



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΟ ΤΜΗΜΑ

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

**Φαινοτυπικές και γονοτυπικές μέθοδοι ελέγχου αντοχής των
Εντεροβακτηριακών στα β-λακταμικά αντιβιοτικά**



ΤΑΤΣΙΝΑ ΕΙΡΗΝΗ

Επιβλέπων Καθηγητής: Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα

Ιωάννινα 2023



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΟ ΤΜΗΜΑ

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

**Φαινοτυπικές και γονοτυπικές μέθοδοι ελέγχου αντοχής των
Εντεροβακτηριακών στα β-λακταμικά αντιβιοτικά**



ΤΑΤΣΙΝΑ ΕΙΡΗΝΗ

Επιβλέπων Καθηγητής: Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα

Ιωάννινα 2023

«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: Τατσίνα Ειρήνη

«Φαινοτυπικές και Γονοτυπικές μέθοδοι ελέγχου αντοχής των Εντεροβακτηριακών στα β-λακταμικά αντιβιοτικά»

Επιβλέπων Καθηγητής:

Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

Ημερομηνία παρουσίασης: 15-6-2023

Εξεταστική Επιτροπή:

Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα, Αναπλ. Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Βρυώνη Γεωργία, Καθηγήτρια Ιατρικής Μικροβιολογίας, ΕΚΠΑ

Παπάς Περικλής, Καθηγητής Φαρμακολογίας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών «Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες» του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η εργασία πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψη της κ. Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνας, Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, με συνεξεταστές την κ. Βρυώνη Γεωργία, Καθηγήτρια Ιατρικής Μικροβιολογίας του ΕΚΠΑ και τον κ. Παππά Περικλή, Καθηγητή Φαρμακολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Αντικείμενο της εργασίας είναι η ανασκόπηση της βιβλιογραφίας σχετικά με τις φαινοτυπικές και γονοτυπικές μεθόδους ανίχνευσης της αντοχής των Εντεροβακτηριακών έναντι των β-λακταμικών αντιμικροβιακών.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλλαν στην εκπόνησή αυτής της εργασίας. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια, κ. Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε εξ' αρχής, αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα, την επιστημονική της καθοδήγηση, τη συμπαράστασή της και τη συνεχή της υποστήριξη από την αρχή μέχρι το τέλος.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά την κ. Πάτρα Βεζυράκη, Καθηγήτρια Φυσιολογίας του τμήματος Ιατρικής Ιωαννίνων και Διευθύντρια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες», για την στήριξη και την κατανόησή της σε όλη την πορεία μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα, καθώς και όλους τους καθηγητές του μεταπτυχιακού προγράμματος.

Θερμές ευχαριστίες απευθύνω στα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, την καθηγήτρια κ. Βρυώνη Γεωργία, και τον καθηγητή κ. Παππά Περικλή, για την πολύτιμη συμβολή τους στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου και το σύντροφό μου για όλη τη στήριξη, τη συμπαράσταση και την κατανόησή τους, καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Πίνακας περιεχομένων

Πρόλογος	7
Πίνακας περιεχομένων.....	8
Πίνακας εικόνων	11
Πίνακες	13
Σχήματα	13
1. Εισαγωγή	14
2. Εντεροβακτηριακά.....	14
2.1 Ταξινόμηση.....	14
2.2 Γενικά Χαρακτηριστικά-Βιοχημικές Ιδιότητες-Δομή	16
2.3 Παθογόνος δράση Εντεροβακτηριακών	20
2.4 Επιδημιολογικά δεδομένα: Εντεροβακτηριακά και αντιμικροβιακά.....	20
3. Αντιμικροβιακά.....	29
3.1 β-λακταμικά αντιμικροβιακά	30
3.2 Κατηγορίες β-λακταμικών αντιμικροβιακών	31
3.2.1 Πενικιλίνες.....	31
3.2.2 Κεφαλοσπορίνες	32
3.2.3 Καρβαπενέμες.....	33
3.2.4 Άλλες κατηγορίες β-λακταμικών αντιμικροβιακών	35
3.3 Μηχανισμός δράσης β-λακταμικών αντιμικροβιακών	35
3.4 Αντιμικροβιακό φάσμα β-λακταμικών αντιμικροβιακών.....	37
3.4.1 Πενικιλίνες.....	37
3.4.2 Κεφαλοσπορίνες	38
3.4.3 Καρβαπενέμες.....	39
3.5 Μηχανισμοί ανοχής Εντεροβακτηριακών στα β-λακταμικά αντιμικροβιακά	40
3.5.1 Μειωμένη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης	42
3.5.2 Αντλίες ενεργητικής εκροής	44

3.5.3 Τροποποιημένος στόχος δράσης.....	44
3.5.4 Αδρανοποίηση β-λακταμικών αντιμικροβιακών μέσω παραγωγής ενζύμων.....	45
3.5.4.1 β-λακταμάσες: Ταξινόμηση.....	46
3.5.4.1.1 Μοριακή Ταξινόμηση κατά Ambler.....	48
3.5.4.1.1.1 Τάξη Α.....	48
3.5.4.1.1.2 Τάξη Β.....	52
3.5.4.1.1.3 Τάξη C.....	53
3.5.4.1.1.4 Τάξη D.....	54
3.5.5 Μοριακή βάση αντοχής.....	55
4. Μέθοδοι ελέγχου αντοχής.....	60
4.1 Φαινοτυπικές μέθοδοι.....	61
4.1.1 Ανίχνευση παραγωγής β-λακταμασών.....	65
4.1.1.1 Εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες.....	65
4.1.1.2 Κεφαλοσπορινάσες.....	76
4.1.1.3 Καρβαπενεμάσες.....	81
4.2 Γονοτυπικές μέθοδοι.....	98
4.2.1 Γονοτυπική ανίχνευση ESBL.....	101
4.2.1.1 Ανίχνευση ESBL γονιδίων με εφαρμογή μεθόδων PCR.....	101
4.2.1.2 Ανίχνευση ESBL γονιδίων με αλληλούχιση πλήρους γονιδιώματος.....	103
4.2.1.3 Εφαρμογή της μεθοδολογίας Microarrays για την ανίχνευση γονιδίων ESBL.....	104
4.2.2 Γονοτυπική ανίχνευση AmpC.....	105
4.2.3 Γονοτυπική ανίχνευση καρβαπενεμασών.....	108
4.2.3.1 Ανίχνευση γονιδίων καρβαπενεμάσης με εφαρμογή μεθόδων PCR.....	108
4.2.3.2 Ανίχνευση γονιδίων καρβαπενεμάσης με τεχνικές ισοθερμικών αντιδράσεων.....	113
4.2.3.3 Ανίχνευση γονιδίων καρβαπενεμάσης με αλληλούχιση πλήρους γονιδιώματος (WGS).....	114

4.2.3.4 Ανίχνευση γονιδίων καρβαπενεμάσης με εφαρμογή της μεθοδολογίας Microarrays	115
4.3 Μελλοντική πρόβλεψη ανάπτυξης μεθόδων ελέγχου αντοχής.....	119
5. Περίληψη	121
6. Abstract.....	122
7. Βιβλιογραφία	123

Πίνακας εικόνων

Εικόνα 1. Αρχιτεκτονική του εξωτερικού περιβλήματος των gram αρνητικών βακτηρίων	19
Εικόνα 2. Μικροοργανισμοί που έχουν απομονωθεί στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, 2011-2012.	21
Εικόνα 3. Γράφημα κατανάλωσης αντιμικροβιακών στην Ελλάδα, 1997-2020.	22
Εικόνα 4. Γράφημα κατανάλωσης καρβαπενεμών στην Ελλάδα, 1997-2020.	23
Εικόνα 5. Γράφημα κατανάλωσης κεφαλοσπορινών 3ης γενεάς στην Ελλάδα, 1997-2020.....	23
Εικόνα 6. Κατανάλωση αντιμικροβιακών στην Ευρώπη κατά το έτος 2020	24
Εικόνα 7. Γράφημα συχνότητας εμφάνισης αντοχής της E. coli στις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενεάς 2010-2020.....	26
Εικόνα 8. Χάρτης συχνότητας εμφάνισης αντοχής της E. coli σε κεφαλοσπορίνες 3ης γενεάς, 2020.....	27
Εικόνα 9. Γράφημα συχνότητας αντοχής στις καρβαπενέμες, 2010-2020.....	28
Εικόνα 10. Χάρτης συχνότητας εμφάνισης αντοχής στις καρβαπενέμες, 2020	28
Εικόνα 11. Alexander Fleming	29
Εικόνα 12. Βασικές δομές και παραδείγματα β-λακταμικών αντιμικροβιακών.	30
Εικόνα 13. Δομή του μορίου της κεφαλοσπορίνης	33
Εικόνα 14. Ο βασικός σκελετός της καρβαπενέμης.....	34
Εικόνα 15. Η χημική δομή της θειαναμυκίνης	34
Εικόνα 16. Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης της πενικιλίνης.	37
Εικόνα 17. Μηχανισμοί αντοχής Εντεροβακτηριακών	42
Εικόνα 18. Παραδείγματα διαφορετικών μηχανισμών αντοχής που συσχετίζονται με τις πορίνες.....	43
Εικόνα 19. Υδρόλυση του αμιδικού δεσμού του β-λακταμικού δακτυλίου.....	46
Εικόνα 20. Μοριακά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των μεγάλων ομάδων β-λακταμασών.....	47
Εικόνα 21. Μεταφορά γενετικού υλικού μεταξύ μικροοργανισμών.	57
Εικόνα 22. Μεσολαβούμενη από ιντεγκρόνια πρόσληψη γονιδίων και πρότυπο ανταλλαγής γονιδιακών κασετών.	59
Εικόνα 23. Μέθοδοι ελέγχου ευαισθησίας στα αντιμικροβιακά.	60
Εικόνα 24. Αλγόριθμος ανίχνευσης ESBL στα Εντεροβακτηριακά.	67

Εικόνα 25. DDS.....	67
Εικόνα 26. Διάφορες δοκιμασίες DDST.....	68
Εικόνα 27. Αποτελέσματα του NDP ESBL τεστ.....	73
Εικόνα 28. Ανίχνευση ESBL σε στελέχη που υπερπαράγουν σταθερά μια κεφαλοσπορινάση με δοκιμασία DDST σε άγαρ με κλοξακιλλίνη.....	76
Εικόνα 29. Επιβεβαιωτικές δοκιμασίες παραγωγής AmpC.....	80
Εικόνα 30. Αποτελέσματα του επιβεβαιωτικού φαινοτυπικού τεστ και η προτεινόμενη τροποποίηση με δίσκους που περιέχουν EDTA και BA	90
Εικόνα 31. Παράδειγμα δοκιμασίας Carba NP.....	93
Εικόνα 32. Σχηματική απεικόνιση της CIM.....	95
Εικόνα 33. Δοκιμασίες πλευρικής ροής.....	97
Εικόνα 34. PCR πραγματικού χρόνου και απεικόνιση των προϊόντων μετά ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης.....	111
Εικόνα 35. Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης	112
Εικόνα 36. Γραφική παράσταση προϊόντων ενίσχυσης με PCR.	113
Εικόνα 37. Χαρακτηριστικές εικόνες μικροσυστοιχιών DNA	118

Πίνακες

Πίνακας 1. Διάγραμμα κατανομής εντός της τάξης Enterobacterales.....	15
Πίνακας 2. Ομάδες και παραδείγματα β-λακταμικών αντιμικροβιακών παραγόντων	32
Πίνακας 3α. Δοκιμασίες επιβεβαίωσης παραγωγής ESBL για Εντεροβακτηριακά θετικά στη δοκιμασία screening (Ομάδα 1 Εντεροβακτηριακών).....	69
Πίνακας 3β. Δοκιμασίες επιβεβαίωσης παραγωγής ESBL για Εντεροβακτηριακά θετικά στη δοκιμασία screening (Ομάδα 2 Εντεροβακτηριακών).....	70
Πίνακας 4. Αιτίες ψευδώς αρνητικών και ψευδώς θετικών φαινοτυπικών τεστ επιβεβαίωσης παραγωγής ESBL.....	72
Πίνακας 5. Κλινικά breakpoints και τιμές cut-off για στελέχη Εντεροβακτηριακών που παράγουν καρβαπενεμάσες.....	83
Πίνακας 6. Ερμηνεία φαινοτυπικών δοκιμασιών με μεθόδους διάχυσης με δίσκους.	85
Πίνακας 7. Αλγόριθμος διαχωρισμού παραγωγής καρβαπενεμασών.	89
Πίνακας 8. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των διαγνωστικών μεθόδων μικροβιακής αντοχής	120

Σχήματα

Σχήμα 1. Εγγενείς και επίκτητες β-λακταμάσες στα Εντεροβακτηριακά.	48
-------------------------------------------------------------------------	----

1. Εισαγωγή

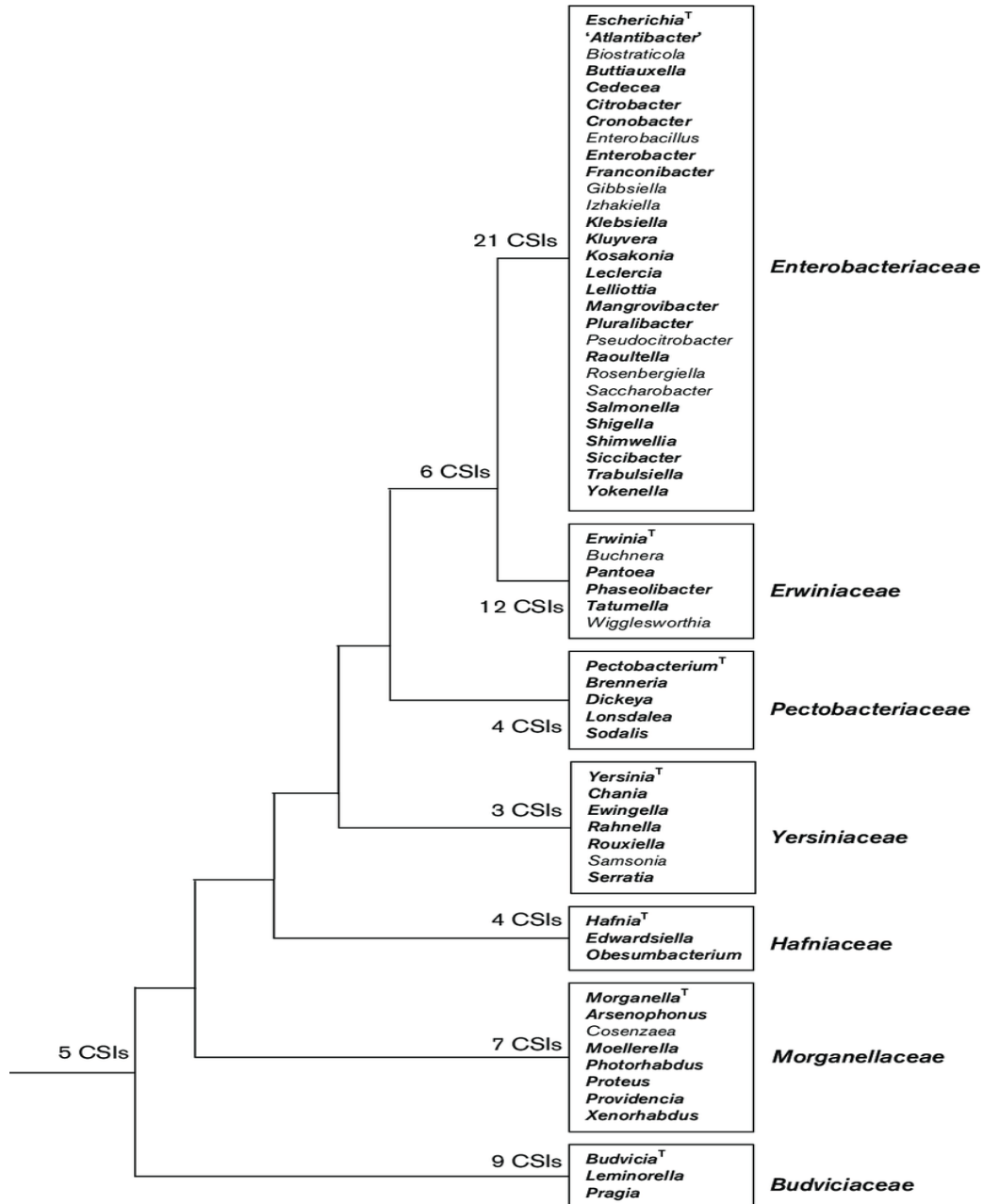
Τα Εντεροβακτηριακά είναι gram αρνητικά βακτήρια που πολύ συχνά απομονώνονται από πολλαπλά και ποικίλα κλινικά δείγματα. Ανήκουν στους προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς, είναι ευρέως διαδεδομένα στη φύση και ζουν ελεύθερα στο έδαφος και το νερό. Αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου των ανθρώπων και των ζώων. Μερικά μέλη τους είναι παθογόνα ή δυνητικώς παθογόνα για τον άνθρωπο και τα ζώα και μερικά είναι σαπρόφυτα ή παθογόνα για τα φυτά. Το κύτταρό τους διαθέτει εξωτερικό περίβλημα, κυτταρόπλασμα και το νουκλεοειδές. Στο κυτταρόπλασμα συχνά βρίσκονται ένα ή περισσότερα κυκλικά μόρια γενετικού υλικού, τα πλασμίδια, που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην απόκτηση και μεταβίβαση αντοχής στα αντιμικροβιακά (Procop, et al, 2017).

2. Εντεροβακτηριακά

2.1 Ταξινόμηση

Τα Εντεροβακτηριακά διακρίνονται σε 7 φυλές (*Escherichiae*, *Edwardsiellae*, *Salmonellae*, *Citrobactereae*, *Klebsiellae*, *Proteaeae*, *Yersinieae*) με παρόμοιες βιοχημικές ιδιότητες και κλινική σημασία. Αποτελούνται από 37 γένη και 148 είδη, οροομάδες και οροτύπους, χωρίς όνομα, αλλά και από νεότερα γένη και είδη που αντιπροσωπεύουν μόλις 1% των Εντεροβακτηριακών που απομονώνονται σε κλινικά δείγματα (Procop, et al, 2017). Η διάκρισή τους πραγματοποιήθηκε αρχικά σύμφωνα με τις βιοχημικές τους ιδιότητες και τις ομοιότητες στη γονιδιακή αλληλουχία του 16S rRNA (Alnajjar and Gupta, 2017). Λόγω αλληλοεπικάλυψης στα χαρακτηριστικά κάποιων μελών πραγματοποιήθηκαν νέες ταξινομικές προσεγγίσεις (Alnajjar and Gupta, 2017). Σύμφωνα με μοναδικές συντηρημένες παρεμβολές/διαγραφές προτείνεται ένας νέος διαχωρισμός των 179 αντιπροσωπευτικών μελών της τάξης των Εντεροβακτηριακών (Enterobacterales) σε 7 οικογένειες όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 (Adeolu, et al, 2016). Ιδιαίτερη κλινική σημασία παρουσιάζουν γένη και είδη που ανήκουν στην οικογένεια Εντεροβακτηριοειδή (Enterobacteriaceae), όπου

στελέχη *Escherichia coli* και *Klebsiella spp* απομονώνονται συχνότερα από ποικίλα δείγματα. Σε συνδυασμό με στελέχη *Proteus mirabilis*, συνιστούν το 95% όλων των Εντεροβακτηριακών που απομονώνονται στη ρουτίνα του εργαστηρίου (Procop, et al, 2017).



Πίνακας 1. Διάγραμμα κατανομής εντός της τάξης Enterobacteriales.

Κατανομή βάση των αναγνωρισμένων CSI (conserved signature insertions/deletions, μοναδικές παρεμβολές/διαγραφές) εντός της τάξης Enterobacteriales (Εντεροβακτηριακά) και προτεινόμενες οικογένειες. Το γράμμα T δίπλα σε ένα γένος δείχνει ότι είναι το γένος τύπου της οικογένειας.

Πηγή: Adeolu, et al, 2016

2.2 Γενικά Χαρακτηριστικά-Βιοχημικές Ιδιότητες-Δομή

Η τάξη των Εντεροβακτηριακών χαρακτηρίζεται από gram αρνητικά βακτηρίδια, μη σπορογόνα, αερόβια, προαιρετικά αναερόβια, σε σχήμα ράβδου (Adeolu, et al, 2016), κινητά, με περίτριχες βλεφαρίδες ή και ακίνητα (π.χ. *Shigella*, *Klebsiella*). Κύριες κοινές βιοχημικές τους ιδιότητες είναι ότι ζυμώνουν τη γλυκόζη με παραγωγή οξέος και κάποια με παραγωγή αερίου. Ανάγουν τα νιτρικά και δίνουν θετική την αντίδραση της καταλάσης, όχι όμως της οξειδάσης. Αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό MacConkey agar και σε υγρά υλικά με πεπτόνη καθώς και με εκχύλισμα κρέατος. Τα πιο πολλά είδη αναπτύσσονται ικανοποιητικά στους 37⁰ C και κάποια είδη αναπτύσσονται καλύτερα στους 25-30⁰C (Southern, 2022).

Η εξωτερική δομή των Εντεροβακτηριακών διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη λοιμογόνο δύναμή τους και περιγράφεται στην Εικόνα 1. Τα Εντεροβακτηριακά ως gram αρνητικά βακτηρίδια, διαθέτουν μια ημιδιαπερατή κυτταροπλασματική μεμβράνη, η οποία καθορίζει τον ενδοκυττάριο χώρο (Procop, et al, 2017). Πρόκειται για μια διπλοστιβάδα αποτελούμενη από φωσφολιπίδια που διατάσσονται σε δυο στιβάδες με τις υδρόφοβες ομάδες εσωτερικά και τις υδρόφιλες εξωτερικά (προς το κυτταρικό τοίχωμα και προς το κυτταρόπλασμα) (Procop, et al, 2017; Breijyeh, et al, 2020). Στην κυτταροπλασματική μεμβράνη εντοπίζονται πρωτεΐνες, οι οποίες συμμετέχουν στην παραγωγή ενέργειας, τη βιοσύνθεση λιπιδίων, την έκκριση και κατεργασία πρωτεϊνών καθώς και τη μεταφορά θρεπτικών ουσιών (Silhavy, et al, 2010). Επιπλέον, η μεμβράνη αυτή διατηρεί το κυτταρόπλασμα σε οριοθετημένο χώρο και εμποδίζει την είσοδο στο βακτηριακό κύτταρο καθώς και την έξοδο από αυτό ιόντων (Hauser, 2013). Από εδώ ξεκινούν τα ινίδια και οι βλεφαρίδες που εκτείνονται έως το εξωτερικό του κυττάρου και διαδραματίζουν και αυτά σημαντικό ρόλο στη λοιμογόνο δύναμή του (Tille, 2022).

Τη δομή των κυττάρων των Εντεροβακτηριακών συμπληρώνει το κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο περιβάλλει την κυτταροπλασματική μεμβράνη και αποτελείται από ένα λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης σε μία ή δυο στιβάδες (Procop, et al, 2017). Το κυτταρικό τοίχωμα προσδίδει στο βακτήριο την ικανότητα να ανθίσταται στην υψηλή οσμωτική πίεση και τις διαφορές πίεσης εκατέρωθεν καθώς και να διατηρεί σταθερή μορφή και το χαρακτηριστικό του σχήμα, που μεταβιβάζεται από γενεά σε γενεά

(Sauvage, et al, 2008). Η πεπτιδογλυκάνη αποτελείται από αλληλοσυνδεόμενες μονάδες N-ακετυλογλυκοζαμίνης και N-ακετυλομουραμικού οξέος. Κάθε μόριο N-ακετυλομουραμικού της πεπτιδογλυκάνης είναι συνδεδεμένο με ένα μικρό πεπτίδιο που περιέχει έως πέντε αμινοξέα. Η ανθεκτικότητα του τοιχώματος οφείλεται σε σχηματισμό δεσμών μεταξύ των γειτονικών πεπτιδικών αλυσίδων. Σε πολλά gram αρνητικά βακτήρια, όπως η *E. coli*, το κυτταρικό τοίχωμα συνδέεται με την εξωτερική μεμβράνη με λιποπρωτεΐνες και με τον τρόπο αυτό αυξάνεται η σταθερότητά του (Dhar, et al, 2018). Στο σχηματισμό του κυτταρικού τοιχώματος και της πεπτιδογλυκάνης, συμμετέχουν πρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, οι πενικιλίνο-δεσμευτικές πρωτεΐνες (penicillin-binding proteins, PBPs), οι οποίες αναδύονται προς το εξωτερικό της μεμβράνης και μέσα στον περιπλασματικό χώρο, όπου πραγματοποιείται η σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης. Είναι συνήθως τρανσπεπτιδάσες, καρβοξυπεπτιδάσες, γλυκοζυλο-τρανσφεράσες και είναι ευαίσθητες στη δράση των β-λακταμικών αντιμικροβιακών, λόγω της ομοιότητας του υποστρώματός τους (το άκρο D-Ala-D-Ala του πενταπεπτιδίου) με τα β-λακταμικά αντιμικροβιακά (Sauvage, et al, 2008).

Το κυτταρικό τοίχωμα περιβάλλεται εξωτερικά από μια δεύτερη μεμβράνη, την εξωτερική μεμβράνη, η οποία αποτελεί εκλεκτικό κυτταρικό φραγμό (Ghai and Ghai, 2018) και δομικό συστατικό αποκλειστικά των gram αρνητικών βακτηρίων, όπως των Εντεροβακτηριακών (Breijyeh, et al, 2020). Είναι μια υδρόφοβη ασύμμετρη διπλοστιβάδα, που αποτελείται από λιπίδια και λιποπολυσακχαρίτες (Kamio and Nikaido, 1976; Delcour, 2009). Φωσφολιπίδια εντοπίζονται στο εσωτερικό τμήμα της μεμβράνης ενώ στο εξωτερικό της τμήμα δομείται από γλυκολιπίδια, κυρίως λιποπολυσακχαρίτες, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την πρόκληση ενδοτοξικού σοκ από gram αρνητικά βακτήρια (Raetz and Whitfield, 2002; Silhavy, et al, 2010). Ο λιποπολυσακχαρίτης (Lipopolysaccharides, LPS), αποτελεί δομικό συστατικό της εξωτερικής μεμβράνης και αποτελείται από τρία τμήματα: το λιπίδιο A, το οποίο είναι υδρόφοβο και έχει δράση ενδοτοξίνης, τον ολιγοσακχαριτικό «πυρήνα» που συνδέεται με την γλυκοζαμίνη του λιπιδίου A, και το τμήμα που αναδύεται προς το εξωτερικό τμήμα του βακτηρίου, το οποίο ονομάζεται O-αντιγόνο και φέρει τις ειδικές αντιγονικές ιδιότητες του βακτηρίου (Procop, et al, 2017; Bertani and Ruiz, 2018). Το πλέον ποικίλο, λόγω διαφορετικής

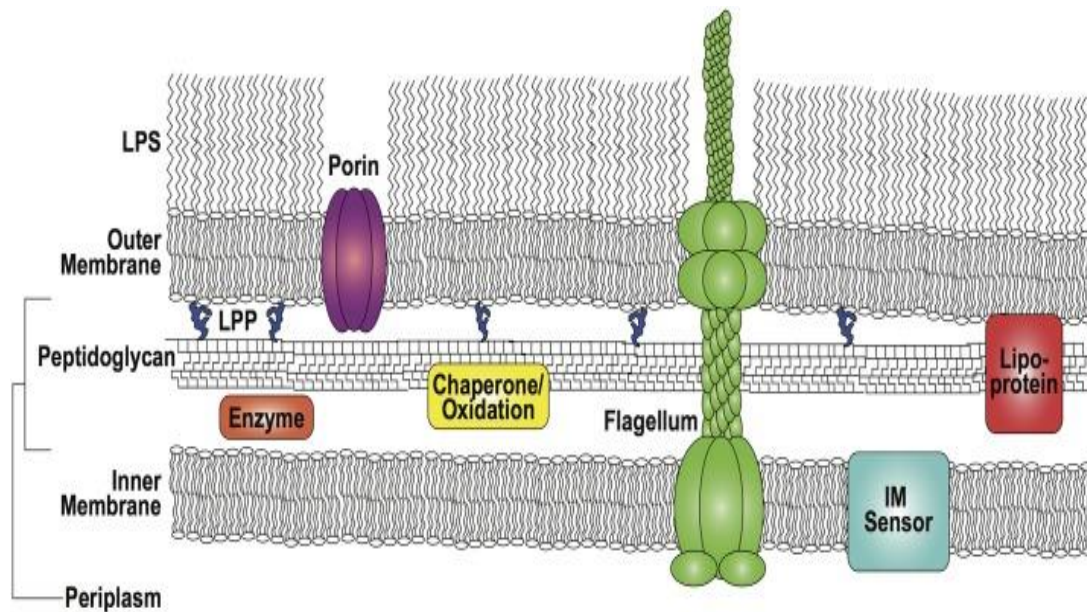
σύστασης, τμήμα του λιποπολυσακχαρίτη είναι το Ο-αντιγόνο. Διαφέρει τόσο σε επίπεδο είδους, αλλά και στα στελέχη του ίδιου είδους (Bertani and Ruiz, 2018).

Η εξωτερική μεμβράνη διαθέτει δυο τάξεις πρωτεϊνών, τις λιποπρωτεΐνες και τις πρωτεΐνες με μορφή β-βαρελιού (Silhavy, et al, 2010). Λόγω της δομής της δεν είναι διαπερατή από υδρόφιλα μόρια και αυτή η λειτουργία επιτελείται παθητικά από διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, τις πορίνες. Αυτές διακρίνονται σε μη ειδικές και ειδικές, ανάλογα με τη λειτουργική δομή τους (μονομερείς ή τριμερείς), ενώ όλες έχουν τη μορφή β-βαρελιού με υδρόφοβη εξωτερική επιφάνεια (Ghai and Ghai, 2017). Οι περιφερικές πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης είναι λιποπρωτεΐνες που παίζουν ρόλο στη σύνθεση της εξωτερικής μεμβράνης ή της πεπτιδογλυκάνης, ενώ αρκετές δεν έχουν γνωστό ρόλο (Kononova, et al, 2017). Οι λιποπρωτεΐνες δεν είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (Silhavy, et al, 2010).

Ο περιπλασματικός χώρος βρίσκεται αποκλειστικά στα gram αρνητικά βακτήρια και είναι ο χώρος ανάμεσα στην εξωτερική μεμβράνη και την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Εδώ εντοπίζονται πρωτεΐνες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση από το κύτταρο βλαπτικών ενζύμων, όπως η ριβονουκλεάση και η αλκαλική φωσφατάση (Silhavy, et al, 2010). Περιέχει το κυτταρικό τοίχωμα που προστατεύει τα κύτταρα από το οσμωτικό stress και διατηρεί το σχήμα τους (Merdanovic, et al, 2011). Στον περιπλασμικό χώρο εντοπίζονται διάφορα ένζυμα υδρολυτικά (π.χ. κολλαγενάσες), αλλά και ένζυμα τα οποία μπορούν να διασπάσουν τα αντιμικροβιακά, όπως είναι οι β-λακταμάσες (Tille, 2022).

Εσωτερικά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης βρίσκεται το κυτταρόπλασμα όπου πραγματοποιούνται όλες οι λειτουργίες που δεν επιτελούνται από την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Περιέχει ποικίλα ένζυμα και είναι το τμήμα του κυττάρου στο οποίο πραγματοποιείται η πρωτεϊνοσύνθεση (Tille, 2022). Στα Εντεροβακτηριακά, όπως και σε όλα τα προκαρυωτικά κύτταρα, ο πυρήνας δεν περιβάλλεται από μεμβράνη, ενώ εντός του κυτταροπλάσματός τους υπάρχει το βακτηριακό νουκλεοειδές που περιλαμβάνει το γενετικό υλικό, ένα μεγάλο μόριο δίκλωνου DNA. Επιπρόσθετα είναι δυνατό να περιέχεται στο κυτταρόπλασμα τους ένα ή περισσότερα κυκλικά μόρια εξωχρωμοσωμικού DNA, που ονομάζονται πλασμίδια, τα οποία αντιγράφονται αυτόνομα. Περιέχουν γενετικές πληροφορίες που

έχουν σχέση με τη λοιμογόνο δύναμη των Εντεροβακτηριακών, όπως είναι τα γονίδια αντοχής σε διάφορα αντιμικροβιακά (Procop, et al, 2017).



Εικόνα 1. Αρχιτεκτονική του εξωτερικού περιβλήματος των gram αρνητικών βακτηρίων. Φαίνεται η ασύμμετρη διπλοστιβάδα από λιποπολυσακχαρίτες και γλυκεροφωσfolιπίδια που αποτελεί την εξωτερική μεμβράνη. Η εσωτερική μεμβράνη είναι μια συμμετρική φωσfolιπιδική διπλοστιβάδα. Ο περιπλασμικός χώρος είναι η ενδιάμεση των μεμβρανών αυτών περιοχή με ποικιλία ενζύμων και λειτουργιών, όπως η οξείδωση και ο ποιοτικός έλεγχος πρωτεϊνών. Επίσης στον περιπλασμικό χώρο βρίσκεται ένα στρώμα από αλληλοσυνδεδεμένα σάκχαρα και αμινοξέα που αποτελούν την πεπτιδογλυκάνη που περιβάλλει το κύτταρο. Η πεπτιδογλυκάνη συνδέεται με την εξωτερική μεμβράνη στα εντερικά βακτήρια με ομοιοπολικούς δεσμούς τρανσπεπτιδάσης μέσω της λιποπρωτεΐνης Lpp της εξωτερικής μεμβράνης. Στην εσωτερική μεμβράνη εδρεύουν αισθητήρες ανίχνευσης της περιβαλλοντικής αλλαγής, οι οποίοι έχουν περιπλασμικά τμήματα. Στην περίπτωση του συστήματος RcsF πρόκειται για αλλαγή στην θέση της Rcsf λιποπρωτεΐνης της εξωτερικής μεμβράνης. Σύμπλοκα πρωτεϊνών όπως τα μαστίγια εκτείνονται και στις δυο μεμβράνες. IM: Εσωτερική μεμβράνη, Lpp: Λιποπρωτεΐνη Braun, LPS: λιποπολυσακχαρίτης, RcsF: Ρυθμιστικό σύστημα σύνθεσης του εξωτερικού περιβλήματος F.

Πηγή: Miller and Salama, 2018

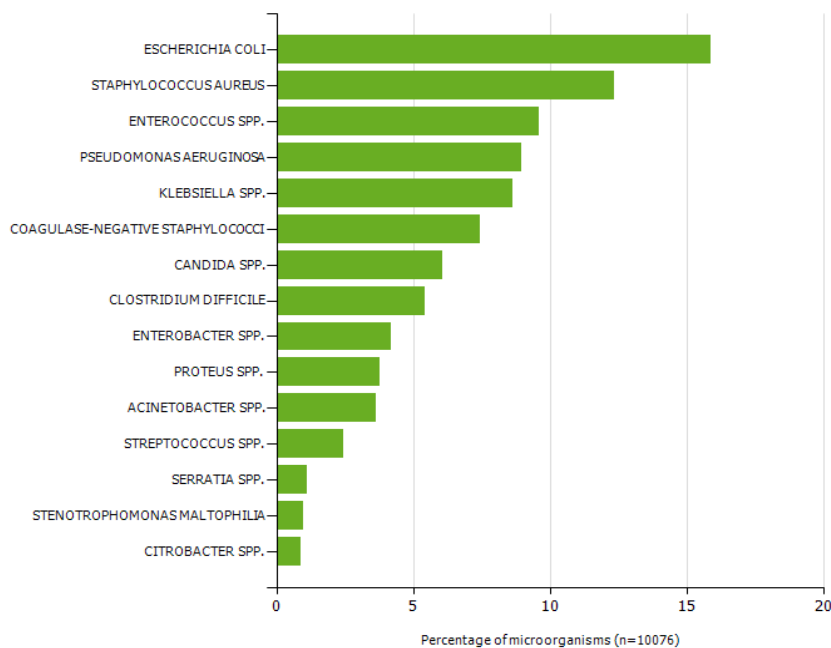
2.3 Παθογόνος δράση Εντεροβακτηριακών

Η τάξη των Εντεροβακτηριακών είναι υπεύθυνη για διάφορες λοιμώξεις στον άνθρωπο, τόσο στην κοινότητα όσο και στο περιβάλλον του νοσοκομείου. Από τα είδη των Εντεροβακτηριακών, η *E. coli* είναι υπεύθυνη για το 90% των ουρολοιμώξεων. Στελέχη του γένους *Klebsiella* και *Proteus* αποτελούν επίσης ευκαιριακά παθογόνα που προκαλούν κυρίως επιπεπλεγμένες ουρολοιμώξεις σε γυναίκες (Zhang, et al, 2003). Στελέχη *Klebsiella spp* και κυρίως η *Klebsiella pneumoniae* ενοχοποιούνται για λοιμώξεις της αναπνευστικής οδού, σηψαιμία και αποστήματα ενδοκοιλιακά (Broberg, et al, 2014). Στελέχη *Enterobacter spp* αποτελούν επίσης σημαντικό αίτιο πνευμονίας. Στελέχη *Salmonella enterica* και άλλα του γένους *Salmonella* είναι υπεύθυνα για γαστρεντερίτιδες, με εντερικές και σε κάποιες περιπτώσεις εξωεντερικές εκδηλώσεις, ενώ τα στελέχη *Shigella spp* προκαλούν επιδημίες σιγκέλλωσης συχνά με υψηλά ποσοστά θνητότητας. Πολλά από τα είδη των Εντεροβακτηριακών, και κυρίως των Εντεροβακτηριοειδών, ενοχοποιούνται για ενδοκοιλιακές λοιμώξεις, όπως η χολαγγειΐτιδα και η περιτονίτιδα αλλά και για μικροβιαμίες (Paterson, et al, 2006).

2.4 Επιδημιολογικά δεδομένα: Εντεροβακτηριακά και αντιμικροβιακά

Στην πορεία των χρόνων η χρήση των αντιμικροβιακών για την καταπολέμηση των λοιμώξεων έχει βελτιώσει σημαντικά την ποιότητα της ιατρικής φροντίδας. Ωστόσο η αλόγιστη χρήση αντιμικροβιακών όχι μόνο στην ιατρική πράξη, αλλά και στην κτηνοτροφία έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών. Η αντοχή στα αντιμικροβιακά αποτελεί απειλή για την παγκόσμια δημόσια υγεία (Antao, et al, 2018). Αντιμικροβιακά παράγονται με ρυθμό περίπου 100.000 τόνων ετησίως σε παγκόσμια κλίμακα, η χρήση τους εντούτοις οδηγεί στην ανάπτυξη ανθεκτικών παθογόνων στελεχών, κάποια από τα οποία είναι πολυανθεκτικά, εμφανίζοντας αντοχή σε πολλά είδη αντιμικροβιακών (Nikaido, 2009). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα 2/3 των ιατρικών συνταγών στο νοσοκομειακό περιβάλλον αφορούν συνταγογράφηση αντιμικροβιακών και κυρίως την κατηγορία των β-λακταμικών αντιμικροβιακών (Bush and Bradford, 2020). Σε έρευνα που πραγματοποίησε το Ευρωπαϊκό Κέντρο Πρόληψης και Ελέγχου Λοιμώξεων

(European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC) για το διάστημα 2011-2012, τα Εντεροβακτηριακά κατείχαν σημαντική θέση ως αίτια πρόκλησης νοσοκομειακής λοίμωξης. Στην 1^η θέση βρίσκεται η *E. coli* και στην 5^η στελέχη *Klebsiella spp* (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Μικροοργανισμοί που έχουν απομονωθεί στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης και του Ευρωπαϊκού Οικονομικού Χώρου κατά το διάστημα 2011-2012.

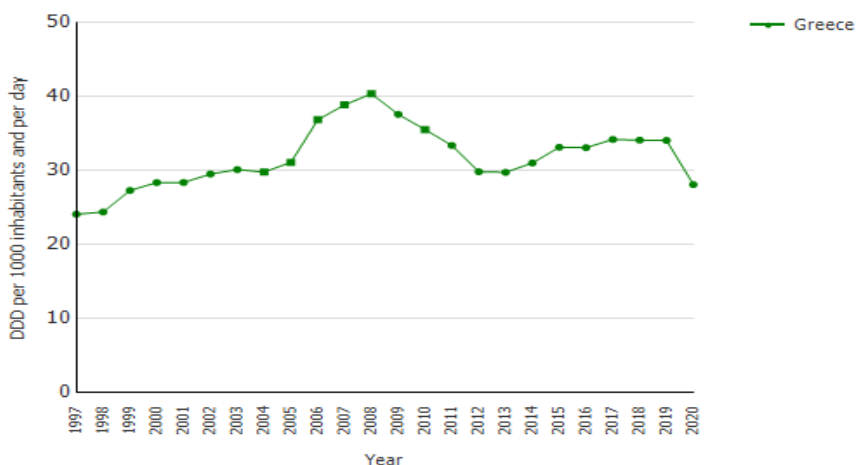
Πηγή: ECDC, 2012 (<https://ecdc.europa.eu/en/healthcare-associatedinfections-acute-care-hospitals/database/microorganisms-and-antimicrobial-resistance/most-frequent>)

➤ Κατανάλωση Αντιμικροβιακών

Σύμφωνα με δεδομένα που έχει συλλέξει ο ECDC, προκύπτουν συμπεράσματα σχετικά με την κατανάλωση αντιμικροβιακών στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης και του Ευρωπαϊκού Οικονομικού Χώρου (ΕΟΧ) που παρουσιάζονται με διάφορα γραφήματα ανά χώρα και ανά έτος. Η κατανάλωση αντιμικροβιακών εκφράζεται σε αριθμό καθορισμένων ημερησίων δόσεων (Defined Daily Doses, DDDs) ανά 1000 κατοίκους ημερησίως. Στην εικόνα 3 παρατηρείται η

αυξητική τάση κατανάλωσης αντιμικροβιακών στην Ελλάδα κατά το διάστημα 2000-2008, όπου παρουσιάζει μια κορυφή της τάξης των 40 DDD/1000 κατοίκους ημερησίως. Κατά το διάστημα 2009-2013 παρουσιάζει πτωτική τάση και αυξάνεται πάλι κατά το διάστημα 2014-2019. Παρατηρείται στη συνέχεια σημαντική μείωση κατά το 2020, όπου σημειώνει τιμή 28 DDD/1000 κατοίκους ημερησίως. Ειδικά για την κατανάλωση καρβαπενεμών (Εικόνα 4), η τάση κατανάλωσης είναι αυξητική, όπως ισχύει και για τις κεφαλοσπορίνες 3^{ης} γενεάς (Εικόνα 5). Κατά το έτος 2020, η Ελλάδα βρίσκεται στην 2^η θέση και η Κύπρος στην 1^η στην κατανάλωση αντιμικροβιακών για συστηματική χρήση στην κοινότητα και στον νοσοκομειακό χώρο. Στην τελευταία θέση βρίσκονται η Αυστρία και η Ολλανδία (Εικόνα 6). Στην Αμερική, το 65% των συνταγογραφούμενων ενέσιμων αντιμικροβιακών αποτελούν τα β-λακταμικά αντιμικροβιακά και από αυτά οι κεφαλοσπορίνες αποτελούν περίπου τα μισά (Bush and Bradford, 2016).

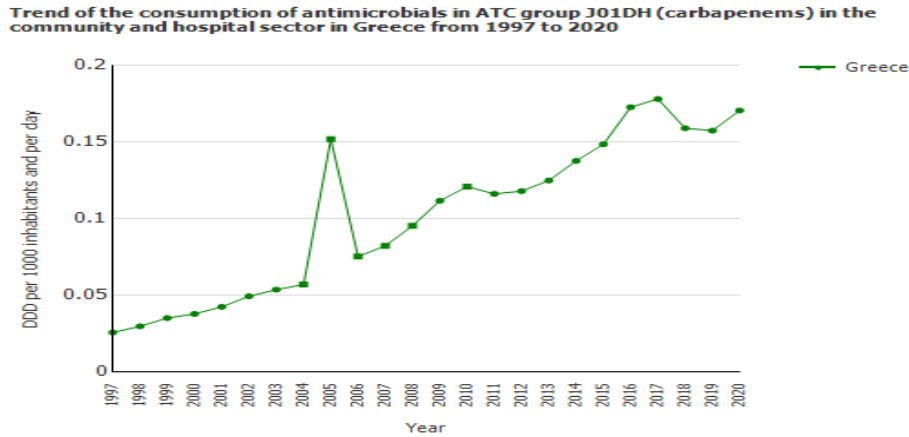
Trend of the consumption of antimicrobials in ATC group J01 (antibacterials for systemic use) in the community and hospital sector in Greece from 1997 to 2020



Εικόνα 3. Γράφημα κατανάλωσης αντιμικροβιακών στην Ελλάδα κατά το διάστημα 1997-2020.

Πηγή: ECDC, 2020

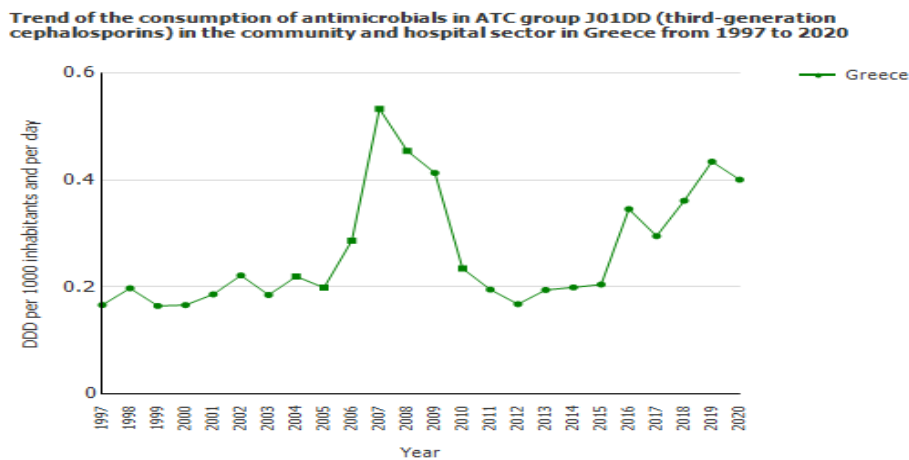
(<https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-consumption/database/trend-country>)



Εικόνα 4. Γράφημα κατανάλωσης καρβαπενεμών στην Ελλάδα κατά το διάστημα 1997-2020.

Πηγή : ECDC, 2020

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



Εικόνα 5. Γράφημα κατανάλωσης κεφαλοσπορινών 3ης γενεάς στην Ελλάδα κατά το διάστημα 1997-2020.

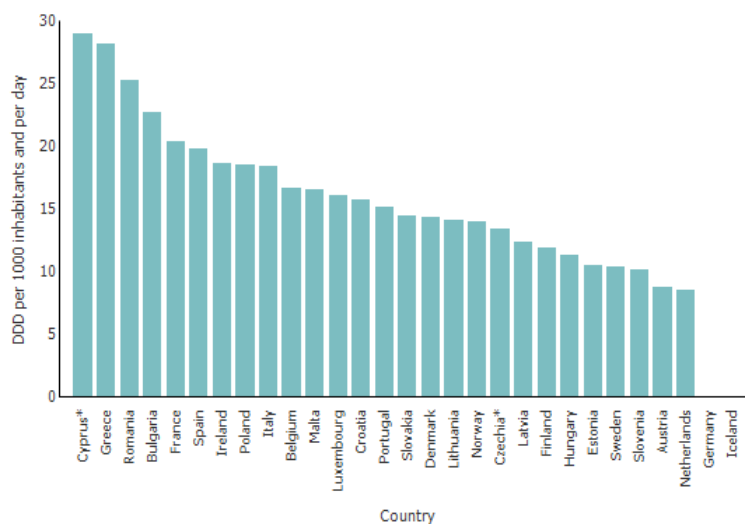
Πηγή: ECDC, 2020

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

Σύμφωνα με την ετήσια μελέτη επιτήρησης που διεξήγαγε ο ECDC για το έτος 2020 στην οποία συμμετείχαν 29 χώρες, ο μέσος όρος κατανάλωσης αντιμικροβιακών για συστηματική χρήση στην κοινότητα και στο νοσοκομειακό χώρο

ήταν 16.4 DDD ανά 1000 κατοίκους ημερησίως (διακύμανση ανά χώρα: 8.5-28.9). Κατά την περίοδο 2011-2020 παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση συνολικά για τις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης και του ΕΟΧ. Κατά τα έτη 2019-2020 παρατηρήθηκε συνολική μείωση στην κατανάλωση αντιμικροβιακών για συστηματική χρήση από 19.9 DDD ανά 1000 κατοίκους ημερησίως το 2019 σε 16.4 DDD ανά 1000 κατοίκους ημερησίως το 2020 (17.6% μείωση). Οι περισσότερες χώρες ανέφεραν μείωση στην κατανάλωση αντιμικροβιακών κατά το διάστημα 2019-2020 και κυρίως αυτό αφορούσε την κατανάλωση στην κοινότητα. Εφτά χώρες (Εστονία, Ελλάδα, Ουγγαρία, Ιταλία, Λάτβια, Μάλτα, Πορτογαλία) ανέφεραν μείωση στην κατανάλωση στην κοινότητα και αύξηση στο νοσοκομειακό χώρο. Μόνο η Βουλγαρία ανέφερε αύξηση στην κατανάλωση και στους δυο τομείς (<https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/ESAC-Net%20AER-2020-Antimicrobial-consumption-in-the-EU-EEA.pdf>).

