης Θ. και Ευσταθίου Κ.. Ιούλιος-Αύγουστος 2012. Η χημική ένωση του μύκητα. *Πενικιλίνη G (Βενζυλοπενικιλινικό οξύ)*. Ιούλιος-Αύγουστος 2012. Ανακτήθηκε 15 Σεπτεμβρίου 2018, από:
http://195.134.76.37/chemicals/chem_penicillin.htm