Consumption of Antibacterials for systemic use (ATC group J01) in the community and hospital sector in Europe, reporting year 2020



Εικόνα 6. Κατανάλωση αντιμικροβιακών στην Ευρώπη κατά το έτος 2020

Πηγή: ECDC, 2020

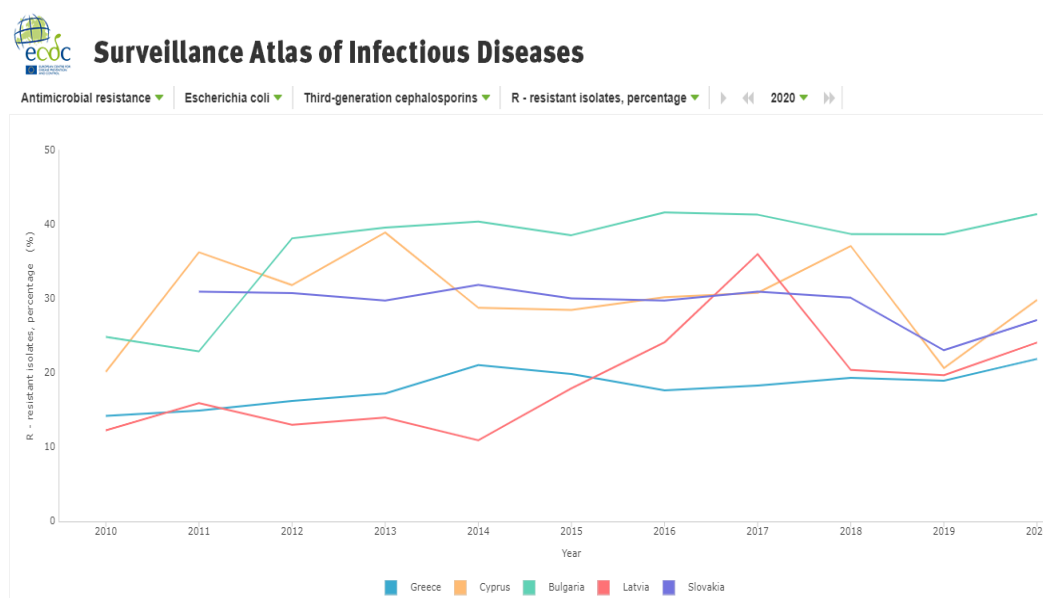
(<https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-consumption/database/rates-country>)

➤ Αντοχή στα αντιμικροβιακά

Λόγω της πίεσης επιλογής που ασκείται στα βακτήρια από τη χρήση αντιμικροβιακών, το φαινόμενο της ανάπτυξης αντοχής στα αντιμικροβιακά γίνεται συνεχώς πιο απειλητικό με την εμφάνιση πολυανθεκτικών αλλά και πανανθεκτικών βακτηρίων. Η αντοχή των Gram αρνητικών βακτηρίων στις καρβαπενέμες είναι ένας από τους κύριους παράγοντες παρουσίας πολυανθεκτικών και πανανθεκτικών στελεχών (Meletis, 2016). Η ανάπτυξη μικροβιακής αντοχής μεταβάλλεται συνεχώς τα τελευταία χρόνια και απαιτεί συντονισμένες και δραστικές ενέργειες παγκοσμίως για την αντιμετώπισή της (Codjoe and Donkor, 2018). Η αλόγιστη συνταγογράφηση αλλά και η χορήγηση αντιμικροβιακών άνευ ιατρικής συνταγής, αποτελούν κύριες αιτίες που οδηγούν στην ανάπτυξη αντοχής, ενώ η χρήση αντιμικροβιακών και στην κτηνοτροφία συμβάλλει εξίσου. Υπολογίζεται ότι περίπου 700.000 θάνατοι παγκοσμίως ανά έτος οφείλονται σε λοιμώξεις από ανθεκτικά μικροβιακά στελέχη. Στη Γερμανία 400.000 - 600.000 περίπου άνθρωποι αναπτύσσουν ετησίως νοσοκομειακές λοιμώξεις, από τις οποίες οι 30.000 - 35.000 οφείλονται σε πολυανθεκτικούς μικροοργανισμούς. Υπολογίζεται ότι 1.000 - 4.000 θάνατοι ετησίως οφείλονται σε πολυαντοχή (Antao, et al, 2018). Σύμφωνα με αναφορά της Αμερικανικής Εταιρείας Λοιμωδών Νοσημάτων (Infectious Diseases Society of America, IDSA), στελέχη *Klebsiella spp* και *E. coli* που παράγουν εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες, ανήκουν στην ομάδα των ανθεκτικών στα αντιμικροβιακά βακτηρίων έναντι των οποίων νέες θεραπευτικές επιλογές είναι άμεσα απαραίτητες (Oteo, et al, 2010). Σύμφωνα με το Κέντρο Πρόληψης και Ελέγχου Λοιμώξεων (Centre for Disease Prevention and Control, CDC), δύο εκατομμύρια άνθρωποι στην Αμερική νοσούν από σοβαρές λοιμώξεις από ανθεκτικά στα αντιμικροβιακά βακτήρια και 23.000 πεθαίνουν κάθε χρόνο (Meletis, 2016). Το ετήσιο κόστος στην Αμερική για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων από ανθεκτικά ή πολυανθεκτικά βακτήρια ανέρχεται σε 21-34 δισεκατομμύρια (Codjoe, et al, 2018).

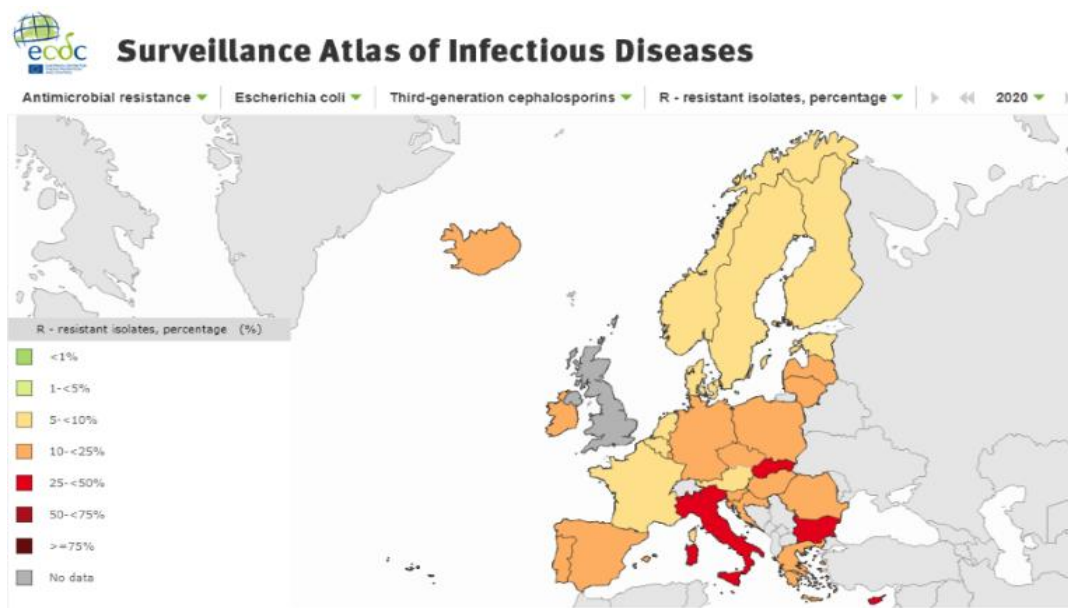
Έως και το τέλος της δεκαετίας 1990-2000 τα Εντεροβακτηριακά και κυρίως η *K. pneumoniae* που παράγει εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (Extended Spectrum β-lactamases, ESBLs) αποτελούσαν την κύρια αιτία νοσοκομειακών λοιμώξεων. Στη συνέχεια στελέχη *E. coli* που παράγουν CTX-M β-λακταμάσες, αποτέλεσαν σε παγκόσμιο επίπεδο κύριο αίτιο λοιμώξεων της κοινότητας και κυρίως

ουρολοιμώξεων (Oteo, et al, 2010). Σύμφωνα με το Ευρωπαϊκό Δίκτυο Επιτήρησης της Αντιμικροβιακής Αντοχής (European Antibiotic Resistance Surveillance System, EARSS), η συχνότητα εμφάνισης στελεχών *E. coli* ανθεκτικών στις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενεάς, έχει παρουσιάσει μικρή άνοδο στην Ελλάδα την τελευταία δεκαετία (Εικόνα 7) παρουσιάζοντας ποσοστό αντοχής 21.9% (Εικόνα 8). Η υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης αντοχής στα συγκεκριμένα αντιμικροβιακά παρατηρείται στην Βουλγαρία (41,4%), ενώ ακολουθούν η Κύπρος (29,8%), η Σλοβακία (27.1%) και η Λάτβια (24.1%) (<https://ecdc.europa.eu/en/surveillance-atlas-infectious-diseases>).



Εικόνα 7. Γράφημα συχνότητας εμφάνισης αντοχής της *E. coli* στις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενεάς 2010-2020

Πηγή: ECDC, 2020 (<https://ecdc.europa.eu/en/surveillance-atlas-infectious-diseases>)

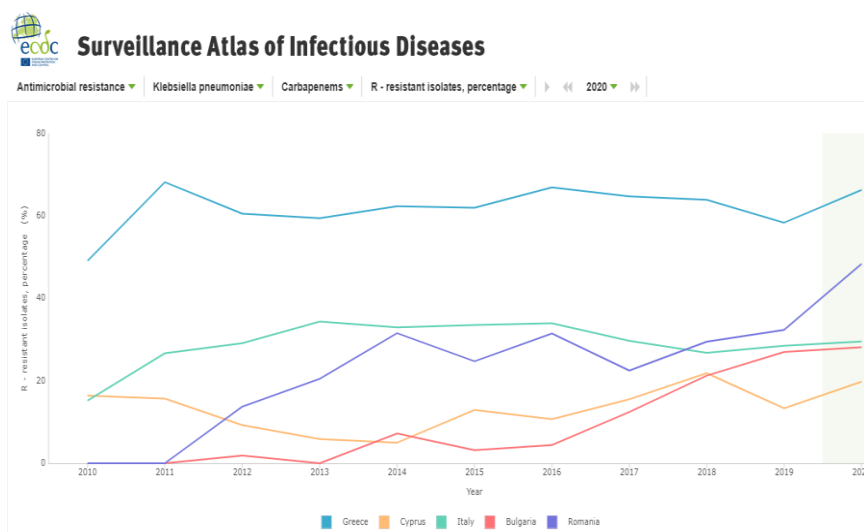


Εικόνα 8. Χάρτης συχνότητας εμφάνισης αντοχής της *E. coli* σε κεφαλοσπορίνες 3ης γενεάς, 2020

Πηγή: ECDC, 2020 (<https://ecdc.europa.eu/en/surveillance-atlas-infectious-diseases>)

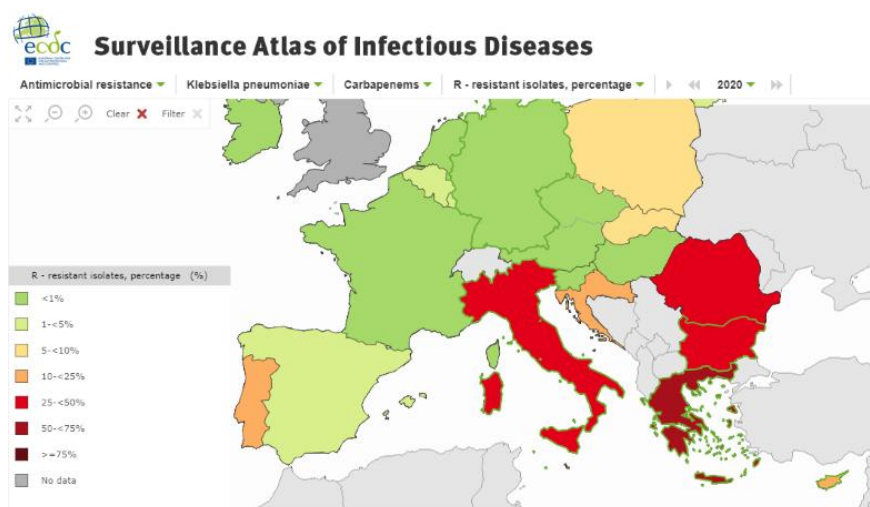
Οι καρβαπενέμες είναι μια από τις σημαντικότερες κατηγορίες αντιμικροβιακών που χρησιμοποιούνται ευρέως στην αντιμετώπιση λοιμώξεων και η ανάπτυξη αντοχής σε αυτές αποτελεί σημαντικό πρόβλημα της δημόσιας υγείας (Codjoe and Donkor, 2018). Η επικράτηση στελεχών που παράγουν εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες οδήγησε στην αυξημένη κατανάλωση καρβαπενεμών και τελικά στην ανάπτυξη αντοχής (Wilson and Torok, 2018). Σύμφωνα με μελέτη που αφορούσε τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες Εντεροβακτηριακά (Carbapenem-resistant Enterobactererales, CRE) κατά την περίοδο 2013-2016 στη Βόρεια Καλιφόρνια, το 38.7% των στελεχών που ελέγχθηκαν έφεραν γονίδια αντοχής και από αυτά, το 20.8% το *blaKPC* γονίδιο (Elshamy and Aboshanab, 2020). Η αντοχή στις καρβαπενέμες οφείλεται κατά κύριο λόγο στην παραγωγή καρβαπεμενασών (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, KPC) και το πρώτο ένζυμο KPC (KPC-1) ανιχνεύθηκε στη Βόρεια Καρολίνα το 1996 σε στέλεχος *K. pneumoniae*. Από τότε στελέχη ανθεκτικά στις καρβαπενέμες λόγω παραγωγής ενζύμων KPC έχουν ανιχνευθεί παγκοσμίως (Elshamy and Aboshanab, 2020). Το 2007 σε νοσοκομείο της Κρήτης αναφέρθηκε μια επιδημία από στελέχη *K. pneumoniae* που παρήγαγαν KPC-2 καρβαπενεμάσες (Maltezou, et al, 2009). Οι περισσότερες λοιμώξεις από KPC

στελέχη είναι νοσοκομειακές και συνοδεύονται από υψηλά ποσοστά θνητότητας (Wilson and Torok, 2018). Η αντοχή στις καρβαπενέμες παρουσιάζει την υψηλότερη συχνότητα στην Ελλάδα (66.3%) κατά την τελευταία δεκαετία, όπως φαίνεται στις Εικόνες 9 και 10 σύμφωνα με τον ECDC (<https://ecdc.europa.eu/en/surveillance-atlas-infectious-diseases>).



Εικόνα 9. Γράφημα συχνότητας αντοχής στις καρβαπενέμες, 2010-2020

Πηγή: ECDC, 2020 (<https://ecdc.europa.eu/en/surveillance-atlas-infectious-diseases>)

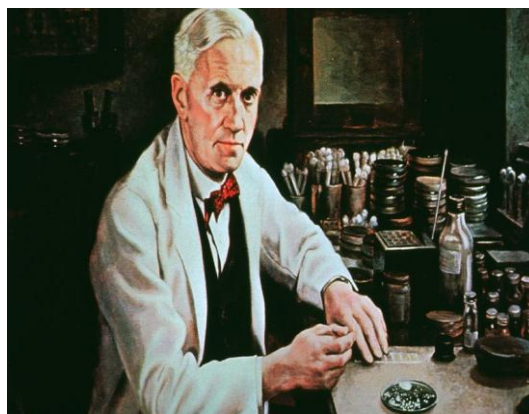


Εικόνα 10. Χάρτης συχνότητας εμφάνισης αντοχής στις καρβαπενέμες, 2020

Πηγή: ECDC, 2020 (<https://ecdc.europa.eu/en/surveillance-atlas-infectious-diseases>)

3. Αντιμικροβιακά

Τα αντιμικροβιακά αποτελούν είτε φυσικά παράγωγα μικροοργανισμών που δρουν εναντίον άλλων μικροοργανισμών, είτε προέρχονται από φυσικά παράγωγα ή συνθετικές ή ημισυνθετικές χημικές ουσίες που δρουν στα βακτήρια μέσω αναστολής των φυσιολογικών λειτουργιών τους (π.χ αναστολή σύνθεσης κυτταρικού τοιχώματος, αναστολή πρωτεϊνοσύνθεσης κ.ά.) (Bush, 2010; Procop, et al, 2017). Ο



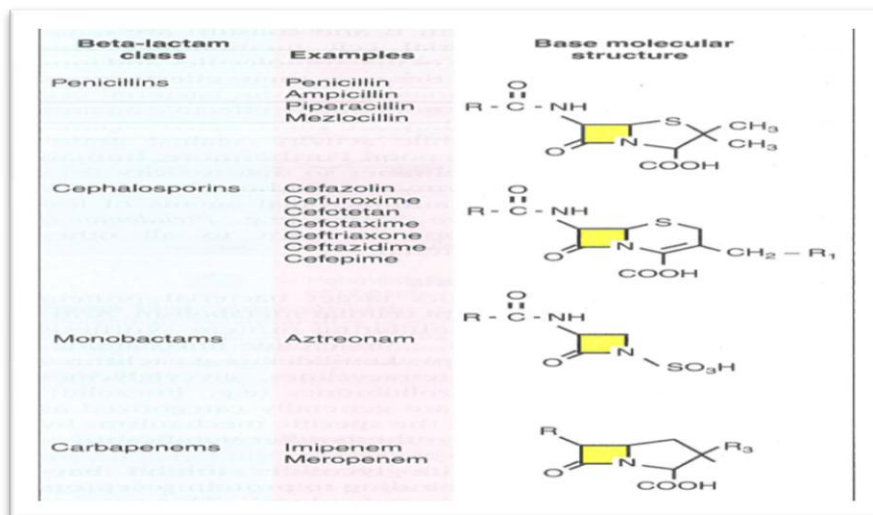
Εικόνα 11. Alexander Fleming (1881-1955)

πρώτος ερευνητής που χρησιμοποίησε τον όρο αντιβιοτικά ήταν ο Selman A. Waksman, αναφερόμενος σε ουσίες που αποτελούσαν φυσικά παράγωγα μικροοργανισμών με βακτηριοστατική ή βακτηριοκτόνο δράση. Ωστόσο σήμερα ο όρος αντιβιοτικά έχει αντικατασταθεί από τον όρο αντιμικροβιακά που περιλαμβάνει φυσικές, ημισυνθετικές ή συνθετικές ουσίες που θεωρούνται βακτηριοστατικά, βακτηριοκτόνα και αντιμυκητικά παράγωγα, είτε φυσικά είτε χημικά (Bush, 2010).

Το πρώτο αντιμικροβιακό, η πενικιλίνη, ανακαλύφθηκε το 1928 από τον Alexander Fleming (Εικόνα 11). Το 1936 με την εισαγωγή της σουλφοναμίδης στην κλινική πράξη σηματοδοτήθηκε η έναρξη της χρυσής εποχής στην ανακάλυψη των αντιμικροβιακών (Shahid, et al, 2009). Κατά τον 2^ο παγκόσμιο πόλεμο ανακαλύφθηκαν περισσότερα αντιμικροβιακά. Το 1945, παρατηρήθηκαν οι αντιμικροβιακές ιδιότητες του μύκητα *Cephalosporium acremonium* από τον Brotzu και αυτό οδήγησε στην ανακάλυψη των κεφαλοσπορινών (Bo, 2000). Έως το τέλος της δεκαετίας 1960-1970 νέα αντιμικροβιακά ανακαλύφθηκαν, όπως οι καρβαπενέμες και οι μονοβακτάμες (Dalhoff, et al, 2006). Ωστόσο το φαινόμενο της ανάπτυξης αντοχής στα αντιμικροβιακά που ανακαλύφθηκαν κατά τον 20^ο αιώνα και η αποτυχία των προσπαθειών για την ανακάλυψη νέων, κάνουν επιτακτική την ανάγκη για τη λήψη μέτρων κατά τον 21^ο αιώνα, λόγω του κινδύνου της επιστροφής σε μια εποχή προ της ανακάλυψης των αντιμικροβιακών. Όλη αυτή η κατάσταση έχει σηματοδοτήσει την έναρξη και έχει επιτείνει την προσπάθεια για την ανακάλυψη νέων αντιμικροβιακών παγκοσμίως (Chopra, 2013).

3.1 β-λακταμικά αντιμικροβιακά

Τα β-λακταμικά αντιμικροβιακά αποτελούν τους πιο ευρέως χρησιμοποιούμενους αντιμικροβιακούς παράγοντες (Meletis, 2016). Εκτός από την κατηγορία των πενικιλινών (Πίνακας 2), στην ομάδα των β-λακταμικών ανήκουν οι κεφαλοσπορίνες, οι καρβαπενέμες, οι μονοβακτάμες (Samaha-Kfoury and Araj, 2003) καθώς και οι συνδυασμοί πενικιλινών ή κεφαλοσπορινών με αναστολείς β-λακταμασών (Bush and Bradford, 2016). Διαθέτουν στη δομή τους ένα τετραμελή δακτύλιο β-λακτάμης, ο οποίος είναι δυνατό να υδρολυθεί από β-λακταμάσες (Εικόνα 12). Τα αντιμικροβιακά της ομάδας αυτής διαφέρουν μεταξύ τους σε επιπρόσθετους δακτυλίους που φέρουν. Οι πενικιλίνες φέρουν ένα δακτύλιο θειαζολιδίνης, οι κεφαλοσπορίνες φέρουν ένα δακτύλιο διυδροθειαζίνης, οι μονοβακτάμες δεν έχουν επιπλέον δακτύλιο και οι καρβαπενέμες έχουν ένα διπλό δακτύλιο στη δομή τους (Samaha-Kfoury and Araj, 2003). Η ομάδα των β-λακταμικών αντιμικροβιακών είναι ευρέως συνταγογραφούμενη για λοιμώξεις από πολλά βακτήρια, ενώ παρουσιάζουν λίγες παρενέργειες, με κυριότερη την αλλεργική αντίδραση, που παρατηρείται σε ένα μικρό ποσοστό ασθενών, κυρίως από την χορήγηση πενικιλίνης ή κεφαλοσπορίνης (Moss, et al, 1991).



Εικόνα 12. Βασικές δομές και παραδείγματα β-λακταμικών αντιμικροβιακών.

Ο β-λακταμικός δακτύλιος έχει τονιστεί με κίτρινο χρώμα σε κάθε δομή

Πηγή: Moore, 2022

3.2 Κατηγορίες β-λακταμικών αντιμικροβιακών

3.2.1 Πενικιλίνες

Τα πρώτα β-λακταμικά αντιμικροβιακά αποτελούν η πενικιλίνη G και η πενικιλίνη V, οι οποίες προκύπτουν φυσικά. Η ανακάλυψη το 1960 του 6-APA, του πυρήνα της πενικιλίνης, οδήγησε στην ανάπτυξη των ημισυνθετικών πενικιλινών, όπως η μεθικιλίνη, η αμπικιλίνη, η αμοξυκιλλίνη, οι ισοξαζολυλ-πενικιλίνες (οξακιλλίνη, κλοξακιλλίνη, δικλοξακιλλίνη, φλουκλοξακιλλίνη) καθώς και αυτές που είναι δραστικές έναντι της *Pseudomonas aeruginosa* (καρβενικιλίνη και τικαρκιλίνη). Η βασική δομή τους είναι ένας δακτύλιος θειαζολιδίνης που συνδέεται με έναν β-λακταμικό δακτύλιο (6-APA) και στον τελευταίο είναι συνδεδεμένη μια πλάγια αλυσίδα που καθορίζει πολλές από τις αντιβακτηριακές και φαρμακολογικές ιδιότητες του κάθε τύπου πενικιλίνης (Shahid, et al, 2008).

Ομάδες β- λακταμικών αντιμικροβιακών	Αντιμικροβιακοί παράγοντες
Πενικιλίνες	Πενικιλίνη G, Πενικιλίνη Ανθεκτικές στις πενικιλινάσες πενικιλίνες: μεθικιλίνη, ναφκιλλίνη, οξακιλλίνη, κλοξακιλλίνη Αμινοπενικιλίνες: αμπικιλίνη, αμοξυκιλλίνη Καρβοξυπενικιλίνες: καρβενικιλίνη, τικαρκιλίνη Ουρεΐδοπενικιλίνες: μεζλοκιλλίνη, πιπερακιλλίνη
Κεφαλοσπορίνες	1 ^η γενεά: κεφαζολίνη, κεφαλοθίνη, κεφαλεξίνη 2 ^η γενεά: κεφουροξίμη, κεφμανδόλη, <ul style="list-style-type: none"> • κεφαμυκίνες (κεφοτετάνη, κεφοξιτίνη) 3 ^η γενεά: κεφοταξίμη, κεφτριαξόνη, κεφποδοξίμη, κεφτιζοξίμη, κεφοπεραζόνη, κεφταζιδίμη (αντιψευδομοναδική) 4 ^η γενεά: κεφεπίμη, κεφπιρόμη
Καρβαπενέμες	Ιμιπενέμη, μεροπενέμη, ερταπενέμη
Μονοβακτάμες	Αζτρεονάμη

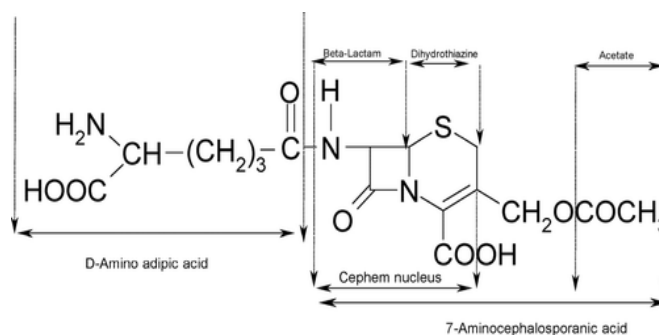
Πίνακας 2. Ομάδες και παραδείγματα β-λακταμικών αντιμικροβιακών παραγόντων

Πηγή: Samaha-Kfoury and Araj, 2003

3.2.2 Κεφαλοσπορίνες

Οι κεφαλοσπορίνες αποτελούν μια ομάδα β-λακταμικών αντιμικροβιακών παραγόντων με πυρήνα το 7-αμινοκεφαλοσπορανικό οξύ (7-ACA) (Εικόνα 13). Η πρώτη κεφαλοσπορίνη που ανακαλύφθηκε ήταν η κεφαλοσπορίνη C (CPC), η οποία ωστόσο δεν είχε κλινική εφαρμογή (Quintiliani, et al, 1982). Το ενδιάμεσο προϊόν από το οποίο συντέθηκαν περίπου τα 2/3 των κεφαλοσπορινών, είναι το 7-ACA, το οποίο προκύπτει από χημική ή ενζυματική αποακυλίωση του φυσικού αντιμικροβιακού, κεφαλοσπορίνη C (Tan, et al, 2018). Με τον τρόπο αυτό παράχθηκαν αρκετά νέα προϊόντα (Πίνακας 2) όπως, η κεφαλοθίνη (1964), η

κεφαλοριδίνη (1966), η κεφαλεξίνη (1971), η κεφαζολίνη (1973), η κεφοξιτίνη, η κεφαμανδόλη (1979) και η κεφοταξίμη (1981), η οποία είναι η πρώτη κεφαλοσπορίνη 3^{ης} γενεάς (Quintiliani, et al, 1982). Παρουσιάζουν χαμηλή τοξικότητα και είναι δραστικές τόσο έναντι gram θετικών όσο και gram αρνητικών βακτηρίων (Abraham, 1987).



Εικόνα 13. Δομή του μορίου της κεφαλοσπορίνης

Πηγή: Sonawane, 2006

3.2.3 Καρβαπενέμες

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν η ιμιπενέμη, η μεροπενέμη, η ερταπενέμη και η νεότερη δοριπενέμη (Kattan, et al, 2008). Διαθέτουν στην δομή τους ένα β-λακταμικό δακτύλιο και έναν πενταμελή δακτύλιο (Εικόνα 14), που διαφέρει από αυτόν της πενικιλίνης διότι είναι ακόρεστος με ένα άτομο άνθρακα και όχι θείου (Elshamy and Aboshanab, 2020). Οι πρώτες καρβαπενέμες που ανακαλύφθηκαν ήταν ουσίες που παρήγαγε το είδος *Streptomyces olivaceus* και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η ανακάλυψη της θειαναμυκίνης το 1976 από το άγνωστο έως τότε είδος *Streptomyces cattleya* (Εικόνα 15). Ήταν ενώσεις χημικά ασταθείς και δεν χρησιμοποιήθηκαν στην κλινική πράξη. Το έτος 1984 πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της ιμιπενέμης, η οποία χρησιμοποιήθηκε θεραπευτικά σε συνδυασμό με σιλαστατίνη λόγω του κινδύνου πρόκλησης νεφροτοξικότητας. Η μεροπενέμη που ανακαλύφθηκε στη συνέχεια δεν ήταν νεφροτοξική. Άλλες καρβαπενέμες για παρεντερική χρήση είναι η βιαπενέμη, η πανιπενέμη, η ερταπενέμη, η λεναπενέμη κ.ά. Καρβαπενέμες

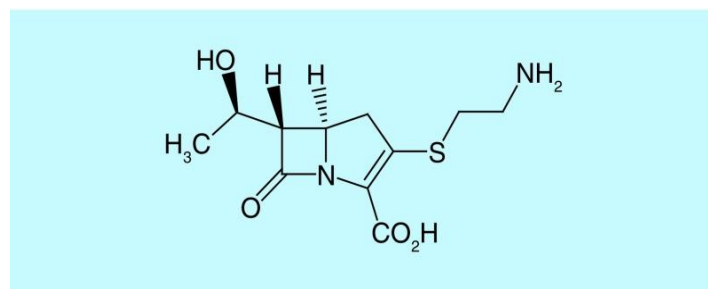
που χρησιμοποιούνται υπό δοκιμή από του στόματος είναι η σανφετρινέμη, η DZ-2640, η CS-834, η GV-129606 (Kattan, et al, 2008).

Οι καρβαπενέμες είναι τα αντιμικροβιακά εκλογής για τη θεραπεία σοβαρών λοιμώξεων σε «δυσμενείς» θέσεις που προκαλούνται από μικροοργανισμούς πολυανθεκτικούς (Naas, et al, 2005). Η αυξανόμενη χρήση των αντιμικροβιακών αυτών έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη αντοχής και στην ανάδυση στελεχών Εντεροβακτηριακών που είναι ανθεκτικά στις καρβαπενέμες. Η αντοχή στις καρβαπενέμες προκύπτει μέσω παραγωγής ενζύμων, που ονομάζονται καρβαπενεμάσες και υδρολύουν τις καρβαπενέμες, αντλιών ενεργητικής εκροής που εξωθούν το αντιμικροβιακό εκτός του βακτηριακού κυττάρου και μέσω της μεσολαβούμενης από πορίνες αντοχής που προκαλεί μείωση στην ποσότητα του αντιμικροβιακού που προσλαμβάνεται από το βακτηριακό κύτταρο (Elshamy and Aboshanab, 2020).



Εικόνα 14. Ο βασικός σκελετός της καρβαπενέμης

Πηγή: Elshamy and Aboshanab, 2020



Εικόνα 15. Η χημική δομή της θειαναμκίνης

Πηγή: Elshamy and Aboshanab, 2020.

3.2.4 Άλλες κατηγορίες β-λακταμικών αντιμικροβιακών

Στην ομάδα των β-λακταμικών αντιμικροβιακών ανήκουν επίσης :

1. **Οι μονοκυκλικές β-λακτάμες.** Πρόκειται για μια οικογένεια αντιμικροβιακών που παράγονται από βακτήρια. Στην κατηγορία αυτή ανήκει η Αζτρεονάμη, η οποία είναι η μοναδική μονοβακτάμη που χρησιμοποιείται από το 1984 στην κλινική πράξη (Drawz and Bonono, 2010; Bush and Bradford, 2016).
2. **Αναστολείς β-λακταμασών.** Τέτοιοι είναι το κλαβουλανικό οξύ, η ταζομπακτάμη και η σουλμπακτάμη. Διαθέτουν ένα β-λακταμικό δακτύλιο στο μόριό τους και δεν αναστέλλονται από λακταμάσες τάξης A (Zervosen, et al, 2012). Κανένας από τους αναστολείς αυτούς δεν χρησιμοποιείται ως μονοθεραπεία, διότι δεν διαθέτουν σημαντική αντιβακτηριδιακή δραστηριότητα αλλά χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με άλλα β-λακταμικά αντιμικροβιακά με τα οποία παρουσιάζουν συνεργική δράση (Zervosen, et al, 2012; Bush and Bradford, 2016).
3. **Αναστολείς β-λακταμασών χωρίς β-λακταμικό δακτύλιο.** Ο πρώτος αντιμικροβιακός παράγοντας αυτής της κατηγορίας είναι η αβιμπακτάμη με ευρύτερο φάσμα δράσης από το κλαβουλανικό οξύ. Χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την κεφταζιδίμη καθώς και με την κεφταρολίνη. Στην ίδια κατηγορία ανήκει η ρελεμπακτάμη, με παρόμοιο φάσμα δράσης με την αβιμπακτάμη και ένα παράγωγο του βορονικού οξέος (RPX7009), το οποίο σε συνδυασμό με τη μεροπενέμη είναι δραστικό έναντι παθογόνων που παράγουν καρβαπενεμάσες σερίνης (Bush and Bradford, 2016).

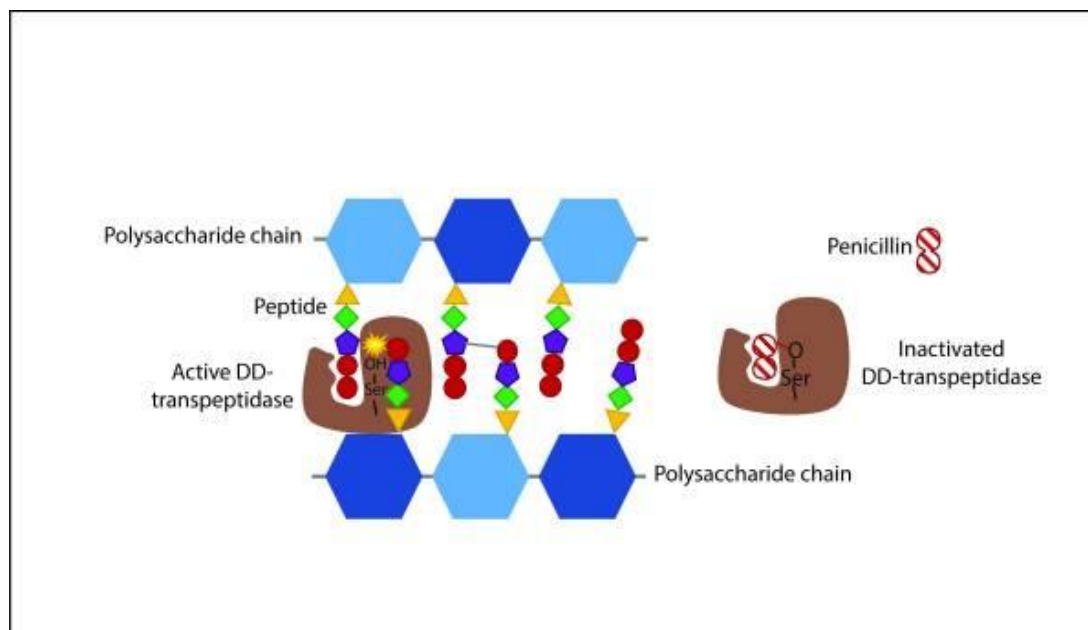
3.3 Μηχανισμός δράσης β-λακταμικών αντιμικροβιακών

Όλες οι β-λακτάμες είναι βακτηριοκτόνες και αναστέλλουν εκλεκτικά τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος διότι δεσμεύουν τις πενικιλινοδοσμευτικές πρωτεΐνες (PBPs), οι οποίες δρουν ως ένζυμα (τρανσπεπτιδάσες) στα τελικά στάδια της σύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης (Georgorapadaku and Liu, 1980). Η δομή των β-λακταμικών αντιμικροβιακών παρουσιάζει ομοιότητα με το ακυλιωμένο D-alanyl-D-alanine κατάλοιπο της πεπτιδογλυκάνης και για τον λόγο αυτό συνδέονται μη αντιστρεπτά με το ενεργό κέντρο των PBPs (Εικόνα 16). Αυτό οδηγεί στην αναστολή

της δράσης της τρανσπεπτιδάσης και την διακοπή σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος λόγω της αδυναμίας σχηματισμού των διασταυρούμενων συνδέσεων των πεπτιδίων (Lobanovska and Pilla, 2017; Elshamy and Aboshanab, 2020). Επιπρόσθετα, οι αυτολυσίνες του βακτηρίου συνεχίζουν να δρουν και προκαλούν λύση του βακτηρίου. Οι αυτολυσίνες εικάζεται ότι δημιουργούν εσοχές στο κυτταρικό τοίχωμα που αποτελούν σημεία πρόσφυσης των νέων μονάδων της πεπτιδογλυκάνης. Εφόσον δεν συντίθενται νέες μονάδες, από τα σημεία αυτά εξέρχεται η κυτταρική μεμβράνη και τελικά διαρρηγνύεται λόγω οσμωτικού stress (Scholar and Pratt, 2000).

Τα β-λακταμικά αντιμικροβιακά δρουν στη φάση πολλαπλασιασμού των μικροβίων, δηλαδή παρεμποδίζουν τη δημιουργία του κυτταρικού τοιχώματος και δεν καταστρέφουν το ήδη υπάρχον (Greenwood and Ogilvie, 2007). Στοχεύουν αποκλειστικά τα βακτήρια διότι κυτταρικό τοίχωμα απουσιάζει από τα ευκαρυωτικά κύτταρα (Lobanovska and Pilla, 2017). Ο κύριος μηχανισμός που διαθέτουν τα Εντεροβακτηριακά για την ανάπτυξη αντοχής στα β-λακταμικά αντιμικροβιακά είναι η παραγωγή ενζύμων, των β-λακταμασών, όπως θα αναλυθεί εκτενέστερα (Livermore, 2012).

Υπάρχουν 7 είδη PBPs, οι 1a, 1b, 2, 3, 4, 5, 6 και 7 (Sauvage, et al, 2008). Κάθε είδος βακτηρίου διαθέτει συγκεκριμένα είδη PBPs. Τουλάχιστον μια PBP σε κάθε είδος βακτηρίων παρουσιάζει ειδικότητα για σύνδεση με τα β-λακταμικά αντιμικροβιακά. Στα gram αρνητικά βακτήρια η αναστολή των 1a και 1b PBPs είναι υπεύθυνη για τη λύση του βακτηρίου, η αναστολή της PBP2 οδηγεί στο σχηματισμό σταθερών σφαιρικών σχηματισμών, οι οποίοι αυτολύονται και η αναστολή της PBP3 προκαλεί παρεμπόδιση της διαίρεσης του κυτταρικού τοιχώματος με αποτέλεσμα το θάνατο του μικροβίου (Spratt, 1983). Η πενικιλίνη G και τα περισσότερα β-λακταμικά αντιμικροβιακά συνδέονται με την PBP1 και την PBP3, ενώ οι καρβαπενέμες συνδέονται με την PBP2 (Γιαμαρέλλου, και συν, 2009).



Εικόνα 16. Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης της πενικιλίνης.

Η πεπτιδογλυκάνη συντίθεται από αλυσίδες πολυσακχαριτών που αποτελούνται από μονάδες GlcNAc και MurNAc (παρουσιάζονται με διαφορετικές αποχρώσεις του μπλε), οι οποίες έχουν μικρά πεπτίδια συνδεδεμένα σε αυτές. Η τρανσπεπτιδάση (PBP) (καφέ χρώμα), καταλύει τον σχηματισμό διασταυρούμενων συνδέσεων ανάμεσα σε αυτά τα πεπτίδια, συνδέοντας τα τελικά δυο κατάλοιπα D-alanine του ενός πεπτιδίου (κόκκινοι κύκλοι). Η πενικιλίνη μιμείται τη δομή των δυο αυτών καταλοίπων, συνδέεται μη αντιστρεπτά με ομοιοπολικό δεσμό με το ενεργό κέντρο σερίνης των PBPs.

Πηγή: Lobanovska and Pilla, 2017

3.4 Αντιμικροβιακό φάσμα β-λακταμικών αντιμικροβιακών

3.4.1 Πενικιλίνες

Οι φυσικές πενικιλίνες (Πενικιλίνη G, Πενικιλίνη V) είναι κυρίως δραστικές έναντι των gram θετικών κόκκων, ενώ δεν είναι δραστικές έναντι των gram αρνητικών βακτηρίων (Procop, et al, 2017). Οι ανθεκτικές στην πενικιλινάση πενικιλίνες (μεθικιλίνη, οξακιλίνη, ναφκιλίνη κ.ά.) χρησιμοποιούνται συνήθως για τη θεραπεία λοιμώξεων από σταφυλοκόκκους που παράγουν πενικιλινάσες. Οι αμινοπενικιλίνες (αμοξικιλίνη, αμπικιλίνη, κ.ά.) είναι δραστικές έναντι gram αρνητικών βακτηρίων, όπως *E. coli*, *P. mirabilis*, *Shigella spp*, *Salmonella spp*, *Listeria spp* και *Haemophilus spp*. Οι καρβοξυπενικιλίνες και οι ουρεϊδοπενικιλίνες είναι ακόμα πιο δραστικές έναντι των Εντεροβακτηριακών και της *P. aeruginosa*

συγκριτικά με τις αμινοπενικιλίνες (Wright and Wilkowske, 1987). Η καρβενικιλίνη ήταν η πρώτη αντιψευδομοναδική πενικιλίνη και η πιπερακιλλίνη και η τικαρκιλίνη έχουν ένα ευρύ αντιμικροβιακό φάσμα που περιλαμβάνει τους ευαίσθητους στην πενικιλίνη σταφυλοκόκκους, τα Εντεροβακτηριακά, τα αναερόβια βακτήρια και την *P. aeruginosa*. Συχνά συνδυάζονται με τους αναστολείς β-λακταμασών (Bush and Bradford, 2016).

Οι πενικιλίνες είναι ευαίσθητες στη δράση β-λακταμασών και γι' αυτό το λόγο έχει περιοριστεί η χρήση τους ως μονοθεραπεία. Σταθερότητα στις εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (ESBLs) αποκτούν όταν συνδυάζονται με αναστολείς β-λακταμασών (Bush, 2013). Η μεκιλλινάμη και η τεμοκιλλίνη, αν και παλαιότερες πενικιλίνες, λόγω της σταθερότητας σε παραγόμενες εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες χρησιμοποιούνται και πάλι για την αντιμετώπιση λοιμώξεων από Εντεροβακτηριακά που παράγουν ESBL και συχνά παρουσιάζουν αποτελεσματικότητα έως και > 90% (Giske, 2015).

3.4.2 Κεφαλοσπορίνες

Από τις κεφαλοσπορίνες, οι πρώτης γενεάς είναι κυρίως δραστικές έναντι gram θετικών μικροοργανισμών και περισσότερο ευαίσθητες στις β-λακταμάσες που παράγουν gram αρνητικά βακτήρια, ενώ οι κεφαλοσπορίνες δεύτερης γενεάς είναι περισσότερο ανθεκτικές στις παραγόμενες β-λακταμάσες των gram αρνητικών βακτηρίων. Οι τρίτης γενεάς κεφαλοσπορίνες είναι δραστικές έναντι των Εντεροβακτηριακών και πιο ανθεκτικές στις β-λακταμάσες που παράγουν πολυανθεκτικά βακτήρια (Forti, 1994). Οι κεφαμυκίνες είναι δραστικές έναντι των Εντεροβακτηριακών που παράγουν ESBL και χρησιμοποιούνται για την διάκριση αυτών των στελεχών από εκείνα που παράγουν Amp-C κεφαλοσπορινάσες (Tamma and Rodriguez-Bano, 2017). Η κεφεπίμη και η κεφπιρόμη ανήκουν στις κεφαλοσπορίνες τέταρτης γενεάς και το αντιμικροβιακό φάσμα δράσης τους περιλαμβάνει τόσο gram θετικούς κόκκους όσο και gram αρνητικά βακτήρια. Ιδιαίτερα η κεφεπίμη είναι δραστική έναντι στελεχών *Enterobacter* και *Pseudomonas spp* ανθεκτικών στις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενεάς και ενδείκνυται για την εμπειρική θεραπεία λοιμώξεων από *Enterobacter spp* (Giamarellou, 1999).

3.4.3 Καρβαπενέμες

Οι καρβαπενέμες έχουν μεγαλύτερο εύρος δράσης συγκριτικά με τα άλλα β-λακταμικά αντιμικροβιακά και την ισχυρότερη δραστηριότητα έναντι gram θετικών και gram αρνητικών βακτηρίων. Γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται ως αντιμικροβιακά τελευταίας επιλογής σε ασθενείς με σοβαρές λοιμώξεις από ανθεκτικά βακτήρια. Η ιμιπενέμη, η δοριπενέμη και η πανιπενέμη (δεν χρησιμοποιείται στην Ευρώπη) είναι δραστικές και έναντι gram θετικών βακτηρίων, ενώ η μεροπενέμη, η ερταπενέμη και η δοριπενέμη είναι ελαφρώς πιο δραστικές έναντι gram αρνητικών βακτηρίων (Wallace-Papp, et al, 2011). Παρουσιάζουν χαμηλή διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης των gram αρνητικών βακτηρίων και διέρχονται μέσω των πορινών που αυτή διαθέτει. Αναστέλλουν τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος μέσω δέσμευσης των PBPs μέσω ακυλίωσης (Armstrong, et al, 2021).

Η μεροπενέμη χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση σοβαρών ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων αγνώστου αιτιολογίας καθώς και σε περιπτώσεις μηνιγγίτιδας διότι διέρχεται τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Armstrong, et al, 2021). Η ιμιπενέμη έχει δραστηριότητα έναντι εντερικών βακτηρίων που δεν παράγουν καρβαπενεμάσες (Bush and Bradford, 2016). Η δοριπενέμη και η μεροπενέμη είναι εξίσου δραστικές έναντι των Εντεροβακτηριακών και τουλάχιστον τέσσερις φορές πιο ισχυρές από την ιμιπενέμη. Και τα τρία αντιμικροβιακά που προαναφέρονται έχουν χαμηλή δραστηριότητα έναντι του *Acinetobacter spp* (Nordmann, et al, 2011). Η δοριπενέμη έχει παρόμοια δραστηριότητα με την ιμιπενέμη και την ερταπενέμη έναντι gram θετικών βακτηρίων (Livemore, et al, 2003), ενώ η τελευταία δεν δρα έναντι της *P. aeruginosa* (Armstrong, et al, 2021).

Η ιμιπενέμη και η μεροπενέμη έχουν υψηλή σταθερότητα έναντι των β-λακταμασών σε σχέση με τα άλλα β-λακταμικά αντιμικροβιακά και αυτό αφορά τις λακταμάσες τάξης A, C και D. Είναι ευαίσθητες έναντι των λακταμασών τάξης B που εκφράζουν όλο και πιο συχνά στελέχη Εντεροβακτηριακών και *Pseudomonas spp* (Livemore, 1998; Shahid, et al, 2009).

3.5 Μηχανισμοί αντοχής Εντεροβακτηριακών στα β-λακταμικά αντιμικροβιακά

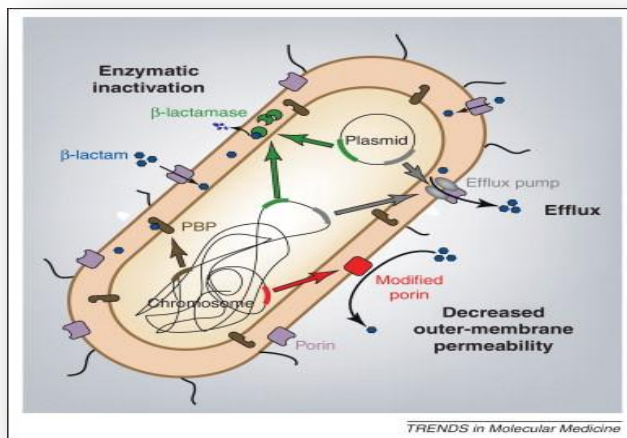
Η μικροβιακή αντοχή αποτελεί ένα φυσικό φαινόμενο εξέλιξης για τα βακτήρια, το οποίο ωστόσο επιταχύνεται από την εκλεκτική πίεση που ασκείται στους μικροοργανισμούς από τη χρήση αλλά και την κατάχρηση των αντιμικροβιακών σε ανθρώπους και οικόσιτα ζώα (Sugden, et al, 2016). Η αντοχή των Εντεροβακτηριακών και γενικότερα των μικροβίων διακρίνεται σε εγγενή και επίκτητη (Tenover, 2006). Οι μηχανισμοί αντοχής των Εντεροβακτηριακών και των gram αρνητικών βακτηρίων φαίνονται στην Εικόνα 17 και αναλύονται διεξοδικότερα παρακάτω.

- **Εγγενής αντοχή:** Ως φυσικό αποτέλεσμα της συνύπαρξης κλινικά σημαντικών βακτηρίων με μικροοργανισμούς του περιβάλλοντος (π.χ. του εδάφους) που παράγουν αντιμικροβιακούς παράγοντες, και άλλων που διαθέτουν στο γονιδίωμά τους μηχανισμούς αντοχής, έχει αναπτυχθεί η εγγενής αντοχή των βακτηρίων και βρίσκεται σε όλα τα είδη βακτηρίων (D'Costa, et al., 2011; Cox and Wright, 2013). Ένα μικρόβιο μπορεί να είναι ανθεκτικό εγγενώς σε περισσότερα του ενός αντιμικροβιακά, οπότε σε αυτές τις περιπτώσεις όλα τα στελέχη του συγκεκριμένου είδους είναι ανθεκτικά (Tenover, 2006). Η εγγενής (φυσική) αντοχή μεταβιβάζεται από γενεά σε γενεά και αφορά όλες τις ιδιότητες ενός μικροοργανισμού, οι οποίες σχετίζονται με τα χαρακτηριστικά του και του προσδίδουν αντοχή σε ένα αντιμικροβιακό (Fernandez and Hancock, 2012). Είναι ανεξάρτητη από την πίεση επιλογής που ασκείται στα μικρόβια από την επίδραση των αντιμικροβιακών και δεν οφείλεται σε οριζόντια μεταφορά γενετικού υλικού. Γονίδια που κωδικοποιούν αυτό το είδος αντοχής βρίσκονται στο γονιδίωμα ενός βακτηριακού είδους σε παγκόσμια κλίμακα (Cox and Wright, 2013). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο φαινότυπος πολυαντοχής που παρατηρείται σε gram αρνητικά βακτήρια που είναι ανθεκτικά σε πολλές τάξεις αντιμικροβιακών, όπως τα γλυκοπεπτιδία, τα οποία είναι κλινικά δραστικά έναντι gram θετικών μικροβίων. Αυτό το φαινόμενο οφείλεται κυρίως στην εξωτερική μεμβράνη των gram αρνητικών που είναι

αδιαπέραστη για αρκετά μόρια και στην παρουσία αντλιών ενεργητικής εκροής που μειώνουν την ενδοκυττάρια συγκέντρωση του αντιμικροβιακού που χορηγείται (Nikaido, 1994). Εγγενείς μηχανισμοί αντοχής κωδικοποιούνται από γονίδια που προκύπτουν φυσικά και βρίσκονται στο χρωμόσωμα των βακτηρίων, όπως οι AmpC-β-λακταμάσες και αντλίες ενεργητικής εκροής τύπου MDR (Alekshun and Levy, 2007). Είδη του γένους *Enterobacter* είναι εγγενώς ανθεκτικά στην αμπικιλίνη, αμοξικιλίνη, αμοξικιλίνη-κλαβουλανικό, πρώτης γενεάς κεφαλοσπορίνες και την κεφοξιτίνη, ενώ η *K. pneumoniae* είναι εγγενώς ανθεκτική στις ημισυνθετικές πενικιλίνες (Bouza and Cercenado, 2002).

- **Επίκτητη Αντοχή:** Το φαινόμενο της επίκτητης αντοχής είναι αρκετά πιο σοβαρό, διότι ευαίσθητα βακτήρια αποκτούν αντοχή σε ένα ή περισσότερα αντιμικροβιακά λόγω της πίεσης επιλογής που ασκείται σε αυτά από την υπέρμετρη χρήση των αντιμικροβιακών παραγόντων. Αυτό προκύπτει μέσω γενετικής μετάλλαξης και επιλογής ή μέσω απόκτησης, με οριζόντια μεταφορά από άλλα βακτήρια, γενετικού υλικού που φέρει γονίδια αντοχής (Tenover, 2006; Fernandez and Hancock, 2012; Christaki, et al, 2020). Πολυανθεκτικά βακτήρια, ανθεκτικά σε 3 ή περισσότερες τάξεις αντιμικροβιακών, προκύπτουν με αυτό τον τρόπο και η διασπορά τους τόσο στο περιβάλλον του νοσοκομείου, όσο και στην κοινότητα αποτελεί μείζων πρόβλημα της δημόσιας υγείας (Tenover, 2006). Η επίκτητη αντοχή αποτελεί ένα σταθερό φαινόμενο και μπορεί να μεταδοθεί και κάθετα σε μεταγενέστερες γενεές του μικροβίου (Fernandez and Hancock, 2012).

Τα Εντεροβακτηριακά, όπως όλα τα gram αρνητικά βακτήρια, αναπτύσσουν αντοχή έναντι των β-λακταμικών αντιμικροβιακών μέσω παραγωγής ενζύμων, των β-λακταμασών, μέσω απώλειας ή μειωμένης έκφρασης πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης (Outer membrane proteins, OMPs), των πορινών ή και μέσω άλλων μη ενζυματικών μηχανισμών (Babic, et al, 2006; Ruppe, et al, 2015). Αυτοί οι μηχανισμοί είτε εκφράζονται εγγενώς σε ένα είδος βακτηρίου ή αποκτώνται από έναν υποπληθυσμό βακτηρίων μέσω μετάλλαξης ή οριζόντιας μεταφοράς (Ruppe, et al, 2015).



Εικόνα 17. Μηχανισμοί αντοχής Εντεροβακτηριακών

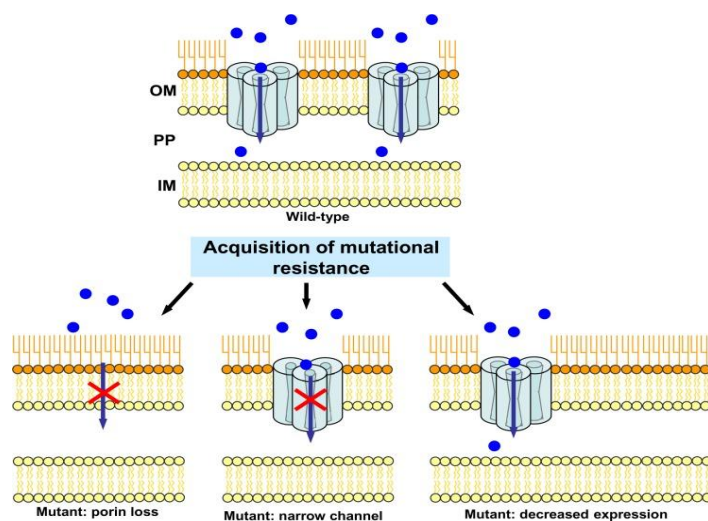
Πηγή: Nordmann, et al, 2012

3.5.1 Μειωμένη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης

Η εξωτερική μεμβράνη των gram αρνητικών βακτηρίων είναι σχετικά αδιαπέραστη λόγω της μορφολογίας της. Γι' αυτό το λόγο, τα gram αρνητικά βακτήρια διαθέτουν επιπλέον μηχανισμούς που συμβάλλουν στην πρόσληψη θρεπτικών ουσιών (Cox and Wright, 2013). Ένας τέτοιος μηχανισμός είναι πρωτεΐνες-κανάλια της εξωτερικής μεμβράνης, οι πορίνες. Αυτές αποτελούν δίοδο που επιτρέπει την είσοδο στο εσωτερικό του βακτηριακού κυττάρου μιας πληθώρας θρεπτικών ουσιών, αλλά εμποδίζουν την είσοδο διαφόρων αντιμικροβιακών, συμβάλλοντας έτσι στην ενδογενή αντοχή (Ruiz, et al, 2003). Αποτρέπουν την είσοδο στο κύτταρο, μεγάλων ή υδρόφοβων μορίων αντιμικροβιακών, ενώ επιπλέον μπορεί να τα απωθούν λόγω του φορτίου τους (Decad and Nikaido, 1976; Nikaido, et al, 1983; Livermore, 2012).

Τα β-λακταμικά αντιμικροβιακά αποτελούν υδρόφιλα μόρια που διαπερνούν την εξωτερική μεμβράνη των gram αρνητικών βακτηρίων μέσω των πορινών (Delcour, 2009). Ο βαθμός ευαισθησίας σε ένα αντιμικροβιακό εξαρτάται από τον αριθμό και τον τύπο των πορινών που εκφράζει το βακτηριακό κύτταρο. Μεταλλάξεις

που επηρεάζουν την έκφραση ή και τη λειτουργία της πορίνης προκαλούν αλλαγή της ευαισθησίας του βακτηρίου στο αντιμικροβιακό. Συνήθως προκαλείται απώλεια πορίνης ή αλλαγή στο μέγεθος του πρωτεϊνικού καναλιού ή χαμηλή έκφραση της πορίνης (Εικόνα 18). Τυπικό παράδειγμα αποτελεί η *K. pneumoniae* που διαθέτει την ικανότητα να αλλάζει τον τύπο της πορίνης που εκφράζει, από OMPK35 σε OMPK36 κατά τη διάρκεια αντιμικροβιακής θεραπείας με αποτέλεσμα 4-8 φορές μείωση στην ευαισθησία σε αρκετά β-λακταμικά αντιμικροβιακά, λόγω μείωσης του μεγέθους του πρωτεϊνικού καναλιού (Fernandez and Hancock, 2012; Munita and Arias, 2016). Απώλεια της OMPK ή της OMPF πορίνης στην *E. coli* οδηγεί σε αντίσταση στις β-λακτάμες ενώ απώλεια της OMPK35 της *Klebsiella spp* οδηγεί σε αντοχή σε κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες, κινολόνες και χλωραμφαινικόλη (Fernandez and Hancock, 2012). Αυτός ο μηχανισμός αντοχής, μειώνει τον ρυθμό εισόδου μικρών μορίων στο βακτηριακό κύτταρο, αλλά όταν δεν συνδυάζεται με άλλους μηχανισμούς αντοχής προσδίδει στο κύτταρο χαμηλού επιπέδου αντοχή (Cox and Wright, 2013).



Εικόνα 18. Παραδείγματα διαφορετικών μηχανισμών αντοχής που συσχετίζονται με τις πορίνες.

Οι μπλε κουκίδες αντιπροσωπεύουν τα μόρια του αντιμικροβιακού και το κόκκινο X καταδεικνύει ότι το αντιμικροβιακό δεν είναι ικανό να διαπεράσει την εξωτερική μεμβράνη. IM: Εσωτερική μεμβράνη, OM: Εξωτερική μεμβράνη, PP: Περιπλαστικός χώρος

Πηγή: Fernandez and Hancock, 2012

3.5.2 Αντλίες ενεργητικής εκροής

Οι αντλίες ενεργητικής εκροής αποτελούν σημαντικό μηχανισμό αντοχής σύμφωνα με τον οποίο τα μικρόβια εκκρίνουν αντιμικροβιακούς παράγοντες εκτός του κυττάρου. Έχουν αναφερθεί πέντε οικογένειες αντλιών, η ABC (ATP binding cassette superfamily), η MATE (multidrug and toxic compound extrusion family), η MFS (major facilitator superfamily), η SMR (small multi-drug resistance family) και η RND (resistance nodulation division superfamily) (Li and Nikaido, 2009; Salabi, et al, 2012). Πρόκειται για μεμβρανικές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από γονίδια που βρίσκονται σε πλασμίδια ή στο χρωμόσωμα (Poole, 2007; Nikaido, 2009). Μπορεί να είναι ειδικές για ένα συγκεκριμένο αντιμικροβιακό ή να έχουν την ικανότητα να απεκκρίνουν περισσότερα αντιμικροβιακά, όπως παρατηρείται στα πολυανθεκτικά βακτήρια. Τέτοιες αντλίες που διαθέτουν τα Εντεροβακτηριακά είναι οι AcrAR-TolC. Αντλίες ενεργητικής εκροής που ανήκουν στην οικογένεια RND και κωδικοποιούνται από το χρωμόσωμα παίζουν ιδιαίτερο ρόλο στην ενδογενή αντοχή κλινικά σημαντικών gram αρνητικών βακτηρίων. Ένα παράδειγμα στο βακτήριο *E. coli* αποτελεί το σύστημα AcrAB-TolC, το οποίο αποτελείται από μια πρωτεΐνη μεταφορέα που εντοπίζεται στην εσωτερική μεμβράνη (Acr-B), μια πρωτεΐνη συνδέτη που εντοπίζεται στον περιπλασμικό χώρο (AcrA) και μια πρωτεΐνη διάλυο που εντοπίζεται στην εξωτερική μεμβράνη (TolC) (Munita and Arias, 2016).

3.5.3 Τροποποιημένος στόχος δράσης

Τα βακτήρια είναι ικανά να αναπτύξουν αντοχή στη δράση των αντιμικροβιακών, είτε μέσω αλλαγών στη δομή της θέσης πρόσδεσης του αντιμικροβιακού που οδηγούν σε χαμηλή συνάφεια του σημείου πρόσδεσης με το αντιμικροβιακό, είτε προστατεύοντας τη θέση πρόσδεσης έτσι ώστε να μην είναι εφικτό το αντιμικροβιακό να προσδεθεί (Munita and Arias, 2016). Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί λόγω σημειακών μεταλλάξεων στο στόχο δράσης του αντιμικροβιακού και μέσω απόκτησης γενετικού υλικού από άλλους μικροοργανισμούς, ικανού να κωδικοποιεί για παράδειγμα μία νέα PBP, όπως συμβαίνει με τον ανθεκτικό στη μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus* (Methicillin

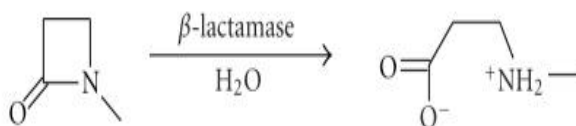
resistant *S. aureus*-MRSA) (Nikaido, 2009). Αυτός ο μηχανισμός αντοχής δεν παρατηρείται στα Εντεροβακτηριακά.

3.5.4 Αδρανοποίηση β-λακταμικών αντιμικροβιακών μέσω παραγωγής ενζύμων

Ο κυριότερος μηχανισμός αντοχής των Εντεροβακτηριακών στα β-λακταμικά αντιμικροβιακά είναι η παραγωγή ενζύμων, των β-λακταμασών (Ambler, 1980; Babic, et al, 2006; Bush, 2010). Η παραγωγή αυτών των πρωτεϊνικής φύσης ουσιών κωδικοποιείται από γονίδια που εδράζουν, είτε στο χρωμόσωμα, είτε σε μεταθετά στοιχεία. Ανάλογα με την γενετική τους θέση, είναι δυνατό η παραγωγή τους να είναι ιδιοσυστασιακή ή επαγωγήμη (Babic, et al, 2006; Bush, 2010; Bush, 2013). Στα gram αρνητικά βακτήρια, οι β-λακταμάσες δρουν υδρολύοντας τον αμιδικό δεσμό του τετραμελούς β-λακταμικού δακτυλίου του μορίου της β-λακτάμης (Εικόνα 19), όταν αυτό βρίσκεται στον περιπλαστικό χώρο, εμποδίζοντας με τον τρόπο αυτό την αναστολή της λειτουργίας των PBPs (Ruppe, et al, 2015; Tooke, et al, 2019). Περισσότερα από 2000 ένζυμα έχουν πλέον απομονωθεί και το καθένα διαθέτει μια μοναδική αλληλουχία αμινοξέων (Bonono, 2017). Είναι δυνατό να παράγονται από gram αρνητικά αλλά και από gram θετικά βακτήρια (Tooke, et al, 2019). Ένας μικροοργανισμός μπορεί να παράγει έως και οχτώ διαφορετικές β-λακταμάσες (Bush, 2010; Bush and Fischer, 2011). Οι εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (ESBLs) και οι καρβαπενεμάσες παρουσιάζουν παγκόσμια διασπορά (Bush, 2013).

Η πρώτη β-λακταμάση ταυτοποιήθηκε από στέλεχος *E. coli* πριν την εισαγωγή της πενικιλίνης στην κλινική πράξη (Abraham and Chain, 1988). Ωστόσο η παρουσία των ενζύμων αυτών στο φυσικό περιβάλλον χρονολογείται έως και 30.000 πριν, σύμφωνα με θραύσματα γενετικού υλικού που βρέθηκαν σε απολιθωμένα δείγματα (Bush, 2013). Με την εισαγωγή των β-λακταμικών αντιμικροβιακών στην κλινική πράξη, η επικράτηση και η ποικιλότητα των ενζύμων αυτών αυξήθηκε σημαντικά (Knapp, et al, 2010). Όταν αυτός ο μηχανισμός συνδυάζεται με άλλους μηχανισμούς αντοχής, όπως με μειωμένη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης ή με αυξημένη έκφραση των αντλιών ενεργητικής εκροής,

προκύπτουν στελέχη με υψηλού επιπέδου αντοχή, που αποτελούν σημαντικό κλινικό πρόβλημα (Bonono, 2016).



Εικόνα 19. Υδρόλυση του αμιδικού δεσμού του β-λακταμικού δακτυλίου.

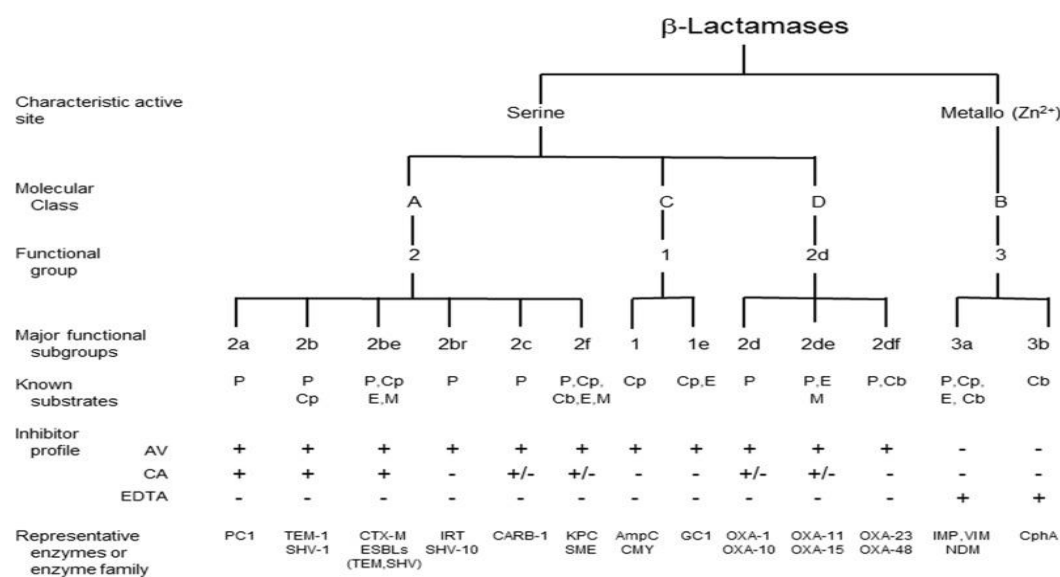
Πηγή: Page and Badarau, 2008

3.5.4.1 β-λακταμάσες: Ταξινόμηση

Η πρώτη ταξινόμηση των β-λακταμασών πραγματοποιήθηκε από τους Jack και Richmond το 1970 και διευρύνθηκε περαιτέρω από τους Richmond και Sykes το 1973 (Richmond and Sykes, 1973). Η ταξινόμηση είχε επιτευχθεί με βάση το φάσμα και εύρος υδρόλυσης των ενζύμων, την ευαισθησία σε αναστολείς και την θέση (χρωμόσωμα ή πλασμίδια) των γονιδίων που τα κωδικοποιούν (Richmond and Sykes, 1973). Το 1989 προτάθηκε νέα ταξινόμηση (Bush, 1989), η οποία οργανώνει εκ νέου τα ένζυμα και επικαιροποιείται και πάλι το 1995 (Bush, et al, 1995). Σύμφωνα με αυτή την λειτουργική ταξινόμηση κατά Bush, ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με βάση τα υποστρώματα που υδρολύονται από τα ένζυμα (πενικιλίνη, οξακιλλίνη, καρβενικιλίνη, κεφαλοριδίνη, ευρέος φάσματος κεφαλοσπορίνες, μιπενέμη) και την ευαισθησία τους στο κλαβουλανικό οξύ. Οι β-λακταμάσες διακρίνονται σε τέσσερις λειτουργικές ομάδες (1, 2, 3, 4) και σε οχτώ υποομάδες (2a, 2b, 2be, 2br, 2c, 2d, 2e, 2f). Η φαινοτυπική αυτή ταξινόμηση, παρουσιάζει ένα μειονέκτημα. Σημειακές μεταλλάξεις είναι δυνατό να αλλάξουν την ειδικότητα του ενζύμου ως προς το υπόστρωμά του καθώς και την ευαισθησία στους αναστολείς, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε ανακατάταξη του ενζύμου σε άλλη λειτουργική ομάδα (Livermore, 1995).

Ο πιο διαδεδομένος τρόπος ταξινόμησης των β-λακταμασών είναι η ταξινόμηση κατά Ambler σύμφωνα με την οποία οι β-λακταμάσες διακρίνονται σε

τέσσερις μοριακές τάξεις (A, B, C και D), σύμφωνα με την αλληλουχία των αμινοξέων τους (Ambler,1980; Ambler, et al, 1991) (Εικόνα 20). Στις τάξεις A, C, και D περιλαμβάνονται ένζυμα τα οποία διαθέτουν εστέρα σερίνης στο ενεργό τους κέντρο, ενώ οι β-λακταμάσες τάξης B είναι μεταλλοένζυμα, τα οποία χρησιμοποιούν τουλάχιστον ένα ιόν ψευδαργύρου στο ενεργό τους κέντρο για να υδρολύσουν το υπόστρωμά τους. Η ταξινόμηση με βάση τη μοριακή δομή είναι περισσότερο απλή και σταθερή, εντούτοις η λειτουργική ταξινόμηση σύμφωνα με τα υποστρώματα που υδρολύονται και την ευαισθησία έναντι του κλαβουλανικού οξέος είναι περισσότερο πρακτική, διότι παρέχει στον κλινικό ιατρό την δυνατότητα να συσχετίσει τον φαινότυπο αντοχής που παρουσιάζει ένα βακτήριο με τις ιδιότητες του ενζύμου που παράγεται (Bush, et al, 1995; Bush and Jacoby, 2010). Από την δεκαετία 1980 έχει παρατηρηθεί μια δραματική αύξηση του αριθμού και είδους των β-λακταμασών και αυτό οφείλεται κυρίως στις β-λακταμάσες τάξης A και D (Canton, et al, 2012).



Εικόνα 20. Μοριακά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των μεγάλων ομάδων β-λακταμασών.

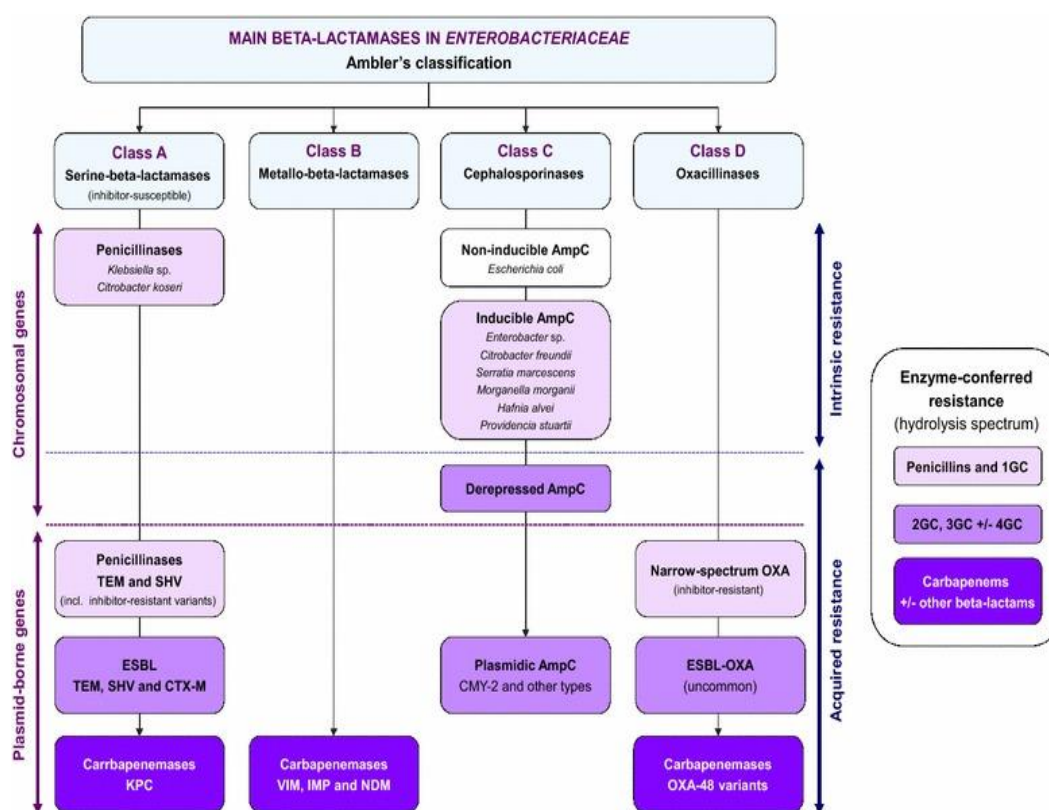
Οι μοριακές τάξεις βασίζονται στην ταξινόμηση κατά Ambler. Οι λειτουργικές ομάδες με τα προφίλ του υποστρώματος και του αναστολέα προέρχονται από την ταξινόμηση που αρχικά προτάθηκε από τον Bush και διευρύνθηκε το 1995 και το 2010. Υποομάδες που περιλαμβάνουν τα πιο επικρατή ένζυμα ή οικογένειες ενζύμων παρουσιάζονται με βάση πρόσφατες επιδημιολογικές μελέτες. Συντομοεύσεις AV: Αβιμπακτάμη, CA: Κλαβουλανικό Οξύ, EDTA: αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ, Cb: Καρβαπενέμη, Cp: Κεφαλοσπορίνη, E: Ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνη, M: Μονοβακτάμη, P: Πενικιλίνη

Πηγή: Bush,2013; Bush, 2018

3.5.4.1.1 Μοριακή Ταξινόμηση κατά Ambler

3.5.4.1.1.1 Τάξη Α

Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται β-λακταμάσες με εστέρα σερίνης στο ενεργό τους κέντρο. Πρόκειται κυρίως για πενικιλινάσες και κεφαλοσπορινάσες, η δράση των οποίων αναστέλλεται από το κλαβουλανικό οξύ (Samaha-Kfoury and Araj, 2003). Για τα Εντεροβακτηριακά, στην τάξη Α των β-λακταμασών (Σχήμα 1) περιλαμβάνονται κυρίως οι TEM-1, TEM-2, SHV-1, οι ESBLs τύπου TEM, SHV, CTX-M και οι KPC καρβαπενεμάσες (Bush, et al, 1995; Tzouvelekis and Bonono, 1999; Bush and Jacoby, 2010; Bush, 2013; Bush, 2018). Τα υπεύθυνα γονίδια εντοπίζονται συνήθως σε πλασμίδια, αλλά είναι δυνατό να βρίσκονται και στο χρωμόσωμα του βακτηρίου (Bonono, 2017).



Σχήμα 1. Εγγενείς και επίκτητες β-λακταμάσες στα Εντεροβακτηριακά.

Πηγή: Ruppe, et al, 2015

- **Ευρέως Φάσματος β-λακταμάσες (Broad Spectrum β-lactamases):** Εδώ ανήκουν τα ένζυμα TEM-1, TEM-2, SHV-1, που περιλαμβάνονται στην λειτουργική ομάδα 2b, κατά Bush-Jacoby-Medeiros και ευρύτερα κάποιες OXA β-λακταμάσες, οι οποίες υπάγονται στην μοριακή τάξη D και την λειτουργική ομάδα 2d. Υδρολύουν την πενικιλίνη G, αμινοπενικιλίνες, καρβενικιλίνες και κεφαλοσπορίνες πρώτης γενεάς και αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ. Οι OXA β-λακταμάσες υδρολύουν επιπλέον τη μεθικιλίνη και την οξακιλλίνη (Bush, et al, 1995; Livermore, 1995; Paterson and Bonomo, 2005). Η TEM-1 είναι η πιο συχνή β-λακταμάση που παράγεται από gram αρνητικά βακτήρια, ενώ η TEM-2 προκύπτει από την TEM-1 με μια μόνο αντικατάσταση αμινοξέος (Bradford, 2001).

- **Εκτεταμένου Φάσματος β-λακταμάσες (Extended Spectrum β-lactamases, ESBLs):** Οι ESBLs κατατάσσονται στη λειτουργική ομάδα 2be κατά Bush-Jacoby-Medeiros. Τα ένζυμα αυτής της ομάδας προκύπτουν από σημειακές μεταλλάξεις σε συγκεκριμένες περιοχές των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα της ομάδας 2b. Σε αυτές ανήκουν πάνω από 90 είδη ενζύμων TEM, περισσότερα από 25 είδη SHV (Bradford, 2001) καθώς και ένζυμα CTX-M, PER, GES, VEB, CME, SFO, BES, BEL, TLA (Naas, et al, 2008; Shaikh, et al, 2015). Υδρολύουν την πενικιλίνη, τις κεφαλοσπορίνες πρώτης, δεύτερης, τρίτης γενεάς και τις μονοβακτάμες. Αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ, τη σουλμπακτάμη, την ταζομπακτάμη και δεν υδρολύουν τις κεφαμυκίνες (κεφοξιτίνη και κεφοτετάνη) και τις καρβαπενέμες (Salabi, et al, 2013). Ωστόσο με απώλεια μιας πορίνης του βακτηρίου είναι δυνατό το βακτήριο να αποκτήσει αντοχή και στις κεφαμυκίνες (Martinez-Martinez, et al, 1996).

- ✓ Η **TEM-3** είναι το πρώτο ένζυμο από την οικογένεια TEM που εκδήλωσε τον φαινότυπο ESBL και έγινε γνωστή το 1989 (Bradford, 2001; Paterson and Bonomo, 2005).

- ✓ Η **SHV-2** ανακαλύφθηκε το 1983 σε στέλεχος *Klebsiella ozaenae* στη Γερμανία. Διαφέρει από την SHV-1 από την οποία προέρχεται, σε ένα αμινοξύ στη θέση 238, όπου η γλυκίνη αντικαταστάθηκε από σερίνη (Knothe, et al, 1983; Jacoby, 1997). Μέσα σε 15 χρόνια από την απομόνωσή της, τα ένζυμα τύπου SHV παρουσίασαν παγκόσμια διασπορά και είναι από τα πιο συχνά απομονούμενα είδη ESBL (Jacoby, 1997).

- ✓ Τα ένζυμα της οικογένειας **CTX-M** ανακαλύφθηκαν στα τέλη της δεκαετίας 1980 και προέρχονται από χρωμοσωμικά γονίδια της *Kluyvera spp.* Τα ένζυμα αυτής της οικογένειας δεν προκύπτουν από σημειακές μεταλλάξεις των γονιδίων, αλλά από οριζόντια μεταφορά συζευκτικών πλασμιδίων ή τρανσποζονίων. Ο τύπος αυτός των ESBLs μετρά περισσότερα από 100 ένζυμα και παρουσιάζει την υψηλότερη συχνότητα παραλλαγών συγκριτικά με τα ένζυμα τύπου TEM και SHV (Canton, et al, 2012; Shaikh, et al, 2015). Υδρολύουν τις ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες και ιδιαίτερα την κεφοταξίμη, ενώ υδρολύουν σε μικρότερο βαθμό την κεφαζιδίμη χωρίς να προκαλούν αντοχή σε αυτή (Tzouveleakis, et al, 2000).

- **Καρβαπενεμάσες:** Τα ένζυμα αυτής της κατηγορίας ανήκουν στην υποομάδα 2f κατά Bush-Jacoby-Medeiros και εδώ περιλαμβάνονται οι μεταφερόμενες από πλασμίδια καρβαπενεμάσες τύπου **KPC** και **GES** καθώς και καρβαπενεμάσες των οικογενειών **SME**, **NMC-A/IMI** που κωδικοποιούνται από γονίδια του χρωμοσώματος (Poirel, 2000; Queenan and Bush, 2007; Rasmussen-Walther and Hoibi, 2007). Εντοπίστηκαν στα μέσα της δεκαετίας του 1980 σε μικρό αριθμό στελεχών Εντεροβακτηριακών, αλλά πλέον έχουν παρουσιάσει παγκόσμια διασπορά (Bonomo, 2017). Έχουν ανιχνευθεί σε στελέχη *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* και *Klebsiella spp* ως μεμονωμένα περιστατικά ή ως ενέχοντα σε μικρές επιδημίες. Στελέχη που παράγουν αυτά τα ένζυμα παρουσιάζουν αυξημένες MICs στην ιμιπενέμη που τους προσδίδουν μειωμένη ευαισθησία έως πλήρη αντοχή. Διαθέτουν την ικανότητα να υδρολύουν καρβαπενέμες, κεφαλοσπορίνες, πενικιλίνες και

την αζτρεονάμη, ενώ αναστέλλονται ασθενώς από το κλαβουλανικό οξύ και την ταζομπακτάμη (Queenan and Bush, 2007).

- ✓ Οι **KPC** β-λακταμάσες ανιχνεύονται κυρίως σε στελέχη *Klebsiella spp* αλλά έχει αναφερθεί πιο σπάνια η παρουσία τους και σε στελέχη *Enterobacter spp* και *Salmonella spp* (Queenan and Bush, 2007). Η αντοχή στις καρβαπενέμες λόγω παραγωγής KPC παρατηρήθηκε για πρώτη φορά σε στέλεχος *K. pneumoniae* στη Βόρεια Καρολίνα το 1996 (Yigit, et al, 2001). Δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ, την ταζομπακτάμη και τη σουλμπακτάμη και υδρολύουν βραδέως την αβιμπακτάμη (Nguyen, et al, 2016). Η πρώτη KPC που ανιχνεύτηκε ήταν η KPC-1 και στη συνέχεια η KPC-2, η οποία διέφερε από την πρώτη κατά ένα αμινοξύ. Σύντομα εμφανίστηκε και η KPC-3 το 2001 στη Νέα Υόρκη, η οποία διέφερε από την KPC-2 σε ένα αμινοξύ. Μετά τη γρήγορη εξάπλωση των στελεχών αυτών στις Η.Π.Α, οι καρβαπενεμάσες τύπου KPC εξαπλώθηκαν παγκοσμίως (Yigit, et al, 2003; Woodford, et al, 2004). Στελέχη που παράγουν KPC συνήθως παρουσιάζουν αντοχή και σε άλλες τάξεις αντιμικροβιακών, όπως στις κινολόνες, στις αμινογλυκοσίδες και στις τετρακυκλίνες και συχνά παρουσιάζουν ευαισθησία αποκλειστικά στην κολιστίνη ή και την τιγκεκυκλίνη (Bush, 2010). Οι καρβαπενεμάσες της οικογένειας **GES** αρχικά είχαν ενταχθεί στην ομάδα των ESBLs, αλλά με το πέρασμα του χρόνου παρουσίασαν χαμηλού βαθμού υδρόλυση της ιμιπενέμης (Queenan and Bush, 2007). Η GES-1 παρουσιάζει παρόμοιο προφίλ υδρόλυσης με άλλες ESBLs, αλλά τα άλλα μέλη της οικογένειας (GES-2, GES-4, GES-5, GES-6, GES-11, and GES-14) έχουν την ικανότητα να υδρολύουν τις καρβαπενέμες (Bonomo, 2017).
- ✓ Οι **καρβαπενεμάσες** των οικογενειών **NMC-A/IMI** είναι σπάνιες. Η NMCA (Non-metallo-carbapenemase-A) απομονώθηκε για πρώτη φορά στη Γαλλία σε στέλεχος *E. cloacae* και η διασπορά της παραμένει σπάνια. Οι καρβαπενεμάσες IMI-1 και IMI-2 απομονώνονται επίσης από στελέχη *Enterobacter spp* στην Αμερική. Η **SME-1** καρβαπενεμάση απομονώθηκε στο Λονδίνο το 1983 και τα

ένζυμα της οικογένειας αυτής (SME-2, SME-3) παρουσιάζουν χαμηλή συχνότητα εμφάνισης, κυρίως στην Αμερική, τον Καναδά και την Ελβετία (Naas, et al, 2016).

3.5.4.1.1.2 Τάξη B

Περιλαμβάνει μεταλλοπρωτεΐνες με κυστεΐνη στην ενεργό ακυλιωτική θέση, που απαιτούν πρόσδεση με ένα ή δύο μεταλλικά ιόντα ψευδαργύρου για να υδρολύσουν το υπόστρωμά τους. Κωδικοποιούνται τόσο από το χρωμόσωμα, όσο και από πλασμίδια. Ανήκουν στην κατηγορία 3 κατά Bush-Jacoby-Medeiros και υδρολύουν πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες. Δεν υδρολύουν την αζτρεονάμη και δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ ή την ταζομπακτάμη. Αναστέλλονται από το EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ) και αυτή η ιδιότητά τους χρησιμοποιείται κατά την εργαστηριακή ανίχνευσή τους. Τα γονίδια που τις κωδικοποιούν βρίσκονται συνήθως σε μεταθετά στοιχεία ή ιντεγκρόνια. Η συνεχής εμφάνιση νέων μέταλλο-β-λακταμασών (Metallo-β-lactamases, MBLs) και η συσχέτιση με φαινότυπους πολυαντοχής στα gram αρνητικά βακτήρια αποτελούν μια συνεχώς επιδεινούμενη απειλή (Jones, et al, 2005; Salabi, et al, 2013; Palzkill, 2013; Gharoufian, et al, 2015).

Διακρίνονται σε τρεις τάξεις, B1, B2 και B3 σύμφωνα με τη δομή τους και στις υποκατηγορίες 3a, 3b και 3c σύμφωνα με τις λειτουργικές τους ιδιότητες. Οι B1 και B3 διαθέτουν δυο ιόντα ψευδαργύρου στο ενεργό κέντρο τους, ενώ στην κατηγορία B2 βρίσκεται ένα ιόν ψευδαργύρου (Walsh et al, 2005; Bush and Jacoby, 2010). Στην υποομάδα 3a ανήκουν ένζυμα των οικογενειών VIM και IMP που κωδικοποιούνται από πλασμίδια και παρουσιάζουν παγκόσμια διασπορά καθώς και ένζυμα της οικογένειας NDM. Τα ένζυμα της τάξης B3 ανήκουν και αυτά στην υποκατηγορία 3a και παρουσιάζουν διαφορές με τα υπόλοιπα μέλη ως προς τα αμινοξέα που συμμετέχουν για την δέσμευση των ιόντων ψευδαργύρου. Στην υποκατηγορία 3b ανήκει μια μικρότερη ομάδα MBLs, που υδρολύουν κυρίως τις καρβαπενέμες και απαιτούν ένα ιόν ψευδαργύρου στο ενεργό κέντρο τους για να δράσουν ενώ η παρουσία δεύτερου ιόντος λειτουργεί ανασταλτικά (Yong, et al, 2009;

Bush and Jacoby, 2010). Άλλες οικογένειες MBLs είναι οι GIM, SIM και SPM (Codjoe and Donkor, 2017).

Μέχρι το 2009 επικρατούσαν κυρίως ένζυμα των οικογενειών VIM και IMP, αλλά το 2009 έγινε γνωστή η αναγνώριση του ενζύμου NDM-1 στο Νέο Δελχί της Ινδίας και έκτοτε παρουσίασε σημαντική διασπορά. Το 2011 βρέθηκε το γονίδιο της NDM-1 καρβαπενεμάσης σε στέλεχος *Providencia stuartii*. Βακτήρια που φέρουν γονίδιο που κωδικοποιεί την NDM-1 ονομάζονται ‘superbugs’, γιατί με μόνες εξαιρέσεις της κολιστίνης, φωσφομυκίνης και τιγκεκυκλίνης, είναι πολυανθεκτικά και λοιμώξεις από αυτά τα βακτήρια συνοδεύονται από υψηλά ποσοστά θνησιμότητας (Bush, 2010; Marsik and Nambiar, 2011).

3.5.4.1.1.3 Τάξη C

Οι AmpC β-λακταμάσες ή κεφαλοσπορινάσες, ανήκουν στην τάξη C κατά Ambler και την κατηγορία 1 κατά Bush-Jacoby-Medeiros. Το πρώτο βακτηριακό ένζυμο που κατέστειλε τη δράση της πενικιλλίνης ήταν μια AmpC β-λακταμάση και αναφορά σε αυτή έγινε το 1940 (Jacoby, 2009). Πρόκειται για ένζυμο που κωδικοποιούνται από γονίδια που εντοπίζονται στο χρωμόσωμα ή σε πλασμίδια (Pitout, et al, 2009; Bonomo, 2017). Πολλά Εντεροβακτηριακά παρουσιάζουν χαμηλή αλλά επαγωγίμη έκφραση των AmpC β-λακταμασών ως απάντηση στην έκθεση στα β-λακταμικά αντιμικροβιακά. Τα είδη *E. cloacae*, *Citrobacter freundii*, *S. marcescens*, *Morganella morganii* και *P. stuartii* παράγουν επαγωγίμες χρωμοσωμικές AmpC β-λακταμάσες (Jacoby and Munoz-Price, 2005), ενώ τα είδη *K. pneumoniae*, *Salmonella spp*, *P. mirabilis* έχουν την ικανότητα να παράγουν πλασμιδιακές AmpC β-λακταμάσες. Δεν διαθέτουν χρωμοσωμικές AmpC β-λακταμάσες (Philippon, et al, 2002). Στελέχη *E. coli* παράγουν χρωμοσωμικές μη επαγωγίμες β-λακταμάσες και σπάνιότερα πλασμιδιακές (Mulvey, et al, 2005).

Τα ένζυμα αυτά διαθέτουν ένα κατάλοιπο σερίνης στην ενεργό ακυλιωτική θέση και προσδίδουν αντοχή σε ένα ευρύ φάσμα β-λακταμικών αντιμικροβιακών, όπως οι πενικιλλίνες, οι οξυ-ιμινο-κεφαλοσπορίνες, οι κεφαμυκίνες και σε κάποιες περιπτώσεις η αζτρεονάμη. Οι καρβαπενέμες και οι κεφαλοσπορίνες τέταρτης γενεάς, όπως η κεφεπίμη, δεν φαίνεται να επηρεάζονται (Bonomo, 2017; Jacoby, 2009). Δεν

αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ, την σουλμπακτάμη και την ταζομπακτάμη, αλλά έναντι του βορονικού οξέος και της κλοξακιλλίνης παρουσιάζουν ικανοποιητική ευαισθησία (Pitout, et al, 2009). Είναι επίσης πολύ ευαίσθητες στη δράση της αβιμπακτάμης. Η υπερπαραγωγή των ενζύμων αυτών όταν το βακτήριο εκτίθεται σε β-λακταμικά αντιμικροβιακά που αποτελούν ασθενείς επαγωγείς οδηγεί σε ανάπτυξη αντοχής (Bonomo, 2017). Αντοχή στις καρβαπενέμες μπορεί π.χ. να παρουσιαστεί όταν σε ένα στέλεχος συνδυάζεται η υπερπαραγωγή AmpC β-λακταμασών με μειωμένη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης (Bradford, et al, 1997).

Πλασμίδια που φέρουν *blaAmpC* γονίδια, συνήθως φέρουν και γονίδια αντοχής έναντι και άλλων αντιμικροβιακών, όπως οι αμινογλυκοσίδες, η χλωραμφαινικόλη, οι κινολόνες κ.ά., καθώς και γονίδια που κωδικοποιούν άλλες β-λακταμάσες, όπως οι TEM-1, PSE-1, CTX-M-3, VIM-1, SHV (Miriagou, et al, 2004). Οι πιο γνωστές AmpC β-λακταμάσες ανήκουν στις οικογένειες CMY, FOX, ACC, LAT, MIR, ACT, MOX, DHA, BIL (Philippon, et al, 2002).

3.5.4.1.1.4 Τάξη D

Στην μοριακή τάξη D ανήκουν ένζυμα που υδρολύουν την οξακιλλίνη ή την κλοξακιλλίνη και ονομάζονται OXA β-λακταμάσες. Διαθέτουν ένα κατάλοιπο σερίνης στην ενεργό ακυλιωτική θέση (Bush and Jacoby, 2010). Έχουν καταγραφεί περισσότερα από 250 ένζυμα, τα οποία αποτελούν μια ετερογενή ομάδα και ανήκουν στην κατηγορία 2d κατά Bush-Jacoby-Medeiros (Bush and Jacoby, 2010; Leonard, et al, 2013). Αποτελούν την πιο διαδεδομένη οικογένεια β-λακταμασών που αριθμεί τα περισσότερα μέλη (Bush, 2013).

Παράγονται κυρίως από gram αρνητικά βακτήρια, όπως *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *E. coli* και *Acinetobacter baumannii*. Διακρίνονται σε τρεις ομάδες: 1) τα στενού φάσματος OXA ένζυμα, που είναι οξακιλλινάσες και υδρολύουν τις αμινοπενικιλίνες και καρβοξυπενικιλίνες, 2) τα OXA-τύπου ESBL ένζυμα που προσδίδουν αντοχή σε πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες και εκτεταμένου φάσματος κεφαλοσπορίνες και 3) τα OXA-τύπου καρβαπενεμάσης ένζυμα που προσδίδουν αντοχή στις καρβαπενέμες (Leonard, et al, 2013). Τα περισσότερα δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ, τη σουλμπακτάμη και την ταζομπακτάμη (Bonomo, 2017;

Codjoe and Donkor, 2018). Εξάιρεση αποτελούν οι OXA-18 και OXA-24 που αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ, και η OXA-49 που αναστέλλεται από την ταζομπακτάμη αλλά όχι από το κλαβουλανικό οξύ (Leonard, et al, 2013).

Οι OXA καρβαπενεμάσες συνήθως παράγονται από πολυανθεκτικά στελέχη *Acinetobacter spp* και πιο σπάνια από στελέχη Εντεροβακτηριακών (Bonomo, 2017). Η OXA-48 είναι η πιο κοινή OXA καρβαπενεμάση που απομονώνεται από στελέχη *Klebsiella spp* και ενδημεί κυρίως στην Τουρκία, τη Βόρεια Αφρική και την Ευρώπη (Codjoe and Donkor, 2018). Οι καρβαπενεμάσες τύπου OXA συνήθως υδρολύουν ασθενέστερα τις καρβαπενέμες συγκριτικά με άλλες καρβαπενεμάσες, όπως οι MBLs. Συχνά συνυπάρχουν με επιπλέον μηχανισμούς πρόκλησης αντοχής, όπως αλλαγές στις πορίνες, ταυτόχρονη παραγωγή και άλλων καρβαπενεμασών και αντλίες ενεργητικής εκροής, με αποτέλεσμα υψηλότερου βαθμού αντοχή στις καρβαπενέμες (Bonomo, 2017).

3.5.5 Μοριακή βάση αντοχής

Τα βακτήρια κατά τη διάρκεια της εξέλιξής τους έχουν αναπτύξει μια σειρά από μηχανισμούς που συμβάλλουν στην επιβίωσή τους. Με τον τρόπο αυτό προκύπτουν η εγγενής και η επίκτητη αντοχή που μπορεί να παρουσιάζουν έναντι ενός ή και περισσότερων αντιμικροβιακών. Παρακάτω περιγράφονται οι τρόποι με τους οποίους αποκτάται και μεταφάιρεται η αντοχή.

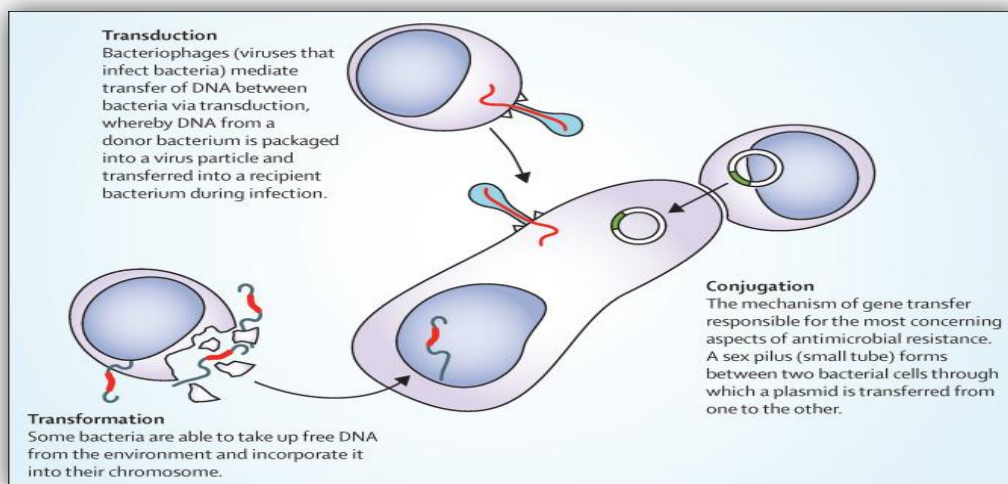
➤ Τρόποι απόκτησης και μεταφοράς της αντοχής

Κάθετη μεταφορά: Το γενετικό υλικό μεταφέρεται κατά τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων από τη μια γενεά στην άλλη και συντελεί στη διατήρηση των χαρακτηριστικών του είδους (Syvanen, 2012; Lorenzo-Diaz, et al, 2017). Η επίκτητη αντοχή που προκύπτει λόγω μεταλλάξεων στο χρωμόσωμα και την πίεση επιλογής που ασκείται λόγω της επίδρασης της αντιμικροβιακής ουσίας ονομάζεται κάθετη εξέλιξη (Tenover, 2006).

Οριζόντια μεταφορά: Αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς μηχανισμούς μικροβιακής αντοχής (Lorenzo-Díaz, et al, 2017). Η μεταφορά γενετικού υλικού πραγματοποιείται μεταξύ στελεχών του ίδιου αλλά και διαφορετικών ειδών (Tenover, 2006; Liu, et al, 2022). Τα βακτήρια αποκτούν εξωγενές γενετικό υλικό με τρεις τρόπους (Εικόνα 21):

- ✓ **Μετασηματισμός :** Η ενσωμάτωση ‘γυμνού’ γενετικού υλικού που βρίσκεται στο περιβάλλον και προέρχεται από βακτήρια που έχουν υποστεί λύση, είναι ο πιο απλός τρόπος απόκτησης αντοχής αλλά και ο πιο σπάνιος.
- ✓ **Μεταγωγή :** Μεταφορά γενετικού υλικού μεσολαβούμενη από βακτηριακούς φάγους.
- ✓ **Σύζευξη:** Πρόκειται για την πιο αποτελεσματική και πιο συχνή μέθοδο μεταφοράς γενετικού υλικού και απαιτείται η κυτταρική επαφή για να πραγματοποιηθεί. Κατά τη σύζευξη, από ένα gram αρνητικό βακτήριο σε ένα άλλο, μεταφέρονται ‘γονίδια αντοχής’, που βρίσκονται σε πλασμίδια ή μεταθετά στοιχεία, μέσω μιας πρωτεϊνικής δομής που ενώνει τα δυο κύτταρα και ονομάζεται συζευκτικό ινίδιο (Tenover, 2006; Holmes, et al, 2016; Christaki, et al, 2020; Liu, et al, 2022).

Μετάλλαξη: Ένας υποπληθυσμός βακτηρίων που προέρχονται από ένα πληθυσμό ευαίσθητων σε ένα αντιμικροβιακό βακτηρίων, αναπτύσσουν **μεταλλάξεις** που τους επιτρέπουν να ανθίστανται στη δράση του αντιμικροβιακού. Η αντοχή προκαλείται μέσω μεταλλάξεων που αλλάζουν μια πρωτεΐνη στόχο του αντιμικροβιακού τροποποιώντας ή εξαλείφοντας τη θέση πρόσδεσης του αντιμικροβιακού ή που ρυθμίζουν θετικά την παραγωγή ενζύμων που αδρανοποιούν το αντιμικροβιακό ή που μειώνουν την έκφραση ή εξαλείφουν μια πορίνη απαραίτητη για την είσοδο του αντιμικροβιακού στο βακτήριο ή που αυξάνουν την έκφραση αντλιών ενεργητικής εκροής συντελώντας στην ταχύτερη αποβολή του αντιμικροβιακού από το κύτταρο. Αυτός ο μηχανισμός απόκτησης αντοχής είναι σπάνιος (McManus, 1997; Shaikh, et al, 2014; Tenover, 2006).



Εικόνα 21. Μεταφορά γενετικού υλικού μεταξύ μικροοργανισμών.

Το γενετικό υλικό μεταφέρεται μέσω τριών κύριων τρόπων: (i) μετασχηματισμός- π.χ. ανασυνδυασμός εξωγενούς DNA από το *Streptococcus mitis* στον *Streptococcus pneumoniae* που προσδίδει αντοχή στην πενικιλίνη μέσω σχηματισμού μωσαϊκών γονιδίων, όπως και η *Neisseria gonorrhoeae*, στην οποία ένα μωσαϊκό γονίδιο *penA* σχετίζεται με αντοχή στην κεφτριαζόνη (ii) μεταγωγή- κατά την οποία γενετικό υλικό που κωδικοποιεί μικροβιακή αντοχή σε αντιμικροβιακά βρίσκεται ενσωματωμένο σε DNA φάγων που απομονώθηκαν κατά τη διαχείριση υδατικών λυμάτων. Τα γονίδια που κωδικοποιούν β-λακταμάσες και τα *mecA* γονίδια έχουν ταυτοποιηθεί σε βακτηριοφάγους που βρέθηκαν σε δείγματα κοπράνων σε φάρμες και σφαγεία και (iii) σύζευξη- μεταφορά γονιδίων από πλασμίδια υπεύθυνα π.χ. για την παγκόσμια διασπορά γονιδίων που κωδικοποιούν καρβαπενεμάσες, όπως η *New Delhi* μεταλλο-β-λακταμάση και οι Εκτεταμένου Φάσματος β-λακταμάσες (ESBLs). Επιπλέον αλληλουχίες εισδοχής (Integrative chromosomal elements, ICEs) μπορούν να μεταφέρουν γονίδια αντοχής μεταξύ πλασμιδίων και του χρωμοσώματος του βακτηρίου-δέκτη σε μια σειρά από gram αρνητικά βακτήρια.

Πηγή: Holmes, et al, 2016

➤ Πλασμίδια, Αλληλουχίες εισδοχής, Τρανσποζόνια, Ιντεγκρόνια

Πλασμίδια: Είναι συνήθως κυκλικά, και πιο σπάνια γραμμικά μόρια εξωχρωμοσωμικού δίκλωνου DNA που αντιγράφονται ανεξάρτητα από το DNA του βακτηρίου. Μεταφέρουν γονίδια που κωδικοποιούν διάφορα χαρακτηριστικά και την αντοχή σε πολλές τάξεις αντιμικροβιακών, όπως τα β-λακταμικά αντιμικροβιακά, τις αμινογλυκοσίδες, τις τετρακυκλίνες, τη χλωραμφαινικόλη, τις σουλφοναμίδες, την τριμεθοπρίμη, τις μακρολίδες και τις κινολόνες. Είναι δυνατό να βρίσκονται

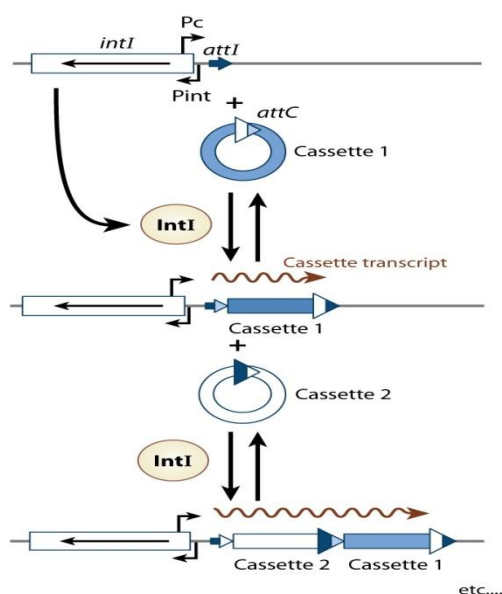
περισσότερα του ενός σε ένα κύτταρο (McManus, 1997; Carattoli, et al, 2005; Carattoli, 2013). Περίπου το 20% των γονιδίων που εντοπίζονται στα μεταθετά στοιχεία και μεταφέρονται μεταξύ βακτηρίων βρίσκονται στα πλασμίδια (Lorenzo-Díaz et al, 2017). Συνήθως φέρουν πολλαπλά γονίδια αντοχής και με αυτό τον τρόπο είναι δυνατό με μια σύζευξη να μεταφερθεί φαινότυπος πολυαντοχής σε ένα βακτήριο-δέκτη (Ruppe, et al, 2015). Η ύπαρξη πολλαπλών γονιδίων αντοχής σε ένα πλασμίδιο μεσολαβείται από τρανσποζόνια, ιντεγκρόνια και αλληλουχίες εισδοχής (Insertion Sequence Common Region, ISCR elements) (Alekshum and Levy, 2007; Christaki, et al, 2020). Τα πλασμίδια αυτά αρχικά ονομάστηκαν παράγοντες αντοχής, επιλέχθηκαν και διαδόθηκαν μετά από ευρεία χρήση της σουλφοναμίδης στην Ιαπωνία κατά το 2^ο Παγκόσμιο Πόλεμο (Watanabe, 1963).

Αλληλουχίες Εισδοχής: Είναι τα πιο απλά από τα μεταθετά στοιχεία και τα πιο πολλά στους προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς. Διακρίνονται από τα τρανσποζόνια διότι μεταφέρουν μόνο το γονίδιο της τρανσποζάσης, σε αντίθεση με τα τρανσποζόνια που μεταφέρουν και επιπρόσθετα γονίδια (Siguiet et al, 2009). Στα άκρα τους αποτελούνται από ανεστραμμένες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που πλαισιώνουν την περιοχή που κωδικοποιεί το γονίδιο της τρανσποζάσης (Wagner, et al, 2007).

Τρανσποζόνια: Είναι μεταθετά στοιχεία που βρίσκονται σε πλασμίδια ή ενσωματώνονται σε άλλα τρανσποζόνια ή στο χρωμόσωμα του βακτηρίου ξενιστή. Τα συζευκτικά τρανσποζόνια μπορούν να διεκολύνουν τη μεταφορά πλασμιδίων από ένα βακτήριο σε ένα άλλο (Alekshum and Levy, 2007). Έχουν την ικανότητα να μετακινούνται σε νέες θέσεις μέσα στο γονιδίωμα χωρίς να υπάρχει ομολογία μεταξύ τρανσποζονίου και της νέας θέσης. Αυτό τα διαχωρίζει από άλλα είδη μεταθετών στοιχείων (Hickman, et al, 2010). Τα γονίδια που κωδικοποιούν β-λακταμάσες είναι δυνατό να βρίσκονται εκτός από το χρωμόσωμα του βακτηρίου, σε τρανσποζόνια και πλασμίδια και αυτό καθορίζει αν η παράγωγή τους θα είναι ιδιοσυστασιακή ή επαγωγήμη (Babic, et al, 2006).

Ιντεγκρόνια: Πρόκειται για γενετικά στοιχεία ικανά να αποκτούν και να αναδιαμορφώνουν μικρά μεταθετά στοιχεία, μεγέθους μικρότερου από ένα γονίδιο, που διαθέτουν μια θέση ανασυνδυασμού και ονομάζονται γονιδιακές κασέτες και τις μετατρέπουν σε λειτουργικά γονίδια, εξασφαλίζοντας τη σωστή έκφρασή τους

(Εικόνα 22). Δεν είναι κινητά αλλά βρίσκονται σε κινητά γενετικά στοιχεία (τρανσποζόνια) που βρίσκονται με τη σειρά τους σε πλασμίδια. Αρχικά αποτελούσαν μηχανισμό των gram αρνητικών βακτηρίων, με τον οποίο συγκέντρωναν γονίδια αντοχής και εξέφραζαν φαινότυπους πολυαντοχής με αυτό τον τρόπο (Partridge, et al, 2008; Cambray, et al, 2010). Είναι τα κύρια οχήματα της πολυαντοχής στα gram αρνητικά βακτήρια και λιγότερο στα gram θετικά. Εκτός από τα κινητά ιντεγκρόνια (Mobile Integrons, MIs) που συσχετίζονται με τα τρανσποζόνια, έχουν ανακαλυφθεί μεταγενέστερα χρωμοσωμικά ιντεγκρόνια (Chromosome Integrons, CIs) στο γένωμα πολλών βακτηριακών ειδών. Το κάθε ιντεγκρόνιο περιέχει λίγες γονιδιακές κασέτες από ετερόλογες πηγές που συλλέχθηκαν με επιτυχία από διαφορετικά γονιδιακά υποστρώματα. Έχουν ανακαλυφθεί επάνω στα MIs περισσότερες από 130 γονιδιακές κασέτες που μεταφέρουν γονίδια αντοχής στα αντιμικροβιακά (Partridge, et al, 2008). Κάθε ιντεγκρόνιο διαθέτει ένα 5' συντηρημένο γονίδιο ιντεγκράσης (Int), γονιδιακές κασέτες με γονίδια αντοχής και μια θέση εισδοχής για την γονιδιακή κασέτα (attI) (Babic, et al, 2006).



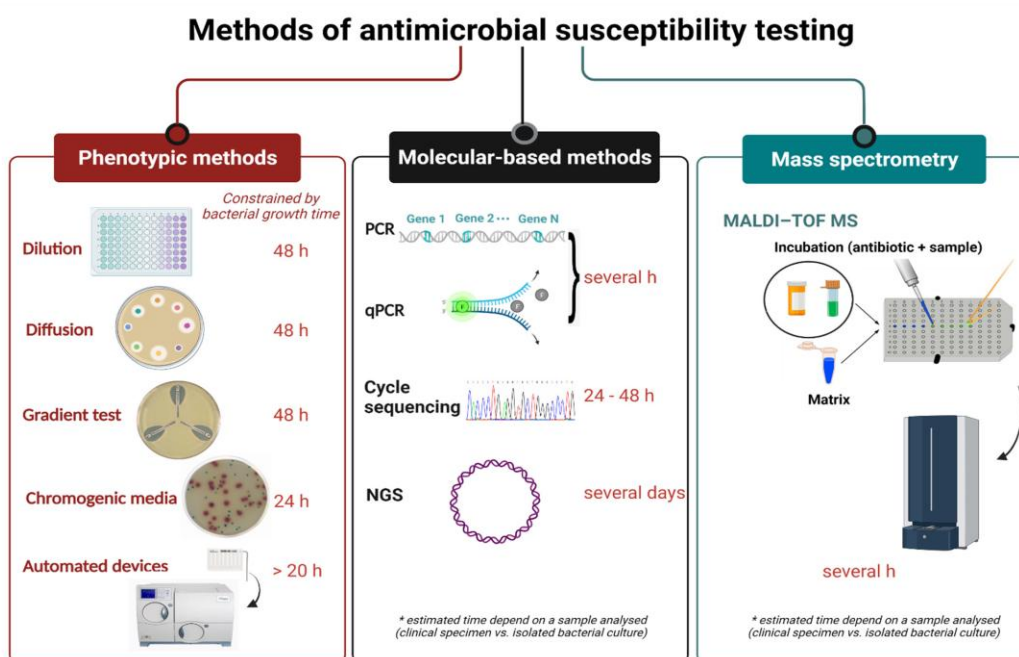
Εικόνα 22. Μεσολαβούμενη από ιντεγκρόνια πρόσληψη γονιδίων και πρότυπο ανταλλαγής γονιδιακών κασετών.

Κυκλικές γονιδιακές κασέτες εισέρχονται επαναλαμβανόμενα στην συγκεκριμένη attI θέση σε ένα ιντεγκρόνιο πιο κάτω από τον ισχυρό εκκινητή (promoter) Pc. IntI: γονίδιο ιντεγκράσης

Πηγή: Cambray, et al, 2010

4. Μέθοδοι ελέγχου αντοχής

Το αντιβιογράμμα, αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο στη θεραπευτική των λοιμώξεων, διότι προσφέρει στον κλινικό ιατρό σημαντικές πληροφορίες για την καθοδήγηση της κατάλληλης θεραπευτικής επιλογής, μέσω ελέγχου της ευαισθησίας των βακτηριακών στελεχών στα αντιμικροβιακά. Συχνά απαιτείται συμπληρωματικά η επιβεβαίωση της αντοχής ή και ο έλεγχος των μηχανισμών αντοχής που μπορεί να παρουσιάζει ένα βακτηριακό στέλεχος, προκειμένου για την επίτευξη στοχευμένης θεραπευτικής προσέγγισης (Jorgensen and Ferraro, 2009). Ο έλεγχος της αντοχής των Εντεροβακτηριακών στα β-λακταμικά αντιμικροβιακά είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί (Εικόνα 23) με φαινοτυπικές δοκιμασίες, με γονοτυπικές μεθόδους καθώς και με βιοχημικές μεθόδους, όπως π.χ. η φασματομετρία μάζας (Cajic, et al, 2022).



Εικόνα 23. Μέθοδοι ελέγχου ευαισθησίας στα αντιμικροβιακά.

PCR- αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, q-PCR-ποσοτική αντίδραση πολυμεράσης, NGS- αλληλούχιση επόμενης γενεάς, MALDI-TOF MS- φασματοφωτομετρία μάζας.

Πηγή: Cajic, et al, 2022

4.1 Φαινοτυπικές μέθοδοι

Οι φαινοτυπικές δοκιμασίες βασίζονται κυρίως στην απομόνωση του υπό εξέταση στελέχους και την ανίχνευση της μικροβιακής αντοχής μέσω εκτίμησης της βακτηριακής ανάπτυξης υπό την παρουσία του αντιμικροβιακού. Πραγματοποιούνται σε αυτοματοποιημένα συστήματα ή χειροκίνητα. Μετά την διενέργεια του αντιβιογράμματος, ελέγχονται οι μηχανισμοί πρόκλησης της αντοχής με επιπρόσθετες φαινοτυπικές δοκιμασίες. Τέτοιες δοκιμασίες είναι η αραίωση αντιμικροβιακού σε ζωμό ή άγαρ, η μέθοδος διάχυσης με δίσκους, η μέθοδος διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιμικροβιακού (Karpou, et al, 2021). Είναι χαμηλές σε κόστος, προσφέρουν ευελιξία και μπορεί να είναι ποσοτικές ή ποιοτικές. Ωστόσο λόγω της φυσικής επιλογής τα βακτήρια αναπτύσσουν συνεχώς νέους μηχανισμούς αντοχής και αυτό επιβάλλει το συνεχή έλεγχο των δοκιμασιών αυτών ως προς τη δυνατότητα ανίχνευσης της αντοχής (Jorgensen and Ferraro, 2009).

➤ Μέθοδος διάχυσης του αντιμικροβιακού με δίσκους

Αποτελεί την συνηθέστερη μέθοδο ελέγχου ευαισθησίας ή αντοχής στα αντιμικροβιακά. Έως 12 δίσκοι αντιμικροβιακών καθορισμένης συγκέντρωσης διαθέσιμοι στο εμπόριο τοποθετούνται στην επιφάνεια ενός Mueller-Hinton (MH) άγαρ στο οποίο έχει επιστρωθεί εναιώρημα του υπό εξέταση βακτηρίου συγκεκριμένης πυκνότητας και επωάζονται σε συγκεκριμένες συνθήκες για 16-24 ώρες. Δημιουργούνται ζώνες αναστολής της ανάπτυξης του βακτηρίου γύρω από τους δίσκους και η διάμετρος αυτών αντιστοιχεί σε μια από τις κατηγορίες S, I, R σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του Ινστιτούτου Κλινικών και Εργαστηριακών Προτύπων (Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI) ή της Ευρωπαϊκής Επιτροπής για τον έλεγχο της Αντιμικροβιακής Ευαισθησίας (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST). Πρόκειται για μέθοδο ποιοτική διότι δεν πραγματοποιείται υπολογισμός της MIC. Είναι απλή, φθηνή και εύκολη στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων από τους κλινικούς ιατρούς, αλλά υστερεί σε αυτοματισμό (Matuscheck, et al, 2014; Jorgensen and Ferraro, 2021).

➤ **Μέθοδος αραιώσης του αντιμικροβιακού σε ζωμό ή άγαρ**

Με την μέθοδο αυτή υπολογίζεται η Ελάχιστη Ανασταλτική Πυκνότητα (Minimum Inhibitory Concentration-MIC) δηλαδή η ελάχιστη συγκέντρωση του αντιμικροβιακού που είναι απαραίτητη για να αναστείλει την ορατή ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Είναι ποσοτική μέθοδος διότι υπολογίζεται ποσοτικά η in vitro αντιμικροβιακή δραστηριότητα του αντιμικροβιακού έναντι του υπό εξέταση βακτηρίου(http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2019_manuals/Reading_guide_BMD_v_1.0_2019.pdf). Αποτελεί μέθοδο αναφοράς και μια από τις πιο συνηθισμένες φαινοτυπικές δοκιμασίες ελέγχου ρουτίνας (Cajic, et al, 2022).

Με σκοπό την ύπαρξη ομοφωνίας σε παγκόσμιο επίπεδο σχετικά με τη διενέργεια της εξέτασης και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, η μέθοδος έχει προτυποποιηθεί με βάση κατευθυντήριες οδηγίες από το CLSI της Αμερικής ή την EUCAST της Ευρώπης (Balouiri, et al, 2016). Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή οι MIC που προκύπτουν για το υπό εξέταση στέλεχος το κατατάσσουν σε τρεις κατηγορίες σε σχέση με την ευαισθησία του στο υπό εξέταση αντιμικροβιακό: Α) Ευαίσθητο (S-Susceptible, standard dosing regimen), με υψηλή πιθανότητα για θεραπευτική επιτυχία, όταν χρησιμοποιείται συγκεκριμένη δόση του αντιμικροβιακού Β) Ενδιάμεση ευαισθησία ή ευαισθησία σε αυξημένη έκθεση (I- Susceptible, Increased Exposure), με υψηλή πιθανότητα θεραπευτικής επιτυχίας είτε όταν η έκθεση στο αντιμικροβιακό επιμηκύνεται είτε όταν η δόση του αντιμικροβιακού ή η συγκέντρωσή του στο σημείο της λοίμωξης αυξάνεται Γ) R (Resistant), με υψηλή πιθανότητα θεραπευτικής αποτυχίας ακόμα και σε αυξημένη έκθεση (<https://www.eucast.org/eucastguidancedocuments>).

Η μέθοδος μικρο- ή μακροαραιώσης σε ζωμό είναι μια από τις πιο βασικές μεθόδους προσδιορισμού της ευαισθησίας ή αντοχής του βακτηρίου. Πραγματοποιούνται υποδιπλάσιες αραιώσεις του αντιμικροβιακού σε σωληνάρια που περιέχουν θρεπτικό ζωμό (μακροαραιώση) ή σε πλάκες μικροτιτλοποίησης των 96 θέσεων (μικροαραιώση). Με τη μέθοδο των αραιώσεων σε ζωμό είναι εφικτός ο υπολογισμός της MIC καθώς και της Ελάχιστης Βακτηριοκτόνου Πυκνότητας (Minimum Bactericidal Concentration-MBC), δηλαδή της ελάχιστης συγκέντρωσης του αντιμικροβιακού που καταστρέφει το 99.9% των βακτηρίων.

Η μέθοδος αραιώσης αντιμικροβιακού σε άγαρ προτιμάται όταν ελέγχονται περισσότερα του ενός μικροβιακά στελέχη ή όταν το χρώμα της αποικίας του μικροοργανισμού κάνει δύσκολο τον υπολογισμό της MIC με τη μέθοδο αραιώσης σε ζωμό. Χρησιμοποιούνται υποδιπλάσιες αραιώσεις του αντιμικροβιακού που έχουν ενσωματωθεί σε θρεπτικό άγαρ, στην επιφάνεια του οποίου ενοφθαλμίζεται συγκεκριμένο εναιώρημα του βακτηρίου. Ως MIC ορίζεται η χαμηλότερη συγκέντρωση του αντιμικροβιακού που αναστέλλει εντελώς την ανάπτυξη του βακτηρίου στην επιφάνεια του άγαρ (Balouiri, et al, 2016).

➤ **Μέθοδος διαβαθμισμένης συγκέντρωσης του αντιμικροβιακού**

Συνδυάζει τις αρχές των μεθόδων αραιώσης αντιμικροβιακού και της διάχυσης αντιμικροβιακών με δίσκους και αποτελεί μέθοδο ποσοτική. Το E-test είναι μια εκδοχή αυτής της μεθόδου που διατίθεται στο εμπόριο. Στηρίζεται στην αρχή υπολογισμού της MIC μέσω δημιουργίας διαβαθμισμένης συγκέντρωσης ενός αντιμικροβιακού σε θρεπτικό άγαρ. Χρησιμοποιείται πλαστικοποιημένη ταινία με διαβαθμισμένη συγκέντρωση του αντιμικροβιακού που τοποθετείται στην επιφάνεια θρεπτικού άγαρ που προηγουμένως έχει ενοφθαλμιστεί το υπό εξέταση βακτηριακό στέλεχος. Η MIC αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του αντιμικροβιακού στο σημείο που η ταινία τέμνει την έλλειψη της αναστολής της βακτηριακής ανάπτυξης. Είναι μέθοδος ρουτίνας, αλλά πιο ακριβή σε σχέση με την διάχυση αντιμικροβιακού με δίσκους (Balouiri, et al, 2016; Matuschek, et al, 2018).

➤ **Αυτοματοποιημένα συστήματα**

Βασίζονται στη μέθοδο μικροαραιώσης αντιμικροβιακών σε ζωμό και με τη χρήση οπτικών συστημάτων που διακρίνουν πολύ μικρές αλλαγές στη βακτηριακή ανάπτυξη, παράγουν σε μικρότερο χρόνο ένα ικανοποιητικό αποτέλεσμα. Υπάρχουν διάφορα διαθέσιμα στο εμπόριο συστήματα όπως το σύστημα Microscan WalkAway (Siemens Healthcare Diagnostics), το Vitek 2 (bioMerieux), το BD Phoenix Microbiology System (BD Diagnostics) κ.α. Τα συστήματα αυτά προσφέρουν ταυτοποίηση του μικροοργανισμού, αντιβιογράμμα και έλεγχο για κάποιους φαινότυπους αντοχής. Ωστόσο έχουν κάποιους περιορισμούς που επιβάλλουν τη

διενέργεια επιπλέον επιβεβαιωτικών φαινοτυπικών δοκιμασιών με σκοπό τον έλεγχο κάποιων φαινοτύπων αντοχής, όπως π.χ. οι επαγωγίμες β-λακταμάσες. Το λογισμικό αυτών των συστημάτων βρίσκεται σε διαρκή εξέλιξη με σκοπό τη γρήγορη διεξαγωγή της επώασης και τη λήψη έγκυρων αποτελεσμάτων (Wiegand, et al, 2007; Jorgensen and Ferraro, 2009).

➤ **Χρωματομετρικές δοκιμασίες και χρωμογόνα υλικά για ανίχνευση της αντοχής**

Χρωμογόνα θρεπτικά υλικά χρησιμοποιούνται με σκοπό τη γρήγορη ανίχνευση ανθεκτικών μικροοργανισμών στα πλαίσια πρόληψης και ελέγχου κυρίως των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων. Η αρχή λειτουργίας τους στηρίζεται στον μεταβολισμό υποστρωμάτων που βρίσκονται στο θρεπτικό υλικό, μέσω ενζύμων που διαθέτει το μικρόβιο, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του χρωμογόνου παράγοντα στο θρεπτικό άγαρ και τον χρωματισμό της αποικίας. Πρωταρχική τους χρήση στον έλεγχο των ασθενών για φορεία πολυανθεκτικών βακτηρίων (Perry, 2017; Cajic, et al, 2022).

Οι χρωματομετρικές δοκιμασίες βασίζονται στην υδρόλυση των αντιμικροβιακών από ένζυμα που παράγουν τα βακτήρια και οδηγούν σε αλλαγή του pH και την ανάπτυξη χρώματος από το χρωμογόνο υπόστρωμα (Cajic, et al, 2022). Τέτοιες είναι οι: **β-LACTA**, η οποία βασίζεται στην υδρόλυση χρωμογόνου υποστρώματος κυρίως από ESBL (CTX-M) και καρβαπενεμάσες (IMP) (Renvoise, et al, 2013), η **CARBA-NP**, που βασίζεται στην υδρόλυση του β-λακταμικού δακτυλίου της ιμιπενέμης (Poirel and Nordmann, 2015) και η **ESBL NDP**, η οποία είναι φθηνή, ταχεία, ειδική και ικανή να ανιχνεύσει στελέχη που παράγουν ESBL και κυρίως CTX-M β-λακταμάσες (Nordmann, Dortet, et al, 2012).

Άλλες δοκιμασίες που χρησιμοποιούνται επιπρόσθετα με σκοπό την επιβεβαίωση της αντοχής και τον έλεγχο του μηχανισμού αντοχής των Εντεροβακτηριακών στα β-λακταμικά αντιμικροβιακά είναι το Modified Hodge Test (MHT), η μέθοδος απενεργοποίησης καρβαπενέμης (Carbapenem Inactivation Method-CIM), ανοσοχρωματογραφικές μέθοδοι όπως οι δοκιμές πλευρικής ροής (ICT) και βιοχημικές μέθοδοι όπως η φασματοφωτομετρία μάζας (MALDI-TOF MS)

(Nordmann and Poirel, 2013; Lutgring and Limbago, 2016; Aguirre-Quiñonero and Martínez-Martínez, 2017; Tamma and Simner, 2018).

4.1.1 Ανίχνευση παραγωγής β-λακταμασών

Ο εντοπισμός των στελεχών των Εντεροβακτηριακών που παράγουν β-λακταμάσες είναι καθοριστικός για την επιλογή της σωστής αντιμικροβιακής θεραπείας και την έγκαιρη αντιμετώπιση της λοίμωξης. Συχνά ο εντοπισμός και ο χαρακτηρισμός των ενζύμων αυτών πραγματοποιείται με στόχο τον περιορισμό διασποράς των λοιμώξεων από πολυανθεκτικά βακτήρια (Drieux, et al, 2008).

Οι κλασικές μέθοδοι ελέγχου της ευαισθησίας στα αντιμικροβιακά παρουσιάζουν χαμηλή ευαισθησία και ειδικότητα ως προς την ανίχνευση των β-λακταμασών. Νεότερες φαινοτυπικές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί με στόχο την ανίχνευση των ενζύμων αυτών (Bradford, 2001).

4.1.1.1 Εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες

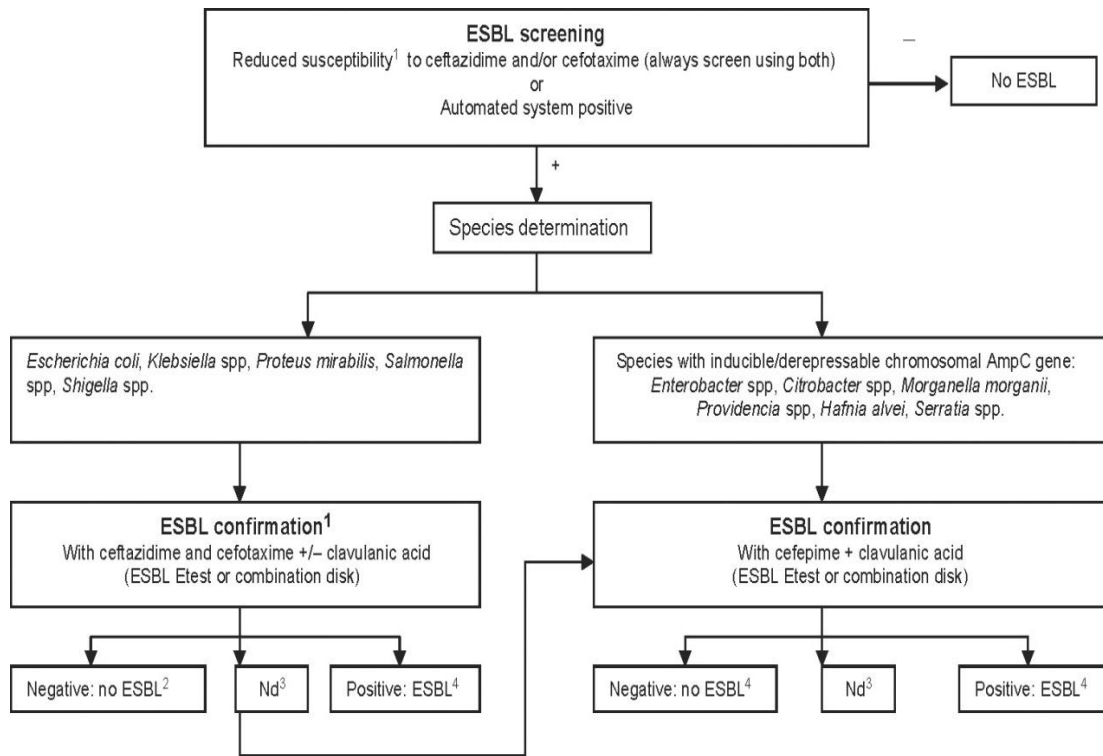
Η ανίχνευση των ESBLs πραγματοποιείται σε δυο στάδια (Εικόνα 24). Αρχικά μια κεφαλοσπορίνη δείκτης χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό στελεχών ύποπτων για την παραγωγή αυτών των ενζύμων και στη συνέχεια πραγματοποιείται επιβεβαίωση με μια τουλάχιστον από τις τέσσερις φαινοτυπικές δοκιμασίες που περιγράφονται παρακάτω. Οι κεφαλοσπορίνες δείκτες που χρησιμοποιούνται είναι συνήθως η κεφποδοξίμη, η οποία παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία ή ο συνδυασμός κεφοταξίμης (ή κεφτριαξόνης) και κεφταζιδίμης που παρουσιάζει καλύτερη ειδικότητα σε σχέση με την κεφποδοξίμη (Willems, et al, 2013).

Ο αρχικός έλεγχος πραγματοποιείται με τη μέθοδο αραίωσης σε ζωμό ή άγαρ ή με τη μέθοδο διάχυσης του αντιμικροβιακού με δίσκους ή σε αυτοματοποιημένα συστήματα. MIC κεφοταξίμης (ή κεφτριαξόνης) και κεφταζιδίμης >1 mg/L καθώς και MIC κεφποδοξίμης >1 mg/L όταν χρησιμοποιείται αποκλειστικά, είναι ενδεικτικές ύπαρξης ESBL και επιβάλλεται επιβεβαίωση. Αν χρησιμοποιηθεί η μέθοδος διάχυσης αντιμικροβιακού με δίσκους, ύποπτα για την παραγωγή ESBL

θεωρούνται στελέχη Εντεροβακτηριακών που παρουσιάζουν ζώνη αναστολής της ανάπτυξης <21 mm για την κεφοταξίμη (5μg), <23 mm για την κεφτριαξόνη (30μg) και < 22mm για την κεφταζιδίμη (10μg) όταν χρησιμοποιείται ο συνδυασμός κεφοταξίμης (ή κεφτριαξόνης) και κεφταζιδίμης ή < 21mm όταν χρησιμοποιείται μόνο η κεφποδοξίμη (10μg) (http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf).

Είναι απαραίτητο να χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα η κεφοταξίμη (ή η κεφτριαξόνη) και η κεφταζιδίμη ως δείκτες διότι έχουν παρουσιαστεί σημαντικές διαφορές στις MICs των αντιμικροβιακών αυτών, για διαφορετικά στελέχη Εντεροβακτηριακών που παράγουν β-λακταμάσες (Oliver, et al, 2002; Hope, et al, 2006).

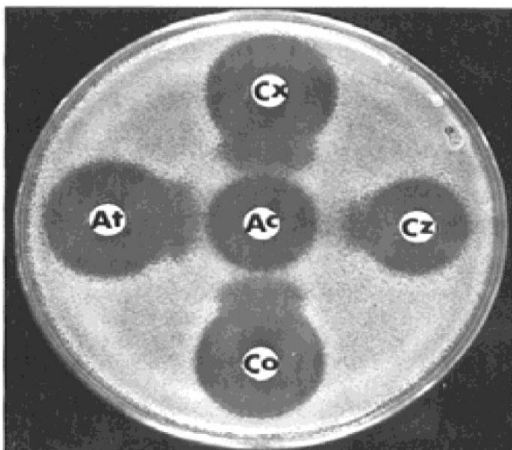
Οι μέθοδοι επιβεβαίωσης βασίζονται στην ανίχνευση συνέργειας ανάμεσα στο κλαβουλανικό οξύ και κεφαλοσπορίνες τρίτης γενεάς (Εικόνα 25). Για στελέχη Εντεροβακτηριακών που δεν παράγουν επαγωγίμες χρωμοσωμικές AmpC β-λακταμάσες, όπως *E. coli*, *Klebsiella spp*, *P. mirabilis*, *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Raoultella spp* (Ομάδα 1), χρησιμοποιείται κεφταζιδίμη και κεφοταξίμη με και χωρίς κλαβουλανικό οξύ. Για στελέχη Εντεροβακτηριακών που παράγουν επαγωγίμες χρωμοσωμικές AmpC β-λακταμάσες, όπως *Enterobacter spp*, *Serratia spp*, *Providencia spp*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Hafnia alvei* (Ομάδα 2), ο έλεγχος για συνέργεια περιλαμβάνει το κλαβουλανικό οξύ και την κεφεπίμη που ανήκει στις κεφαλοσπορίνες τέταρτης γενεάς και υδρολύεται από τις ESBLs, αλλά όχι από AmpC ένζυμα (Εικόνα 26). Τα αποτελέσματα των επιβεβαιωτικών μεθόδων κατηγοριοποιούνται σε θετικά, αρνητικά και απροσδιόριστα (Platteel, et al, 2011; https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf).



Εικόνα 24. Αλγόριθμος ανίχνευσης Εκτεταμένου Φάσματος β-λακταμασών (ESBL) στα Εντεροβακτηριακά.

(1) Αν η κεφοζιτίνη είναι ανθεκτική πραγματοποιείται επιβεβαιωτικός έλεγχος με κεφεπίμη (2) Δεν δύναται να αποκλεισθεί η ύπαρξη ανθεκτικής σε αναστολείς ESBL (3)Nd= απροσδιόριστο (ταινία Etest ή καμία ζώνη αναστολής) (4)Το επιβεβαιωτικό τεστ παραγωγής ESBL μπορεί να δώσει ψευδώς θετικά αποτελέσματα σε στελέχη *Klebsiella oxytoca* που υπερπαραγωγή KI β-λακταμάση. Εξαιρέση αποτελούν στελέχη *K. oxytoca* με υψηλού επιπέδου αντοχή στην κεφταζιδίμη και συνέργεια ανάμεσα στην κεφταζιδίμη και το κλαβουλανικό οξύ, που υποδηλώνει την παραγωγή ESBL.

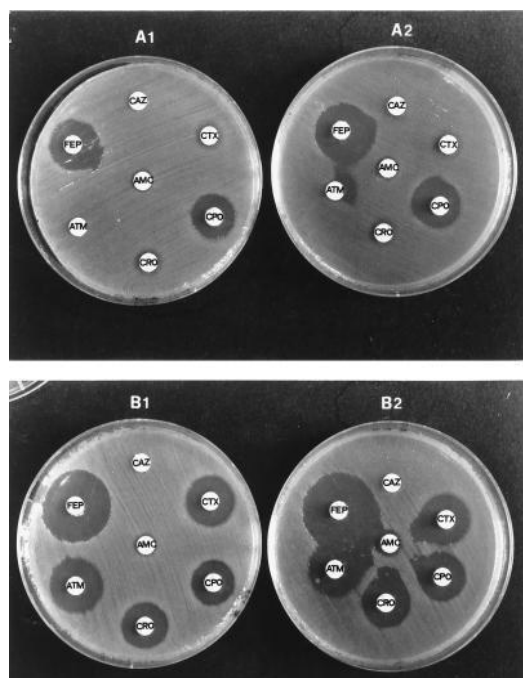
Πηγή: Plateel, et al, 2011



Εικόνα 25. DDS.

Η εικόνα παρουσιάζει την διεύρυνση της ζώνης αναστολής γύρω από τις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενεάς προς τον δίσκο αμοξικιλίνης/κλαβουλανικού οξέος.

Πηγή: Aruhotomikama, 2020



Εικόνα 26. Διάφορες δοκιμασίες DDST.

Δυο αντιπροσωπευτικά στελέχη *E. cloacae* (TSV-287 και TSV-9) που παράγουν β-λακταμάσες. Στις δοκιμασίες A1 και B1 η απόσταση των δίσκων έχει προσαρμοστεί στα 30mm από τον δίσκο με κλαβουλανικό οξύ (από κέντρο σε κέντρο). Στις δοκιμασίες A2 και B2 η απόσταση προσαρμόστηκε στα 20mm. AMC: αμοξικιλίνη-κλαβουλανικό, CAZ: κεφταζιδίμη, CTX: κεφτοαζίμη, CRO: κεφτριαζόνη, FEP: κεφεπίμη, CPO: κεφπιρόμη

Πηγή: Tzelepi, et al, 2000

Οι φαινοτυπικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την επιβεβαίωση της παραγωγής ESBL παρουσιάζονται συνοπτικά στον πίνακα 3 (α και β) και είναι η δοκιμασία συνδυασμένων δίσκων (CDT), η δοκιμασία συνέργειας διπλού δίσκου (DDST), η δοκιμασία διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιμικροβιακού με ταινίες ESBL και η δοκιμασία μικροαραιώσεων σε ζωμό. Δοκιμασίες ανίχνευσης ESBL που βασίζονται στην αναστολή από το κλαβουλανικό οξύ χρησιμοποιούνται σε αυτοματοποιημένα συστήματα ελέγχου της αντιμικροβιακής ευαισθησίας (http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf).

Μέθοδος	Αντιμικροβιακός παράγοντας (συγκέντρωση αντιμικροβιακού)	Η επιβεβαίωση ESBL είναι θετική όταν
Δοκιμασία βαθμίδωσης με ταινίες Etest	Κεφοταξίμη+/- κλαβουλανικό οξύ	Λόγος MIC ≥ 8 ή παρουσία έλλειψης με αλλοιωμένο σχήμα
	Κεφταζιδίμη+/- κλαβουλανικό οξύ	Λόγος MIC ≥ 8 ή παρουσία έλλειψης με αλλοιωμένο σχήμα
Δοκιμασία συνδυασμένων δίσκων (CDT)	Κεφοταξίμη (30μg) +/- κλαβουλανικό οξύ (10μg)	≥ 5 mm αύξηση στη ζώνη αναστολής
	Κεφταζιδίμη (30μg) +/- κλαβουλανικό οξύ (10μg)	≥ 5 mm αύξηση στη ζώνη αναστολής
Δοκιμασία μικροαραιώσεων σε ζωμό	Κεφοταξίμη +/- κλαβουλανικό οξύ (4mg/L)	Λόγος MIC ≥ 8
	Κεφταζιδίμη +/- κλαβουλανικό οξύ (4mg/L)	Λόγος MIC ≥ 8
	Κεφεπίμη +/- κλαβουλανικό οξύ (4 mg/L)	Λόγος MIC ≥ 8
Δοκιμασία συνέργειας διπλού δίσκου (DDST)	Κεφοταξίμη, Κεφταζιδίμη, Κεφεπίμη	Επέκταση της ζώνης αναστολής της κεφαλοσπορίνης δείκτη προς τον δίσκο αμοξυκιλλίνης-κλαβουλανικού οξέος

Πίνακας 3α. Δοκιμασίες επιβεβαίωσης παραγωγής ESBL για Εντεροβακτηριακά θετικά κατά τη δοκιμασία screening (Ομάδα 1 Εντεροβακτηριακών).

Πηγή: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf

Μέθοδος	Αντιμικροβιακός παράγοντας	Η επιβεβαίωση είναι θετική όταν
Δοκιμασία βαθμίδωσης με ταινίες Etest	Κεφεπίμη +/- κλαβουλανικό οξύ	Λόγος MIC ≥ 8 ή παραμορφωμένη έλλειψη
Δοκιμασία συνδυασμένων δίσκων (CDT)	Κεφεπίμη (30μg) +/- κλαβουλανικό οξύ (10 μg)	≥ 5 mm αύξηση στην ζώνη αναστολής
Δοκιμασία μικροαραιώσεων σε ζυμό	Κεφεπίμη +/- κλαβουλανικό οξύ (σταθερή συγκέντρωση 4 mg/L)	Λόγος MIC ≥ 8
Δοκιμασία συνέργειας διπλού δίσκου (DDST)	Κεφοταξίμη, κεφταζιδίμη, Κεφεπίμη	Επέκταση της ζώνης αναστολής της κεφαλοσπορίνης δείκτη προς τον δίσκο αμοξικιλίνης-κλαβουλανικού οξέος

Πίνακας 3β. Δοκιμασίες επιβεβαίωσης παραγωγής ESBL για Εντεροβακτηριακά που είναι θετικά στη δοκιμασία screening (Ομάδα 2 Εντεροβακτηριακών).

Πηγή: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf

1. **Δοκιμασία συνδυασμένων δίσκων αντιμικροβιακού (Combination Disk Test-CDT):** Χρησιμοποιούνται δίσκοι κεφαλοσπορίνης ευρέως φάσματος, μόνης και σε συνδυασμό με κλαβουλανικό οξύ. Το τεστ είναι θετικό όταν παρατηρείται διαφορά ≥ 5 mm στο μέγεθος της ζώνης αναστολής γύρω από το δίσκο της κεφαλοσπορίνης που συνδυάζεται με κλαβουλανικό οξύ. Συνήθως χρησιμοποιούνται η κεφταζιδίμη και η κεφτριαξόνη μόνες και σε συνδυασμό με κλαβουλανικό οξύ καθώς και η κεφεπίμη (M'Zali, et al, 2000; Stürenburg, et al, 2004).
2. **Δοκιμασία συνέργειας διπλού δίσκου (Double Disk Synergy Test-DDST):** Χρησιμοποιούνται δίσκοι που περιέχουν κεφαλοσπορίνες (κεφοταξίμη, κεφταζιδίμη, κεφεπίμη) και αζτρεονάμη των 30 μg που τοποθετούνται σε απόσταση 30 mm από δίσκο που περιέχει κλαβουλανικό οξύ, συνήθως δίσκο αμοξικιλίνης-κλαβουλανικού οξέος (20μg/10μg). Όπως παρουσιάζεται στην

εικόνα 25, θετικό θεωρείται το αποτέλεσμα όταν παρατηρείται διεύρυνση της ζώνης αναστολής γύρω από την κεφαλοσπορίνη ή όταν σχηματίζεται μια διεύρυνση τύπου κλειδαρότρυπας στην ζώνη αναστολής γύρω από την κεφαλοσπορίνη και προς την πλευρά του δίσκου που περιέχει κλαβουλανικό οξύ. Η απόσταση ανάμεσα στους δίσκους δύναται να προσαρμοστεί στα 20 mm αυξάνοντας την ευαισθησία της μεθόδου, κυρίως όταν προκύπτουν αμφίβολα αποτελέσματα, δηλαδή σε περιπτώσεις που παρατηρείται εμφανής μείωση της ευαισθησίας στις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενεάς χωρίς συνέργεια με τον δίσκο κλαβουλανικού οξέος στην κλασική δοκιμασία (Tzelepi, et al, 2000; Drieux, et al, 2008; Aruhomukama, 2020). Η ευαισθησία της δοκιμασίας μπορεί να ελαττωθεί όταν η δραστηριότητα του ESBL ενζύμου είναι χαμηλή με αποτέλεσμα την εμφάνιση μεγάλης ζώνης αναστολής της ανάπτυξης γύρω από τους δίσκους κεφαλοσπορίνης και αζτρεονάμης όπως συμβαίνει σε περιπτώσεις στελεχών *P. mirabilis* (Vercauteren, et al, 1997).

3. **Δοκιμασία διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιμικροβιακού με ταινίες Etest (Gradient Test Method):** Χρησιμοποιούνται ταινίες Etest με διαβαθμισμένη συγκέντρωση κεφαταζιδίμης, κεφοταξίμης ή κεφεπίμης στο ένα άκρο της ταινίας και το συνδυασμό της αντίστοιχης κεφαλοσπορίνης με κλαβουλανικό οξύ στο άλλο άκρο της ταινίας. Ελάττωση της MIC της κεφαλοσπορίνης κατά τρεις υποδιπλάσιες συγκεντρώσεις (λόγος MICs ≥ 8) παρουσία κλαβουλανικού οξέος θεωρείται θετική για την παραγωγή ESBL (Drieux, et al, 2008). Η δοκιμασία αυτή παρουσιάζει χαμηλή ειδικότητα για στελέχη Εντεροβακτηριακών εκτός της *E.coli* και δεν είναι αξιόπιστη για περιπτώσεις στελεχών που παράγουν AmpC β-λακταμάσες (Polsfuss, et al, 2012).
4. **Δοκιμασία μικροαραιώσεων σε ζωμό (Broth Microdillution):** Χρησιμοποιείται ζωμός Mueller-Hinton που περιέχει υποδιπλάσιες αραιώσεις κεφοταξίμης, κεφαταζιδίμης και κεφεπίμης από 0.25 έως 512mg/L με και χωρίς κλαβουλανικό οξύ σε σταθερή συγκέντρωση 4mg/L. Όταν παρατηρείται οχταπλάσια ή και μεγαλύτερη μείωση στην MIC της κεφαλοσπορίνης που συνδυάζεται με κλαβουλανικό οξύ σε σχέση με την αντίστοιχη κεφαλοσπορίνη, η δοκιμασία θεωρείται θετική
(http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf).

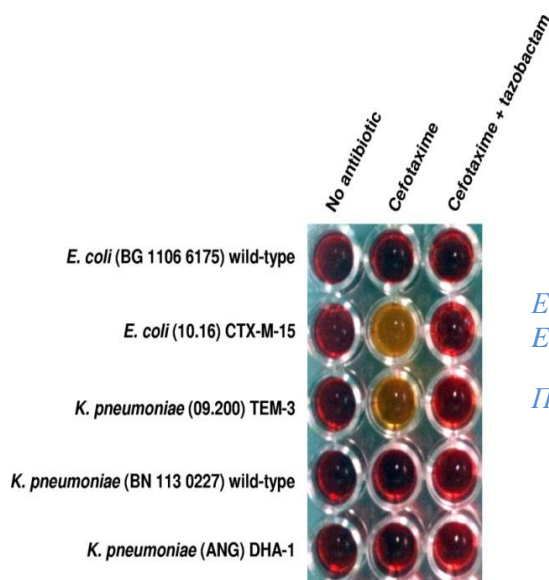
Η επιβεβαίωση με φαινοτυπικές μεθόδους μπορεί να είναι δύσκολη διότι οι β-λακταμάσες υδρολύουν τα διάφορα υποστρώματα σε διαφορετικό βαθμό, ενώ πολλά στελέχη Εντεροβακτηριακών διαθέτουν επιπλέον μηχανισμούς αντοχής που είναι δυνατό να οδηγήσουν σε ψευδή αποτελέσματα. Αιτίες ψευδώς θετικών ή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων των δοκιμασιών ανίχνευσης ESBLs αναφέρονται στον πίνακα 4 (Willems, et al, 2013).

Αιτίες ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων	Αιτίες ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων
<p>Χρωμοσωμική AmpC β-λακταμάση (<i>Enterobacter spp</i>, <i>C. freundii</i>, <i>Morganella morganii</i>, <i>Providencia spp</i>, <i>Serratia spp</i>, <i>P. aeruginosa</i>, <i>A. baumannii</i>)</p> <p>β-λακταμάση πλασμιδιακής προέλευσης (έχει γίνει περιγραφή κυρίως σε <i>K. pneumoniae</i>, <i>K. oxytoca</i>, <i>E. coli</i> και πιο σπάνια σε <i>Salmonella spp</i>, <i>P. mirabilis</i>, <i>C. freundii</i>, <i>Enterobacter aerogenes</i>)</p> <p><i>P. aeruginosa</i>: ESBLs που αναστέλλονται ασθενώς ή καθόλου από το κλαβουλανικό οξύ (π.χ CMT-τύπουβ-λακταμάσες), Καρβαπενεμάσες</p>	<p>K1 υπερπαραγωγή (<i>K. oxytoca</i>)</p> <p>SHV-1 υπερπαραγωγή (<i>K. pneumoniae</i> και <i>E. coli</i>)</p> <p>KPC καρβαπενεμάσες</p>

Πίνακας 4. Αιτίες ψευδώς αρνητικών και ψευδώς θετικών φαινοτυπικών δοκιμασιών επιβεβαίωσης παραγωγής ESBL

Πηγή: Willems, et al, 2013

1. **Βιοχημικές (χρωματομετρικές) δοκιμασίες:** Η δοκιμασία **ESBL NDP** (Εικόνα 27) παρουσιάζει πολύ καλή ευαισθησία και ειδικότητα, ενώ παρέχει τη δυνατότητα εφαρμογής απευθείας στο δείγμα. Πραγματοποιείται σε πλάκες τιτλοποίησης 96 βοθρίων ή σε ξεχωριστά σωληνάρια και θετική θεωρείται η δοκιμασία όταν παρατηρείται αλλαγή στο χρώμα (από κόκκινο σε κίτρινο). Χρησιμοποιείται η κεφοταξίμη ως αντιμικροβιακό-δείκτης και η ταζομπακτάμη ως αναστολέας. Παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, κυρίως για στελέχη που παράγουν CTX-M β-λακταμάσες και είναι μια δοκιμασία οικονομική και γρήγορη. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο πλαίσιο πρόληψης των λοιμώξεων (Nordmann, Dortet, et al, 2012). Η δοκιμασία **β-LACTA** είναι μια ταχεία και αξιόπιστη μέθοδος για στελέχη Εντεροβακτηριακών που παράγουν ESBL, αλλά και καρβαπενεμάσες KPC και τάξης D (OXA-48). Παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα για στελέχη *E.coli* και *K.pneumoniae*, όταν τα στελέχη αυτά δεν παράγουν AmpC β-λακταμάσες. Κατά τη δοκιμασία χρησιμοποιείται ένα χρωμογόνο υπόστρωμα κεφαλοσπορίνης (HMRZ-86) τόσο σε στελέχη όσο και απευθείας στο κλινικό δείγμα (Morosini, et al, 2014; Durand, et al, 2020).



Εικόνα 27. Αποτελέσματα του NDP ESBL τεστ σε αιμοκαλλιέργειες.

Πηγή: Nordmann, Dortet, et al, 2012

2. Η ηλεκτροχημική δοκιμασία **BL-RED (Beta-Lactamase Rapid Electrochemical Detection)** για την ανίχνευση της αντοχής στις

κεφαλοσπορίνες τρίτης γενεάς παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα κυρίως για στελέχη που παράγουν ESBL αποκλειστικά και κυρίως CTX-M, καθώς και για εκείνα που παράγουν KPC καρβαπενεμάσες, αλλά δεν ισχύει το ίδιο στην περίπτωση των στελεχών που παράγουν AmpC β-λακταμάσες και MBL καρβαπενεμάσες. Διαταραχές στην διαπερατότητα της μεμβράνης δεν επηρεάζουν την ποιότητα των αποτελεσμάτων (Durand, et al, 2020).

➤ **Δοκιμασίες ανίχνευσης ESBL παρουσία άλλων β-λακταμασών που υποκρύπτουν τη συνέργεια**

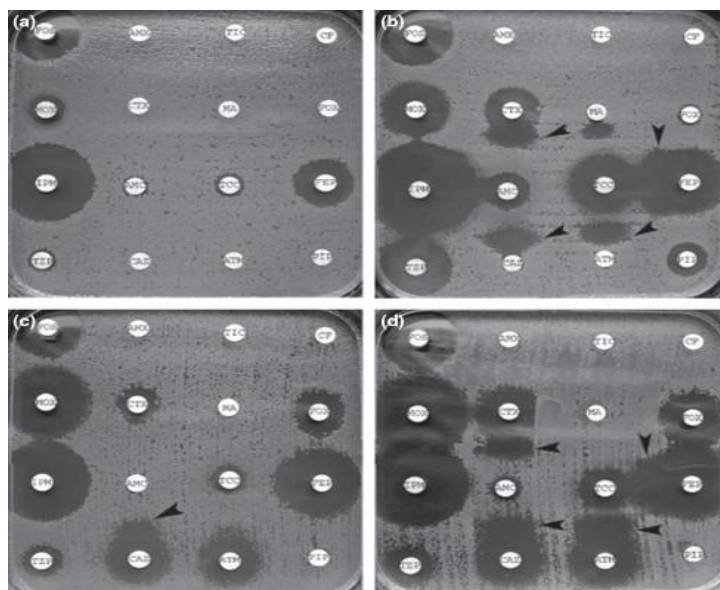
Καρβαπενεμάσες MBL και KPC καθώς και διαταραχές στην διαπερατότητα (απώλεια πορίνης ή αύξηση στην έκφραση αντλιών ενεργητικής εκροής) είναι δυνατό να προκαλούν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα σε δοκιμασίες ανίχνευσης ESBLs. Σε αυτές τις περιπτώσεις η εφαρμογή τροποποιημένων δοκιμασιών ανίχνευσης ESBL δύναται να παρέχει τη λύση. Χρησιμοποιούνται δίσκοι κεφοταξίμης και κεφταζιδίμης και οι συνδυασμοί τους με κλαβουλανικό οξύ, καθώς και οι αναστολείς EDTA και βορονικό οξύ, των οποίων η παρουσία μπορεί να αυξήσει τη διαφορά στις ζώνες αναστολής της ανάπτυξης γύρω από τους δίσκους του αντιμικροβιακού με κλαβουλανικό οξύ, όπως περιγράφεται στην εικόνα 28. Η τροποποιημένη αυτή φαινοτυπική δοκιμασία παρουσιάζει υψηλή ακρίβεια για την ανίχνευση ESBLs, τόσο σε στελέχη που παράγουν και άλλες β-λακταμάσες, όσο και σε αυτά που παράγουν αποκλειστικά ESBL (Poulou, et al, 2014). Οι μοριακές μέθοδοι ωστόσο προτιμώνται όταν κρίνεται απαραίτητη η διαπίστωση της ταυτόχρονης παραγωγής ESBL και MBL/KPC ενζύμων σε στελέχη Εντεροβακτηριακών (https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf).

AmpC β-λακταμάσες που παράγονται από στελέχη Εντεροβακτηριακών που παράγουν ταυτόχρονα και ESBL, αποτελούν επίσης αιτία απροσδιόριστων ή αρνητικών αποτελεσμάτων σε δοκιμασίες επιβεβαίωσης παραγωγής ESBL, όταν οι δοκιμασίες ελέγχου είναι θετικές (Black, et al, 2005; Doi and Paterson, 2007; Munier, et al, 2010). Σε αυτήν την περίπτωση, το κλαβουλανικό οξύ δεν αναστέλλει, αλλά αντίθετα αποτελεί επαγωγέα της παραγωγής AmpC β-λακταμασών, με αποτέλεσμα την παραγωγή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων λόγω υψηλού επιπέδου έκφρασης

AmpC ενζύμων (Kaur, et al, 2016). Ένδειξη παραγωγής AmpC β-λακταμάσης αποτελεί η αντοχή στις κεφαμυκίνες (π.χ. στην κεφοξιτίνη) (Doi and Paterson, 2007). Εξαιρέση αποτελούν στελέχη Εντεροβακτηριακών που παράγουν ACC β-λακταμάσες, διότι δεν είναι ανθεκτικά στην κεφοξιτίνη (Jacoby, 2009). Ωστόσο η αντοχή στην κεφοξιτίνη είναι δυνατό να οφείλεται σε μειωμένη διαπερατότητα και όχι σε παραγωγή AmpC ενζύμων (Brenwald, et al, 2005).

Αρχικά η κεφεπίμη χρησιμοποιείται ως κεφαλοσπορίνη δείκτης γιατί δεν υδρολύεται από AmpC β-λακταμάσες. Επιπλέον χρησιμοποιείται στις φαινοτυπικές δοκιμασίες επιβεβαίωσης ως αναστολέας των AmpC ενζύμων (Stürebürg, et al, 2004; Derbyshire, et al, 2009). Ψευδώς θετικά αποτελέσματα μπορεί να προκύψουν σε στελέχη *K. oxytoca* που υπερπαράγουν K1 χρωμοσωμικές β-λακταμάσες και όχι ESBL (Stürenburg, et al, 2004). Όσον αφορά την κλοξακιλλίνη, χρησιμοποιείται είτε σε δοκιμασίες CDT με δίσκους που περιέχουν κεφοταξίμη και κεφταζιδίμη σε συνδυασμό με κλαβουλανικό οξύ και κλοξακιλλίνη, είτε σε δοκιμασίες CDT ή DDST που διενεργούνται σε θρεπτικό άγαρ που περιέχει σταθερή συγκέντρωση κλοξακιλλίνης (200-250 mg/L), όπως περιγράφεται στην εικόνα 28 (Drieux, et al, 2008; Garrec, et al, 2011).

Ένας ακόμη αναστολέας των AmpC ενζύμων είναι το βορονικό οξύ, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε δοκιμασίες με δίσκους αντιμικροβιακών, είτε σε δοκιμασίες με μέτρηση της MIC (Moland, et al, 2008). Χρησιμοποιούνται υποδιπλάσιες αραιώσεις κεφοταξίμης και κεφταζιδίμης καθώς και των ίδιων αντιμικροβιακών με βορονικό οξύ καθώς και με ή χωρίς κλαβουλανικό οξύ. Οχταπλάσια ή και μεγαλύτερη μείωση στην MIC για τον συνδυασμό αντιμικροβιακού με βορονικό οξύ οδηγεί σε θετικό αποτέλεσμα. Περιορισμό της μεθόδου αποτελεί η συνδυασμένη παραγωγή KPC καρβαπενεμάσης από το υπό εξέταση στέλεχος όταν η μείωση στην ευαισθησία έναντι των καρβαπενεμών δεν είναι εμφανής (Jeong, et al, 2009). Εναλλακτικά όλες οι φαινοτυπικές δοκιμασίες επιβεβαίωσης παραγωγής ESBL είναι δυνατό να πραγματοποιηθούν σε Mueller Hinton άγαρ που περιέχει κλοξακιλλίνη με σκοπό την αναστολή της δράσης των κεφαλοσπορινασών (Drieux, et al, 2008; Garrec, et al, 2011; Nordmann, Gniadkowski, et al, 2012).



Εικόνα 28. Ανίχνευση ESBL σε στελέχη που υπερπαραγωγή σταθερά μια κεφαλοσπορινάση με δοκιμασία DDST σε άγαρ με κλοζακιλλίνη (200 mg/L).

Συνέργεια ανάμεσα στην κεφοταζίμη (CTX), κεφταζιδίμη (CAZ) ή κεφεπίμη (FEP) και το κλαβουλανικό οξύ (αμοξικιλίνη-κλαβουλανικό οξύ/AMC ή την τικαρκιλίνη-κλαβουλανικό/TCC) υποδεικνύεται με τα βέλη. (a) και (c) σε Mueller-Hinton άγαρ. (b) και (d) σε άγαρ με κλοζακιλλίνη

Πηγή: Drieux, et al, 2008

4.1.1.2 Κεφαλοσπορινάσες

Σε αντίθεση με τα ένζυμα μοριακής τάξης A, δεν υπάρχουν καθιερωμένες δοκιμασίες αρχικού ελέγχου αλλά και επιβεβαίωσης παραγωγής κεφαλοσπορινασών και κυρίως AmpC β-λακταμασών. Η αντοχή των Εντεροβακτηριακών στην κεφοξιτίνη καθώς και η αντοχή σε μια οξυμινοκεφαλοσπορίνη, όπως η κεφταζιδίμη είναι ενδεικτική της παραγωγής β-λακταμάσης τάξης C. Πρόκειται για μια μέθοδο ευαίσθητη αλλά όχι ειδική (Doi and Paterson, 2007). Εξαιρέση αποτελούν στελέχη Εντεροβακτηριακών που παράγουν AAC β-λακταμάσες τάξης C, τα οποία δεν παρουσιάζουν αντοχή στις κεφαμυκίνες (Bauernfeind, et al, 1999; Jacoby, 2009). Κάποια στελέχη Εντεροβακτηριακών είναι δυνατό να παρουσιάζουν υψηλότερες MIC στην κεφοξιτίνη, ενώ η ελαττωμένη παραγωγή OMP πρωτεϊνών σε στελέχη *E. coli* και *K. pneumoniae* οδηγεί σε μη-ευαίσθησία στην κεφοξιτίνη (Doi and Paterson, 2007). Οι κλασικοί αναστολείς β-λακταμασών, όπως το κλαβουλανικό οξύ, η

σουλμπακτάμη και η ταξομπακτάμη δεν αναστέλλουν τις β-λακταμάσες τάξης C. Στελέχη Εντεροβακτηριακών που παράγουν τάξης A β-λακταμάσες της οικογένειας IRT παρουσιάζουν επίσης αντοχή στους κλασικούς αναστολείς β-λακταμασών (Livermore, et al, 2001). Η υπερπαραγωγή ESBL, TEM-1 ή SHV ενζύμων αλλά και η συνδυασμένη παραγωγή ενζύμων τύπου OXA και ESBL είναι δυνατό να οδηγήσουν σε αντοχή στους κλασικούς αναστολείς των ESBL ενζύμων και να δημιουργήσουν φαινότυπο παρόμοιο με αυτό των AmpC (Doi and Paterson, 2007).

Σε στελέχη Εντεροβακτηριακών που παράγουν επαγώγιμες χρωμοσωμικές AmpC β-λακταμάσες, δεν είναι απαραίτητη η διεξαγωγή επιβεβαιωτικών φαινοτυπικών δοκιμασιών, διότι το είδος του μικροοργανισμού είναι ενδεικτικό της παραγωγής AmpC ενζύμων. Τέτοια στελέχη είναι τα *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *S. marcescens*, *Providencia spp*, *M. morgani*, *H. alvei*. Αυτά τα στελέχη έχουν την ικανότητα να αναπτύσσουν αντοχή λόγω μετάλλαξης κατά τη διάρκεια της θεραπείας με β-λακταμικά αντιμικροβιακά, εκτός από καρβαπενέμες και τέταρτης γενεάς κεφαλοσπορίνες (π.χ κεφεπίμη) (Thomson, 2010).

Από την επιτροπή EUCAST προτείνεται ως μέθοδος ελέγχου για στελέχη *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *Salmonella spp* και *Shigella spp* η αντοχή στην κεφοξιτίνη (MIC $\geq 8\text{mg/L}$ ή ζώνη αναστολής γύρω από δίσκο $< 19\text{mm}$) και η αντοχή στην κεφταζιδίμη ή/και την κεφοταξίμη (http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf).

Στην περίπτωση των Εντεροβακτηριακών στελεχών που υπερπαραγωγή σταθερά κεφαλοσπορινάσες, όπως τα στελέχη *Enterobacter spp*, η χρήση κεφεπίμης σε δοκιμασία DDST αυξάνει την ευαισθησία της μεθόδου στο 61%, όταν ο δίσκος τοποθετείται στα 30mm από δίσκο με κλαβουλανικό οξύ και στο 90%, όταν η απόσταση αυτή ελαττώνεται στα 20mm. Το ίδιο ισχύει και για στελέχη που υπερπαραγωγή AmpC β-λακταμάσες (Εικόνα 26). Η ευαισθησία της μεθόδου είναι μόνο 16% όταν χρησιμοποιούνται δίσκοι κεφοταξίμης, κεφτριαξόνης, κεφταζιδίμης και αζτρεονάμης (Drieux, et al, 2008). Η κεφεπίμη δεν υδρολύεται από AmpC β-λακταμάσες και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε όλες τις επιβεβαιωτικές δοκιμασίες συμπληρωματικά (CDT, DDST, δοκιμασία διαβαθμισμένης συγκέντρωσης

αντιμικροβιακού σε ταινίες, δοκιμασία μικροαραιώσεων σε ζωμό) αυξάνοντας σημαντικά την ευαισθησία και την ειδικότητα των δοκιμασιών (Polsfuss, et al, 2012).

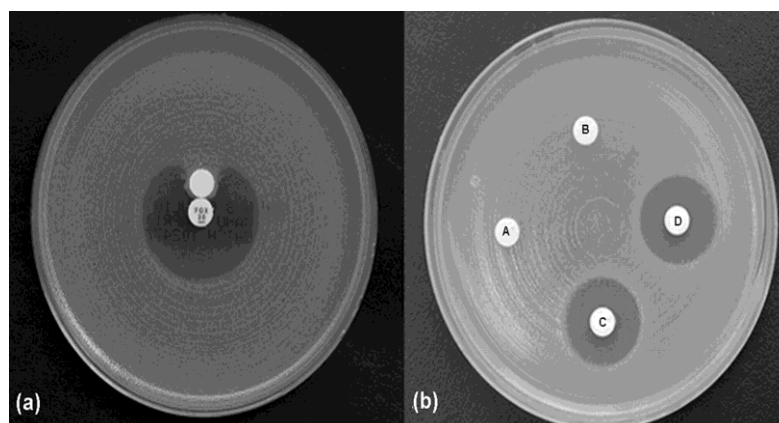
Έχουν πραγματοποιηθεί επιβεβαιωτικές μέθοδοι ανίχνευσης AmpC β-λακταμασών (DDST, CDT, Etests) με βορονικό οξύ ή τα παράγωγά του ή κλοξακιλλίνη ως αναστολείς αντίστοιχοι του κλαβουλανικού οξέος σε δοκιμασίες ανίχνευσης ESBLs. Με τις μεθόδους αυτές δεν είναι δυνατός ο διαχωρισμός μεταξύ πλασμιδιακών ή χρωμοσωμικών AmpC β-λακταμασών, ενώ απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή, όταν χρησιμοποιείται ως αναστολέας το βορονικό οξύ λόγω του κινδύνου παραγωγής ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, όταν τα υπό εξέταση στελέχη Εντεροβακτηριακών παράγουν KPC καρβαπενεμάσες (Yagi, et al, 2005; Coudron, 2005; Willems, et al, 2013).

Έχει μελετηθεί η **δοκιμασία διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιμικροβιακού** με κεφοξιτίνη μόνη και σε συνδυασμό με κλοξακιλλίνη ως φαινοτυπική μέθοδος επιβεβαίωσης παραγωγής AmpC. Τετραπλάσια ή και μεγαλύτερη μείωση της MIC της κεφοξιτίνης όταν συνδυάζεται με κλοξακιλλίνη λαμβάνεται ως θετικό αποτέλεσμα (Tan, et al, 2009). Ταινίες Etest που διατίθενται στο εμπόριο με διαβαθμισμένη συγκέντρωση κεφοτετάνης ή κεφοξιτίνης στην μια άκρη και συνδυασμό με σταθερή συγκέντρωση κλοξακιλλίνης στην άλλη μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επιβεβαίωση παραγωγής AmpC σε στελέχη Εντεροβακτηριακών με ασφάλεια (Willems, et al, 2013). Ταινία Etest κεφοτετάνης τοποθετείται στην επιφάνεια Mueller-Hinton άγαρ στο οποίο έχει ενοφθαλμιστεί το υπό εξέταση στέλεχος και μετά από ολονύκτια επώαση, οχταπλάσια ή και μεγαλύτερη μείωση της MIC παρουσία κλοξακιλλίνης αποτελεί θετικό αποτέλεσμα (Ingram, et al, 2011).

Έχει μελετηθεί **δοκιμασία CDT** με κεφοξιτίνη, κεφοξιτίνη και φαινυλοβορονικό οξύ ή κλοξακιλλίνη ή με συνδυασμό και των δυο αναστολέων. Καλύτερη ευαισθησία (96%) στην ανίχνευση AmpC ενζύμων παρουσίασε ο συνδυασμός κεφοξιτίνης με τους δυο αναστολείς και τιμή cut-off της διεύρυνσης της ζώνης αναστολής $\geq 4\text{mm}$ ενώ καλύτερη ειδικότητα (99%) παρουσίασε ο δίσκος κεφοξιτίνης με κλοξακιλλίνη και τιμή cut-off $\geq 6\text{mm}$. Ο συνδυασμός κλοξακιλλίνης και κεφοξιτίνης με τιμή cut-off $\geq 4\text{mm}$ παρουσίασε τον καλύτερο συνδυασμό ευαισθησίας (95%) και ειδικότητας (95%) (Tan, et al, 2009).

Η **δοκιμασία CDT με αμινοφαινυλοβορονικό οξύ (APB) ως αναστολέα** και κεφοταξίμη και κεφταζιδίμη ως κεφαλοσπορίνες δείκτες, μπορεί να ανιχνεύσει τις AmpC β-λακταμάσες (πλασμιδιακές ή χρωμοσωμικές) όταν ως cut-off χρησιμοποιείται διεύρυνση της ζώνης αναστολής $\geq 5\text{mm}$ (Yagi, et al, 2005; Willems, et al, 2013). Έχει επίσης πραγματοποιηθεί η **δοκιμασία συνέργειας** με δίσκο κεφοταξίμης ή κεφταζιδίμης και δίσκο που περιέχει APB σε απόσταση 18 mm, από κέντρο σε κέντρο μεταξύ των δίσκων, κατά την οποία παρατηρείται επέκταση της ζώνης αναστολής προς τον δίσκο με τον αναστολέα όταν το υπό εξέταση στέλεχος παράγει AmpC ένζυμα. Η **δοκιμασία μικροαραιώσεων σε ζωμό** έχει επίσης μελετηθεί, όπου οχταπλάσια ή μεγαλύτερη μείωση της MIC κεφοταξίμης ή κεφταζιδίμης, όταν συνδυάζεται με APB αποτελεί θετικό αποτέλεσμα (Yagi, et al, 2005). Η **δοκιμασία DDST με κλοξακιλλίνη ως αναστολέα** διατίθεται στο εμπόριο και είναι δυνατό να παράγει ψευδώς θετικά αποτελέσματα στην περίπτωση στελεχών *E. coli* που παράγουν φυσικά AmpC β-λακταμάσες, ενώ αυτό δεν παρατηρείται όταν χρησιμοποιείται το βορονικό οξύ ως αναστολέας και διάστημα 18mm από κέντρο σε κέντρο μεταξύ των δίσκων αντιβιοτικού, όταν εξετάζονται στελέχη *E. coli* και *K. pneumoniae* (Yagi, et al, 2005; Willems, et al, 2013).

Μια ακόμη φαινοτυπική δοκιμασία επιβεβαίωσης παραγωγής AmpC, απλή και ακριβής, είναι η **δοκιμή AmpC με δίσκους αντιμικροβιακού και EDTA (AmpC disk test)**. Όπως περιγράφεται στην εικόνα 29, βασίζεται στη χρήση Tris-EDTA με σκοπό την αύξηση της διαπερατότητας των βακτηριακών κυττάρων του υπό εξέταση στελέχους και την απελευθέρωση β-λακταμασών στο εξωτερικό του κυττάρου. Χρησιμοποιείται άγαρ Mueller-Hinton, στο οποίο ενοφθαλμίζεται ευαίσθητο στην κεφοξιτίνη πρότυπο στέλεχος *E. coli* ATCC25922. Δίσκος με Tris-EDTA και αποικίες του υπό εξέταση στελέχους (AmpC δίσκος) τοποθετείται στην επιφάνεια του άγαρ. Δίσκος κεφοξιτίνης τοποθετείται σε επαφή με τον δίσκο AmpC επάνω στο θρεπτικό άγαρ. Μετά από ολονύκτια επώαση, η παρουσία εσοχής ή επιπέδωσης στη ζώνη αναστολής της κεφοξιτίνης μεταφράζεται ως απενεργοποίηση της κεφοξιτίνης λόγω παραγωγής AmpC. Η δοκιμασία δεν επηρεάζεται από την συνδυασμένη παραγωγή ESBL, αλλά απαιτείται προσοχή όταν εξετάζονται στελέχη με ελαττωμένη ευαισθησία στις καρβαπενέμες λόγω της πιθανότητας να παράγουν καρβαπενεμάσες (Black, et al, 2005).



Εικόνα 29. Επιβεβαιωτικές δοκιμασίες παραγωγής AmpC.

α) Θετικό αποτέλεσμα από επιβεβαιωτική δοκιμασία *blaAmpC* με Tris-EDTA. Παρατηρείται ζώνη αναστολής ανάπτυξης της *E.coli* ATCC 25922 γύρω από δίσκο κεφοξιτίνης, με μια εσοχή κοντά στο δίσκο με Tris-EDTA και αποικίες του υπό εξέταση στελέχους. β) Θετικό αποτέλεσμα από επιβεβαιωτική δοκιμασία *blaAmpC* με το “MAST ID D68C disk test”. Εμφανίζεται ως διαφορά στη ζώνη αναστολής ανάπτυξης $\geq 5\text{mm}$ ανάμεσα σε δίσκους που περιέχουν κεφοδοξίμη με (C, D) και χωρίς (A, B) έναν μη ταυτοποιημένο αναστολέα *blaAmpC*

Πηγή: Ingram, et al, 2011

Ακόμη μια εναλλακτική για τον έλεγχο παραγωγής AmpC ενζύμων αποτελεί μια παραλλαγή του τροποποιημένου **Hodge Test**, κατά το οποίο ένα πρότυπο στέλεχος *E. coli* ευαίσθητο στην κεφοξιτίνη ενοφθαλμίζεται στην επιφάνεια Mueller-Hinton agar και δίσκος κεφοξιτίνης τοποθετείται στο κέντρο του τρυβλίου. Το υπό εξέταση στέλεχος ενοφθαλμίζεται με κρικοφόρο στυλεό σε ευθεία γραμμή που ξεκινά από το δίσκο κεφοξιτίνης προς την περιφέρεια του τρυβλίου και επωάζεται για 18 ώρες. Αλλοίωση στη ζώνη αναστολής της κεφοξιτίνης κοντά στο υπό εξέταση στέλεχος αποτελεί θετικό αποτέλεσμα. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με στελέχη *E. coli* και *K. pneumoniae* που παράγουν CMY-1 AmpC ένζυμα και απαιτείται περαιτέρω μελέτη για διαφορετικά AmpC ένζυμα (Yong, et al, 2002). Παρουσιάζει ευαισθησία 73% και ειδικότητα 95% (Ingram, et al, 2011).

Στο εμπόριο διατίθενται ταχείες δοκιμασίες με χρωμογόνα υποστρώματα ικανά να ανιχνεύσουν την παραγωγή AmpC ενζύμων όπως το **Cica-β-test**, το οποίο χρησιμοποιεί μια χρωμογόνο κεφαλοσπορίνη, HMRZ-86, σε συνδυασμό με διάφορους αναστολείς με σκοπό την ανίχνευση ESBL, MBL ή AmpC ενζύμων που

υπερπαράγονται (Livermore, et al, 2007; Garrec, et al, 2011). Παρουσιάζει χαμηλή ευαισθησία σε σχέση με άλλες δοκιμασίες και ειδικότητα 100%. Η συγκριτική ευαισθησία και ειδικότητα των μεθόδων που προαναφέρθηκαν δεν έχει μελετηθεί αρκετά (Ingram, et al, 2011).

4.1.1.3 Καρβαπενεμάσες

Στελέχη που παράγουν καρβαπενεμάσες συχνά είναι ανθεκτικά και σε άλλους αντιμικροβιακούς παράγοντες εκτός των β-λακταμικών, όπως οι κινολόνες, οι αμινογλυκοσίδες και η κοτριμοξαζόλη. Οι τιμές MIC που αφορούν τις καρβαπενέμες είναι δυνατό να ποικίλουν ανάλογα με τον τύπο της καρβαπενεμάσης που παράγουν τα στελέχη, το επίπεδο έκφρασης αυτής, το είδος του βακτηρίου και άλλους μηχανισμούς αντοχής που είναι δυνατό να διαθέτουν, όπως η παραγωγή κεφαλοσπορινασών (ESBL και AmpC) καθώς και η μειωμένη διαπερατότητα ή οι αντλίες ενεργητικής εκροής. Σε στελέχη Εντεροβακτηριακών οι υψηλές MIC στις καρβαπενέμες είναι δυνατό να οφείλονται σε υψηλού επιπέδου έκφραση AmpC ή CTX-M ESBL σε συνδυασμό με αλλαγές στην έκφραση των πορινών που εμποδίζουν τη συσσώρευση των β-λακταμικών παραγόντων στα βακτήρια (Stuart and Leverstein-Van Hall, 2010; Willems, et al, 2013; Lutgring and Limbago, 2016).

Ο έλεγχος για την παραγωγή καρβαπενεμάσης γίνεται σε δυο στάδια:

Αρχικά πραγματοποιείται ο έλεγχος αντιμικροβιακής ευαισθησίας, είτε με τη μέθοδο διάχυσης αντιμικροβιακού με δίσκους, είτε με τη μέθοδο μικροαραιώσεων του αντιμικροβιακού, είτε σε αυτοματοποιημένα συστήματα. Ο έλεγχος σε αυτοματοποιημένα συστήματα ίσως να μην ανιχνεύει αξιόπιστα όλα τα είδη των στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες. Η καρβαπενέμη που χρησιμοποιείται ως δείκτης είναι η μεροπενέμη γιατί συνδυάζει τα χαρακτηριστικά με την καλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα αν συγκριθεί με την ιμιπενέμη και την ερταπενέμη που παρουσιάζουν χαμηλότερη ειδικότητα. Η ερταπενέμη παρουσιάζει την υψηλότερη ευαισθησία, αλλά είναι δυνατό σπάνια να παρουσιάσει αστάθεια έναντι ESBL ενζύμων και AmpC σε συνδυασμό με απώλεια πορίνης με αποτέλεσμα να χαρακτηρίζεται από χαμηλότερη ειδικότητα (Nordmann, Gniadkowski, et al, 2012; Maurer, et al, 2015; Aguirre-Quiñonero and Martínez-Martínez, 2017). Η

φαροπενέμη παρουσιάζει παρόμοια ευαισθησία με υψηλότερη ειδικότητα συγκριτικά με τις υπόλοιπες καρβαπενέμες (Bartolini, et al, 2014; Hrabak, et al, 2014; Aguirre-Quiñonero and Martínez-Martínez, 2017).

Οι τιμές ECOFF (Epidemiological cut-off values), όπως ορίζονται από τη EUCAST, συνεισφέρουν σημαντικά στην ανίχνευση των καρβαπενεμασών. Στον πίνακα 5 παρουσιάζονται οι τιμές αυτές για τα Εντεροβακτηριακά που παράγουν καρβαπενεμάσες, καθώς και οι συγκεντρώσεις της καρβαπενέμης στα όρια (breakpoint) του ευαίσθητου (S) και του μέτρια ευαίσθητου (I) (http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf).

Σε κάποιες περιπτώσεις οι τιμές MIC της καρβαπενέμης-δείκτη στελεχών Εντεροβακτηριακών που παράγουν καρβαπενεμάσες βρίσκονται κάτω από το επίπεδο της τιμής cut-off. Συμπερασματικά, οποιοδήποτε στέλεχος Εντεροβακτηριακών με μειωμένη ευαισθησία στις καρβαπενέμες (με την εξαίρεση στελεχών *Proteus spp* και συγγενών μικροοργανισμών με χαμηλού επιπέδου αντοχή στην ιμιπενέμη) θα πρέπει να ελέγχεται περαιτέρω για την παραγωγή καρβαπενεμάσης (Miriagou, et al, 2010; Thomson, 2010; Nordmann, Gniadkowski, et al, 2012; Aguirre-Quiñonero and Martínez-Martínez, 2017).

Καρβαπενέμη	MIC (mg/L)		Διάμετρος ζώνης αναστολής (mm) με δίσκους συγκέντρωσης 10 μg	
	S/I breakpoint	Screening cut-off	S/I breakpoint	Screening cut-off
Μεροπενέμη¹	≤2	>0.125	≥22	<28 ²
Ερταπενέμη³	≤0.5	>0.125	≥25	<25

Πίνακας 5. Κλινικά breakpoints και τιμές cut-off για στελέχη Εντεροβακτηριακών που παράγουν καρβαπενεμάσες

¹Καλύτερος συνδυασμός ευαισθησίας και ειδικότητας

²Στελέχη με ζώνη αναστολής 25-27 mm ελέγχονται για παραγωγή καρβαπενεμάσης μόνο στην περίπτωση που είναι ανθεκτικά στο συνδυασμό πιπερακιλλίνης-ταζομπακτάμης και/ή στην τεμοκιλλίνη (η τεμοκιλλίνη συμβάλλει περισσότερο στην ειδικότητα). Ο έλεγχος για καρβαπενεμάσες επιβάλλεται όταν η ζώνη αναστολής της μεροπενέμης είναι < 25mm

³Υψηλή ευαισθησία αλλά χαμηλή ειδικότητα. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά ως δείκτης αλλά στελέχη με ESBL και AmpC ίσως είναι ανθεκτικά χωρίς να παράγουν καρβαπενεμάσες

Πηγή: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf

Σε δεύτερο στάδιο και κατόπιν της ανίχνευσης μειωμένης ευαισθησίας στις καρβαπενέμες πραγματοποιείται επιβεβαίωση με φαινοτυπικές δοκιμασίες. Αυτές είναι δοκιμασίες που βασίζονται σε συνδυασμό δίσκων αντιμικροβιακών, χρωματομετρικές ή άλλες μέθοδοι που βασίζονται ή ανιχνεύουν την υδρόλυση καρβαπενεμών, και δοκιμασίες πλευρικής ροής (Bialvaei, et al, 2016; Lutgring and Limbago, 2016; Aguirre-Quiñonero and Martínez-Martínez, 2017; Tamma and Simner, 2018). Οι δοκιμασίες αυτές στοχεύουν στην ανίχνευση παραγωγής καρβαπενεμάσης, αλλά δεν παρέχουν τη δυνατότητα της ανίχνευσης του συγκεκριμένου τύπου της καρβαπενεμάσης (Lutgring and Limbago, 2016).

Δοκιμασίες βασιζόμενες στη χρήση αναστολέων

Η δοκιμασία βασίζεται στις αλλαγές στο μέγεθος της ζώνης αναστολής της ανάπτυξης δίσκου καρβαπενέμης (συνήθως μεροπενέμης ή ιμιπενέμης) συγκριτικά με τη ζώνη αναστολής γύρω από δίσκο καρβαπενέμης με αναστολέα. Υπάρχουν εμπορικά τεστ τέτοιου είδους, όπως το KPC+MBL confirmation ID test και το Mastdisks combi Carba Plus, αλλά διενεργούνται με τα κατάλληλα υλικά και στον πάγκο του εργαστηρίου (Aguirre-Quiñonero and Martínez-Martínez, 2017; Tamma and Simner, 2018).

Το KPC+MBL confirmation ID test ανιχνεύει αξιόπιστα KPC και MBL καρβαπενεμάσες (ευαισθησία 96% και 92% αντίστοιχα) και προτείνεται από την EUCAST ως δοκιμασία αρχικού ελέγχου όλων των στελεχών με μειωμένη ευαισθησία στις καρβαπενέμες. Όσον αφορά, τα ένζυμα τύπου OXA-48 και AmpC, τα αποτελέσματα ήταν αμφισβητήσιμα και ο έλεγχος με δεύτερη μέθοδο επιβεβλημένος. Αποτελείται από έναν δίσκο μεροπενέμης, έναν μεροπενέμης με διπικολινικό οξύ, έναν μεροπενέμης με βορονικό οξύ και έναν δίσκο μεροπενέμης με κλοξακιλλίνη (Girlich, et al, 2013; Bartolini, et al, 2014).

Από τους αναστολείς, το βορονικό οξύ και τα παράγωγά του, φαινυλοβορονικό οξύ (PBA) και 3-αμινο φαινυλοβορονικό οξύ (APBA), αναστέλλουν τις καρβαπενεμάσες τάξης A (κυρίως KPC), το διπικολινικό οξύ (DPA) και το αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) αναστέλλουν τις καρβαπενεμάσες τάξης B ενώ η κλοξακιλλίνη αναστέλλει τις AmpC β-λακταμάσες και συμβάλλει στο διαχωρισμό ανάμεσα στην παραγωγή καρβαπενεμάσης και στην παραγωγή AmpC μαζί με απώλεια πορίνης (Hrabak, et al, 2014). Στον πίνακα 6 παρουσιάζονται συνοπτικά οι φαινοτυπικές δοκιμασίες που πραγματοποιούνται με δίσκους μεροπενέμης και διάφορους αναστολείς σύμφωνα με την EUCAST.

β-λακταμάσες	Συνέργεια που παρατηρείται ως αύξηση στη διάμετρο της ζώνης αναστολής ανάπτυξης (mm) με δίσκο μεροπενέμης (10μg)				MIC τεμοκιλλίνης >128 mg/L ή διάμετρος ζώνης <11mm
	DPA/EDTA	APBA/PBA	DPA+APBA	CLX	
MBL	+	-	-	-	Μεταβλητός ¹
KPC	-	+	-	-	Μεταβλητός ¹
MBL+KPC ²	Μεταβλητός	Μεταβλητός	+	-	Μεταβλητός ¹
OXA-48-like	-	-	-	-	Ναι
AmpC + porin loss	-	+	-	+	Μεταβλητός ¹
ESBL + porin loss	-	-	-	-	Όχι

Πίνακας 6. Ερμηνεία φαινοτυπικών δοκιμασιών με μεθόδους διάχυσης με δίσκους.

Συνομειώσεις: 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 δοκιμασία ευαισθησίας με τεμοκιλλίνη προτείνεται μόνο σε περιπτώσεις που δεν παρατηρείται καμία συνέργεια, με στόχο τον διαχωρισμό ανάμεσα σε παραγωγή ESBL ενζύμων σε συνδυασμό με απώλεια πορίνης και ενζύμων τύπου OXA-48. Όταν άλλα ένζυμα είναι παρόντα, η ευαισθησία ποικίλει και δεν προσφέρει επιπλέον ένδειξη για την β-λακταμάση που παράγεται. ² Υπάρχει μια αναφορά υπέρ της χρήσης εμπορικών δίσκων που περιέχουν διπλούς αναστολείς (DPA ή EDTA σε συνδυασμό με APBA ή PBA) αλλά πολυκεντρικές μελέτες λείπουν. Αυτός ο συνδυασμός προκαλεί υψηλού επιπέδου αντοχή στις καρβαπενέμες και είναι σπάνιος εκτός της Ελλάδας.

Πηγή: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf

Η δοκιμασία συνδυασμένων δίσκων αντιμικροβιακού (CDT) παρουσιάζει ευαισθησία >90% και ειδικότητα >96% σε στελέχη Εντεροβακτηριακών και κυρίως εκείνα που παράγουν τάξης A καρβαπενεμάσες (Tsakris, et al, 2010; Bartolini, et al,

2014). Δίσκοι μεροπενέμης και μεροπενέμης με PBA ή EDTA ή και τους δυο αναστολείς τοποθετούνται σε Mueller-Hinton άγαρ που έχει ενοφθαλμιστεί το υπό εξέταση στέλεχος. Μετά από επώαση στους 37°C, ελέγχεται η διεύρυνση στη ζώνη αναστολής ανάπτυξης γύρω από τους δίσκους. Διεύρυνση ≥ 5 mm στη ζώνη αναστολής γύρω από το δίσκο μεροπενέμης με EDTA και τον συνδυασμό EDTA και PBA συγκριτικά με το δίσκο μεροπενέμης, συνηγορεί για παραγωγή MBL. Αντίστοιχα, διεύρυνση ≥ 5 mm στη ζώνη αναστολής του δίσκου μεροπενέμης με PBA καθώς και του δίσκου με συνδυασμό PBA και EDTA συνεπάγεται παραγωγή KPC. Όταν η ίδια διεύρυνση παρατηρείται μόνο γύρω από το δίσκο μεροπενέμης με το συνδυασμό EDTA και PBA, συμπεραίνουμε ότι το υπό εξέταση στέλεχος παράγει MBL και KPC ένζυμα. Όταν κανένα από τα παραπάνω δεν παρατηρείται, το υπό εξέταση στέλεχος είναι αρνητικό για την παραγωγή MBL και KPC ενζύμων (Tsakris, et al, 2010; Pournaras, et al, 2010).

Παρόμοια είναι η **δοκιμασία συνέργειας διπλών δίσκων αντιμικροβιακού (DDST)**, όπου δίσκος β-λακταμικού αντιμικροβιακού και δίσκος με αναστολέα β-λακταμάσης τοποθετούνται σε τρυβλίο όπου έχει προηγηθεί ενοφθαλμισμός του υπό εξέταση στελέχους. Η παρουσία διεύρυνσης στη ζώνη αναστολής (συνεργική ζώνη αναστολής) μετά από επώαση ερμηνεύεται ως θετικό αποτέλεσμα. Οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί καταδεικνύουν ευαισθησία 100% και ειδικότητα > 91%, όταν οι δίσκοι τοποθετούνται σε απόσταση 10mm, αλλά απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την επιβεβαίωση αυτών των δεδομένων. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δοκιμασία ελέγχου για την παραγωγή MBL, αλλά προτείνεται να μην χρησιμοποιείται ως μοναδική δοκιμασία ελέγχου της παρουσίας MBL (Galani, et al, 2008).

Η **δοκιμασία διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιμικροβιακού (Gradient Test) με ταινίες Etest**, χρησιμοποιείται για την ανίχνευση κυρίως MBL και KPC καρβαπενεμασών ξεχωριστά, και βασίζεται στο συνδυασμό μιας καρβαπενέμης (συνήθως ιμιπενέμης ή μεροπενέμης) με έναν αναστολέα β-λακταμασών σε μια ταινία που περιέχει αραιώσεις του αντιμικροβιακού παράγοντα στην μια άκρη και αραιώσεις του συνδυασμού με τον αναστολέα στην άλλη. Παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα κυρίως στην ανίχνευση MBL καρβαπενεμασών. Ταινίες με ιμιπενέμη και ιμιπενέμη με EDTA στην άλλη άκρη ή μεροπενέμη και μεροπενέμη με EDTA στην άλλη άκρη, χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση MBL ενζύμων, ενώ

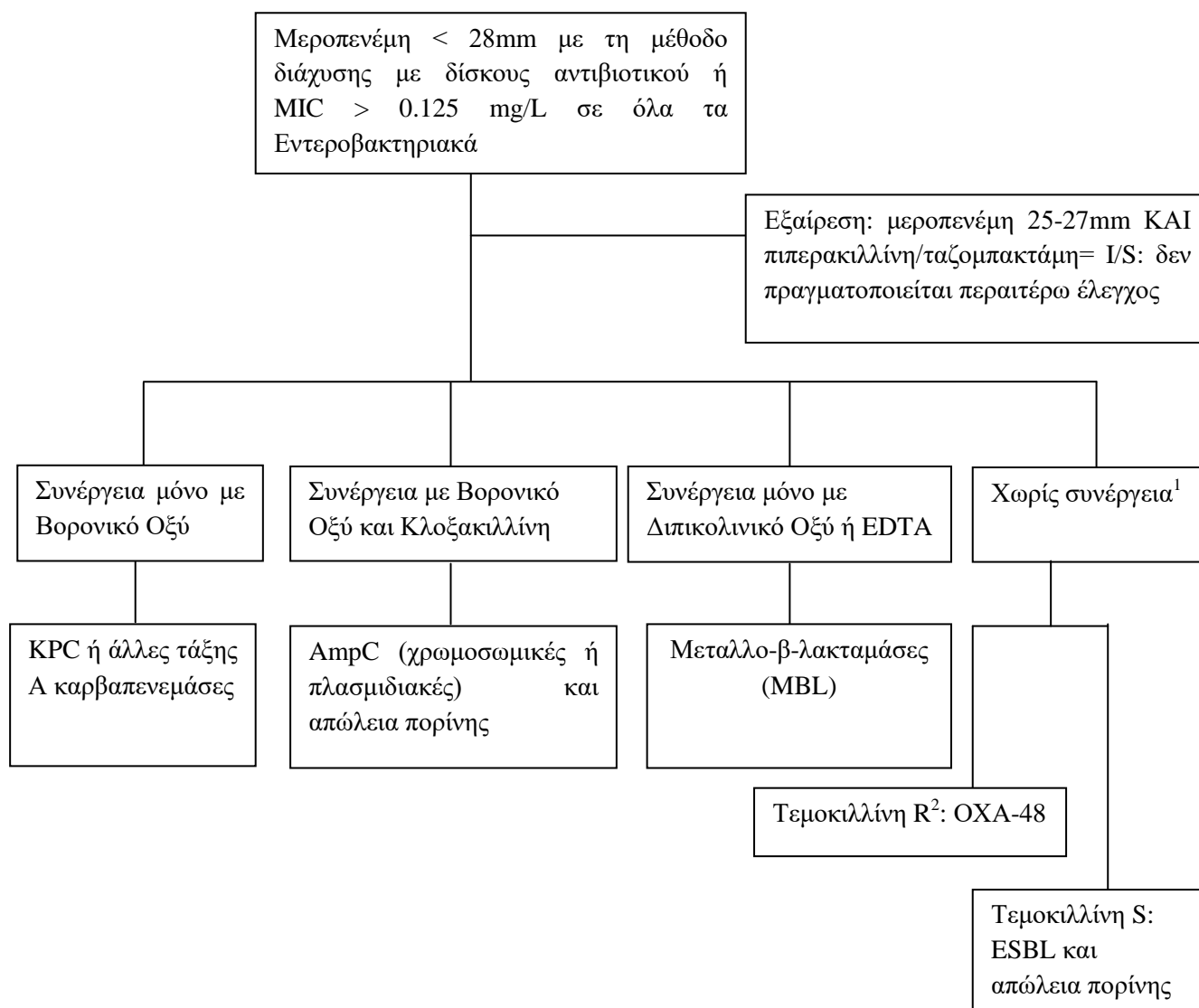
ταινία με μεροπενέμη και μεροπενέμη με βορονικό οξύ στην άλλη άκρη χρησιμοποιείται για την ανίχνευση KPC καρβαπενεμασών. Μετά την μέτρηση της MIC και στις δυο άκρες της ταινίας, τριπλάσια ή και μεγαλύτερη μείωση στην MIC στον συνδυασμό καρβαπενέμης με τον αναστολέα συνεπάγεται θετικό αποτέλεσμα. Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις τα αποτελέσματα θεωρούνται αρνητικά ή απροσδιόριστα π.χ όταν οι MIC βρίσκονται επάνω ή κάτω από το επίπεδο ανίχνευσης των ταινιών (Girlich, et al, 2013; Bartolini, et al, 2014).

Οι καρβαπενεμάσες τύπου OXA-48 δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ, τη σουλμπακτάμη, την ταζομπακτάμη ή από ιόντα ψευδαργύρου. Η υψηλού επιπέδου αντοχή στην τεμοκιλλίνη (MIC >128 mg/L) έχει προταθεί ως δείκτης παραγωγής OXA-48 καρβαπενεμάσης. Παρουσιάζει χαμηλή ειδικότητα και επιβάλλεται η επιβεβαίωση με άλλες δοκιμασίες διότι ο ίδιος φαινότυπος αντοχής είναι δυνατό να εκδηλωθεί και από άλλους μηχανισμούς αντοχής, π.χ παραγωγή AmpC με απώλεια πορίνης. Η αβιμπακτάμη αποτελεί έναν μη β-λακταμικό αναστολέα της OXA-48 καρβαπενεμάσης αλλά προς το παρόν δεν συμπεριλαμβάνεται στις φαινοτυπικές δοκιμασίες επιβεβαίωσης (Huang, Berhin, et al, 2014; Aguirre-Quiñonero and Martínez-Martínez, 2017). Σε γεωγραφικές περιοχές με υψηλή επίπτωση στελεχών που παράγουν OXA-48, έχει προταθεί ο αποκλεισμός της παρουσίας OXA-48 με έλεγχο της ευαισθησίας στην τεμοκιλλίνη, καθώς και στον συνδυασμό πιπερακιλλίνης-ταζομπακτάμης (Huang, Poirel, et al, 2014).

Μια νέα δοκιμασία ικανή να ανιχνεύσει την παρουσία OXA-48 έχει προταθεί. Σε Mueller-Hinton άγαρ ενοφθαλμίζεται πρότυπο στέλεχος *E.coli* ATCC 25922 και δίσκος ιμιπενέμης (10 µg). Ένας δίσκος εμποτισμένος με EDTA και ένας με EDTA και PBA, στους οποίους έχουν τοποθετηθεί 2-3 αποικίες του υπό εξέταση στελέχους, τοποθετούνται στην επιφάνεια του άγαρ εφραπτόμενοι με το δίσκο ιμιπενέμης και εκατέρωθεν αυτού. Μετά από επώαση 18 ωρών, η παρουσία εσοχής ή επιπέδωσης της ζώνης αναστολής προς τον δίσκο με EDTA και τον δίσκο με EDTA και PBA αποτελούν ένδειξη παραγωγής OXA-48. Παρουσία εσοχής προς τον δίσκο με EDTA χωρίς παρουσία εσοχής στη ζώνη ανάπτυξης προς τον δίσκο με EDTA/PBA είναι ενδεικτική παραγωγής KPC ή KPC και MBL. Απουσία ανάπτυξης στους δυο δίσκους είναι ενδεικτική παραγωγής MBL καρβαπενεμάσης ή ESBL/AmpC σε συνδυασμό με απώλεια πορίνης (Tsakris, et al, 2015). Έχει επίσης μελετηθεί ο έλεγχος της ευαισθησίας στην τεμοκιλλίνη, είτε με δίσκους, είτε με ταινίες Etest σε

Mueller-Hinton άγαρ με κλοξακιλλίνη. Με τη μέθοδο αυτή αυξάνεται η ειδικότητα της δοκιμασίας ελέγχου με τεμοκιλλίνη και δεν επηρεάζεται η ευαισθησία (Maurer, et al, 2015).

Στον πίνακα 7 περιγράφεται σύμφωνα με την EUCAST, ένας αλγόριθμος διαχωρισμού παραγωγής MBLs, τάξης A καρβαπενεμασών, τάξης D καρβαπενεμασών και ESBL ή AmpC σε συνδυασμό με απώλεια πορίνης (http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf).



Πίνακας 7. Αλγόριθμος διαχωρισμού παραγωγής καρβαπενεμασών.

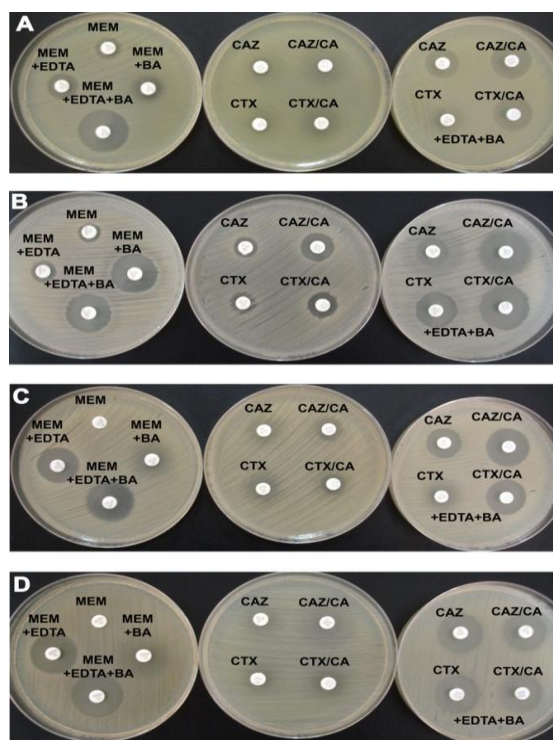
¹Ο συνδυασμός διάφορων καρβαπενεμασών μπορεί να οδηγήσει σε μη-συνέργεια π.χ. MBL και KPC σε συνδυασμό. Μοριακός έλεγχος είναι συνήθως απαραίτητος σε τέτοιες περιπτώσεις.

² Υψηλού-επιπέδου αντοχή στην τεμοκιλλίνη (>128 mg/L, ζώνη αναστολής <11mm) είναι φαινοτυπικός δείκτης παραγωγής OXA-48

Πηγή: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf

Οι δοκιμασίες αυτές είναι εύκολες και οικονομικές. Το μειονέκτημά τους είναι ο χρόνος που απαιτείται για τα αποτελέσματα (24 ώρες) και η ανάγκη επιβεβαίωσης με άλλη μέθοδο, όταν τα αποτελέσματα είναι αμφίβολα. Παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα σε στελέχη Εντεροβακτηριακών που παράγουν έναν τύπο καρβαπενεμάσης, αλλά όταν πρόκειται για στελέχη που παράγουν

ταυτόχρονα διαφορετικά είδη καρβαπενεμασών, η ευαισθησία και η ειδικότητα ελαττώνονται (Aguirre-Quiñonero and Martínez-Martínez, 2017). Στην εικόνα 30 περιγράφονται φαινοτυπικές δοκιμασίες που εφαρμόζονται στην περίπτωση ταυτόχρονης παραγωγής διαφορετικών ενζύμων από το ίδιο στέλεχος. Στην περίπτωση αμφίβλων αποτελεσμάτων των επιβεβαιωτικών φαινοτυπικών δοκιμασιών καθώς και όταν υπάρχει η υποψία παραγωγής συνδυασμού ενζύμων από ένα στέλεχος, προτείνεται η διενέργεια μοριακών τεχνικών, οι οποίες αποτελούν τη μέθοδο αναφοράς (Nordmann, Gniadkowski, et al, 2012; Van Dijk, et al, 2013; Bartolini, et al, 2014).



Εικόνα 30. Αποτελέσματα του επιβεβαιωτικού φαινοτυπικού τεστ (δύετηρη σειρά) και η προτεινόμενη τροποποίηση (τρίτη σειρά) με δίσκους που περιέχουν EDTA και BA για στελέχη που παράγουν KPC, VIM και ESBL (A), KPC και ESBL (B), VIM και ESBL (C) και VIM (D) β-λακταμάσες. Η πρώτη στήλη αντιπροσωπεύει αποτελέσματα φαινοτυπικών δοκιμασιών για την ανίχνευση και διαφοροποίηση των καρβαπενεμασών σε στελέχη Εντεροβακτηριακών με δίσκους μεροπενέμης (MEM) με και χωρίς EDTA, BA ή EDTA και BA

Δοκιμασίες που βασίζονται στην υδρόλυση καρβαπενέμης

1. Modified Hodge Test (MHT)

Είναι μια δοκιμασία οικονομική και απλή αλλά οδηγεί αρκετά συχνά σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα όταν πρόκειται για στελέχη που παράγουν ESBL σε συνδυασμό με απώλεια πορίνης ή μετάλλαξη και AmpC κεφαλοσπορινάσες με απώλεια πορίνης καθώς και ψευδώς αρνητικά όταν πρόκειται για στελέχη που παράγουν NDM-1 καρβαπενεμάσες (Bartolini, et al, 2014; Hrabak, et al, 2014; Elshamy and Absoranab, 2020). Τόσο η επιτροπή CLSI (Elshamy and Absoranab, 2020) όσο και η EUCAST έχουν αποκλείσει τη δοκιμασία από τις κατευθυντήριες οδηγίες τους (http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf). Προτείνεται από τον CDC μόνο για την ανίχνευση KPC, αλλά στελέχη που είναι θετικά στη δοκιμασία είναι απαραίτητο να υποβάλλονται σε μοριακό έλεγχο για την ανίχνευση της παρουσίας του υπεύθυνου γονιδίου τάξης A καρβαπενεμάσης. Θετικά ή αμφίβολα αποτελέσματα είναι σημαντικό να επιβεβαιώνονται με άλλες δοκιμασίες. Είναι μια χρήσιμη δοκιμασία σε περιοχές όπου KPC ένζυμα είναι ενδημικά, αλλά δεν συνεισφέρει σημαντικά στη φαινοτυπική ανίχνευση σε μέρη όπου επικρατούν και άλλες καρβαπενεμάσες, όπως MBL. Παρουσιάζει ευαισθησία και ειδικότητα >90% για καρβαπενεμάσες τάξης A (τύπου KPC) και τάξης D (OXA-48), αλλά χαμηλή ευαισθησία για MBL καρβαπενεμάσες, χαμηλή ειδικότητα για καρβαπενεμάσες με σερίνη στο ενεργό κέντρο και αποτελεί μια αρκετά χρονοβόρα διαδικασία (24-48 ώρες, μετά την απομόνωση του στελέχους) (Hrabak, et al, 2014; Takayama, et al, 2015; Bialvaei, et al, 2016).

Η μεθοδολογία περιλαμβάνει τον ενοφθαλμισμό του υπό εξέταση στελέχους σε ευθεία γραμμή από δίσκο ερταπενέμης ή μεροπενέμης που έχει τοποθετηθεί σε τρυβλίο στο οποίο έχει ενοφθαλμιστεί ευαίσθητο στις καρβαπενέμες πρότυπο στέλεχος *E.coli* ATCC 25922. Η εμφάνιση αλλοίωσης στη ζώνη αναστολής αποτελεί θετικό αποτέλεσμα (Amjad, et al, 2011). Έχει προταθεί η προσθήκη θεικού ψευδαργύρου με στόχο τη βελτίωση της ευαισθησίας για την ανίχνευση KPC, MBL,

OXA-48 καρβαπενεμασών και κυρίως NDM-1 στελεχών. Ωστόσο δεν παρουσιάστηκε αλλαγή στην ειδικότητα της μεθόδου (Girlich, et al, 2012).

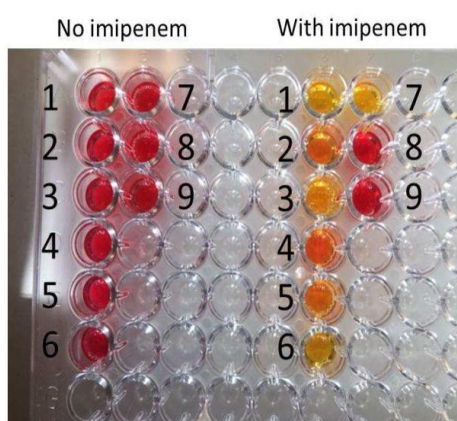
2. Χρωματομετρικές μέθοδοι

Βασίζονται στην ενζυμική υδρόλυση του β-λακταμικού δακτυλίου της καρβαπενέμης υπό την παρουσία και δράση καρβαπενεμάσης που οδηγεί σε ελάττωση του pH και αλλαγή του χρώματος του δείκτη. Κύριο πλεονέκτημα των μεθόδων αυτών είναι ο σύντομος χρόνος που απαιτείται για το αποτέλεσμα (≤ 2 ώρες) καθώς και η απλότητα και ευκολία διενέργειας. Υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα kit, όπως το RAPIDEC CARBA-NP, RAPID CARB Screen, Neo-Rapid CARB και RAPID CARB Blue kit, που στηρίζονται σε αυτή την μεθοδολογία (Aguirre-Quiñonero and Martínez-Martínez, 2017).

- **Δοκιμασία CARBA-NP:** Η δοκιμασία αυτή (Εικόνα 31) είναι φθηνή και ταχεία (<2 ώρες). Παρουσιάζει ευαισθησία 97% και ειδικότητα 100% (Dortet, et al, 2015). Ανιχνεύει καρβαπενεμάσες τάξης A (KPC, NMC-A, SME, GES, IMI), καρβαπενεμάσες τάξης B (NDM, VIM, IMP) και τάξης D (τύπου OXA-48). Βασίζεται στην υδρόλυση της ιμιπενέμης από το υπό εξέταση στέλεχος. Η αλλαγή του pH που προκαλείται από την υδρόλυση, οδηγεί σε αλλαγή του χρώματος του δείκτη (ερυθρό της φαινόλης) από κόκκινο σε πορτοκαλί ή κίτρινο. Στην περίπτωση στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες, ικανοποιητική αλλαγή του χρώματος προκύπτει εντός 30 λεπτών. Πρόκειται για μια ταχεία δοκιμασία ικανή να διαχωρίσει στελέχη που παράγουν καρβαπενεμάσες, από εκείνα με άλλους μηχανισμούς αντοχής στις καρβαπενέμες, όπως ESBL ή υπερπαραγωγή κεφαλοσπορινάσης σε συνδυασμό με απώλεια πορίνης καθώς και από εκείνα που είναι ευαίσθητα στις καρβαπενέμες, αλλά παράγουν ESBL ή πλασμιδιακές και χρωμοσωμικές κεφαλοσπορινάσες (Nordmann, Poirel, et al, 2012).
- **Δοκιμασία Blue-Carba:** Αποτελεί παραλλαγή της δοκιμασίας CARBA NP με ευαισθησία 100% και ειδικότητα 97% (Dortet, et al, 2015). Επιτρέπει την ανίχνευση παραγωγής καρβαπενεμάσης απευθείας από τη βακτηριακή αποικία, χωρίς να προηγηθεί κάποια προετοιμασία του δείγματος και δείκτης αλλαγής του pH είναι το μπλε της βρωμοθυμόλης. Υπερτερεί συγκριτικά με

τη δοκιμασία Carba NP διότι δεν απαιτεί την προετοιμασία εναιωρήματος του βακτηρίου και το κόστος είναι αρκετά πιο χαμηλό. Ωστόσο ο χρόνος που απαιτείται για την ανίχνευση παραγωγής ενζύμων τύπου OXA είναι σχετικά μεγάλος (≈ 2 ώρες) (Pires, et al, 2013; Pasteran, et al, 2015).

- **Δοκιμασία β CARBA:** Πρόκειται για μια ταχεία (< 2 ώρες) βιοχημική δοκιμασία που στηρίζεται στην αλλαγή του χρώματος ενός χρωμογόνου υποστρώματος, όταν το υπό εξέταση στέλεχος παράγει καρβαπενεμάσες. Είναι μια καλή επιλογή ως δοκιμασία ελέγχου παραγωγής καρβαπενεμασών και ως δοκιμασία επιβεβαίωσης μετά την διαπίστωση χαμηλής ευαισθησίας στις καρβαπενέμες, όσον αφορά στελέχη Εντεροβακτηριακών, ενώ μπορεί να εφαρμοσθεί σε αποικίες βακτηρίων που αναπτύσσονται σε εκλεκτικά θρεπτικά υλικά ελέγχου παραγωγής καρβαπενεμασών. Η ανάγνωση του αποτελέσματος είναι πιο εύκολη σε σχέση με τη δοκιμασία Carba NP και το Rapidec Carba NP. Ωστόσο παρουσιάζει χαμηλή ευαισθησία ως προς την ανίχνευση παραγωγής καρβαπενεμασών OXA και δεν δύναται να ανιχνεύσει καρβαπενεμάσες τάξης A, εκτός των KPC (Bernabeu, et al, 2017). Ψευδώς θετικά αποτελέσματα είναι δυνατό να προκύψουν με στελέχη *K.oxytoca* που υπερπαραγουν K1 β-λακταμάσες (Noëll, et al, 2017).



Εικόνα 31. Παράδειγμα δοκιμασίας Carba NP.

Στα βοηθία 1-7 βρίσκονται στελέχη που παράγουν καρβαπενεμάσες. Φωτογραφία μετά από 1 ώρα επώασης

Πηγή: Iovlena and Doi, 2017

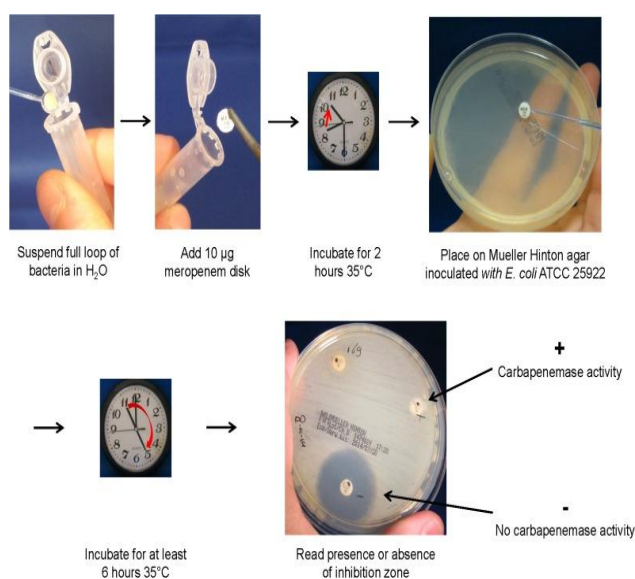
- Η **νιτροσεφίνη** αποτελεί μια χρωμογόνο κεφαλοσπορίνη που υδρολύεται από β-λακταμάσες. Η χρήση της αποτελεί μια από τις πιο κοινές μεθόδους ανίχνευσης της παρουσίας β-λακταμασών σε gram αρνητικά αλλά και gram θετικά βακτήρια. Οι καρβαπενέμες εμποδίζουν την υδρόλυση της

νιτροσεφίνης από ESBL και AmpC ένζυμα. Έχει μελετηθεί ο συνδυασμός της νιτροσεφίνης με ερταπενέμη ως ταχεία δοκιμασία ελέγχου παραγωγής καρβαπενεμασών (αποτέλεσμα εντός 30 λεπτών) και για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ένας δίσκος νιτροσεφίνης και ένας με νιτροσεφίνη και ερταπενέμη. Αλλαγή χρώματος από κίτρινο σε κόκκινο παρατηρείται και στους δυο δίσκους όταν το υπό εξέταση στέλεχος παράγει καρβαπενεμάσες. Αλλαγή χρώματος μόνο στο δίσκο της νιτροσεφίνης παρατηρείται όταν το υπό εξέταση στέλεχος δεν παράγει καρβαπενεμάση και καμία αλλαγή στο χρώμα παρατηρείται στους δίσκους όταν το υπό εξέταση στέλεχος δεν παράγει β-λακταμάσες. Παρουσιάζει καλή ευαισθησία και ειδικότητα, ενώ μπορεί να ανιχνεύσει στελέχη που υπερπαράγουν AmpC β-λακταμάσες και παρουσιάζουν ενδιάμεση ευαισθησία στην ερταπενέμη καθώς και στελέχη που παράγουν OXA-48 τύπου ένζυμα. Κρίνεται ωστόσο απαραίτητη η περαιτέρω μελέτη της συγκεκριμένης δοκιμασίας (Teethaisong, et al, 2018).

- **Χρωμογόνα θρεπτικά υλικά** χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο φορέας, κυρίως σε δείγματα κοπράνων, με στόχο την μικροβιακή επιτήρηση και τον έλεγχο διασποράς ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών (Vrioni, et al, 2012). Ο ρόλος τους είναι κυρίως ο έλεγχος αντοχής στις καρβαπενέμες και όχι η ανίχνευση στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες. Το CHROMagar KPC περιέχει μια καρβαπενέμη και ανιχνεύει βακτήρια με υψηλού επιπέδου αντοχή στις καρβαπενέμες, αλλά όχι εκείνα με χαμηλού επιπέδου αντοχή στις καρβαπενέμες όπως π.χ. αρκετά στελέχη που παράγουν MBL και OXA-48 τύπου ένζυμα. Το CRE Brilliance περιέχει καρβαπενέμη και ανιχνεύει στελέχη που παράγουν KPC, MBL και αρκετά OXA-48 τύπου ένζυμα. Το SUPERCARBA περιέχει κλοξακιλλίνη, ψευδάργυρο και ερταπενέμη (Nordmann and Poirel, 2013) και παρουσιάζει ευαισθησία 92.4% και ειδικότητα 96.9% για την ανίχνευση στελεχών ανθεκτικών στις καρβαπενέμες με υψηλού ή χαμηλού επιπέδου αντοχή (Vrioni, et al, 2012). Έχει προταθεί η αρχική χρήση του SUPERCARBA και η συμπληρωματική χρήση της δοκιμής Carba NP με σκοπό την ανίχνευση των στελεχών που είναι ανθεκτικά στις καρβαπενέμες, λόγω παραγωγής καρβαπενεμάσης (Nordmann and Poirel, 2013).

3. Μέθοδος Απενεργοποίησης Καρβαπενέμης (Carbapenem Inactivation Method-CIM)

Ανιχνεύει την παραγωγή καρβαπενεμασών εντός 8 ωρών. Εναιώρημα του υπό εξέταση βακτηριακού στελέχους επωάζεται σε σωληνάριο για 2 ώρες τουλάχιστον στους 35° C μαζί με δίσκο μεροπενέμης (10μg). Στη συνέχεια ο δίσκος μεροπενέμης τοποθετείται σε Mueller-Hinton άγαρ, στο οποίο έχει ενοφθαλμιστεί εναιώρημα πρότυπου στελέχους *E.coli* ATC 25922, ευαίσθητου στις καρβαπενέμες και επωάζεται εκ νέου στους 35°C για τουλάχιστον 6 ώρες (ή ολονύκτια επώαση). Αν το υπό εξέταση στέλεχος παράγει καρβαπενεμάση, τότε η μεροπενέμη έχει απενεργοποιηθεί λόγω υδρόλυσης και το πρότυπο στέλεχος *E.coli* αναπτύσσεται κοντά στο δίσκο μεροπενέμης. Αντίθετα αν το υπό εξέταση στέλεχος δεν παράγει καρβαπενεμάση, παρατηρείται μεγάλη ζώνη αναστολής της ανάπτυξης του πρότυπου στελέχους κοντά στο δίσκο μεροπενέμης. Στην εικόνα 32 απεικονίζεται η μέθοδος CIM σε στάδια (van der Zwaluw, et al, 2015). Έχει παρατηρηθεί 100% συμφωνία στα αποτελέσματα ελέγχου παραγωγής καρβαπενεμάσης σε στελέχη Εντεροβακτηριακών με CIM και μοριακές μεθόδους και 96,6% με την δοκιμασία Carba NP, αλλά είναι μια μέθοδος πολύ πιο οικονομική, δεν απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό και ο χρόνος που απαιτείται για την προετοιμασία πριν την επώαση είναι πολύ μικρός (van der Zwaluw, et al, 2015; McMullen, et al, 2017).



Εικόνα 32. Σχηματική απεικόνιση της CIM

Πηγή: van der Zwaluw, et al, 2015

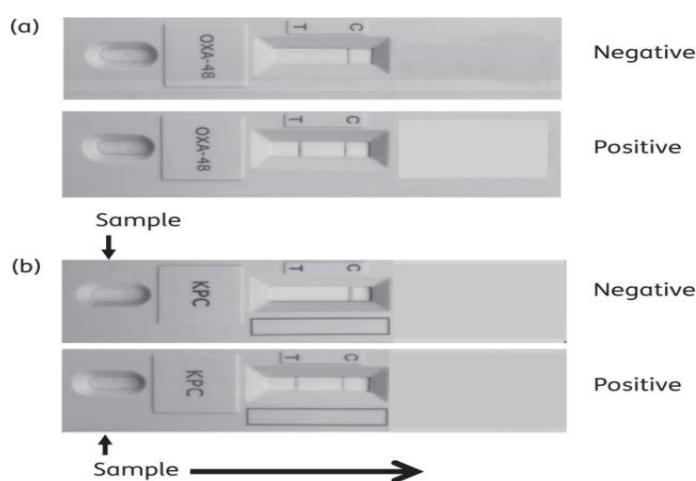
Φασματομετρία Μάζας MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight)

Η Φασματομετρία μάζας με ιονισμό εκρόφησης με τη βοήθεια χημικού υποστρώματος-μήτρας σε αναλυτή «χρόνου πτήσης» (MALDI-TOF) έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την ταυτοποίηση μικροοργανισμών και έχει συμβάλει σημαντικά στην σωστή επιλογή της εμπειρικής θεραπείας λοιμώξεων (Lasserre, et al, 2015). Αρκετές τεχνικές ανίχνευσης καρβαπενεμάσης με τη βοήθεια της φασματομετρίας μάζας έχουν αναπτυχθεί αλλά ακόμα δεν χρησιμοποιούνται στη ρουτίνα του εργαστηρίου. Συγκεκριμένα, σε διάλυμα που περιέχει καρβαπενέμη φέρεται αποικία του υπό εξέταση στελέχους και επωάζεται στους 37°C για χρονικό διάστημα που μπορεί να κυμαίνεται από 15 λεπτά έως αρκετές ώρες. Ένα μικρό μέρος του διαλύματος τοποθετείται σε πλάκα με υλικό μήτρας, αναμειγνύεται και πραγματοποιείται η μέτρηση στον αναλυτή. Με τον τρόπο αυτό προκύπτουν τα φάσματα μάζας, μέσω προσδιορισμού του λόγου μάζας προς φορτίο m/z , που παρουσιάζονται ως κορυφές. Η ιμιπενέμη έχει έναν λόγο μάζας προς φορτίο (m/z) 300 και ο επικρατής μεταβολίτης της 254. Ένδειξη παραγωγής καρβαπενεμάσης αποτελεί η ανίχνευση της κορυφής του μεταβολίτη ως επικρατούσας σε σχέση με αυτή της ιμιπενέμης. Παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Ψευδώς θετικά αποτελέσματα μπορεί να προκύψουν στην περίπτωση παραγωγής OXA-48 καθώς και με στελέχη που παράγουν βλέννη λόγω αλληλεπιδράσεων με τον πολυσακχαρίτη (Hrabak, et al, 2013; Lasserre, et al, 2015; Iovleva and Doi, 2017).

Μέθοδοι Ανοσοχρωματογραφίας (πλευρικής ροής-ICT)

Οι μέθοδοι αυτές είναι εύκολες, χαμηλού κόστους, ταχείες (αποτέλεσμα εντός 15 λεπτών) και ιδιαίτερα ακριβείς στην επιβεβαίωση της παραγωγής OXA-48 ενζύμων και αρκετών αλληλόμορφων παραλλαγών τους (OXA-181, OXA-204, OXA-232, OXA-244) καθώς και KPC και NDM καρβαπενεμασών (Εικόνα 33). Είναι δυνατό ο έλεγχος να πραγματοποιηθεί από το καλλιέργημα του ύποπτου στελέχους αλλά και απευθείας από τα κλινικά δείγματα (π.χ. ούρα και αίμα) (Glupczynski, et al, 2016; Glupczynski, et al, 2017). Βασίζονται στη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων και στην ανοσολογική δέσμευση επιτόπων ειδικών για ένζυμα π.χ. τύπου OXA-48 ή KPC (Glupczynski, et al, 2016). Έχει αναπτυχθεί μέθοδος ανοσοχρωματογραφίας που

ανιχνεύει ταυτόχρονα ένζυμα τύπου OXA-48, KPC και NDM με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα για στελέχη που παράγουν ακόμα και συνδυασμό καρβαπενεμασών. Ωστόσο οι δοκιμασίες αυτές δεν είναι ικανές να ανιχνεύσουν ένζυμα που δεν ανήκουν σε αυτές τις 3 μεγάλες κατηγορίες (π.χ ένζυμα OXA-163 και VIM), ενώ μπορούν να ανιχνεύσουν ένζυμα των προηγούμενων κατηγοριών με πολύ ήπια δράση έναντι των καρβαπενεμών (Glupczynski, et al, 2017). Οι Pasteran, et al περιέγραψαν το 2016 μια νέα μέθοδο ανοσοχρωματογραφίας πλευρικής ροής με δύο μονοκλωνικά OXA-48 αντισώματα, ικανά να ανιχνεύσουν και να διαφοροποιήσουν ένζυμα των υπό-κατηγοριών OXA-48 και OXA-163 με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα και ταχεία παραγωγή αποτελέσματος. Πρόκειται για μια δοκιμασία για την οποία ακόμα δεν υπάρχουν αρκετές μελέτες αλλά παρουσιάζει καλή προοπτική ως προς την ανίχνευση ενζύμων που περιπλέκουν την θεραπεία των ασθενών, όπως τα OXA-163, συμβάλλοντας με τον τρόπο αυτό σημαντικά στη μικροβιακή επιτήρηση (Pasteran, et al, 2016).



Εικόνα 33. Δοκιμασίες πλευρικής ροής για την ανίχνευση OXA-48 τύπου (α) και KPC τύπου (β) καρβαπενεμασών

Σε αρνητικά αποτελέσματα, μια γραμμή εμφανίζεται στη θέση της γραμμής εσωτερικού ποιοτικού ελέγχου (C). Σε θετικά αποτελέσματα, μια δεύτερη γραμμή εμφανίζεται στη θέση της γραμμής δοκιμής (T) εκτός από τη γραμμή του εσωτερικού ποιοτικού ελέγχου. Το οριζόντιο βέλος δείχνει την κατεύθυνση της πλευρικής ροής

Πηγή: Glupczynski, et al, 2015

4.2 Γονοτυπικές μέθοδοι

Βασίζονται κυρίως την ανίχνευση των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τη μικροβιακή αντοχή. Η χρήση τους είχε αρχικά περιοριστεί για επιδημιολογικές μελέτες, όμως σταδιακά παρατηρείται μια στροφή προς τα διαγνωστικά εργαστήρια και τον έλεγχο παρά την κλίνη του ασθενούς (POCT, Point of Care Test). Οι κύριοι λόγοι είναι η ταχύτητα διεξαγωγής της τεχνικής με συνέπεια την παραγωγή αποτελέσματος σε σύντομο χρονικό διάστημα και η απευθείας εφαρμογή της τεχνικής στο κλινικό δείγμα. Τέτοιες μέθοδοι είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), μέθοδοι που βασίζονται στον υβριδισμό του DNA και κυρίως οι μικροσυστοιχίες DNA (DNA Microarrays) και μέθοδοι αλληλούχισης επόμενης γενεάς (Next Generation Sequencing) (Frickmann, et al, 2014).

➤ **Μέθοδοι που βασίζονται στην ενίσχυση του γενετικού υλικού μέσω της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)**

Αποτελούν τις πιο διαδεδομένες μοριακές μεθόδους για την ανίχνευση γονιδίων αντοχής. Οι πιο πρόσφατες τεχνικές, όπως η PCR πραγματικού χρόνου, η ποσοτική, η ψηφιακή και η πολυπλεκτική PCR διαδραμάτισαν καθοριστικό ρόλο στην αποδοχή των μεθόδων αυτών στην κλινική πράξη με στόχο το γενετικό έλεγχο (Karprou, et al, 2021). Διακρίνονται στην PCR τελικού σημείου που είναι δυνατό να ανιχνεύσει ένα γονίδιο ή περισσότερα (πολυπλεκτική PCR) και την ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (Real-time qPCR, RT-PCR). Η PCR τελικού σημείου που ανιχνεύει μόνο ένα γονίδιο στόχο είναι ο πρόγονος των μοριακών μεθόδων που χρησιμοποιούνται σε διαγνωστικές και επιδημιολογικές μελέτες για την ανίχνευση γονιδίων μικροβιακής αντοχής. Επιτρέπει την ανίχνευση διαφορετικών στόχων στην ίδια αντίδραση, αλλά παρουσιάζει το μειονέκτημα της διασταυρούμενης αντίδρασης (Lupo, et al, 2013). Έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση γονιδίων *blaAmpCs* (Perez-Perez and Hanson, 2002), καθώς και ως δοκιμασία διαλογής (screening) για τον έλεγχο της παρουσίας γονιδίων ESBL και καρβαπενεμασών (Hornsey, et al, 2011). Η RT-PCR προσφέρει τη δυνατότητα ταυτόχρονης και ταχείας ανίχνευσης πολλαπλών γονιδίων αντοχής με σημαντική ευελιξία (Frickmann, et al, 2014). Η

διαφορά από την PCR τελικού σημείου έγκειται στη δυνατότητα παρακολούθησης της ενίσχυσης του DNA στόχου κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και όχι στο τέλος αυτής, λόγω της παρουσίας φθορίζουσων χρωστικών (Anjum, et al, 2017). Επιτρέπει επιπρόσθετα την ποσοτικοποίηση του γονιδιακού στόχου, είτε απόλυτα, είτε σχετικά και με τον τρόπο αυτό είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί ο προσδιορισμός των αντιγράφων του γονιδίου στο γονιδίωμα ενός μικροοργανισμού ή η ποσοτική σύγκριση του γενετικού στόχου σε διαφορετικά δείγματα. Υπερτερεί συγκριτικά με την PCR τελικού σημείου διότι είναι λιγότερο χρονοβόρος διαδικασία και δεν απαιτεί ακολούθως την αλληλούχιση του προϊόντος της αντίδρασης (Lupo, et al, 2013).

➤ **Μέθοδοι ισοθερμικής ενίσχυσης γενετικού υλικού**

Είναι ταχείες και ανήκουν στα διαγνωστικά εργαλεία επόμενης γενεάς. Αποτελούν μια καλή εναλλακτική διότι δεν είναι απαραίτητο το στάδιο κυκλοποίησης με εναλλαγή των θερμοκρασιών, όπως συμβαίνει στην συμβατική αλλά και την πραγματικού χρόνου PCR. Πολλές τέτοιες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί, όπως η SDA (Strand Displacement Amplification), η TMA (Transcription Mediated Amplification), η NASBA (Nucleic Acid Sequence-based Amplification), η RPA (Recombinase Polymerase Amplification), η LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) κ.ά. Οι κυκλοποιητές δεν είναι απαραίτητοι σε αυτές τις τεχνικές, διότι στη θέση τους χρησιμοποιούνται υδατόλουτρα ή θερμές πλάκες που ρυθμίζουν τη θερμοκρασία. Είναι ταχείες διότι δεν πραγματοποιούνται θερμικοί κύκλοι, αλλά αντίθετως συνεχής ενίσχυση του γενετικού στόχου με αποτέλεσμα την παραγωγή ανιχνεύσιμων αμπλικονίων εντός 10 λεπτών. Είναι ευαίσθητες μέθοδοι και ιδιαίτερα οι τεχνικές LAMP και RPA είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν σε περιπτώσεις δομών με χαμηλούς οικονομικούς πόρους, λόγω της υψηλής ευαισθησίας, του χαμηλού κόστους και της απλότητας στην διεξαγωγή της τεχνικής (Karpou, et al, 2021).

➤ **Μέθοδοι που βασίζονται στην Αλληλούχιση Επόμενης Γενεάς (Next Generation Sequencing, NGS)**

Στόχος είναι ο χαρακτηρισμός παραλλαγών συγκεκριμένων γονιδίων μέσω καθορισμού της αλληλουχίας του DNA. Για την ανίχνευση γονιδίων αντοχής έχει χρησιμοποιηθεί η μέθοδος Pyrosequencing και μεταγενέστερα η αλληλούχιση Ion Torrent (Lupo, et al, 2013). Διακρίνονται σε μεθόδους πρώτης γενεάς, που αναπτύχθηκαν κατά την δεκαετία 1970 και από αυτές η μέθοδος Sanger επικράτησε,

σε μεθόδους δεύτερης γενεάς και τρίτης γενεάς με τις οποίες έγινε εφικτή η αλληλούχιση του πλήρους γονιδιώματος και η ταυτοποίηση γονιδίων αντοχής (Kaprou, et al, 2021).

Η αλληλούχιση του πλήρους γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing, WGS) βασίζεται στην τεχνολογία NGS και αποτελεί την πιο περιεκτική μοριακή μέθοδο που προσφέρει ολόκληρη τη γενετική πληροφορία ενός μικροοργανισμού με πολύ καλή σχέση κόστους και αποτελέσματος (Al-Zahrani, 2018). Προσφέρει τη δυνατότητα της αναζήτησης πολλών διαφορετικών στόχων ταυτόχρονα και την ικανότητα του χαρακτηρισμού συγκεκριμένων παραλλαγών των γονιδίων. Τα αποτελέσματα είναι παρόμοια με την προσέγγιση της PCR και των μικροσυστοιχιών αλλά επιπρόσθετα προσφέρει τη δυνατότητα της άμεσης προσθήκης νέων αλληλουχιών-στόχων στη βάση δεδομένων, με την οποία πραγματοποιείται σύγκριση και την πραγματοποίηση άμεσης *in silico* επανεξέτασης σε στελέχη στα οποία ήδη έχει πραγματοποιηθεί αλληλούχιση (Anjum, et al, 2017). Όταν χρησιμοποιείται για τον έλεγχο σε αντιμικροβιακούς παράγοντες, συμβάλλει στην πρόβλεψη όλων των φαινοτύπων αντοχής που παρουσιάζει ένα στέλεχος, ενώ ταυτόχρονα παρέχει πληροφορίες απαραίτητες για την επιτήρηση της μικροβιακής αντοχής. Ολόκληρο το μικροβιακό γένωμα δύναται να αλληλουχηθεί και πολύ ακριβή δεδομένα εξάγονται με τη συμβολή αυτής της προσέγγισης. Ωστόσο η προσέγγιση αυτή δεν χρησιμοποιείται στην καθημερινή ρουτίνα των εργαστηρίων λόγω του υψηλού κόστους, της πολυπλοκότητας της τεχνικής, του χρόνου που απαιτείται για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων και της υψηλής πιθανότητας ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων λόγω της παρεμβολής του μεγάλου γενετικού υλικού του φορέα συγκριτικά με αυτό του υπό εξέταση παθογόνου (Su, et al, 2019).

➤ **Μικροσυστοιχίες DNA (microarrays)**

Η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση και τον μερικό χαρακτηρισμό μεγάλου αριθμού γονιδίων (>1000). Χρησιμοποιούνται προσχεδιασμένοι ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές που έχουν προσδεθεί και ακινητοποιηθεί στη στερεή επιφάνεια μιας συστοιχίας. Αν το υπό αναζήτηση αλληλόμορφο παθογόνο γονίδιο είναι παρών τότε αυτό υβριδίζεται στη μικροσυστοιχία που βρίσκεται επάνω στο στέρεο υπόστρωμα και στη συνέχεια η υβριδοποίηση ανιχνεύεται οπτικά (Sibley, et al, 2012).

4.2.1 Γονοτυπική ανίχνευση ESBL

Η γονοτυπική επιβεβαίωση της παρουσίας γονιδίου ESBL στα Εντεροβακτηριακά, είναι εφικτή με την εφαρμογή είτε PCR και αλληλούχισης, είτε WGS και επακόλουθη *in silico* χαρτογράφηση των γονιδίων αντοχής, καθώς και με την εφαρμογή της τεχνικής των μικροσυστοιχιών DNA (http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf). Είναι μέθοδοι περισσότερο ακριβείς και ταχείες σε σύγκριση με τις φαινοτυπικές δοκιμασίες παρέχοντας τη δυνατότητα του χαρακτηρισμού των γονιδίων ESBL εντός μιας ημέρας (Wintermans, et al, 2013).

4.2.1.1 Ανίχνευση ESBL γονιδίων με εφαρμογή μεθόδων PCR

Η ομάδα των Pitout et al, ταυτοποίησαν τις πέντε ομάδες CTX-M ενζύμων με τη μέθοδο της PCR τελικού σημείου, χρησιμοποιώντας εκκινητές ειδικούς για την ενίσχυση γονιδίων ειδικών για τις συγκεκριμένες ομάδες CTX-M (Pitout, et al, 2004). Ανίχνευση γονιδίων παραγωγής ενζύμων τύπου PER, TEM, SHV πραγματοποιήθηκε με την ίδια μέθοδο από άλλους ερευνητές (De Champs, et al, 2004), καθώς και ενζύμων τύπου VEB, GES, SFO (Poirel et al, 2000). Την πολυπλεκτική PCR τελικού σημείου χρησιμοποίησε ο Dallene et al, για τον χαρακτηρισμό ESBL ενζύμων των ομάδων TEM, SHV, CTX-M, GES, VEB, PER (Dallene, et al, 2010). Πολυπλεκτική PCR αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε με στόχο την ανίχνευση γονιδίων που εκφράζουν τις πέντε ομάδες CTX-M, με βάση το μέγεθος των αμπλικονίων και μετά από την ηλεκτροφόρηση αυτών σε γέλη αγαρόζης (Woodford, et al, 2006).

Η μέθοδος RT-PCR χρησιμοποιήθηκε με στόχο την ανίχνευση γονιδίων *blaSHV* σε στελέχη *K. pneumoniae*. Πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση των αντιγράφων των γονιδίων *blaSHV* και η υψηλού επιπέδου αντοχή συσχετίστηκε με υψηλό αριθμό αντιγράφων του γονιδίου στο στέλεχος, ενώ αποδείχθηκε η παρουσία διαφορετικών αλληλόμορφων γονιδίων *blaSHV* σε ένα στέλεχος (Hammond, et al, 2005). Παρομοίως με την τεχνική RT-PCR καθορίστηκαν οι ποσότητες

πλασμιδιακών TEM αλληλόμορφων γονιδίων σε βακτηριακούς πληθυσμούς *E. coli* (Mroczkowska, et al, 2008).

Οι πέντε ομάδες τύπου CTX-M ενζύμων ταυτοποιήθηκαν από στελέχη *E.coli* με την τεχνική της RT-PCR και επακόλουθα πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση με την τεχνική pyrosequencing με στόχο την περαιτέρω ταυτοποίηση του ενζύμου. Απομονώθηκαν ένζυμα που ανήκαν στις ομάδες CTX-M-1, CTX-M-2 CTX-M-9, CTX-M-15, ενώ ανάλυση με ηλεκτροφόρηση γέλης παλμικού πεδίου (PFGE) αυτών των στελεχών αποκάλυψε διάφορους κλώνους με επικρατέστερο να ανήκει σε CTX-M-15 στελέχη (Naas, et al, 2007). Με την χρήση της RT-PCR και με ανιχνευτές υβριδισμού (hybridization probes) ως σύστημα ανίχνευσης απευθείας σε δείγματα ούρων, εντοπίστηκαν στελέχη Εντεροβακτηριακών και συγκεκριμένα στελέχη *E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. freundii*, *P. stuartii*, *E. cloacae* και *E. aerogenes*, τα οποία παρήγαγαν CTX-M τύπου β-λακταμάσες που ανήκαν σε τρεις από τις πέντε ομάδες CTX-M (CTX-M-1, CTX-M-9, CTX-M-2), ενώ πραγματοποιήθηκε και ο διαχωρισμός των αλληλόμορφων γονιδίων (Oxacelay, et al, 2009).

Γονίδια υπεύθυνα για παραγωγή ESBL που ανήκουν στις πέντε ομάδες CTX-M ενζύμων ανιχνεύθηκαν σε στελέχη Εντεροβακτηριακών με τη μέθοδο της πολυπλεκτικής RT-PCR και Taqman ανιχνευτές. Τα βακτηριακά στελέχη απομονώθηκαν από καλλιέργειες αίματος και ούρων, ενώ Taqman ανιχνευτές χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά με στόχο την ταυτοποίηση γονοτύπων της κατηγορίας CTX-M ενζύμων (Birkett, et al, 2007). Τρεις πολυπλεκτικές PCR αναπτύχθηκαν από τον Dallene et al, με στόχο την ανίχνευση γονιδίων ESBL σε στελέχη Εντεροβακτηριακών και την αλληλούχιση των προϊόντων των αντιδράσεων, εκ των οποίων μια στόχευε στην ανίχνευση γονιδίων *bla*TEM, *bla*SHV και *bla*OXA-1 τύπου, μια στην ανίχνευση των *bla*CTX-M των φυλογενετικών ομάδων 1, 2 και 9 και μια τρίτη με στόχο *bla*VEB, *bla*GES και *bla*PER γονίδια. Αποτελούν γρήγορες, χαμηλού κόστους και αξιόπιστες τεχνικές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέθοδοι διαλογής για τα πιο συχνά ανιχνεύσιμα ESBL ένζυμα (Dallene, et al, 2010). Ο Voets et al, επίσης χρησιμοποίησε την προσέγγιση της PCR για την ανίχνευση γονιδίων CTX-M, TEM, SHV, GES, VEB, PER τροποποιώντας την προσέγγιση του Dallene et al με τη χρήση πολυμεράσης Super Taq στη θέση της πολυμεράσης AmpliTaq (Voets, et al, 2011).

Από την άλλη, ερευνητές χρησιμοποίησαν την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης λιγάσης (Ligation-mediated real-time PCR/LM-PCR) για τον έλεγχο στελεχών Εντεροβακτηριακών με στόχο την ανίχνευση της παραγωγής ESBL ενζύμων και συγκεκριμένα ένζυμα CTX-M που ανήκουν στις ομάδες 1, 2, 9 καθώς και TEM και SHV λακταμάσες (SHV-238S, TEM-104K, TEM-164S). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη ανίχνευση μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (Single-nucleotide polymorphisms-SNPs) (Nijhuis et al, 2012).

4.2.1.2 Ανίχνευση ESBL γονιδίων με αλληλούχιση πλήρους γονιδιώματος (WGS)

Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες σχετικά με τη συμβολή της προσέγγισης αυτής, στην πρόβλεψη της αντοχής των Εντεροβακτηριακών και κυρίως στελεχών *E.coli* και *K. pneumoniae* στα β-λακταμικά αντιμικροβιακά και των γονιδίων που είναι υπεύθυνα.

Χρησιμοποιώντας την αλληλούχιση WGS ταυτοποιήθηκε μια ποικιλία γονιδίων, όπως *bla*CTX-M, *bla*TEM, *bla*SHV και πολλών άλλων σε στελέχη *E. coli* και *K. pneumoniae* με καλή σχέση κόστους-αποτελέσματος και σε σύντομο χρόνο συγκριτικά με τις φαινοτυπικές μεθόδους ανίχνευσης της αντοχής, με τις οποίες ωστόσο παρατηρήθηκε υψηλή συσχέτιση (95%) (Stoesser, et al, 2013).

Σε ερευνητική μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Ολλανδία κατά το διάστημα 2014-2017, σε στελέχη *E. coli* που παρήγαγαν ESBL και απομονώθηκαν από δείγματα κοπράνων αλλά και άλλες εξωεντερικές πηγές, εφαρμόστηκε WGS και πραγματοποιήθηκε συγκριτική γενωμική ανάλυση με στόχο την κατανομή των 10 πιο συχνών κλώνων *E. coli* και των γονιδίων ESBL. Από τα γονίδια ESBL, τα πιο συχνά ανήκαν στην οικογένεια CTX-M και συγκεκριμένα τα *bla*CTX-M-15, *bla*CTX-M-14, *bla*CTX-M-27, και άλλα γονίδια που απομονώθηκαν ήταν τα *bla*SHV-12 και *bla*TEM-52 (Verschuuren, et al, 2020).

Σε μελέτη κοόρτης που πραγματοποιήθηκε σε νοσοκομεία του Καναδά κατά το χρονικό διάστημα 2007-2018, 671 στελέχη *E. coli* που σύμφωνα με φαινοτυπικές δοκιμασίες παρήγαγαν ESBL, υπεβλήθησαν σε WGS και 636 γονιδιώματα

προέκυψαν. Πραγματοποιήθηκε συσχέτιση με τις φαινοτυπικές δοκιμασίες ελέγχου της αντοχής (μέθοδος μικροαραιώσεων σε ζωμό). Η ευαισθησία και η μη-ευαισθησία στην κεφτριαξόνη χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτες διαχωρισμού των στελεχών. Τα πιο κοινά ESBL γονίδια που ανιχνεύθηκαν ήταν τα CTX-M-15, CTX-M-27 και CTX-M-14. Στις περισσότερες περιπτώσεις στελεχών που παρουσίαζαν μη-ευαισθησία στην κεφτριαξόνη, με την αλληλούχιση WGS ανιχνεύθηκαν *bla*CTX-M, *bla*SHV, *bla*TEM γονίδια. Ωστόσο, σπάνια, υπήρξαν και περιπτώσεις που ανιχνεύθηκαν *bla*AmpC γονίδια. Από τα 625 στελέχη που βρέθηκαν μη-ευαίσθητα με τη μέθοδο μικροαραιώσεων σε ζωμό, τα 606 ήταν μη-ευαίσθητα με το WGS. Έντεκα στελέχη ήταν ευαίσθητα με τη φαινοτυπική δοκιμασία αλλά μόνο δυο από αυτά με την αλληλούχιση. Στα υπόλοιπα 9 ανιχνεύθηκαν ένζυμα CTX-M-15, SHV-2 και SHV-12 με την εφαρμογή αλληλούχισης ολόκληρου του γονιδιώματος (Golden, et al, 2021).

Σε μία άλλη μελέτη, ελέχθηκαν 533 στελέχη *E. coli* που απομονώθηκαν από ασθενείς με λοίμωξη της ουροποιητικής οδού κατά το χρονικό διάστημα 2016-2017 στο νοσοκομείο Cerdanya. Από αυτά τα 33 ελέγχθηκαν για την παραγωγή ESBL ενζύμων διότι παρουσίαζαν μειωμένη ευαισθησία στις κεφαλοσπορίνες δεύτερης και τρίτης γενεάς. Ο αρχικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε με συμβατικές μεθόδους. Πραγματοποιήθηκε WGS στα επιβεβαιωμένα ESBL στελέχη. Παρατηρήθηκε ότι τα *bla*CTX-M επικρατούσαν και από αυτά, τα *bla*CTX-M-15 και *bla*CTX-M-14 ήταν τα πιο συχνά. Από τα *bla*SHV, τα *bla*SHV-12 ήταν τα πιο συχνά ενώ απομονώθηκαν και γονίδια *bla*TEM (Gaviria, et al, 2022).

4.2.1.3 Εφαρμογή της μεθοδολογίας Microarrays για την ανίχνευση γονιδίων ESBL

Παρόλο που αρκετά in-house συστήματα μικροσυστοιχιών αναπτύχθηκαν, λόγω αδυναμίας προτυποποίησης της διαδικασίας δεν ήταν δυνατή η εφαρμογή τους σε άλλα εργαστήρια (Lupo, et al, 2013). Ένα σύστημα μικροσυστοιχιών ταχείας ανίχνευσης γονιδίων *bla*TEM αναπτύχθηκε με ικανότητα ανίχνευσης 96% των SNPs που παρουσιάζουν τα γονίδια *bla*TEM (Grimm, et al, 2004). Μεταγενέστερα, το ίδιο σύστημα χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση γονιδίων *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M (Leinberger, et al, 2010).

Ο Cohen Stuart et al περιέγραψε το πρώτο εμπορικά διαθέσιμο σύστημα μικροσυστοιχιών. Πρόκειται για ένα τεστ ταχείας ανίχνευσης που βασίζεται σε μια αντίδραση ενίσχυσης μεσολαβούμενη από λιγάση που στόχο έχει την ανίχνευση των πιο σημαντικών *bla* γονιδίων που εντοπίζονται στα gram αρνητικά βακτήρια. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται από το λογισμικό που προσφέρεται από τον κατασκευαστή (Check-Points). Χρησιμοποιήθηκαν 212 στελέχη Εντεροβακτηριακών με στόχο την ανίχνευση γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα ESBP που ανήκουν στις τρεις πιο συχνές οικογένειες ESBP, των TEM, SHV και CTX-M, με ευαισθησία 95% και ειδικότητα 100%. Ταυτόχρονα το σύστημα αυτό προσφέρει πληροφορίες σχετικά με τα SNPs που παρουσιάζουν τα TEM και SHV γονίδια. Παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα καθότι προσφέρει αποτελέσματα εντός μίας ημέρας και παρουσιάζει υψηλή ακρίβεια όταν εξετάζονται στελέχη Εντεροβακτηριακών που παράγουν ταυτόχρονα και άλλες β-λακταμάσες, όπως στην περίπτωση στελεχών που παράγουν ταυτόχρονα ESBP και AmpC β-λακταμάσες. Καλύπτει το 95% των γονιδίων TEM και το 77% των SHV που περιγράφονται στην βάση δεδομένων Lahey (Cohen Stuart, et al, 2010). Ο Leinberger et al περιέγραψε ένα σύστημα μικροσυστοιχιών με 99% κάλυψη των γονιδίων TEM και 94% των SHV, που ωστόσο δεν είναι εμπορικά διαθέσιμο (Leinberger, et al, 2010). Και άλλα εμπορικά συστήματα αναπτύχθηκαν με ποικιλία γονιδιακών στόχων όπως *blaKPC*, *blaESBP*, *blaAmpC*, *blaNDM* (Endimiani, et al, 2010; Boagerts, et al, 2011; Plateel, et al, 2011).

4.2.2 Γονοτυπική ανίχνευση AmpC

Αν και οι πλασμιδιακές AmpC β-λακταμάσες συναντώνται σπανιότερα από τις ESBP λακταμάσες, έχουν βρεθεί σε αρκετές περιοχές παγκοσμίως. Από αυτές, η CMY-2 έχει παρουσιάσει την ευρύτερη γεωγραφική κατανομή. Οι φαινοτυπικές δοκιμασίες δεν μπορούν να διαχωρίσουν τις οικογένειες των πλασμιδιακών AmpC ενζύμων, ενώ δεν ανιχνεύουν πάντα τις χρωμοσωμικές AmpC β-λακταμάσες με ευρύ φάσμα. Μέθοδοι εκλογής, για τον σκοπό αυτό, είναι οι γονοτυπικές μέθοδοι (Jacoby, 2009). Η χρήση γονοτυπικών μεθόδων με στόχο την ανίχνευση και ταυτοποίηση στελεχών Εντεροβακτηριακών που παράγουν AmpC β-λακταμάσες κρίνεται απαραίτητη για θεραπευτικούς λόγους και για τη λήψη μέτρων για τον έλεγχο των

λοιμώξεων. Στελέχη που παράγουν AmpC β-λακταμάσες μπορεί να είναι *in vitro* ευαίσθητα σε κάποιες κεφαλοσπορίνες, αλλά αντιθέτως δεν επιτυγχάνουν τη θεραπεία της λοίμωξης, όταν χρησιμοποιούνται ως θεραπευτικές επιλογές (Thomson, 2001).

Οι Prerez-Perez and Hanson ανέπτυξαν μια πολυπλεκτική PCR για την ανίχνευση γονιδίων που κωδικοποιούν πλασμιδιακές AmpC β-λακταμάσες σε Εντεροβακτηριακά στελέχη *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *Salmonella enterica*. Με την τεχνική αυτή, είναι δυνατό να ανιχνευθούν πλασμιδιακά γονίδια *blaAmpC* σε μικροοργανισμούς που εκφράζουν και χρωμοσωμικές AmpC β-λακταμάσες, εφόσον το γονίδιο που εδράζεται στο πλασμίδιο δεν είναι της ίδιας προέλευσης με το χρωμοσωμικό (Perez-Perez and Hanson, 2002).

Ο Mammeri et al, πραγματοποίησε μελέτη που στόχευε στο χαρακτηρισμό των AmpC β-λακταμασών που παράγονται από στελέχη *E. coli* που απομονώθηκαν σε νοσοκομείο της Γαλλίας το 2006. Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της πολυπλεκτικής PCR και μετέπειτα η αλληλούχιση των προϊόντων της αντίδρασης, για την ανίχνευση της παρουσίας γονιδίων που κωδικοποιούν κεφαλοσπορινάσες πλασμιδιακές και μεταλλάξεις στα χρωμοσωμικά AmpC γονίδια των στελεχών *E. coli*. Από τα 2800 στελέχη που απομονώθηκαν, τα 34 παρουσίαζαν φαινότυπο αντοχής συμβατό με την παραγωγή AmpC ενζύμων, δηλαδή ανθεκτικά σε στενού φάσματος κεφαλοσπορίνες και στο κλαβουλανικό οξύ, ενώ παρουσίαζαν ευαισθησία στα αντιμικροβιακά αυτά όταν χρησιμοποιούνταν τρυβλία με κλοξακιλλίνη στο θρεπτικό άγαρ. Από αυτά, 16 στελέχη παρουσίαζαν υπερέκφραση των χρωμοσωμικών κεφαλοσπορινασών, ενώ ήταν ευαίσθητα στις εκτεταμένου φάσματος κεφαλοσπορίνες, 18 παρήγαγαν χρωμοσωμικές AmpC λακταμάσες ή πλασμιδιακές κεφαλοσπορινάσες (CMY-2, ACC-1), ή συνδυασμό μηχανισμών αντοχής με αποτέλεσμα μειωμένη ευαισθησία στις κεφαλοσπορίνες εκτεταμένου φάσματος (Mammeri, et al, 2008).

Σε μελέτη που πραγματοποίησε ο Voets et al, με την μέθοδο της πολυπλεκτικής PCR ανιχνεύθηκαν γονίδια που κωδικοποιούν πλασμιδιακές AmpC β-λακταμάσες και συγκεκριμένα ACC, ACT, DHA, CMY, FOX, LAT, MIR, MOX ένζυμα (Voets et al, 2011). Σε μελέτη που πραγματοποίησε ο Khari et al, 117 στελέχη *Enterobacter spp* ελέγχθηκαν με την τεχνική της πολυπλεκτικής PCR για την ανίχνευση γονιδίων AmpC και συγκεκριμένα για το MIR/ACT που είναι στενά

συνδεδεμένο με το χρωμοσωμικό γονίδιο της οικογένειας των Εντεροβακτηριακών, καθώς και τα πλασμιδιακής προέλευσης DHA, MOX, CMY, ACC, FOX γονίδια, ενώ χρησιμοποιήθηκαν και φαινοτυπικές δοκιμασίες, όπως έλεγχος με δίσκο κεφοξιτίνης κ.α., για την αξιολόγηση της παραγωγής AmpC β-λακταμασών και πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αποτελεσμάτων. Από τα 117 στελέχη *Enterobacter spp.*, στα 40 ανιχνεύθηκε γονίδιο AmpC και από αυτά στα 39 ανιχνεύθηκε το γονίδιο MIR/ACT, ενώ σε ένα στέλεχος, ανιχνεύθηκε ένα γονίδιο AmpC τύπου DHA για πρώτη φορά. Κατά τη σύγκριση, παρατηρήθηκε χαμηλή συμφωνία ανάμεσα στις φαινοτυπικές δοκιμασίες που χρησιμοποιήθηκαν και στην μοριακή μέθοδο (Khari, et al, 2016).

Ο Zhu et al, ανέπτυξε μια τεχνική βασισμένη στις μεθόδους της πολυπλεκτικής PCR και των μικροσυστοιχιών με στόχο την ανίχνευση ESBL και AmpC γονιδίων καθώς και 6 σημειακών μεταλλάξεων σε γονίδια *blaSHV*. Η μέθοδος αυτή, MAPCR, περιλάμβανε 2 κύκλους PCR με στόχο την ταυτόχρονη ενίσχυση 10 γονιδίων β-λακταμασών που επικρατούν στα gram αρνητικά βακτήρια και τον υβριδισμό των αμπλικονίων που προέκυψαν, με την τεχνική των μικροσυστοιχιών. Ελέγχθηκαν 111 στελέχη Εντεροβακτηριακών και συγκεκριμένα, 46 *E.coli*, 46 *K. pneumoniae* και 19 *E. cloacae*. Χρησιμοποιήθηκαν οι κλασικές φαινοτυπικές μέθοδοι για την ταυτοποίηση των στελεχών, τον προσδιορισμό της ευαισθησίας στα αντιμικροβιακά και την φαινοτυπική επιβεβαίωση των μηχανισμών της αντοχής, ενώ πραγματοποιήθηκε και αλληλούχιση DNA για τον έλεγχο της μικροβιακής αντοχής. Από τα 111 στελέχη Εντεροβακτηριακών, στα 13 ανιχνεύθηκαν πλασμιδιακά *blaAmpC* γονίδια που κωδικοποιούσαν το ένζυμο DHA-1. Συνολικά ανιχνεύθηκαν 34 διαφορετικοί γονότυποι αντοχής που αφορούσαν γονίδια ESBL, SHV και AmpC και τα αποτελέσματα της μελέτης παρουσίαζαν συμφωνία με τα αποτελέσματα της αλληλούχισης DNA καθώς και με τον έλεγχο της ευαισθησίας στα αντιμικροβιακά με MIC για όλα τα στελέχη *E. coli* και *K. pneumoniae* εκτός από 4 στελέχη με περισσότερα του ενός γονίδια αντοχής. Όσον αφορά τα στελέχη *E. cloacae*, δεν παρατηρήθηκε υψηλή συμφωνία με τις φαινοτυπικές μεθόδους, για εκείνα που διέθεταν αποκλειστικά χρωμοσωμικά *blaAmpC* (Zhu, et al, 2007).

4.2.3 Γονοτυπική ανίχνευση καρβαπενεμασών

4.2.3.1 Ανίχνευση γονιδίων καρβαπενεμάσης με εφαρμογή μεθόδων PCR

Οι μοριακές τεχνικές αποτελούν μεθόδους αναφοράς για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν την παραγωγή καρβαπενεμασών (Hrabák, et al, 2014; Cui, et al, 2019). Βασίζονται στην ανίχνευση μιας ή περισσότερων αλληλουχιών στο γενετικό υλικό των βακτηρίων και εφαρμόζονται είτε σε μεμονωμένα στελέχη βακτηρίων είτε στο κλινικό δείγμα απευθείας. Το σημαντικότερο μειονέκτημα των μεθόδων αυτών είναι το υψηλό κόστος που περιορίζει τη χρήση τους κυρίως στον τομέα της έρευνας και του ελέγχου διασποράς των λοιμώξεων καθώς και σε ειδικές περιπτώσεις ασθενών με ασαφές κλινικό ιστορικό. Επίσης δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανεύρεση νέων γονιδίων αντοχής. Η τεχνική της PCR είναι η πιο χρησιμοποιημένη μοριακή μέθοδος για την ανίχνευση γονιδίων καρβαπενεμασών στα Εντεροβακτηριακά (Rabaan, et al, 2022). Κατά το διάστημα 2006-2012 μια σειρά από προσεγγίσεις που βασίζονται στην πολυπλεκτική PCR εισήχθησαν με στόχο την ταυτοποίηση γονιδίων καρβαπενεμασών (Cui, et al, 2019). Αργότερα αναπτύχθηκαν εμπορικά διαθέσιμα kit που έκαναν ευρύτερα δυνατή τη χρήση των μοριακών μεθόδων στις μονάδες υγείας (Rabaan, et al, 2022).

Διαφορετικές μέθοδοι πολυπλεκτικής PCR (Εικόνα 34), μιας PCR και μιας RT-PCR για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν MBL ένζυμα των οικογενειών IMP, VIM, SPM, GIM, SIM αναπτύχθηκαν το 2007 (Mendes, et al, 2007; Ellington, et al, 2007). Η ομάδα των Poirel et al ανέπτυξε μια πολυπλεκτική PCR με 11 γονιδιακούς στόχους που κωδικοποιούν καρβαπενεμάσες κλινικά σημαντικές, IMP, VIM, NDM, SPM, KPC και τύπου OXA-48 και λιγότερο σημαντικές, AIM, DIM, GIM, SIM και BIC. Στην εικόνα 35 παρουσιάζονται τα ευρήματα μετά από τον διαχωρισμό τους με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης 2%. Χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές πολυπλεκτικές αντιδράσεις και η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος διαλογής σε περιοχές που ενδημούν καρβαπενεμάσες ανιχνεύοντας, με την απλούστερη αντίδραση, το συχνότερο παρατηρούμενο στην περιοχή γονίδιο, όπως επίσης και σε περιοχές που δεν

παρατηρείται ενδημικότητα συγκεκριμένων καρβαπεμενασών, οπότε όλα τα γονίδια είναι δυνατό να ανιχνευθούν (Poirel et al, 2011).

Μια ακόμη πολυπλεκτική PCR σχεδιάστηκε με στόχο τον εντοπισμό γονιδίων *blaKPC*, *blaGES*, *blaOXA-48*, *blaIMP*, *blaVIM*, *blaNDM* σε στελέχη Εντεροβακτηριακών μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα (<3 ωρών) (Monteiro, et al, 2012). Την μέθοδο της πολυπλεκτικής PCR για την ταυτοποίηση γονιδίων *blaKPC* με τη χρήση των molecular beacons ως ανιχνευτές και στόχο τον εντοπισμό SNPs και την διαφοροποίηση αλληλόμορφων γονιδίων *blaKPC* ανέπτυξε ο Chen et al (Chen, et al, 2011). Μια πολυκεντρική μελέτη πραγματοποιήθηκε, με στόχο την ανίχνευση γονιδίων καρβαπενεμάσης OXA-48, VIM, IMP, NDM, KPC με την μέθοδο της πολυπλεκτικής RT-PCR (Εικόνα 36) σε 86 στελέχη gram αρνητικών βακτηρίων με ευαισθησία και ειδικότητα 100% (van der Zee, et al, 2014).

Μεταγενέστερα, ο Ellington et al ανέπτυξε μια ταχεία πολυπλεκτική PCR με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα για την ανίχνευση γονιδίων που κωδικοποιούν καρβαπενεμάσες των οικογενειών KPC, NDM, OXA-48 και VIM, σε στελέχη Εντεροβακτηριακών. Πραγματοποίησε πολυκεντρική εκτίμηση της μεθόδου χρησιμοποιώντας 100 στελέχη gram αρνητικών βακτηρίων, κυρίως Εντεροβακτηριακών, και επιβεβαίωσε την υψηλή ευαισθησία (100%) και ειδικότητα (100%) της μεθόδου (Ellington, et al, 2016).

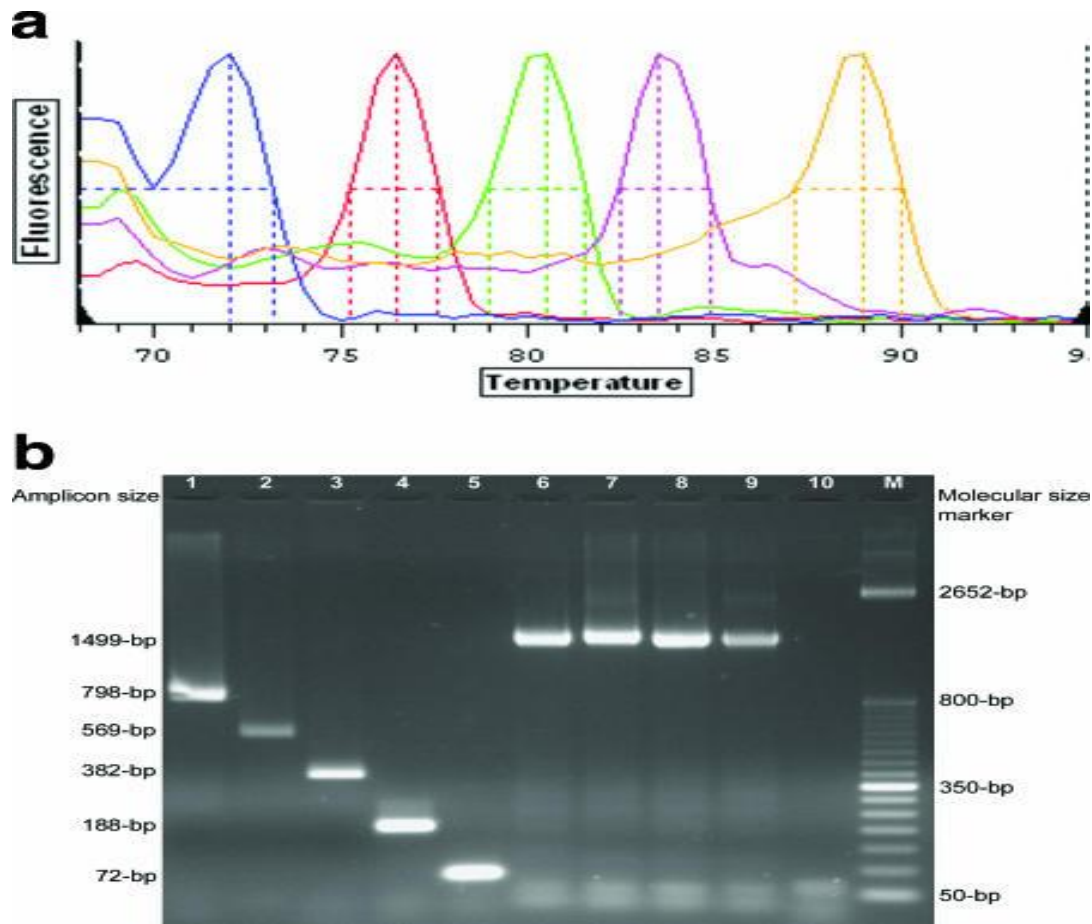
Χρησιμοποιώντας ειδικό σύστημα ανίχνευσης με ανιχνευτές τύπου peptide-nucleic acid (PNA) αναπτύχθηκε μια μέθοδος πολυπλεκτικής PCR με στόχο την ταχεία, ακριβή και ταυτόχρονη ανίχνευση 9 γονιδίων που κωδικοποιούν καρβαπενεμάσες (KPC, OXA-48, GES, IMP, VIM, NDM, ISAbal-OXA-51, OXA-23 και OXA-58) σε gram αρνητικά βακτήρια και κυρίως σε στελέχη Εντεροβακτηριακών. Η ευαισθησία της μεθόδου ήταν 100% εκτός από τις περιπτώσεις της ανίχνευσης γονιδίου καρβαπενεμάσης ISAbal-OXA-51 και της συνύπαρξης δυο διαφορετικών γονιδίων καρβαπενεμάσης στο ίδιο στέλεχος. Η ειδικότητα της μεθόδου ήταν >99% για όλα τα γονίδια που ανιχνεύθηκαν με τη μέθοδο αυτή (Jeong, et al, 2015).

Με στόχο την αναγνώριση και διαφοροποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν καρβαπενεμάσες τάξης D, αναπτύχθηκε μια μέθοδος που βασίζεται στην PCR πραγματικού χρόνου με ανάλυση υψηλής διακριτικής ικανότητας καμπυλών τήξης

(High Resolution Melt Analysis-HRMA). Μπορεί να ανιχνεύσει γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα τύπου OXA-48 αλλά και να διαχωρίσει τα *blaOXA48/245*, *blaOXA-162*, *blaOXA244*, *blaOXA-181/204* και *blaOXA-232* χωρίς την πραγματοποίηση αλληλούχισης, αντίθετα από άλλες μεθόδους που βασίζονται στην PCR αλλά δεν έχουν αυτή τη διακριτική ικανότητα, ενώ συχνά στελέχη που φέρουν γονίδια καρβαπενεμάσης ταξης D, όπως το *blaOXA-232* δεν καθίστανται δυνατό να ανιχνευτούν με απλή PCR. Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για γονοτυπικό έλεγχο, για την ανίχνευση SNPs για ερευνητικούς σκοπούς αλλά και σε επίπεδο κλινικό, όπως και για τον έλεγχο της διασποράς CRE στελεχών που φέρουν συγκεκριμένα γονίδια καρβαπεμενασών (Hemarajata, et al, 2015).

Μια μέθοδος που βασίζεται στην PCR και διεξάγεται στην πλατφόρμα GeneXpert (Cepheid, Sunnyvale, CA) σε μεμονωμένους περιέκτες (cartridges) αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε κυρίως για τον έλεγχο φορέας CRE απευθείας σε δείγματα κοπράνων. Η μέθοδος αυτή (Cepheid Xpert Carba-R) είναι ποιοτική και στοχεύει στην ταχεία αναγνώριση και διαφοροποίηση γονιδίων *blaKPC*, *blaNDM*, *blaVIM*, *blaIMP-1* και *blaOXA-48*. Συνολικά περιλαμβάνει 91 γονιδιακούς στόχους και εκτός των δειγμάτων κοπράνων, μπορεί να εφαρμοσθεί σε δείγματα αίματος, ούρων και πτυέλων (Tato, et al, 2016; Rabaan, et al, 2022). Στην προοπτική μελέτη που πραγματοποιήθηκε, από τον Ιούλιο 2013 έως τον Φεβρουάριο 2014, λήφθησαν δείγματα κοπράνων από 383 ασθενείς και πραγματοποιήθηκε σύγκριση με την κλασική μέθοδο της καλλιέργειας και των φαινοτυπικών δοκιμασιών. Παρουσίασε ευαισθησία 96.6% και ειδικότητα 98.6%, ενώ ο χρόνος της ανάλυσης δεν ξεπερνά τα 48 λεπτά. Μπορεί να αναγνωρίσει περισσότερα του ενός γονίδια αντοχής σε ένα στέλεχος και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον περιορισμό της διασποράς βακτηρίων ανθεκτικών στις καρβαπενέμες με την έγκαιρη ανίχνευση του αποικισμού ασθενών από τα στελέχη αυτά (Tato, et al, 2016). Με στόχο τη βελτίωση της ευαισθησίας της μεθόδου, είναι απαραίτητο να είναι γνωστή η επικράτηση των γονιδίων αντοχής στις καρβαπενέμες ανά γεωγραφική περιοχή αλλά και η ενσωμάτωση στη μέθοδο αυτή των αλληλουχιών των επικρατούντων γονιδίων αντοχής (Anandan, et al, 2015). Μία επίσης αυτοματοποιημένη μέθοδος που βασίζεται στην πολυπλεκτική PCR, είναι το Biofire Filmarray Blood Culture Identification Panel (bioMerieux). Είναι το πρώτο αυτόματο σύστημα που συνδυάζει την πολυπλεκτική PCR με την μέθοδο των μικροσυστοιχιών και έχει τη δυνατότητα

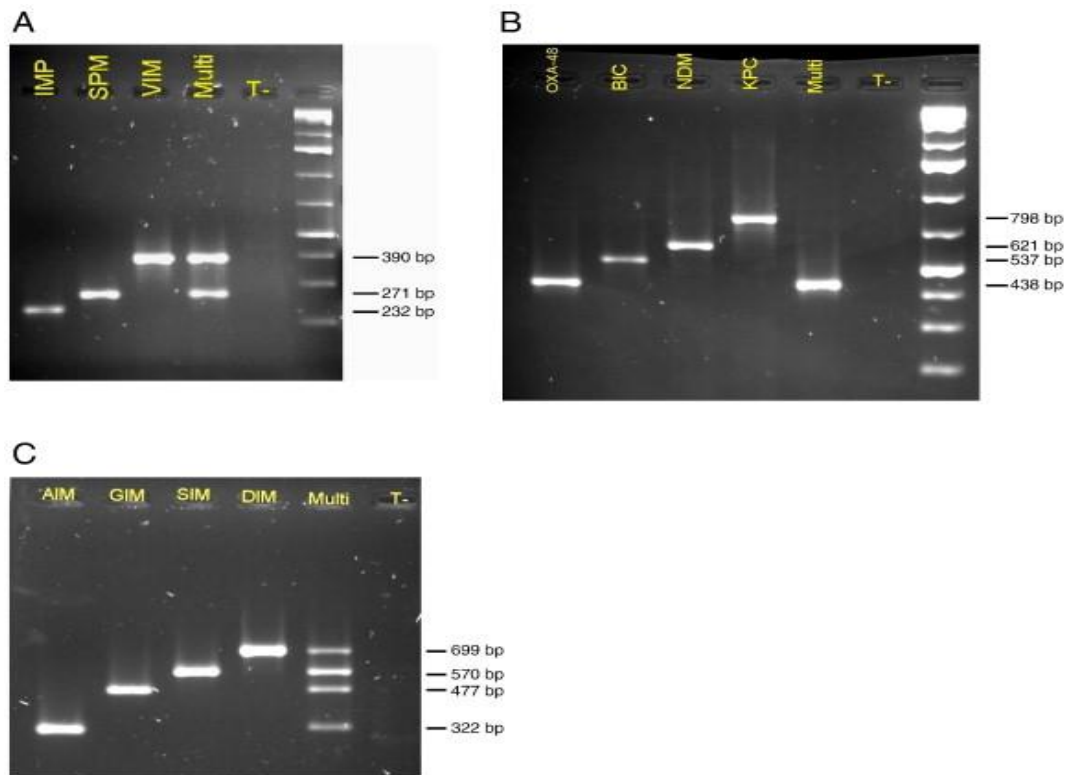
της ταχείας ταυτοποίησης 24 παθογόνων σε θετικές καλλιέργειες αίματος και της ταυτόχρονης ανίχνευσης συγκεκριμένων γονιδίων αντοχής συμπεριλαμβανομένων και των *blaKPC* (Rabaan et al, 2022).



Εικόνα 34. Α) PCR πραγματικού χρόνου Β) Απεικόνιση μετά ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 1.5% που περιέχει 0.5 μg/ml βρωμιούχο αιθίδιο

(Α) Χαρακτηριστικές κορυφές τήξης (έγχρωμες γραμμές) των αμπλικονίων που δημιουργούνται από εκκινητές που στοχεύουν τους πέντε τύπους MBL που έχουν αναγνωριστεί σε στελέχη που φέρουν MBL και έχουν αναλυθεί με την PCR πραγματικού χρόνου. Χρώματα και γονίδια, από αριστερά προς δεξιά, είναι τα ακόλουθα: μπλε, *blaGIM-1* (T_m 72.0°C), κόκκινο, *blaIMP*-τύπου γονίδια (T_m 76.5°C), πράσινο, *blaSIM-1* (T_m 80.5°C), ροζ, *blaSPM-1* (T_m 83.5°C), πορτοκαλί, *blaVIM*-τύπου γονίδια (T_m 89.0°C). (Β) Αμπλικόνια που δημιουργήθηκαν από εκκινητές που στοχεύουν τους πέντε τύπους MBL και το γονίδιο-εσωτερικό μάρτυρα (16S rRNA). Η απεικόνιση πραγματοποιήθηκε σε κουτί υπεριώδους φωτός μετά από ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 1.5% που περιέχει 0.5 μg/ml βρωμιούχο αιθίδιο. Γραμμή 1: αμπλικόνιο SPM-1, Γραμμή 2: αμπλικόνιο SIM-1, Γραμμή 3: αμπλικόνιο VIM-τύπου, Γραμμή 4: αμπλικόνιο IMP-τύπου, Γραμμή 5: αμπλικόνιο GIM-1, Γραμμή 6-9: το αμπλικόνιο του εσωτερικού μάρτυρα, Γραμμή 10: αρνητικός μάρτυρας, Γραμμές M: δείκτες μοριακού βάρους (50-bp DNA ladder, Invitrogen)

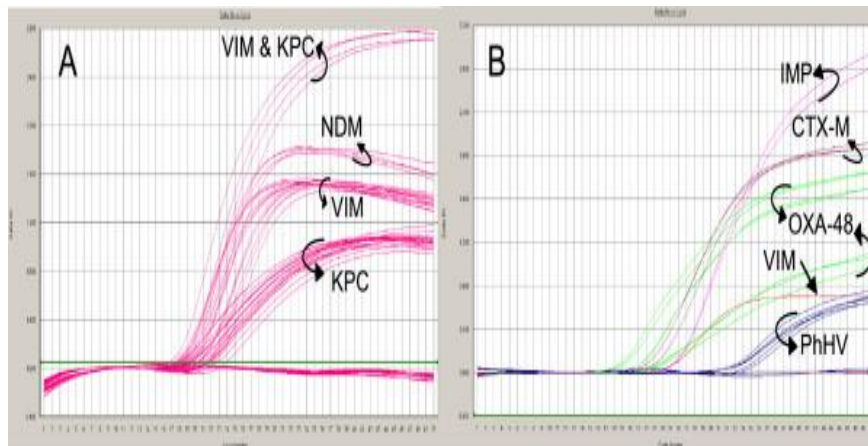
Πηγή: Mendes, et al, 2007



Εικόνα 35. Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης (2%) που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των προϊόντων της πολυπλεκτικής PCR.

Στις γραμμές 'T' αναφέρονται οι μάρτυρες. (Α) Αποτελέσματα πολυπλεκτικής PCR 1 που ανιχνεύει *blaIMP-1*, *blaSPM-1* και *blaVIM-2* γονίδια. Στη γραμμή 'multi', το δείγμα DNA περιέχει *blaVIM-2* και *blaSPM-1* γονίδια. (Β) Αποτελέσματα πολυπλεκτικής PCR 2 που ανιχνεύει *blaOXA-48*, *blaBIC-1*, *blaNDM-1*, *blaKPC-2* γονίδια. Στη γραμμή 'multi', το δείγμα DNA περιέχει *blaOXA-48* μαζί με *blaVIM-2*. (Γ) Αποτελέσματα πολυπλεκτικής PCR 3 που ανιχνεύει *blaAIM-1*, *blaGIM-1*, *blaSIM-1*, *blaDIM-1* γονίδια. Στη γραμμή 'multi', το δείγμα DNA περιέχει ένα μείγμα από τα τέσσερα γονίδια *blaAIM-1*, *blaDIM-1*, *blaGIM-1*, *blaSIM-1*. Το μέγεθος κάθε αμπλικονίου αναφέρεται δεξιά. Χρησιμοποιείται η *Generuler 1 kb Plus DNA ladder* (Euromedex, Souffelweyersheim, France)

Πηγή: Poirel, et al, 2011



Εικόνα 36. Γραφική παράσταση των Α) VIM, NDM, και KPC και Β) OXA-48/CTX-M και VIM/IMP, προϊόντων ενίσχυσης με PCR.

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν παρουσία του εσωτερικού μάρτυρα PhHV. Μια σειρά από στελέχη παρουσιάζονται. OXA-48 θετικά με χαμηλότερες γραφικές παραστάσεις ήταν επίσης θετικά για CTX-M.

Πηγή: van der Zee, et al, 2014

4.2.3.2 Ανίχνευση γονιδίων καρβαπενεμάσης με τεχνικές ισοθερμικών αντιδράσεων

Μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την ταχεία ανίχνευση γονιδίων που κωδικοποιούν καρβαπενεμάσες με την τεχνική της ισοθερμικής ενίσχυσης μέσω βρόγχου (Loop-mediated isothermal amplification-LAMP). Σε μια μελέτη, εκκινητές εξωτερικοί, εσωτερικοί και βρόγχου, σχεδιάστηκαν με στόχο την ανίχνευση με ισοθερμική αντίδραση συγκεκριμένων περιοχών σε κάθε γονίδιο-στόχο (*blaKPC*, *blaNDM*, *blaIMP*, *blaVIM*). Διακόσια είκοσι δύο στελέχη gram αρνητικών βακτηρίων ανθεκτικά στις καρβαπενέμες, εκ των οποίων 22 στελέχη ήταν Εντεροβακτηριακά, ελέγχθηκαν με την τεχνική αυτή και τα αποτελέσματα ήταν σύμφωνα με αυτά της κλασικής PCR που χρησιμοποιήθηκε ως μέθοδος αναφοράς (Cheng, et al, 2014).

Σε μια ακόμη μελέτη, 62 στελέχη Εντεροβακτηριακών και *Pseudomonas spp* που παρήγαγαν καρβαπενεμάσες και 37 στελέχη Εντεροβακτηριακών που δεν παρήγαγαν καρβαπενεμάσες, μελετήθηκαν με την τεχνική LAMP και χρωστική μπλε της υδροξυναφθόλης (LAMP-HNB) και ως μέθοδος αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η

PCR. Η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου για τα γονίδια *bla*NDM, *bla*OXA-48, *bla*VIM, *bla*IMP-14, *bla*KPC ήταν 100% και η μέθοδος φάνηκε ότι θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για επιβεβαίωση των μηχανισμών αντοχής στο εργαστήριο (Srisrattakarn, et al, 2017). Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε με 450 στελέχη Εντεροβακτηριακών και LAMP μεθοδολογία, χρησιμοποιώντας ένα εμπορικά διαθέσιμο κιτ, ανιχνεύθηκαν γονίδια *bla*KPC, *bla*NDM, *bla*OXA-48, *bla*VIM, όχι όμως *bla*OXA-181 και *bla*IMP, με ευαισθησία και ειδικότητα 100%, με εξαίρεση τα *bla*OXA-48, για τα οποία η ευαισθησία και ειδικότητα ήταν 83% και 100% αντίστοιχα (Sekyere, et al, 2015).

4.2.3.3 Ανίχνευση γονιδίων καρβαπενεμάσης με αλληλούχιση πλήρους γονιδιώματος (WGS)

Η μεθοδολογία WGS έχει επιτρέψει τον χαρακτηρισμό γονιδίων αντοχής στις καρβαπενέμες καθώς και το γενετικό τους περιβάλλον (ιντεγκρόνια, τρανσποζόνια, πλασμίδια). Ταυτόχρονα προσφέρει πληροφορίες για ολόκληρο το γονιδίωμα του υπό εξέταση βακτηρίου, σε μια μόνο αντίδραση (Cui, et al, 2019). Επιπλέον, αναδεικνύει και άλλους μηχανισμούς αντοχής στις καρβαπενέμες, όπως η απώλεια ή η αλλαγή των πορινών (Sekyere, et al, 2015; Al-Zaxrani, 2018). Γονίδια αντοχής στις καρβαπενέμες που δεν ήταν δυνατό να ανιχνευτούν με τη βοήθεια της PCR, είτε γιατί δεν είχαν περιγραφεί στο παρελθόν, είτε γιατί δεν συμπεριλαμβάνονταν εκκινητές ειδικοί για αυτά, είναι δυνατό να αναγνωριστούν με την WGS (Sekyere, et al, 2015). Αν και η ανίχνευση των γονιδίων καρβαπενεμάσης μπορεί να πραγματοποιηθεί με την τεχνική WGS εντός λίγων ωρών παρουσιάζοντας ευαισθησία και ειδικότητα 100% (Sekyere et al, 2015), το υψηλό κόστος της ανάλυσης, ο βαθμός δυσκολίας στη διαχείριση των δεδομένων, ο χρόνος που απαιτείται από την διεξαγωγή της ανάλυσης έως την παραγωγή του αποτελέσματος (turnaround time), είναι περιοριστικοί παράγοντες προς το παρόν για την ευρεία εφαρμογή της μεθοδολογίας σε μικροβιολογικό εργαστήριο ρουτίνας (Cui, et al, 2019).

Η ανάπτυξη συστημάτων WGS, όπως οι αναλυτές MiSeq System (Illumina Inc.), Ion Torrent Personal Genome Machine (Life Technologies), Ion Proton (Life Technologies), PacBio RS II (Pacific Biosciences), Sequel System (Pacific

Biosciences), GridION (Oxford Nanopore Technologies), MinION (Oxford Nanopore Technologies), και PromethION (Oxford Nanopore Technologies) βρίσκονται υπό εξέλιξη (Patel, 2016). Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ανάπτυξη μιας ενιαίας βάσης δεδομένων για την ανάλυση, σύγκριση και κοινοποίηση πληροφοριών στην παγκόσμια επιστημονική κοινότητα.

Το πρώτο επιδημικό κύμα στελεχών *K. pneumoniae* που παρήγαγαν OXA-48 στην Αυστραλία, μελετήθηκε με WGS. Τα στελέχη *K. pneumoniae* απομονώθηκαν από ασθενείς της ΜΕΘ και τα γονίδια OXA-48 και CTX-M-14 βρέθηκαν στο ίδιο συζευκτικό πλασμίδιο για πρώτη φορά. Φαίνεται η σημασία της επιτήρησης των γονιδίων αντοχής που φέρονται σε πλασμίδια, γιατί αυτά μεταφέρονται σιωπηλά σε στελέχη Εντεροβακτηριακών και περιορίζουν σημαντικά τις θεραπευτικές επιλογές αντιμικροβιακών. Επιπλέον με την αλληλούχιση WGS μελετήθηκε η *in vivo* εξέλιξη τέτοιου στελέχους *K. pneumoniae* σε ασθενή που εξήλθε και ήταν φορέας επί 18 μήνες (Espedido, et al, 2013). Επίσης, με WGS μελετήθηκε το πρώτο στέλεχος *E. coli* που παρήγαγε NDM-1 στο Χονγκ Κονγκ, όπου πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση στο πλασμίδιο που έφερε το γονίδιο της μεταλλο-β-λακταμάσης και αποδείχθηκε ότι έχει εξελιχθεί μέσω πολύπλοκων οδών (Ho, et al, 2011).

Με WGS έγινε έλεγχος και παρακολούθηση της έξαρσης από στέλεχος *K. pneumoniae* ανθεκτικού στις καρβαπενέμες μέσω παραγωγής KPC, σε νοσοκομείο, κατά το έτος 2011, σε 18 ασθενείς. Με συνδυασμένη επιδημιολογική μελέτη αλλά και του γονιδιώματος του στελέχους, διαπιστώθηκε ότι η έξαρση ξεκίνησε από έναν ασθενή που πήρε εξιτήριο 3 εβδομάδες πριν την κλινική εκδήλωση των επόμενων κρουσμάτων, μέσω τριών ανεξάρτητων μεταφορών του στελέχους. Συμπερασματικά, αποδείχθηκε ότι η μελέτη του γονιδιώματος με WGS σε συνδυασμό με επιδημιολογικά δεδομένα μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της διασποράς των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων (Snitkin, et al, 2012).

4.2.3.4 Ανίχνευση γονιδίων καρβαπενεμάσης με εφαρμογή της μεθοδολογίας Microarrays

Με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 37, είναι δυνατό να διερευνηθεί μεγάλος αριθμός γονιδίων σε μία μόνο αντίδραση, σε

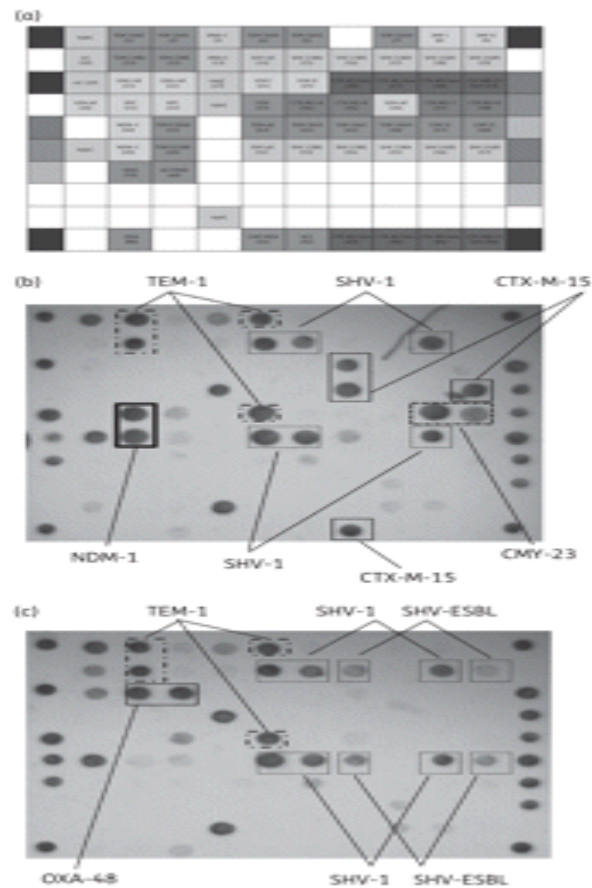
αντίθεση με τις μεθόδους PCR και αλληλούχισης που παρουσιάζουν χαμηλότερη ευαισθησία όταν ελέγχονται στελέχη που εκφράζουν περισσότερα του ενός γονίδια β-λακταμάσης της ίδιας οικογένειας (Cuzon, et al, 2012). Είναι εξαιρετικά ευαίσθητη και ειδική μέθοδος όταν χρησιμοποιείται για την ανίχνευση γονιδίων καρβαπενεμάσης (Rabaan, et al, 2022), αλλά φαίνεται να μην δύναται να ανιχνεύσει νέα γονίδια, όπως άλλωστε ισχύει για όλες τις μοριακές μεθόδους (Cuzon, et al, 2012).

Υπάρχουν αρκετά εμπορικά διαθέσιμα kit που συνδυάζουν την τεχνολογία των μικροσυστοιχιών και της PCR, όπως το Check-Points ESBL/KPC array (Check-Points, Wageningen, The Netherlands). Διαθέτει τρία διαφορετικά πάνελ για έλεγχο γονιδίων αντοχής. Το Check-MDR CT103, ανιχνεύει ταυτόχρονα γονίδια ESBL (TEM, SHV, CTX-M και διαχωρίζει τα TEM και SHV αλληλόμορφα γονίδια ESBL από τα μη ESBL), *ρAmpC* (τύπου CMY-2, DHA, FOX, ACC-1 ACT/MIR, CMY-1 τύπου/MOX) και καρβαπενεμάσες (KPC, VIM, IMP, NDM, OXA-48) (Cuzon, et al, 2012; Lee, et al, 2022). Παρουσιάζει ειδικότητα και ευαισθησία 100% για τα γονίδια *blaKPC*, *blaNDM*, *blaVIM*, *blaIMP* και 100% και 95% αντίστοιχα, για τα γονίδια *blaOXA-48* (Cuzon, et al, 2012). Αποτελεί αναβάθμιση του Check-MDR CT102, το οποίο αναγνωρίζει γονίδια ESBL (*blaCTX-M*, *blaSHV*, *blaTEM*) και γονίδια καρβαπενεμάσης (*blaKPC*, *blaOXA-48*, *blaVIM*, *blaIMP*, *blaNDM-1*) (Naas, et al, 2011).

Με μια ακόμη τεχνική που βασίζεται στην ανάλυση επιλεγμένων σημάτων, από ανιχνευτές που έχουν υβριδιστεί, σε μια συσκευή ανάγνωσης συστοιχιών (Alere Technologies GmbH, Loebstedter, Jena, Germany) ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο είδους 117 στελέχη Εντεροβακτηριακών, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* και ελέγχθηκαν για γονίδια αντοχής (καρβαπενεμάσες, ESBL, στενού φάσματος β-λακταμάσες) με ευαισθησία 98.2% και ειδικότητα 97.4%. Δύο περιπτώσεις γονιδίων OXA-23 και OXA-48 δεν ανιχνεύθηκαν (Sekyere, et al, 2015).

Ένα ακόμη εμπορικά διαθέσιμο σύστημα μικροσυστοιχιών μελετήθηκε, το Verigene Gram-Negative Blood Culture Nucleic Acid test (BC-GN) (Nanosphere, Northbrook, IL). Αναγνωρίζει τουλάχιστον 9 γένη/είδη βακτηρίων (*Acinetobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *E. coli/Shigella spp.*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Proteus spp.*, *P. aeruginosa*, and *S. marcescens*) και 6 μηχανισμούς αντοχής (CTX-M, KPC, NDM, VIM, IMP, OXA) απευθείας από θετικές

καλλιέργειες αίματος, παρουσιάζοντας ευαισθησία 96,7% και ειδικότητα 100% όταν τα δείγματα ελέγχονται για γονίδια αντοχής. Ως μέθοδος αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το Check-MDR CT102 και τα αποτελέσματα της ανάλυσης, βρέθηκαν σε πλήρη συμφωνία με αυτά της PCR πραγματικού χρόνου (Sullivan, et al, 2014). Σε άλλη μελέτη που πραγματοποίησε η ομάδα των Ledebouer et al, το σύστημα αυτό παρουσίασε υψηλή θετική προγνωστική συμφωνία (Positive Predictive Agreement-PPA), όταν ο έλεγχος αφορούσε τα γονίδια αντοχής και συγκεκριμένα, η PPA για κάθε γονιδιακό στόχο ήταν ως ακολούθως: *blaCTX-M* 98.9%, *blaKPC* 100%, *blaNDM* 96.2%, *blaOXA* 94.3%, *blaVIM* 100% και *blaIMP* 100%. Όλοι οι γονιδιακοί στόχοι αντοχής παρουσίασαν αρνητική προγνωστική συμφωνία (Negative Predictive Agreement-NPA) >99.9%. Ως μέθοδος αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η κλασική καλλιέργεια του δείγματος, η βιοχημική ταυτοποίηση και η επιβεβαίωση της αντοχής με αλληλούχιση του γενετικού υλικού. Ο χρόνος παραγωγής αποτελέσματος ήταν < 2 ωρών από την στιγμή της επεξεργασίας του δείγματος στο σύστημα μικροσυστοιχιών (Ledebouer, et al, 2015).



Εικόνα 37. Χαρακτηριστικές εικόνες μικροσυστοιχιών DNA από το σύστημα ‘Check-MDR CT103 array’.

Αποτελείται από μοναδικά συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια (cZIP) που στοχεύουν μεμονωμένους ανιχνευτές και είναι τοποθετημένα στον πυθμένα ενός φιαλιδίου μικροαντίδρασης. Όταν ολοκληρώνεται ο υβριδισμός των ενισχυμένων από την PCR προϊόντων σύνδεσης στην μικροσυστοιχία, πραγματοποιείται χρωματομετρική ανίχνευση των θετικών αντιδράσεων. Κάθε συστοιχία καθορίζει τα αποτελέσματα τυποποίησης ενός στελέχους και αποτελείται από σημεία μάρτυρα και σημεία συγκεκριμένου δείκτη, που αριθμούνται από 1 έως 96. Α) Θεωρητική απεικόνιση των ανιχνευτών των συστοιχιών ενός στελέχους. *HybC* μάρτυρας υβριδισμού: DNA-C μάρτυρας για βακτηριακό DNA gram αρνητικών στελεχών, *rxC* μάρτυρας αντίδρασης, *negC* αρνητικός μάρτυρας Β) Αποτελέσματα συστοιχιών για στέλεχη *K. pneumoniae* που φέρουν *blaNDM-1*, *blaSHV-1*, *blaTEM-1*, *blaCTX-M-15*, *blaCMY-23*. C) Αποτελέσματα συστοιχιών από στέλεχος *K. pneumoniae* που φέρει γονίδια *blaOXA-48*, *blaSHV-1*, *blaSHV-2a*, *blaTEM-1*. Θετικές αντιδράσεις στα σημεία 15, 16, 18, 19 υποδηλώνουν την παρουσία *blaSHV-ESBL* και *blaSHV-non-ESBL* γονιδίων ταυτόχρονα στο στέλεχος.

Πηγή: Cuzon, et al, 2012

4.3 Μελλοντική πρόβλεψη ανάπτυξης μεθόδων ελέγχου αντοχής

Το πρόβλημα της μικροβιακής αντοχής και η ανάπτυξη πολυανθεκτικών και πανανθεκτικών στελεχών απαιτεί τη συνδυασμένη προσπάθεια της βιομηχανίας, των κυβερνήσεων, των ακαδημαϊκών και άλλων φορέων με στόχο τη βελτίωση των διαθέσιμων μεθόδων ελέγχου της αντοχής αλλά και την ανάπτυξη νεότερων που παρακάμπτουν τα μειονεκτήματα των πρώτων. Τα κύρια πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των συμβατικών φαινοτυπικών και μοριακών μεθόδων ελέγχου της αντοχής παρουσιάζονται στον πίνακα 8 (Karprou, et al, 2021).

Αρκετές νέες τεχνικές βρίσκονται υπό ανάπτυξη και εξέλιξη, όπως ταχείες μέθοδοι φαινοτυπικού ελέγχου της ευαισθησίας στα αντιμικροβιακά, αλληλούχιση ολόκληρου γονιδιώματος και μεταγονιδιωματική ανάλυση (Agnostic Metagenomic Analysis). Είναι ωστόσο απαραίτητο να πραγματοποιηθεί πρόοδος ως προς την επίλυση σημαντικών προβλημάτων που αποτρέπουν τη μελλοντική εφαρμογή των τεχνικών αυτών στο μικροβιολογικό εργαστήριο με στόχο την σωστή διαχείριση των αντιμικροβιακών στην κλινική πράξη, την άμεση αντιμετώπιση των λοιμώξεων, τον έλεγχο της διασποράς και την ορθή διαχείριση των ασθενών. Τέτοια προβλήματα είναι η έλλειψη τυποποιημένων στοιχείων βιοπληροφορικής και τεχνικών διεργασιών, περιορισμοί των ήδη υπάρχοντων βάσεων δεδομένων καθώς και η έλλειψη μέτρων ποιοτικού ελέγχου που είναι απαραίτητα για την ορθή φροντίδα του ασθενούς (Patel, et al, 2016).

Άλλες τεχνολογίες που εικάζεται ότι θα βελτιώσουν σημαντικά τον τομέα της διάγνωσης και θεραπείας είναι η μέθοδος LOC (lab-on-a-chip technology), που στοχεύει στην ανάπτυξη συστημάτων που θα συνδυάζουν διάφορες εργαστηριακές λειτουργίες σε ένα ενσωματωμένο κύκλωμα (chip) με χρήση της τεχνολογίας της μικρορευστομηχανικής (microfluidics), η οποία βασίζεται στη μηχανική διαχείριση υγρών σε κλίμακα μικρότερη του χιλιοστόμετρου (Sackmann, et al, 2014; Vasala, et al, 2020; Postek, et al, 2022). Η φασματομετρία μάζας προβλέπεται ότι θα ενσωματωθεί σε άλλες τεχνολογίες ελέγχου της αντιμικροβιακής ευαισθησίας, κυρίως στις περιπτώσεις σηψαιμίας, και αρκετή πρόοδος πραγματοποιείται σε συστήματα βιοανίχνευσης (biosensor technologies) και ισοθερμικής ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων (Vasala, et al, 2020).

Μέθοδος	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Φαινοτυπικές Μέθοδοι	<p>Επικυρωμένες μέθοδοι αναφοράς</p> <p>Απλή μεθοδολογία</p> <p>Υπολογίζονται MICs</p> <p>Συνήθως πραγματοποιείται και ταυτοποίηση παθογόνων</p>	<p>Έλεγχος μεμονωμένων στελεχών</p> <p>Προηγούμενη καλλιέργεια είναι απαραίτητη (δύσκολη για απαιτητικά βακτήρια, δεν είναι εφικτή για μη καλλιεργήσιμα βακτήρια)</p> <p>Διαφωνία σε προτυποποιημένες οδηγίες</p> <p>Για κάποιες ταξονομικές μονάδες, οι τιμές cut-off για την ευαισθησία δεν έχουν καθιερωθεί</p>
Μοριακές Μέθοδοι	<p>Δεν είναι απαραίτητη η απομόνωση του μικροοργανισμού</p> <p>Αναλύονται πολυμικροβιακά δείγματα</p> <p>Πολυπλεκτική στόχευση των γονιδίων μικροβιακής αντοχής</p> <p>Πιο ακριβής ανίχνευση και χαρακτηρισμός των γονιδίων</p> <p>Σχετικά γρήγορη προσαρμογή σε νέους παράγοντες αντοχής</p>	<p>Απαραίτητο το εξειδικευμένο προσωπικό</p> <p>Υψηλό κόστος εργαστηριακού εξοπλισμού</p> <p>Δεν προσδιορίζουν MICs</p> <p>Μερικά γονίδια αντοχής μπορεί να μην ανιχνευτούν (ευαισθησία και κάλυψη)</p> <p>Η ποικιλότητα των γονιδίων αποτελεί δυσκολία για την δημιουργία μεθοδολογιών λόγω του υψηλού κόστους</p> <p>Δεν υπάρχει απόλυτη συσχέτιση με τις φαινοτυπικές μεθόδους</p>

Πίνακας 8. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των διαγνωστικών μεθόδων μικροβιακής αντοχής.

Πηγή: Kaprou, et al, 2021

5. Περίληψη

Η εισαγωγή των αντιμικροβιακών στην κλινική πράξη αποτελεί ακρογωνιαίο λίθο στη θεραπευτική των λοιμώξεων. Ωστόσο, σχεδόν ταυτόχρονα με την ανακάλυψη του πρώτου αντιμικροβιακού παρατηρήθηκε το φαινόμενο της μικροβιακής αντοχής. Όπως αποδεικνύεται από θραυσματα γενετικού υλικού σε απολιθώματα, η μικροβιακή αντοχή είναι έκδηλη σε βακτήρια του περιβάλλοντος 30.000 πριν. Η μικροβιακή αντοχή καθιστά τη θεραπεία με αρκετά αντιμικροβιακά αναποτελεσματική περιορίζοντας σημαντικά τις υπάρχουσες θεραπευτικές επιλογές. Είναι μια αυξανόμενη απειλή για τη δημόσια υγεία και συχνά παρατηρείται σε βακτήρια της τάξης των Εντεροβακτηριακών (Enterobacterales), ενώ συχνά εκδηλώνεται έναντι αντιμικροβιακών της ομάδας των β-λακταμικών, που είναι μια από τις ευρέως συνταγογραφούμενες κατηγορίες αντιμικροβιακών παραγόντων παγκοσμίως.

Ο κύριος μηχανισμός αντοχής που παρατηρείται στα Εντεροβακτηριακά και κυρίως τα Εντεροβακτηριοειδή έναντι των β-λακταμικών αντιμικροβιακών είναι η παραγωγή ενζύμων, των β-λακταμασών. Είναι δυνατό να παράγονται περισσότερα του ενός ένζυμα από το ίδιο στέλεχος ενώ συχνά συνυπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί αντοχής όπως η απώλεια πορίνης και η υπερεκφραση αντλιών ενεργητικής εκροής που προκαλούν υψηλού επιπέδου αντοχή. Ο εργαστηριακός έλεγχος των μηχανισμών αντοχής είναι απαραίτητος για τον έλεγχο της διασποράς των λοιμώξεων και την επιλογή της πιο κατάλληλης αντιμικροβιακής θεραπείας. Φαινοτυπικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται συχνά γι' αυτό το λόγο που ανιχνεύουν τον φαινότυπο αντοχής, αλλά και μοριακές που επιτρέπουν το χαρακτηρισμό των γονιδίων αντοχής, τη μελέτη του γενετικού περιβάλλοντος αυτών και την ανακάλυψη νέων γονιδίων αντοχής. Οι φαινοτυπικές μέθοδοι παρουσιάζουν μικρότερη ευαισθησία και ειδικότητα σε περιπτώσεις στελεχών που παράγουν περισσότερες β-λακταμάσες. Επίσης, επιπρόσθετοι μηχανισμοί αντοχής όπως οι πορίνες ανιχνεύονται μόνο με τις γονοτυπικές μεθόδους οι οποίες σταδιακά βρίσκουν εφαρμογή σε εργαστήρια που διαθέτουν τον απαραίτητο προϋπολογισμό αλλά και εξειδικευμένο προσωπικό και χρησιμοποιούνται συμπληρωματικά όταν η επιβεβαίωση των μηχανισμών της αντοχής με φαινοτυπικές μεθόδους δεν παρέχει όλες τις απαραίτητες πληροφορίες.

6. Abstract

«Phenotypic and genotypic detection of antimicrobial resistance in Enterobacterales to β -lactam antibiotics» Eirini Tatsina

The introduction of antimicrobial agents into clinical practice is a cornerstone in infection treatment. However, antimicrobial resistance was observed almost at the same time as the discovery of the first antimicrobial agent and is evident in fossils that are 30.000 years old. Nowadays antimicrobial resistance is a major public health threat, since it renders treatment with several antimicrobial agents ineffective and limits treatment options. Bacteria of the order Enterobacterales are often resistant to one or more groups of antimicrobial agents, one of the most important of which is the group of β -lactam agents.

The main resistance mechanism in members of the order Enterobacterales to β -lactam antimicrobial agents is the production of enzymes called β -lactamases. A bacterial strain may produce one or more enzymes and it may also confer more than one mechanisms of resistance e.g hyperproduction of efflux pumps, porin loss, alteration of porins. As a consequence, it is able to manifest a high level of resistance. Phenotypic and genotypic methods are employed in order to detect and confirm the production of β -lactamases so as to protect public health by controlling the spread of drug-resistant and multidrug-resistant strains. Phenotypic methods may not be able to detect the exact mechanism of resistance in cases of bacteria that produce more than one enzymes. Furthermore, other mechanisms of resistance can only be detected by genotypic methods which are slowly becoming a reality for laboratories other than reference laboratories and academic medical centers. New resistance genes may be discovered by the application of genotypic methods and their genetic environment could be examined. Since genotypic methods are still rather expensive and require specialized personell, it is only logical that, nowadays, they are mainly employed in order to monitor and control antimicrobial resistance and serve as complementary to phenotypic methods when the latter fail to provide the exact mechanism of resistance.

7. Βιβλιογραφία

- Abraham, E.P. (1987) Cephalosporins 1945-1986. *Drugs*, 34: 1-14
- Abraham, E.P., Chain, E. (1988). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Rev Infect Dis*, 10: 677-678.
- Adeolu, M., Alnajjar, S., Naushad, S., Gupta, R.S. (2016) Genome based phylogeny and taxonomy of the '*Enterobacteriales*': proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66: 5575-5599
- Aguirre-Quinonero, A., Martinez-Martinez, L. (2017) Non-molecular detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates. *J Infect Chemother*, 23(1):1-11
- Alekshun, M.N., Levy, S.B. (2007) Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 128(6):1037-1050
- Alnajjar, S. and Gupta, R.S. (2017) Phylogenomics and comparative genomic studies delineate six main clades within the family *Enterobacteriaceae* and support the reclassification of several polyphyletic members of the family. *Infection, Genetics and Evolution*, 54: 108-127
- Al-Zahrani, I.A. (2018) Routine detection of carbapenem-resistant gram-negative bacilli in clinical laboratories. *Saudi Med J*, 39(9): 861-872
- Ambler, R.P. (1980) The structure of beta lactamases. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*, 289(1036): 321-331
- Ambler, R.P., Coulson A.F., Frere, J.M., Ghuyssen, J.M., Joris, B., Forsman, M., Levesque, R.C., Tiraby, G., Waley, S.G. (1991) A standard numbering scheme for the class A -lactamases. *Biochem J*, 276(1): 269-270.
- Amjad, A., Mirza, I.A., Abbasi, S.A., Farwa, U., Malik, N., Zia, F. (2011) Modified Hodge Test: A simple and effective test for detection of carbapenemase production. *Iranian Journal of Microbiology*, 3(4):189-193

- Anandan, S., Damodaran, S., Gopi, R., Bakthavatchalam, Y.D., Veeraraghavan, B. (2015) Rapid screening for carbapenem resistant organisms: current results and future approaches. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9(9):1-3
- Antao, E.M., Vincze, S., Hanke, R., Klimmek, L., Suchecka, K., Lubke-Becker, A., Wieler, L.H. (2018) Antibiotic resistance, the 3As and the road ahead. *Gut Pathog*, 10 : 52
- Anjum, M.F., Zankari, E.A., Hasman, H. (2017) Molecular methods for detection of antimicrobial resistance. *Microbiol Spectrum*, 5(6):1-17
- Armstrong, T, Fenn, S.J., Hardie, K.R. (2021) JMM Profile: Carbapenems: a broad-spectrum antibiotic. *Journal of Medical Microbiology*, 70:001462
- Aruhomukama, D. (2020) Review of phenotypic assays for detection of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases: a microbiology laboratory bench guide. *African Health Sciences*, 20(3):1090-1108
- Babic, M., Hujer, A.M., Bonomo, R.A. (2006) What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resistance Updates*, 9:142–156
- Balouiri, M., Sadiki, M., Ibsouda, S.K. (2016) Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6: 71-79
- Bartolini, A., Frasson, I., Cavallaro, A., Richter, S.R., Palu, G. (2014) Comparison of phenotypic methods for the detection of carbapenem non-susceptible Enterobacteriaceae. *Gut Pathog*, 6:13
- 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*, 43:1924-1931
- Bernabeu, S., Dortet, L., Naas, T. (2017) Evaluation of the β -Carba test, a colorimetric test for the rapid detection of carbapenemase activity in gram-negative bacilli. *J Antimicrob Chemother*, 72:1646-1658
- Bertani, B., Ruiz, N. (2018) Function and biogenesis of lipopolysaccharides. *Ecosal plus*, 8(1): 10.1128

- Bialvaei, A.Z., Kafil, H.S., Asgharzadeh, M., Memar, M.Y., Yousefi, M. (2016) Current methods for the identification of carbapenemases. *Journal of Chemotherapy*, 28(1):1-19
- Birkett, C.I., Ludlam, H.A., Woodford, N., Brown, D.F.J., Brown, N.M., Roberts, M.T.M., Milner, N., Curran, M.D. (2007) Real-time TaqMan PCR for rapid detection and typing of genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases. *Journal of Medical Microbiology*, 56:52-55
- Bo, G. Giuseppe Brotzu and the discovery of cephalosporins. (2000) *Clin Microbiol Infect*, 6(3):6-9.
- Bogaerts, P., Hujer, A.M., Naas, T., de Castro, R.R., Endimiani, A., Nordmann, P., Glupczynski, Y., Bonomo, R.A. (2011) Multicenter evaluation of a new DNA microarray for rapid detection of clinically relevant bla genes from β -lactam-resistant gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 55:4457-4460
- Bonomo, R.A. (2017) β -Lactamases: A focus on current challenges. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 7(1):a025239
- Bouza, E., Cercenado, E. (2002) *Klebsiella* and *Enterobacter*: antibiotic resistance and treatment implications. *Semin Respir Infect*, 17(3):215-230
- 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
- Bradford, P.A., Urban, C., Mariano, N., Projan, S.J., Rahal, J.J., Bush, K. (1997) Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid mediated AmpC β -lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother*, 41:563-569
- Breijyeh, Z., Jubeh, B., Karaman, R. (2020) Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules*, 25:1340
- Brenwald, N.P., Jevonsi, G., Andrews, J., Ang, L., Fraise, A.P. (2005) Disc methods for detecting AmpC β -lactamase-producing clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56:600-601

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.

Bush, K. (1989) Characterization of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 33:259-263

Bush, K., Jakoby, 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. (2010) The coming of age of antibiotics: discovery and therapeutic value. *Ann N Y Acad Sci*, 1213:1-4

Bush, K., Fisher, J.F. (2011) Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from Gram-negative bacteria. *Ann Rev Microbiol*, 65: 455–478

Bush, K. (2013) Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1277:84-90

Bush, K., Bradford, P.A. (2016) β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 6(8):a025247

Bush, K. (2018) Past and present perspectives on β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 62(10):e01076-18

Bush, K., Bradford, P.A. (2020) Epidemiology of β -lactamase-Producing Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(2):e00047-19

Bush, K., Jacoby, G. (2010) Updated Functional Classification of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3):969-976

Cajic, I., Kabic, J., Kekic, D., Jovikevic, M., Milenkovic, M., Culafic, D.M., Trudic, A., Ranin, L., Opavski, N. (2022) Antimicrobial Susceptibility Testing: A Comprehensive Review of Currently Used Methods. *Antibiotics (Basel)*, 11(4):427

Cambray, G., Guerout, A.M., Mazel, D. (2010) Integrons. *Annu Rev Genet*, 44:141-166

Canton, R., Alba-Gonzalez, J.M., Galan, J.C. (2012) CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Frontiers in Microbiology*, 3:110

Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K.L., Threlfall, E.J. (2005) Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods*, 63:219-228

Carattoli, A. (2013) Plasmids and the spread of resistance. *International Journal of Medical Microbiology*, 303:298-304

Chen, L., Medivalla, J.R., Endimiani, A., Rosenthal, M.E., Zhao, Y., Bonomo, R.A., Kreiswirth, B.N. (2011) Multiplex real-time PCR assay for detection and classification of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase gene (*blaKPC*) variants. *J Clin Microbiol*, 49: 579–585.

Cheng, C., Zheng, F., Rui, Y. (2014) Rapid detection of *blaNDM*, *blaKPC*, *blaIMP*, and *blaVIM* carbapenemase genes in bacteria by loop-mediated isothermal amplification. *Microb Drug Resist*, 20:533–538

Chopra, I. (2013) The 2012 Garrod Lecture : Discovery of antibacterial drugs in the 21st century. *J Antimicrob Chemother*, 68: 496–505

Christaki, E., Markou, M., Tofarides, A. (2020) Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution and Persistence. *Journal of molecular evolution*, 88(1):26-40

Codjoe, F.S, Donkor E.S. (2018) Carbapenem Resistance : A Review. *Medical Sciences (Basel)*, 6 (1): 1

Cohen Stuart, J., Dierikx, C., Naiemi, N.A., Karczmarek, A., Van Hoek, A.H.A.M., Vos, P., Fluit, A.C., Scharringa, J., Duim, B., Mevius, D., Leverstein-van Hall, M.A. (2010) Rapid detection of TEM, SHV and CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Enterobacteriaceae using ligation-mediated amplification with microarray analysis. *J Antimicrob Chemother*, 65:1377-1381

Coudron, E. (2005) Inhibitor-Based Methods for Detection of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamases in *Klebsiella spp*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(8):4163-4167

- Cui, X., Zhang, H., Du, H. (2019) Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Detection and antimicrobial therapy. *Frontiers in Microbiology*, 10:1823
- Cuzon, G., Naas, T., Bogaerts, P., Glupczynski, Y., Nordmann, P. (2012) Evaluation of a DNA microarray for the rapid detection of extended spectrum β -lactamases (TEM, SHV and CTX-M), plasmid-mediated cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, FOX, ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-like/MOX) and carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM) .*J Antimicrob Chemother*, 67:1865-1869
- Dalhoff, A., Janjic, N., Echols, R. Redefining penems. (2006) *Biochem Pharmacol*, 71(7):1085-95
- Dallene, C., Da Costa, A., Decre, D., Favier, C., Arlet, G. (2010) Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*, 65:490-495
- Decad, G.M., Nikaido, H. (1976) Outer membrane of gram-negative bacteria. XII. Molecular-sieving function of cell wall. *J Bacteriol*, 128:325–336
- De Champs, C., Chanal, C., Sirot, D., Baraduc, R., Romaszko, J.P., Bonnet, R., Plaidy, A., Boyer, M., Carroy, E., Gbadamassi, M., Lалуque, S., Oules, O., Poupert, M.C., Villemain, M., Sirot, J. (2004) Frequency and diversity of class A extended-spectrum β -lactamases in hospitals of the Auvergne, France: a 2 year prospective study. *J Antimicrob Chemother*, 54:634-639
- Delcour, A.H. (2009) Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1794:808-816
- Derbyshire, H., Kay, G., Evans, K., Vaughan, C., Kavuri, U., Winstanley, T. (2009) A simple disk diffusion method for detecting AmpC and extended spectrum β -lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63:497-501
- Dhar, S., Kumari, H., Balasubramanian, D., Mathee, K. (2018) Cell-wall recycling and synthesis in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* - their role in the development of resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 67(1):1–21

D'Costa, V.M., King, C.E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W.W., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G.B., Poinar, H.N., Wright, G.D., (2011) Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, 477:457–461.

Doi, Y., Paterson, D.L. (2007) Detection of plasmid mediated class C β -lactamases. *International Journal of Infectious Diseases*, 11:191-197

Dortet, L., Agathine, A., Naas, T., Cuzon, G., Poirel, L., Nordmann, P. (2015) Evaluation of the Rapidec Carba NP, the Rapid Carb Screen and the Carba NP test for biochemical detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*, 70:3014-3022

Drawz, S.M., Bonono, R.A. (2010) Three decades of β -lactamase inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1):160–201

Drieux, L., Brossier, F., Sougakoff, W., Jarlier, V. (2008) Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clinical Microbiology and Infection*, 14 (1): 90-103

Durand, C., Boudet, A., Lavigne, J.P., Pantel, A. (2020) Evaluation of two methods for the detection of third generation cephalosporin resistant Enterobacterales directly from positive blood cultures. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10:491

Ellington, M.J., Kistler, J., Livermore, D.M., Woodford, N. (2007) Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59:321-322

Ellington, M.J., Findlay, J., Hopkins, K.L., Meunier, D., Alvarez-Buylla, A., Horner, C., McEwan, A., Guiver, M., McCrae, L.X., Woodford, N., Hawkey, P. (2016) Multicentre evaluation of a real-time PCR assay to detect genes encoding clinically relevant carbapenemases in cultured bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 47:151-154

Elshamy, A.A., Aboshanab, K.M. (2020) A review on bacterial resistance to carbapenems: epidemiology, detection and treatment options. *Future Sci OA*, 6:3

Endimiani, A., Hujer, A.M., Hujer, K.M., Gatta, J.A., Schriver, A.C., Jacobs, M.R., Rice, L.B., Bonomo, R.A. (2010) Evaluation of a commercial microarray system for

detection of SHV-, TEM-, CTX-M, and KPC-type β -lactamase genes in gram-negative isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(7):2618-2622

Espedido, B.A., Steen, J.A., Ziochos, H., Grimmond, S.M., Cooper, M.A., Gosbell, I.B., van Hall, S.J., Jensen, S.O. (2013) Whole Genome Sequence Analysis of the First Australian OXA-48-Producing Outbreak-Associated *Klebsiella pneumoniae* Isolates: The Resistome and In Vivo Evolution. *Plos One*, 8(3):e59920

Frickmann, H., Masanta, W.O., Zautner, A.E. (2014) Emerging rapid resistance testing methods for clinical microbiology laboratories and their potential impact on patient management. *BioMed Research International*, 14:375681

Galani, I., Rekatsina, P.D., Hatzaki, D., Plachouras, D., Souli, M., Giamarellou, H. (2008) Evaluation of different laboratory tests for the detection of metallo- β -lactamase producing in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother*, 61:548-553

Garrec, H., Drieux-Rouzet, L., Golmard, J.L., Jarlier, V., Robert, J. (2011) Comparison of nine phenotypic methods for detection of Extended-Spectrum β -Lactamase production. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(3):1048-1057

Gaviria, L.P., Montsant, L., Azuaje, C., González-Díaz, A., Horcajada, J.P., Limón, E. Viñas, M., Espinal, P., Fusté, E. (2022) A Descriptive Analysis of Urinary ESBL producing-*Escherichia coli* in Cerdanya Hospital. *Microorganisms*, 10(488):1-14

Georgopapadakou, N.H., Liu, F.Y. (1980) Penicillin-binding proteins in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 18:148-157

Ghai, I. and Ghai, S. (2018) Understanding antibiotic resistance via outer membrane permeability. *Infection of Drug Resistance*, 11:523–530

Ghai, I. and Ghai, S. (2017) Exploring bacterial outer membrane barrier to combat bad drugs. *Infection and Drug Resistance*, 10:261-273

Ghafourian, S., Nourkhoda S., Soheili, S., Sekawi, Z. (2015) Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology. *Curr Issues Mol Biol*, 17:11-22

Giamarellou, H. (1999) Fourth Generation Cephalosporins in the Antimicrobial Chemotherapy of Surgical Infection. *Journal of Chemotherapy*, 11:486-493

Girlich, D., Halimi, D., Zambardi, G., Nordmann, P. (2013) Evaluation of Etest strips for detection of KPC and metallo-carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 77:200-201

Girlich, D., Poirel, L., Nordmann, P. (2012) Value of the Modified Hodge test for Detection of Emerging Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*, 50:477-479

Giske, C.G. (2015) Contemporary resistance trends and mechanisms for the old antibiotics colistin, temocillin, fosfomicin, mecillinam and nitrofurantoin. *Clin Microbiol Infect* 21:899-905

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.

Glupczynski, Y., Evrard, S., Ote, I., Mertens, P., Huang, T.D., Leclipteux, T., Bogaerts, P. (2016) Evaluation of two new commercial immunochromatographic assays for the rapid detection of OXA-48 and KPC carbapenemases from cultured bacteria. *J Antimicrob Chemother*, 71:1217-1222

Golden, A.R., Karlowsky, J.A., Walkty, A., Baxter, M.R., Denisuk, A.J., McCracken, M., Mulvey, M.R., Adam, H.J., Bay, D., Zhanel, G.G. (2021) Comparison of phenotypic antimicrobial susceptibility testing results and WGS-derived genotypic resistance profiles for a cohort of ESBL-producing *Escherichia coli* collected from Canadian hospitals:CANWARD 2007–18. *J Antimicrob Chemother*, 76:2825-2832

Greenwood, D., Ogilvie, M.M. (2007) 'Antimicrobial Agents'. In *Medical Microbiology*. Eds, Greenwood, D., Slack, R., Peutherer, J., Barer M. 17th Edition. Elsevier, 64-82

Grimm, V., Ezaki, S., Susa, M., Knabbe, C., Schmid, R.D., Bachmann, T.T. (2004) Use of DNA microarrays for rapid genotyping of TEM β -lactamases that confer resistance. *J Clin Microbiol*, 42:3766-3774

Hammond, D.S., Schooneveldt, J.M., Nimo, G.R., Huygens, F., Giffard, P.M. (2005) *bla*SHV genes in *Klebsiella pneumoniae*: Different allele distributions are associated

with different promoters within individual isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(1):256-263

Hauser, A.R. (2013) 'Cell Envelop'. In *Antibiotics Basics for Clinicians. The ABCs of choosing the right antibacterial agent*. 2d Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 3-5

Hemarajata, P., Yang, S., Hindler, J.A., Humphries, R.M. (2015) Development of a Novel Real-Time PCR Assay with High-Resolution Melt Analysis To Detect and Differentiate OXA-48-Like β -Lactamases in carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*, 59:5574-5580

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

Ho, P.L., Lo, W.U., Yeung, M.K., Lin, C.H., Chow, K.H., Ang, I., Tong, A.H.Y., Bao, J.Y.J., Lok, S., Lo, J.Y.C. (2011) Complete Sequencing of pNDM-HK Encoding NDM-1 Carbapenemase from a Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Strain Isolated in Hong Kong. *Plos One*, 6(3):e17989

Holmes, A.H., Moore L.S.P., Sundsford, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., Guerin, P.J., Piddock, L.J.V. (2016) Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet*, 387:176-187

Homsey, M., Phee, L., Wareham, D.W. (2011) A novel variant, NDM-5, of the New Delhi metallo- β -lactamase in multidrug-resistant *Escherichia coli* ST648 isolate recovered from a patient in the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother*, 55:5952-5954

Hope, R., Potz, N.A., Warner, M., Fagan, E.J., Arnold, E., Livermore, D.M. (2007) Efficacy of practiced screening methods for detection of cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother*, 59(1):110-113

Hrabák, J., Chudáčková, E., Papagiannitsis, C.C. (2014) Detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(9):839-853

Hrabák, J., Chudáčková, E., Walkova R. (2013) Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry for Detection of Antibiotic Resistance Mechanisms: from Research to Routine Diagnosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(1):103-114

Huang, T.D., Berhin, C., Bogaerts, P., Glupczynski, Y. (2014) Evaluation of avibactam-supplemented combination disk tests for the detection of OXA-48 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 79:252-254

Huang, T.D., Poirel, L., Bogaerts, P., Berhin, C., Nordmann, P., Glupczynski, Y. (2014) Temocillin and piperacillin/tazobactam resistance by disk diffusion as antimicrobial surrogate markers for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in geographical areas with a high prevalence of OXA-48 producers. *J Antimicrob Chemother*, 69:445-450

Ingram, P.R., Inglis, T.J.J., Vanzetti, T.R., Henderson, B.A., Harnett, G.B., Murray, R.J. (2011) Comparison of methods for AmpC β -lactamase detection in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Medical Microbiology*, 60:715-721

Iovleva, A., Doi, Y. (2017) Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Clin Lab Med*, 37(2):303-315

Jacoby, G.A. (2009) AmpC β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1):161-182

Jacoby, G.A., Munoz-Price, L.S. (2005) The new β -lactamases. *N Engl J Med*, 352:380-391

Jeong, S.H., Song, W., Kim, J.S., Kim, H.S., Lee, K.M. (2009) Broth microdilution method to detect extended-spectrum beta-lactamases and AmpC beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* isolates by use of clavulanic acid and boronic acid as inhibitors. *J Clin Microbiol*, 47:3409-3412

Jeong, S., Kim, J.O., Jeong, S.H., Bae, I.K., Song, W. (2015) Evaluation of peptide nucleic acid-mediated multiplex real-time PCR kits for rapid detection of carbapenemase genes in gram-negative clinical isolates. *Journal of Microbiological Methods*, 113:4-9

- Jones, R.N, Biedenbach, D.J., Sader, H.S., Fritsche, T.R., Toleman, M.A., Walsh, T.R. (2005) Emerging epidemic of metallo-beta-lactamase-mediated resistances. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 51:77-84
- Jorgensen, J.H., Ferraro, M.J. (2009) Antimicrobial susceptibility testing: A review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*, 49:1749-1755
- Kamio, Y., Nikaido, H. (1976). Outer membrane of *Salmonella typhimurium*: Accessibility of phospholipid head groups to phospholipase c and cyanogen bromide activated dextran in the external medium. *Biochemistry*, 15: 2561–2570.
- Kaprou, G.D., Bergspica, I., Alexa, E.A., Ordonez-Alvarez, A., Prieto, M. (2021) Rapid methods for antimicrobial resistance diagnostics. *Antibiotics*, 10(209):1-30
- Knapp, C.W., Dolfing, J., Ehlert, P.A.I., Graham, D.W. (2010) Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environ Sci Technol*, 44(2): 580–587.
- 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.
- Konovalova, A., Kahne, D.E., Silhavy, T.J. (2017) Outer membrane biogenesis. *Annu Rev Microbiol*, 71: 539–556
- Kattan, J.N., Villegas, M.V., Quinn, J.P. (2008) New developments in carbapenems. *Clinical Microbiology and Infection*, 14:1102-1111
- Kaur, J., Mahajan, G., Chand, K., Chopra, S.S. (2016) Enhancing phenotypic detection of ESBL in AmpC co-producers by using cefepime and tazobactam. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 10(1):5-8
- Khari, F.I.M., Karunakaran, R., Rosli, R., Tay, S.T. (2016) Genotypic and Phenotypic detection of AmpC β -lactamases in *Enterobacter spp* isolated from a teaching hospital in Malaysia. *Plos One*, 11(3):e0150643
- Lasserre, C., Martin, L.D.S., Cuzon, G., Bogaerts, P., Lamar, E., Glupczynski, Y., Naas, T. (2015) Efficient Detection of Carbapenemase Activity in *Enterobacteriaceae*

by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Less Than 30 Minutes. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(7):2163-2171

Ledeboer, N.A., Lopansri, B.K., Dhiman, N., Cavagnolo, R., Carroll, K.C., Granato, P., Thomson, R., Butler-Wu, S.M., Berger, H., Samuel, L., Pancholi, P., Swyers, L., Hansen, G.T., Tran, N.K., Polage, C.R., Thomson, K.S., Hanson, N.D., Winegar, R., Buchan, B.W. (2015) Identification of Gram-Negative Bacteria and Genetic Resistance Determinants from Positive Blood Culture Broths by Use of the Verigene Gram-Negative Blood Culture Multiplex Microarray-Based Molecular Assay. *J Clin Microbiol*, 53(8):2460-2472

Lee, Y.L., Chen, H.M., Hii, I.M., Hsueh, P.R. (2022) Carbapenemase-producing Enterobacterales infections: recent advances in diagnosis and treatment. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 59:106528

Leinberger, D.M., Grimm, V., Rubtsova, M., Weile, J., Schroppel, K., Wichelhaus, T.A., Knabbe, C., Svhid, R.D., Bachmann, T.T. (2010) Intergrated detection of extended-spectrum- β -lactam resistance by DNA microarray-based genotyping of TEM, SHV, and CTX-M genes. *J Clin Microbiol*, 48:460-471

Leonard, D.A., Bonomo, R.A., Powers, R.A. (2013) Class D β -lactamases: A reappraisal after five decades. *Acc Chem Res*, 46:2407-2415

Li, X.Z., Nikaido, H. (2009) Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs*, 69:1555-1623

Liu, G., Thomsen, L.E., Olsen, G.E. (2022) Antimicrobial-induced of horizontal transfer of antimicrobial resistnce genes in bacteria: a mini review. *J Antimicrob Chemother*, 77:556-567

Livermore, D.M., Winstanley, T.G, Shannon, K.P. (2001) Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *J Antimicrob Chemother*, 48:87-102

Livermore, D.M. (1995) b-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiolody Reviews*, 8:557-584

- Livmore, D.M. (1998) β -lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. *J Antimicrob Chemother*, 41 (D):25-41
- Livmore, D.M., Sefton, A.M., Scott, G.M. (2003) Properties and potential of ertapenem. *J Antimicrob Chemother*, 52: 331-344
- Livmore, D.M. (2012) Current epidemiology and growing resistance of Gram-negative pathogens. *Korean J Intern Med*, 27:128-142
- Livmore, D.M., Warner, M., Mushtaq, S. (2007) Evaluation of the chromogenic Cica- β -test for detecting extended-spectrum, AmpC and metallo- β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60:1375-1379
- Lobanovska, M., Pilla, G. (2017) Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? *Yale Journal of Biology and Medicine*, 90:135-145
- 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.
- Lupo, A., Papp-Wallace, K.M., Sendi, P., Bonomo, R.A., Endimiani, A. (2013) Non-phenotypic tests to detect and characterize antibiotic resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 77(3):179-194
- Lutgring, J.D., Limbago, B.M. (2016) The problem of carbapenemase-Producing-Carbapenem-Resistant-*Enterobacteriaceae* Detection. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(3):529-534
- Maltezou, H.C., Giakkoupi, P., Maragos, A., Bolikas, M., Raftopoulos, V., Papahatzaki, H., Vrouhos, G., Liakou, V., Vatopoulos, A.C. (2009) Outbreak of infections due to KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Crete (Greece). *Journal of infection*, 58: 213-219
- Mammeri, H., Eb, F., Berkani, A., Nordmann, P. (2008) Molecular characterization of AmpC-producing *Escherichia coli* clinical isolates recovered in a French hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61:498-503
- Martinez-Martinez, L., Hernandez-Alles, S., Alberti, S., Tomas J., Benedi, V., Jacoby, G. (1996) In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with

increased resistance to cefoxitin and expanded spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 40:342-348

Masik, F.J., Nambiar, S. (2011) Review of Carbapenemases and AmpC-beta-Lactamases. *Pediatr Infect Dis J*, 30(12):1094-1095

Matuscheck, E., Brown, D.F.J., Kahlmeter, G. (2014) Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, 20:255-266

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

Maurer, F.P., Castelberg, C., Quiblier, C., Bloemberg, G.V., Hombach, M. (2015) Evaluation of carbapenemase screening and confirmation tests with *Enterobacteriaceae* and development of a practical diagnostic algorithm. *J Clin Microbiol*, 53:95-104

McManus, M.C. (1997) Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Am J Health-Syst Pharm*, 54:1420-1433

McMullen, A.R., Yarbrough, M.L., Wallace, M.A., Shupe, A., Burnham, C.A.D. (2017) Evaluation of Genotypic and Phenotypic Methods to Detect Carbapenemase Production in Gram-Negative Bacilli. *Clinical Chemistry*, 63(3):723-730

Meletis, G. (2016) Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 3(1): 15-21

Mendes, R.E., Kiyota, K.A., Monteiro, J., Castanheira, M., Andrade, S.S., Gales, A.C., Pignatari, A.C.C., Tufik, S. (2007) Rapid Detection and Identification of Metallo- β -Lactamase-Encoding Genes by Multiplex Real-Time PCR Assay and Melt Curve Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(2):544-547

Merdanovic, M., Clausen, T., Kaiser, M., Huber, P., Ehrmann, M. (2011) Protein Quality Control in the bacterial periplasm. *Annu Rev Microbiol*, 65:149–168

Miller, S.I, Salama, N.R. (2018) The gram-negative bacterial periplasm: SizeMatters. Plos Biology, 16(1): e2004935

Miriagou, V., Cornaglia, G., Edelstein, M., Galani, I., Giske, C.G., Gniadkowski, M., Malamou-Lada, E., Martinez-Martinez, L., Navarro, F.P., Nordmann, P., Peixe, L., Pournaras, S., Rossolini, G.M., Tsakris, A., Vatopoulos, A., Canton, R. (2010) Acquired carbapenemases in gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. Clin Microbiol Infect, 16:112-122

Miriagou, V., Tzouvelekis, L.S., Villa, L., Lebessi, E., Vatopoulos, A.C., Carattoli, A., Tzelepi, E. (2004) CMY-13, a novel inducible cephalosporinase encoded by an *Escherichia coli* plasmid. Antimicrob Agents Chemother, 48:3172-3174

Moland, E.S., Kim, S.Y., Hong, S.G., Thomson, K.S. (2008) Newer beta-lactamases: clinical and laboratory implications, part I. Clin Microbiol Newsl, 30:71-77

Monteiro, J., Widen, R.H., Pignatari, A.C.C., Kubasek, C., Silbert, S. (2012) Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. J Antimicrob Chemother, 67:906-909

Moore, N.M. (2022) 'Principles of antimicrobial action and resistance'. In Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. Ed, Tille, P.M. 15th Ed. Elsevier, 165-181

Morosini, M.I., García-Castillo, M., Tato, M., Gijón, D., Valverde, A., Ruiz-Garbajosa, P., Canton, R. (2014) Rapid detection of β -lactamase-hydrolyzing extended-spectrum cephalosporins in *Enterobacteriaceae* by use of the new chromogenic β Lacta test. J. Clin. Microbiol, 52:1741–1744.

Moss, R.B., McClelland, E., Williams, R.R., Hilman, B.C., Rubio, T., Adkinson, N.F. (1991) Evaluation of the immunologic cross-reactivity of aztreonam in patients with cystic fibrosis who are allergic to penicillin and/or cephalosporin antibiotics. Rev infect Dis, 13:598-607

Mroczkowska, J.E., Barlow, M. (2008) Fitness trade-offs in *bla*TEM evolution. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 52(7):2340-2345

- Mulvey, M.R., Bryce, E., Boyd, D.A., Agostini-Ofner, M., Land, A.M., Simor, A.E., Paton, S. (2005) Molecular characterization of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* from Canadian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*, 49:358-365
- Munier, G.K, Johnson, C.L., Snyder, J.W., Moland, E.S., Hanson, N.D., Thomson, K.S. (2010) Positive extended-spectrum-beta-lactamase (ESBL) screening results may be due to Amp^C beta-lactamases more often than to ESBLs. *J Clin Microbiol*, 48(2):673-674
- Munita, J.M., Arias, C.A. (2016) Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol Spectr*, 4(2):1-37
- M'Zali, F.H., Chanawong, A., Kerr, K.G., Birkenhead, D., Hawkey, P.M. (2000) Detection of extended-spectrum β -lactamases on the MAST DD test, the double disk and the Etest ESBL. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45:881-885
- Naas, T., Levy, M., Hirschauer, C., Marchandin, H., Nordmann P. (2005) Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-23 in a tertiary care hospital of Papeete, French Polynesia. *J Clin Microbiol*, 43:4826-4829
- Naas, T., Oxacaley, C., Nordmann, P. (2007) Identification of CTX-M-type extended-spectrum- β -lactamase genes using real-time PCR and pyrosequencing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(1):223-230
- Naas, T., Poirel, L., Nordmann, P. (2008) Minor extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect*, 14(1):42-52
- Naas, T., Cuzon, G., Bogaerts, P., Glupczynski, Y., Nordmann, P. (2011) Evaluation of a DNA Microarray (Check-MDR CT102) for Rapid Detection of TEM, SHV, and CTX-M Extended-Spectrum β -Lactamases and of KPC, OXA-48, VIM, IMP, and NDM-1 Carbapenemases. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(4):1608-1613
- Naas, T., Dortet, L., Iorga, B.I. (2016) Structural and functional aspects of class A carbapenemases. *Curr Drug Targets*, 17:1006-1028
- Nikaido, H. (2009) Multidrug Resistance in bacteria. *Annu Rev Biochem*, 78:119-146

- Nikaido, H. (1994) Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science*, 264:382-388
- Nikaido, H., Rosenberg, E.Y., Foulds, J. (1983) Porin channels in *Escherichia coli*: studies with beta-lactams in intact cells. *J Bacteriol*, 153:232-240.
- Nijhuis, R., van Zwet, A., Cohen Stuart, J., Weijers, T., Savelkoul, P. (2012) Rapid molecular detection of extended-spectrum β -lactamase gene variants with a novel ligation-mediated real-time PCR. *Journal of Medical Microbiology*, 61:1563-1567
- Noëll, A., Huang, T.D., Berhin, C., Hoebeke, M., Bouchahrouf, W., Yunus, S., Bogaerts, P., Glupczynski, Y. (2017) Comparative Evaluation of Four Phenotypic Tests for Detection of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(2):510-518
- Nordmann, P., Poirel, L. (2019) Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, 69(7):521-528
- Nordmann, P., Poirel, L. (2013) Strategies for identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother*, 68:487-489
- 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., Dortet, L. (2012) Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis*, 18(9):1503-1507
- Nordmann, P., Gniadkowski, M., Giske, C.G., Poirel, L., Woodford, N., Miriagou, V. (2012) Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clinical Microbiology and Infection*, 18:432-438
- Nordmann, P., Picazo, J.J., Mutters, R., Korten, V., Quinta, A., Laeuffer, J.M., Seak, J.C.H., Flamm, R.K., Morrissey, I. (2011) Comparative activity of carbapenem testing: the COMPACT study. *J Antimicrob Chemother*, 66:1070-1078
- Nguyen, N.Q., Krishnan, N.P., Rojas, L.J., Prati, F., Caselli, E., Romagnoli, C., Bonomo, R.A., Akker F.V.D. (2016) Crystal structures of KPC-2 and SHV-1 β -lactamases in complex with the boronic acid transition state analog S02030. *Antimicrob Agents Chemother*, 60:1760-1766

- Oliver, A., Weigel, L.M., Rasheed, J.K., McGowan Jr, J.E, Raney, P., Tenover, F.C. (2002) Mechanisms of decreased susceptibility to cefpodoxime in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 46:3829-3836
- Oteo, J., Perez-Vazquez, M., Campos, J. (2010) Extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli*: changing epidemiology and clinical impact. *Current opinion in infectious diseases*, 23:320-326
- Oxacaley, C., Ergani, A., Naas, T., Nordmann, P. (2009) Rapid detection of CTX-M-producing *Enterobacteriaceae* in urine samples. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64:986-989
- Page, M.I., Badarau, A. (2008) The mechanisms of catalysis by Metallo- β -lactamases. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2008:576297
- Palzkill, T. (2013) Metallo-b-lactamase structure and function. *Ann N Y Acad Sci*, 1277:91-104
- 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., Lucero, C., Rapoport, M., Albornoz, E., Gomez, S., Corso, A. (2015) Evaluation of the Blue-Carba test for rapid detection of carbapenemases in gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol*, 53(6):1996-1998
- Paterson, D.L. (2006) Resistance in Gram-Negative Bacteria: *Enterobacteriaceae*. *The American Journal of Medicine*, 119(6A):20-28
- Paterson, D.L., Bonomo, R.A. (2005) Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4):657-686
- Partridge, S.R., Tsafnat, G., Coiera, E., Iredell, J.R. (2008) Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev*, 33:757-784

Patel, R. (2016) New developments in clinical bacteriology laboratories. *Mayo Clin Proc*, 91(10):1448-1459

Perez-Perez, F.J., Hanson, N.D. (2002) Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, 40:2153-2162

Philippon, A., Arlet, G., Jacoby, G.A. (2002) Plasmid determined AmpC-type β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(1):1-11

Pires, J., Novais, Â., Peixe, L. (2013) Blue-Carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(12):4281-4283

Pitout, J.D.D., Le, P.G., Moore, K.L., Church, D.L., Gregson, D.B. (2009) Detection of AmpC β -lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Salmonella spp* and *Proteus mirabilis* in a regional clinical microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(2): 165-170

Pitout, J.D., Hossain, A., Hanson, N.D. (2004) Phenotypic and molecular detection of CTX-M- β -lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella spp*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(12):5715-5721

Platteel, T.N., Stuart Cohen, J.W., de Neeling, A.J., Voets, G.M., Scharringa, J., Van de Sande, N., Fluit, A.C., Bonten, M.J.M., van Hall-Leverstein, M.A., on behalf of the ESBL national surveillance working group. (2013) Multi-centre evaluation of a phenotypic extended spectrum β -lactamase detection guideline in the routine setting. *Clin Microbiol Infect*, 19(1):70-76

Platteel, T.N., Stuart, J.W., Voets, G.M., Scharringa, J., van de Sande, N., Fluit, A.C., Leverstein-Van Hall, M.A. (2011) Evaluation of a commercial microarray as a confirmation test for the presence of extended-spectrum β -lactamases in isolates from the routine clinical setting. *Clin Microbiol Infect*, 17:1435-1438

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.

Poirel, L., Walsh, T.R., Cuvillier, V., Nordmann, P. (2011) Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 70:119-123

Polsfuss, S., Bloemberg, G.V., Giger, J., Meyer, V., Bottger, E.C., Hombach, M. (2012) Evaluation of a diagnostic flow chart for detection and confirmation of extended-spectrum β -lactamases (ESBL) in *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect*, 18:1194-1204

Poole, K. (2007) Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Annals of medicine* 39(3):162-176

Postek, W., Pacocha, N., Garstecki, P. (2022) Microfluidics for antibiotic susceptibility testing. *Royal Society of Chemistry*, 22(19):3637-3662

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., Poulou, A., Tsakris, A. (2010) Inhibitor-based methods for the detection of KPC carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in clinical practice by using boronic acid compounds. *J Antimicrob Chemother*, 65:1319-1321

Procop, G.W., Church, D.L., Hall, G.S., Janda, W.M., Koneman, E.W., Schreckenberger, P.C., Woods, G.L. (2017) 'The *Enterobacteriaceae*'. In *Konemman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 7th Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 214-302

Queenan, A.M., Bush, K. (2007) Carbapenemases: the Versatile β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(3):440-458

Quintiliani, R., French, M., Nightingale, C.H. (1982) First and Second Generation Cephalosporins. *Medical Clinics of North America*, 66 :183- 197

- Rabaan, A.A., Eljaaly, K., Alhumaid, S., Albayat, H., Al-Adsani, W., Sabour, A.A., Alshiekheid, M.A., Al-Jishi, J.M., Khamis, F., Alwarthan, S., Alhajri, M., Alfaraj, A.H., Tombuloglu, H., Garout, M., Alabdullah, D.M., Mohammed, E.A.E., Al Yami, F.S., Almuhtaresh, H.A., Livias, K.A., Al Mutair, A., Almushrif, S.A., Abusalah, M.A.H.A., Ahmed, N. (2022) An overview on phenotypic and genotypic characterization of carbapenem-resistant Enterobacterales. *Medicina*, 58:1675
- Raetz, C.R., Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*, 71: 635-700
- Rasmussen-Walther, J., Hoibi, N. (2007) Class A Carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60:470-482
- Richmond, M.H., Sykes, R.B. (1973) The β -lactamases of gram negative bacteria and their possible physiological roles. *Adv Microb Physiol*, 9:31-88
- Ruiz, N., Montero, T., Hernandez-Borrell, J., Vinas, M. (2003) The role of *Serratia marcescens* porins in antibiotic resistance. *Microb Drug Resist*, 9:257-264
- Ruppe, E., Woerther, P.L., Barbier, F. (2015) Mechanisms of antimicrobial resistance in gram negative bacilli. *Ann Intensive Care*, 5:21
- Sackmann, E.K., Fulton, A.L., Beebe, D.J. (2014) The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature*, 507(7491):181-189
- Salabi, A.El., Walsh, T.R., Chouchani, C. (2013) Extended spectrum β -lactamases, carbapenemases and mobile genetic elements responsible for antibiotics resistance in Gram-negative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(2):113-122
- Samaha-Kfoury, J.M., Araj, G.F. (2003) Recent developments in β -lactamases and extended spectrum β -lactamases. *BMJ*, 327:1209-1213
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J.A., Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev*, 32:234-258
- Scholar, E.M., Pratt, W.B. (2000) The inhibitors of cell wall synthesis, I. In *The Antimicrobial Drugs*. Scholar, E.M., Pratt, W.B. 2d Ed. Oxford University Press. 51-80

Sekyere, J.O., Govinden, U., Essack, S.Y. (2015) Review of established and innovative detection methods for carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 119:1219-1233

Shahid, M., Sobia, F., Singh, A., Malik, A., Khan, H.M., Jonas, D., Hawkey, P.M. (2009) Beta-lactams and Beta-lactamase-inhibitors in current- or potential-clinical practice: A comprehensive update. *Critical Reviews in Microbiology*, 35(2):81-108

Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi S.M.D., Kamal, M.A. (2015) Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22:90-101

Sibley, C.D., Peirano, G., Church, D.L. (2012) Molecular methods for pathogen microbial community detection and characterization: current and potential application in diagnostic microbiology. *Infect Genet Evol*, 12:505-521

Siguié, P., Gagnevin, L., Chandler, M. (2009) The new IS1595 family, its relation to IS1 and the frontier between insertion sequences and transposons. *Res Microbiol*, 160:232-241

Silhavy, T.J., Kahne, D., Walker, S. (2010) *The Bacterial Cell Envelope*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2(5):a000414

Snitkin, E.S., Zelanzy, A.M., Thomas, P.J., Stock, F. (2012) Tracking a hospital outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with whole-genome sequencing. *Sci Transl Med*, 4(148):148ra

Sonawane, V.C. (2006) Enzymatic Modifications of Cephalosporins by Cephalosporin Acylase and Other Enzymes. *Critical Reviews in Biotechnology*, 26: 95-120

Southern, T. (2022) 'Enterobacterales'. In Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. Ed, Tille, P.M. 15th Ed. Elsevier, 335-361

Spratt, B.G. (1983) Penicillin-binding proteins and the future of β -lactam antibiotics. *J Gen Microbiol*, 129:1247-1260

Srisrattakarn, A., Lulitanond, A., Wilailuckana, C., Charoensri, N., Wonglakorn, L., Saenjamlam, P., Chaimanee, P., Daduang, J., Chanawong, A. (2017) Rapid and simple

identification of carbapenemase genes, *bla*NDM, *bla*OXA-48, *bla*VIM, *bla*IMP-14 and *bla*KPC groups, in Gram-negative bacilli by in-house loop-mediated isothermal amplification with hydroxynaphthol blue dye. *World J Microbiol Biotechnol*, 33:130

Stoesser, N., Batty, E.M., Eyre, D.W., Morgan, M., Wyllie, D.H., Del Ojo Elias, C., Johnsons, J.R., Walker, A.S., Peto, T.E.A., Crook, D.W. (2013) Predicting antimicrobial susceptibilities for *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates using whole genomic sequence data. *J Antimicrob Chemother*, 68:2234-2244

Stuart, J.C., Leverstein-Van Hall, M.A. (2010) Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36:205-210

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

Su, M., Satola, S.W., Read, T.D. (2019) Genome-based prediction of bacterial antibiotic resistance. *J Clin Microbiol*, 57(3):e01405-18

Sudgen, R., Kelly, R., Davies, S. (2016) Combatting antimicrobial resistance globally. *Nat Microbiol*, 1(10):16187

Sullivan, K.V., Deburger, B., Roundtree, S.S., Ventrola, C.A., Blecker-Shelly, D.L., Mortensen, J.E. (2014) Pediatric Multicenter Evaluation of the Verigene Gram-Negative Blood Culture Test for Rapid Detection of Inpatient Bacteremia Involving Gram-Negative Organisms, Extended-Spectrum Beta-Lactamases, and Carbapenemases. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(7):2416-2421

Syvanen, M. (2012) Evolutionary implications of horizontal gene transfer. *Ann Rev Genet*, 46:341-358.

Takayama, Y., Adachi, Y., Nihonyanagi, S., Okamoto, R. (2015) Modified Hodge test using Mueller-Hinton agar supplemented with cloxacillin improves screening for carbapenemase-producing clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *J Med Microbiol*, 64:774-777

Tamma, P.D., Simner, P.J. (2018) Phenotypic detection of Carbapenemase-Producing Organisms from Clinical Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(11): e01140-18

Tamma, P.D., Rodriguez-Bano, J. (2017) The Use of Noncarbapenem β -Lactams for the Treatment of Extended-Spectrum β -Lactamase Infections. *Clinical Infectious Diseases*, 64(7):972-980

Tan, Q., Qiu, J., Luo, X., Zhang, T., Liu, Y., Chen, Y., Yan, J., Liao, W. (2018) Progress in One-pot Bioconversion of Cephalosporin C to 7-Aminocephalosporanic Acid. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 19(1):30-42

Tan, T.Y., Ng, L.S.Y., He, J., Koh, T.H., Hsu, L.Y. (2009) Evaluation of screening methods to detect plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(1):146-149

Tato, M., Ruiz-Garbajosa, P., Traczewski M., Dodgson, A., McEwan, A., Humphries, R., Hindler, J., Veltman, J., Wang, H., Cantón, R. (2016) Multisite evaluation of Cepheid Xpert Carba-R assay for detection of carbapenemase-producing organisms in rectal swabs. *J Clin Microbiol*, 54:1814 -1819

Teethaisong, Y., Hobbs, G., Nakouti, I., Evans, K., Eumkeb, G. (2018) A nitrocefin disk supplemented with ertapenem for rapid screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 91:85-88

Tenover, F.C. (2006) Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine*, 119(6 Suppl 1):S3-10

Thomson, K.S. (2010) Extended-spectrum-beta-lactamase, AmpC and Carbapenemase Issues. *Journal of Clinical Microbiology* 48(4):1019-1025

Thomson, J.M., Bonomo, R.A. (2005) The threat of antibiotic resistance in gram negative pathogenic bacteria: β -lactams in peril! *Current Opinion in Microbiology*, 8:518-524

Thomson, K.S. (2001) Controversies about extended-spectrum and AmpC beta-lactamases. *Emerging Infectious Diseases*, 7(2):2001

Tille, P.M. (2022) Bacterial Genetics, Metabolism and Structure. In Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 15th Edition. Elsevier, 6-21

Tooke, C.L., Hinchliffe, P., Bragginton, E.C., Colenso, C.K., Hivonen, V.H.A., Takebayashi, Y., Spencer, J. (2019) β -Lactamases and β -Lactamase inhibitors in the 21st century. *Journal of molecular Biology*, 431(18):3472-3500

Tsakris, A., Poulou, A., Bogaerts, P., Dimitroula, E., Pournaras, S., Glupczynski, Y. (2015) Evaluation of a New Phenotypic OXA-48 Disk Test for Differentiation of OXA-48 Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* Clinical Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(4):1245-1251

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- β -lactamases and class A KPC carbapenemases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother*, 65(8):1664-1671

Tzelepi, E., Giakkoupi, P., Sofianou, D., Loukova, V., Kemeroglou, A., Tsakris, A. (2000) Detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J Clin Microbiol*, 38:542-546

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

Tzouvelekis, L.S., Tzelepi, E., Tassios, P.T., Legakis, N.J. (2000) CTX-M type beta-lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *Int J Antimicrob Agents* 14:137-143

Van der Zee, A., Roorda, L., Bosman, G., Fluit A.C., Hermans, M., Smits, P.H.M., van der Zanden, A.G.M., Witt, R.T., Bruijnesteijn van Coppenraet, L.E.S., Stuart, J.C., Ossewaarde, J.M. (2014) Multi-centre evaluation of real-time multiplex PCR for detection of carbapenemase genes OXA-48, VIM, IMP, NDM and KPC. *BMC Infect Dis*, 14:27

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):e0123690

- Vasala, A., Hytonen, V.P., Laitinen, O.H. (2020) Modern tools for rapid diagnostics of antimicrobial resistance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10:308
- Vercauteren, E., Descheemaeker, P., Ieven, M., Sanders, C.C., Goossens, H. (1997) Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum beta-lactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella spp* in a Belgian teaching hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, 35:2191-2197
- Verschuuren, T.D., van Hout, D., Arredondo-Alonso, S., Fluit, A.C., Reuland, E.A., Top, J., Schürch, A.C., Bosch, T., Bonten, M.J.M., Kluytmans, J. A. J.W., Willems, R. J. L. (2021) Comparative genomics of ESBL-producing *Escherichia coli* (ESBL-Ec) reveals a similar distribution of the 10 most prevalent ESBL-Ec clones and ESBL genes among human community faecal and extra-intestinal infection isolates in the Netherlands (2014-17). *J Antimicrob Chemother*, 76:901-908
- Voets, G.M., Fluit, A.C., Scharringa, J., Cohen Stuart, J., Leverstein-van Hall, M.A. (2011) A set of multiplex PCRs for genotypic detection of extended-spectrum β -lactamases, carbapenemases, plasmid-mediated AmpC β -lactamases and OXA β -lactamases. *International Journal of Antimicrobial agents*, 37:356-359
- Vrioni, G., Daniil, I., Voulgari, E., Ranellou, K., Koumaki, V., Ghirardi, S., Kimouli, M., Zambardi, G., Tsakris, A. (2012) Comparative evaluation of a prototype chromogenic medium (ChromID CARBA) for detecting carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in surveillance rectal swabs. *J Clin Microbiol*, 50(6):1841-1846
- Wagner, A., Lewis, C., Bichsel, M. (2007) A survey of bacterial insertion sequences using IScan. *Nucleic Acids Res*, 35:5284-5293
- Wallace-Papp, K.M., Endimiani, A., Taracila, M.A., Bonomo, R.A. (2011) Carbapenems: Past, Present, Future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55 (11):4943-4960
- Walsh, T.R., Toleman, M.A., Poirel, L., Nordmann, P. (2005) Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev*, 18:306-325
- Watanabe, T. (1963) Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriol Rev* 27:87-115

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.

Willems, E., Verhaegen, J., Magerman, K., Nys, S., Cartuyvels, R. (2013) Towards a phenotypic screening strategy for emerging β -lactamases in Gram-negative bacilli. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 41:99-109

Wilson, H., Torok, M.E. (2018) Extended spectrum β -lactamase-producing and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Microbial Genomics*, 4:1-14

Wintermans, B.B., Reuland, E.A., Wintermans, R.G.F., Bergmans, A.M.C., Kluytmans, J.A.J.W. (2013) The cost-effectiveness of ESBL detection: towards molecular detection methods? *Clin Microbiol Infect*, 19:662-665

Woodford, N., Tierno, P.M., Young, J.K., Tysall, L., Palepou, M.-F.I., Ward, E., Painter, R.E., Suber, D.F., Shungu, D., Silver, L.L., Inglima, K., Kornblum, J., Livermore, D.M. (2004) Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A lactamase, KPC-3, in a New York medical center. *Antimicrob Agents Chemother*, 48:4793–4799

Woodford, N., Fagan, E.J., Ellington, M.J. (2006) Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. *J Antimicrob Chemother*, 57:154-155

Wright, A.J., Wilkowske, C.J. (1987) The penicillins. *Mayo Clinic Proceedings*, 62 (9):806-820

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 β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*, 43:2551-2558

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

Yigit, H., Queenan, A.M., Rasheed, K., Biddle, J.W., Domenech-Sanchez, A., Alberti, S., Bush, K., Tenover, F.C. (2003) Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2. *Antimicrob Agents Chemother*, 47:3881-3889

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

Yong, D., Park, R., Yum, J.H., Lee, K., Choi, E.C., Chong, Y. (2002) Further modification of the Hodge test to screen AmpC β -lactamase (CMY-1)-producing strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Microbiological Methods*, 51:407-410

Zervosen, A., Sauvage, E., Frere, J.M., Charlier, P., Luxen, A. (2012) Development of new drugs for an old target- The penicillin binding proteins. *Molecules*, 17:12478-12505

Zhang, L., Foxman, B. (2003) Molecular epidemiology of *Escherichia coli* urinary tract infections. *Frontiers in Bioscience*, 8:235-244

Zhu, L.X., Zhang, Z.W., Liang, D., Jiang, D., Wang, C., Du, N., Zhang, Q., Mitchelson, K., Cheng, J. (2007) Multiplex asymmetric PCR-based oligonucleotide microarray for detection of drug resistance genes containing single mutations in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(10):3707-3713

Ελληνική βιβλιογραφία

Γιαμαρέλλου, Ε., και συν. (2009) Λοιμώξεις και Αντιμικροβιακή Χημειοθεραπεία. Π.Χ Πασχαλίδης ΕΠΕ, 3-51

Ιστοσελίδες

European Centre for Disease Control and Prevention. Antimicrobial Consumption in the EU/EEA (ESAC-Net). Annual Epidemiological Report for 2020.

Ανακτήθηκε από:

<https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/ESAC-Net%20AER-2020-Antimicrobial-consumption-in-the-EU-EEA.pdf>

European Centre for Disease Control and Prevention. Most frequently isolated microorganisms in HAIs (2011-2012).

Ανακτήθηκε από:

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

European Centre for Disease Control and Prevention. Trend of the consumption of Third-generation cephalosporins (ATC group J01DD) in the community and hospital sector in Greece from 1997 to 2020.

Ανακτήθηκε από:

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

European Centre for Disease Control and Prevention. Trend of the consumption of Carbapenems (ATC group J01DH) in the community and hospital sector in Greece from 1997 to 2020.

Ανακτήθηκε από:

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

European Centre for Disease Control and Prevention. Trend of the consumption of Antibacterials for systemic use (ATC group J01) in the community and hospital sector in Greece from 1997 to 2020.

Ανακτήθηκε από:

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

European Centre for Disease Control and Prevention. Consumption of Antibacterials for systemic use (ATC group J01) in the community (primary care sector) in Europe, reporting year 2020.

Ανακτήθηκε από:

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

European Centre for Disease Control and Prevention. Surveillance Atlas of Infectious Diseases.

Ανακτήθηκε από:

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

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Guidance on the 2019 modifications of susceptibility categories S, I and R categories.

Ανακτήθηκε από :

<https://www.eucast.org/eucastguidancedocuments>

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST reading guide for broth microdilution. EUCAST (2019), version 1.0.

Ανακτήθηκε από:

http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2019_manuals/Reading_guide_BMD_v_1.0_2019.pdf

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 από:

http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf