



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΑΠΟ ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ
ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΙΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΕΣ, ΛΟΓΩ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
Β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΩΝ ΤΑΞΗΣ Α**

ΜΥΑΡΗ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ

ΙΑΤΡΟΣ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2025



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΑΠΟ ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ
ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΙΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΕΣ, ΛΟΓΩ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
Β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΩΝ ΤΑΞΗΣ Α**

ΜΥΑΡΗ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ

ΙΑΤΡΟΣ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2025

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

Ημερομηνία αίτησης της κ. Μύαρη Αλεξάνδρας: 18-12-2013

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. αριθμ. 759α/14-02-2014

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα:

Λεβειδιώτου-Στεφάνου Σταματίνα, Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα, Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Βρυώνη Αικατερίνη, Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του ΕΚΠΑ

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 07-05-2014

«Μελέτη των λοιμώξεων από εντεροβακτηριακά ανθεκτικά στις καρβαπενέμες»

Ανασυγκρότηση Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. αριθμ. 771α/28-11-2014

Επιβλέπουσα:

Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα, Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Λεβειδιώτου-Στεφάνου Σταματίνα, Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Βρυώνη Αικατερίνη, Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του ΕΚΠΑ

Τροποποίηση τίτλου θέματος: Γ.Σ. αριθμ. 771α/28-11-2014

«Μελέτη των λοιμώξεων από Εντεροβακτηριακά ανθεκτικά στις καρβαπενέμες λόγω παραγωγής β-λακταμασών τάξης Α»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 1147α/13-05-2025

1. Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Βρυώνη Γεωργία, Καθηγήτρια Ιατρικής Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του ΕΚΠΑ
3. Λεβειδιώτου Σταματίνα, Ομότιμη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Καψάλη Ελένη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Αιματολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Κουλούρα Βασίλειο, Καθηγητή Εντατικής Θεραπείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Τσιάρα Σταυρούλα, Καθηγήτρια Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Μποζίδης Πέτρο, Επίκουρο Καθηγητή Ιατρικής Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 4-6-2025

Ιωάννινα 4-6-2025

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Σπυρίδων Κοντισιώτης

Καθηγητής Νευρολογίας



*Αφιερωμένο στους γονείς μου,
το στήριγμά μου και*

*στα παιδιά μου, την πηγή
έμπνευσής μου*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Με την ανακάλυψη της πενικιλίνης από τον Φλέμινγκ σηματοδοτήθηκε η εποχή των αντιβιοτικών, η οποία έφερε την επανάσταση στη μάχη έναντι των μικροβιακών λοιμώξεων που αποτελούσαν μάλιστα για την ανθρωπότητα. Σύντομα όμως, η μεγάλη προσαρμοστικότητα των μικροβίων στο εχθρικό γι' αυτά περιβάλλον οδήγησε στο φαινόμενο της αντοχής, το οποίο αποτελεί πλέον μια σταδιακά αυξανόμενη απειλή για την υγεία και τη ζωή του σύγχρονου ανθρώπου. Η μελέτη και κατανόηση των μηχανισμών αντοχής των μικροβίων στα αντιβιοτικά καθώς και η συνεχής επιτήρηση της παρουσίας των ανθεκτικών μικροβίων στις υγειονομικές μονάδες αποτέλεσαν τα πρώτα βήματα στην αντιμετώπιση της σύγχρονης αυτής απειλής. Επιπρόσθετα σε αυτά, οργανισμοί όπως το CDC (Centers for Disease and Prevention) και ο ΠΟΥ (Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας) κατάρτισαν κατευθυντήριες οδηγίες για τα μέτρα πρόληψης και αντιμετώπισης της διασποράς των ανθεκτικών βακτηρίων εντός των υγειονομικών μονάδων.

Από τα αντιβιοτικά β-λακτάμης, οι καρβαπενέμες αποτέλεσαν αντιβιοτικά τελευταίας εκλογής για τη θεραπεία των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων. Όμως, η υπέρμετρη χρήση τους οδήγησε στην ανάπτυξη αντοχής δυσχεραίνοντας ακόμα περισσότερο την αποτελεσματική αντιμετώπιση αυτών των λοιμώξεων. Τα Εντεροβακτηριακά στελέχη ανθεκτικά στις καρβαπενέμες παρουσιάζουν ολοένα αυξανόμενη επίπτωση και διασπορά σε παγκόσμιο επίπεδο. Είναι υπεύθυνα για μια πληθώρα λοιμώξεων, οι οποίες σε αρκετές περιπτώσεις είναι σοβαρές και οδηγούν σε παρατεταμένη νοσηλεία και αυξημένη θνητότητα. Ιδιαίτερα στη χώρα μας, καθώς και σε άλλες χώρες της Μεσογείου και των Βαλκανίων, τα Εντεροβακτηριακά στελέχη παρουσιάζουν αυξημένα ποσοστά ανθεκτικότητας στις καρβαπενέμες.

Μέσα σε αυτό το πλαίσιο, σκοπός αυτής της διατριβής ήταν η μελέτη των λοιμώξεων από Εντεροβακτηριακά στελέχη που παράγουν καρβαπενεμάσες που ανήκουν στην τάξη A. Δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στην απομόνωση των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες Εντεροβακτηριακών στελεχών από κλινικά δείγματα ασθενών που νοσηλεύτηκαν στο ΠΓΝΙ στο χρονικό διάστημα της μελέτης και στον φαινοτυπικό και γονοτυπικό χαρακτηρισμό τους σε συνδυασμό με τη μελέτη των κλινικών

χαρακτηριστικών των ασθενών που έφεραν αυτά τα στελέχη όπως τα δημογραφικά στοιχεία, το ατομικό αναμνηστικό, την κλινική εισαγωγή, το χρόνο νοσηλείας, το ιστορικό διακίνησης σε άλλες κλινικές νοσηλείας του ΠΓΝΙ καθώς και την τελική έκβαση τους. Από την παρούσα διατριβή αναδεικνύεται η μεγάλη ετερογένεια όσον αφορά τα γονίδια αντοχής έναντι των αντιβιοτικών β-λακτάμης σε Εντεροβακτηριακά στελέχη που απομονώνονται εντός ενός υγειονομικού σχηματισμού και στη συγκεκριμένη περίπτωση του ΠΓΝΙ, η υψηλή νοσηρότητα και θνητότητα που προκαλούν οι λοιμώξεις από αυτά τα στελέχη καθώς και η επιτακτική ανάγκη εφαρμογής μέτρων πρόληψης και περιορισμού της διασποράς τους εντός των χώρων των φορέων παροχής υγείας.

Τελειώνοντας θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες και τη βαθιά ευγνωμοσύνη μου προς όλους όσους συνέβαλλαν στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής. Η βοήθειά τους υπήρξε πολύτιμη και ανεκτίμητη. Και πρώτη απ' όλους θα ήθελα ιδιαιτέρως να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της παρούσας διατριβής, κα Κωνσταντίνα Γκαρτζονίκα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Ιατρικού τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση αυτού του θέματος, την καθοδήγηση και την αμέριστη συμπαράσταση και υπομονή της καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της μακράς πορείας εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής καθώς και για τις επισημάνσεις της κατά τη διαδικασία συγγραφής της διατριβής. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Σταματίνα Λεβειδιώτου-Στεφάνου, Ομότιμη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Ιατρικού τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και την κα Γεωργία Βρυώνη, Καθηγήτρια Ιατρικής Μικροβιολογίας του Ιατρικού τμήματος του ΕΚΠΑ για τη συνεισφορά τους ως μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής αυτής της διατριβής. Ευχαριστώ θερμά τον κ. Πέτρο Μποζίδη, Επίκουρο Καθηγητή Μικροβιολογίας του Ιατρικού τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και μέλος της επταμελούς επιτροπής, για την πολύτιμη επιστημονική συμβολή του στο πειραματικό κομμάτι του διαχωρισμού των δύο αλληλίων του KPC. Ευχαριστώ επίσης και τους κα Ελένη Καψάλη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Αιματολογίας του Ιατρικού τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Βασίλειο Κουλούρα, Καθηγητή Εντατικής Θεραπείας του Ιατρικού τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και την κα Σταυρούλα Τσιάρα, Καθηγήτρια

Παθολογίας του Ιατρικού τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων που δέχτηκαν με χαρά να αποτελέσουν μέλη της επταμελούς επιτροπής. Από τις ευχαριστίες δεν θα μπορούσα να παραλείψω την κα Ευθαλία Πριάβαλη, Διευθύντρια ΕΣΥ και υπεύθυνη του τμήματος καλλιεργειών στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του ΠΓΝΙ, για την πολύτιμη συμβολή της στο κομμάτι των φαινοτυπικών δοκιμασιών και της ερμηνείας των τεστ ευαισθησίας των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες Εντεροβακτηριακών έναντι στα συνήθη αντιβιοτικά. Τέλος, θέλω να εκφράσω την απέραντη ευγνωμοσύνη σε όλους αυτούς που με στήριξαν, με παρότρυναν και με ενθάρρυναν καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	4
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1. Γενικά.....	8
1.2. Αντιβιοτικά β-λακτάμης	11
1.2.1 Μηχανισμός δράσης.....	11
1.2.2. Πενικιλλίνες	13
1.2.3. Κεφαλοσπορίνες	14
1.2.4. Καρβαπενέμες	15
1.2.5. Μονομπακτάμες.....	17
1.3. Μηχανισμοί αντοχής των βακτηρίων στα αντιβιοτικά	17
1.3.1. Απόκτηση γονιδίων αντοχής-Μεταβίβαση αντοχής.....	17
1.3.2. Μηχανισμοί αντοχής των Εντεροβακτηριοειδών στα β-λακταμικά αντιβιοτικά	18
1.3.2.1. β-λακταμάσες	19
1.3.2.2. Μειωμένη διαπερατότητα κυτταροπλασματικής μεμβράνης	30
1.3.2.3. Ενεργότητα αντλίας εκροής.....	31
1.3.2.4. Τροποποίηση στόχου δράσης του αντιβιοτικού.....	32
1.4. Επιδημιολογία των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες εντεροβακτηριακών στελεχών στην Ελλάδα.....	33
1.5. Ανίχνευση των εντεροβακτηριοειδών στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες στο εργαστήριο.....	37
1.5.1. Διαλογή των στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες	37
1.5.2. Φαινοτυπικές δοκιμασίες ανίχνευσης καρβαπενεμασών	40
1.5.2.1. Μέθοδοι που βασίζονται στη χρήση αναστολέα	40
1.5.2.1.1. Μέθοδος συνδυασμού δίσκων (CDT)	41
1.5.2.1.2. Ταινίες βαθμιδωτής διάχυσης	43
1.5.2.2. Μέθοδοι που βασίζονται στην υδρόλυση/απενεργοποίηση καρβαπενέμης	45
1.5.2.2.1. Τροποποιημένο Hodge τεστ (Modified Hodge Test, MHT)	45
1.5.2.2.2. Χρωματομετρικές (βιοχημικές) μέθοδοι	46
1.5.2.2.3. Μέθοδος αναστολής καρβαπενέμης (Carbapenem Inhibition Method, CIM)	47

1.5.2.2.4. Μέθοδος αμύλου-ιωδίου	48
1.5.2.2.5. Φασματοφωτομετρικές μέθοδοι.....	48
1.5.2.2.5.1. Φασματοφωτομετρία υπεριώδους (UV)	48
1.5.2.2.5.2. Φασματομετρία μάζας	49
1.5.2.2.6. Ηλεκτροχημική μέθοδος.....	49
1.5.2.3. Ανοσοχρωματογραφικές μέθοδοι.....	50
1.5.3. Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης των καρβαπενεμασών	51
1.5.3.1. Μέθοδοι που βασίζονται στην PCR	52
1.5.3.2. Τεχνικές που βασίζονται στην υβριδοποίηση (microarrays)	57
1.5.3.3. Προσδιορισμός της αλληλουχίας ολόκληρου του γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing, WGS)	58
1.6. Λοιμώξεις από εντεροβακτηριακά	59
1.6.1. Γενικά χαρακτηριστικά των εντεροβακτηριακών.....	59
1.6.2. Ανθεκτικότητα των εντεροβακτηριακών στα αντιβιοτικά	60
1.6.2.1. Γενικά.....	60
1.6.3. Λοιμώξεις από εντεροβακτηριακά ανθεκτικά στις καρβαπενέμες (Carbapenem Resistant <i>Enterobacteriaceae</i> : CRE)	62
1.6.3.1. Παράγοντες που επιδρούν στον αποικισμό από CRE.....	62
1.6.3.2. Από τον αποικισμό με CRE στη λοίμωξη.....	64
1.6.3.3. Κλινικά χαρακτηριστικά των λοιμώξεων από CRE	65
1.6.3.4. Μέτρα ελέγχου και πρόληψης των λοιμώξεων από CRE	67
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	75
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	76
3.1. Βακτηριακά στελέχη.....	76
3.2. Αρχική απομόνωση, ταυτοποίηση και έλεγχος ευαισθησίας	77
3.3. Φαινοτυπικός έλεγχος και τυποποίηση	77
3.3.1. Έλεγχος για παρουσία καρβαπενεμασών	77
3.3.2. Τυποποίηση των καρβαπενεμασών τάξης A	78
3.4. Μοριακές τεχνικές.....	79
3.4.1. Εκχύλιση βακτηριακού DNA.....	79
3.4.2. Ενίσχυση των γονιδίων β-λακταμασών με PCR.....	79
3.4.3. Ηλεκτροφόρηση προϊόντος πολλαπλασιασμού.....	82

3.4.4. Διάκριση μεταξύ των δύο αλληλίων KPC-2 και KPC-9	82
3.4.5. Μοριακή τυποποίηση με Multi Locus Sequence Typing (MLST)	83
3.4.6. Δημογραφικά-Επιδημιολογικά δεδομένα ασθενών	86
3.4.7. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων	86
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	88
4.1. Κλινικά δείγματα	88
4.2. Κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών	91
4.3. Ευαισθησία στα αντιβιοτικά	94
4.4. Έκβαση των ασθενών με αποικισμό/λοίμωξη με στέλεχος KPC	96
4.5. Φαινοτυπικές και μοριακές δοκιμασίες	97
4.6. Παραλλαγές των στελεχών KPC-Διάκριση των αλληλίων KPC-2 και KPC-9...	102
4.6.1. Επιδημιολογικά δεδομένα της ενδονοσοκομειακής διασποράς του αλληλίου KPC-9	102
4.6.2. Συγκριτικά αποτελέσματα ευαισθησίας στα αντιμικροβιακά φάρμακα των στελεχών KPC-2 και KPC-9	110
4.6.3. Συχνότητα εμφάνισης των γονιδίων ESBP στα στελέχη KPC-2 και KPC-9 ...	119
4.6.4. Αποτελέσματα τυποποίησης MLST	120
4.6.5. Σύγκριση των στελεχών KPC-2 και KPC-9 αναφορικά με την έκβαση των ασθενών	122
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	124
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	135
7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	137
8. ABSTRACT	139
9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	141

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Γενικά

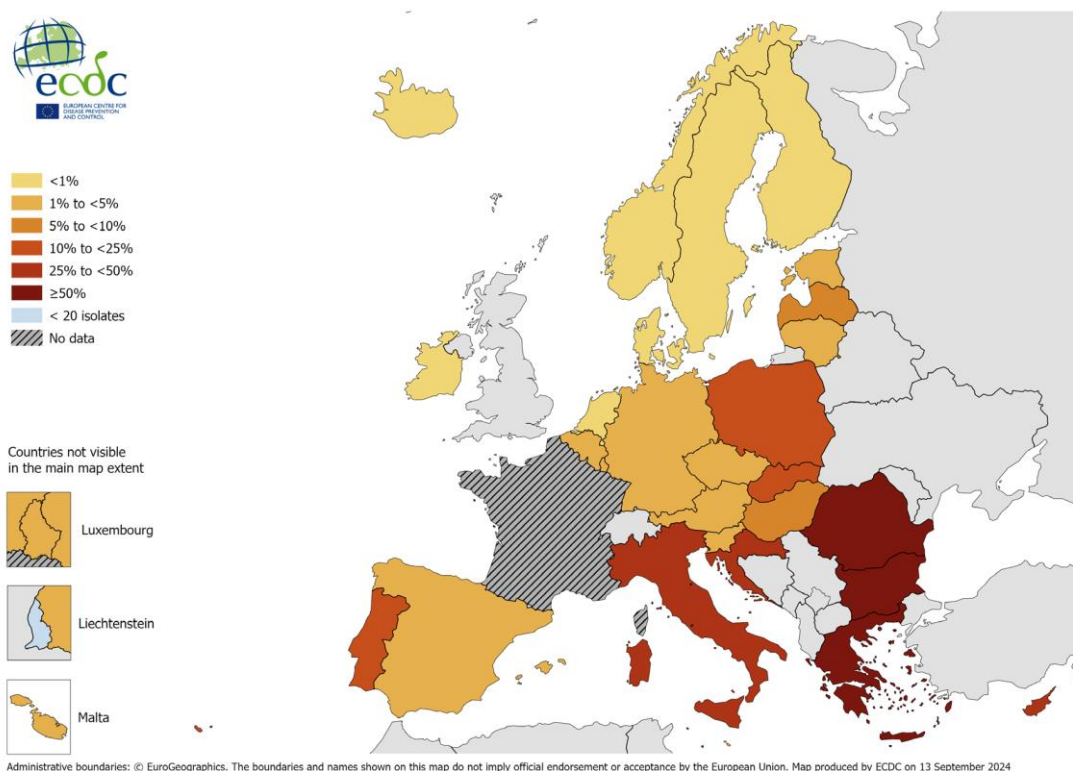
Μετά από πολλές δεκαετίες χρήσης των αντιβιοτικών με επιτυχία στη θεραπεία των λοιμώξεων, οι βακτηριακές λοιμώξεις αποτελούν ξανά σημαντική απειλή. Η εμφάνιση αντοχής σε όλα σχεδόν τα αντιμικροβιακά που έχουν παραχθεί μέχρι σήμερα σηματοδοτεί την εμφάνιση μιας νέας εποχής, η οποία είναι πλέον γνωστή ως εποχή κρίσης αντοχής στα αντιβιοτικά [1,2]. Σε αυτό συνέβαλαν η κατάχρηση και η λανθασμένη χρήση των αντιβιοτικών, η εκτεταμένη χρήση τους στη γεωργία καθώς και η ανεπαρκής έως παντελής ανάπτυξη νέων φαρμάκων από τις φαρμακοβιομηχανίες, λόγω των μειωμένων οικονομικών κινήτρων και των επίπονων διαδικασιών που απαιτούνται [2].

Οι λοιμώξεις από βακτήρια ανθεκτικά στα αντιβιοτικά επιδεινώνουν οικονομικά τα ήδη επιβαρυμένα συστήματα υγείας λόγω της χρήσης ακριβότερων θεραπειών, παρατετινόμενων νοσηλείων, περισσότερων ιατρικών επισκέψεων, μεγαλύτερων χρονικών διαστημάτων ανάρρωσης και αυξημένης πιθανότητας αναπηρίας [3]. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι στην Ευρωπαϊκή Ένωση και τον Ευρωπαϊκό Οικονομικό Χώρο, η αντιμικροβιακή αντοχή κοστίζει περίπου 11,7 δισεκατομμύρια ευρώ κάθε χρόνο με τη θεραπεία των πολυανθεκτικών βακτηρίων να οδηγεί σε αυξημένο κόστος υγειονομικής περίθαλψης [4]. Σύμφωνα με διάφορες μελέτες, εκτιμάται ότι το επιπλέον κόστος από την επιβάρυνση των συστημάτων υγείας που προκαλείται από τα πολυανθεκτικά μικρόβια είναι πιθανό να φτάσει περίπου τα 300 δις έως 1 τρισεκατομμύριο δολάρια ετησίως για την παγκόσμια οικονομία, ενώ το παγκόσμιο ακαθάριστο εγχώριο προϊόν μπορεί να ελαττωθεί κατά 1% ετησίως με την ελάττωση αυτή να φτάνει το 5-7% στις αναπτυσσόμενες χώρες ως το 2050 [5-6].

Η αυξανόμενη αντοχή στα αντιβιοτικά από διάφορα είδη βακτηρίων, που προκαλούν τόσο ενδονοσοκομειακές όσο και λοιμώξεις της κοινότητας, ευθύνεται για την παρατετινόμενη νοσηλεία, την αποτυχία της θεραπείας και τα υψηλά ποσοστά θνησιμότητας και θνητότητας. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), η αντιμικροβιακή αντοχή ευθύνεται άμεσα για 133.000 θανάτους και συνδέεται έμμεσα με 541.000 θανάτους ετησίως στον Ευρωπαϊκό χώρο [4]. Ένα από τα

σημαντικότερα αίτια είναι η ταχέως αναπτυσσόμενη αντοχή στα αντιβιοτικά β-λακτάμης από τα Gram αρνητικά βακτήρια. Τα κλασικά αντιβιοτικά β-λακτάμης περιλαμβάνουν τις πενικιλίνες, τις κεφαλοσπορίνες (α', β', γ' και δ' γενεάς), τις καρβαπενέμες και τις μονομπακτάμες και αποτελούν θεραπεία πρώτης εκλογής για λοιμώξεις που προκαλούνται από μέλη της τάξης των Εντεροβακτηριακών (*Enterobacteriales*). Στην τάξη αυτή ανήκει η οικογένεια των Εντεροβακτηριοειδών (*Enterobacteriaceae*) που απομονώνονται συχνότερα ως αίτια λοιμώξεων, για τα οποία στη συνέχεια θα υπάρχει πιο εκτενής αναφορά. Ο συνηθέστερος μηχανισμός αντοχής στα β-λακταμικά αντιβιοτικά όσον αφορά τα εντεροβακτηριακά στελέχη είναι η παραγωγή β-λακταμασών, ενζύμων που υδρολύουν τον β-λακταμικό δακτύλιο [7]. Η αντοχή στις καρβαπενέμες, αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται ως έσχατη θεραπευτική επιλογή για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων, αυξάνεται όλο και περισσότερο και παρατηρείται όλο και πιο συχνά.

Στην Ευρώπη, όπως αναφέρει η έκθεση του EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network) για τις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης/Ευρωζώνης (EE/EZ) για το 2023, τα υψηλότερα ποσοστά αντοχής της *Klebsiella pneumoniae* στις καρβαπενέμες παρατηρήθηκαν στη Νότια και Ανατολική Ευρώπη (Σχήμα 1.1) [8]. Επιπλέον, δεδομένου ότι η αύξηση της επίπτωσης των διεισδυτικών λοιμώξεων από στελέχη *K.pneumoniae* ανθεκτικά στις καρβαπενέμες από το 2019 ως το 2023, προσεγγίζει περίπου το 57,5%, η Ευρωπαϊκή Ένωση (EE) φαίνεται να απομακρύνεται όλο και περισσότερο από το στόχο της για ελάττωση της επίπτωσης αυτής κατά 5% ως το 2030. Χαρακτηριστικά, το 2023 στην Ελλάδα περίπου το 70% των στελεχών *K.pneumoniae* υπεύθυνων για διεισδυτικές λοιμώξεις εμφάνισε ανθεκτικότητα στις καρβαπενέμες με συνολική αύξηση της επίπτωσης των διεισδυτικών λοιμώξεων από ανθεκτικά στελέχη κατά περίπου 64% σε σύγκριση με το 2019 [9].



Σχήμα 1.1. Ποσοστό διεισδυτικών λοιμώξεων από στελέχη *K. pneumoniae* ανθεκτικών στις καρβαπενέμες (ιμιπενέμη/μεροπενέμη), ανά χώρα της ΕΕ/ΕΖ για το 2023 [8].

Πριν μια δεκαετία οι αναφορές για εντεροβακτηριακά στελέχη που παράγουν καρβαπενεμάσες (Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae, CRE) ήταν σποραδικές, σήμερα υπάρχουν εκτενείς αναφορές, ενδεικτικό της εξάπλωσής τους παγκοσμίως [10]. Οι κύριες παράμετροι που προσδιορίζουν την επιδημιολογία των στελεχών CRE είναι τρεις. Πρώτη παράμετρος είναι η κύρια δεξαμενή (reservoir) που σχετίζεται με την εμφάνιση ενός τύπου ενζύμου σε μια συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή όπου υφίστανται ευνοϊκές συνθήκες, όπως πυκνοκατοικημένες περιοχές, συνθήκες πτωχής υγιεινής και πίεσης επιλογής ανθεκτικών στελεχών μέσω της αλόγιστης και λανθασμένης χρήσης των αντιβιοτικών. Η δεύτερη παράμετρος σχετίζεται με τις ιδιότητες των γονιδίων των καρβαπενεμασών και την ικανότητά τους για οριζόντια μεταφορά μέσω κινητών γενετικών στοιχείων, όπως τρανσποζόνια, ιντεγκρόνια και πλασμίδια, τόσο μεταξύ στελεχών του ίδιου είδους, αλλά και μεταξύ διαφορετικών ειδών. Τέλος, η τρίτη παράμετρος αφορά τη μετακίνηση των πληθυσμών όταν ήδη υπάρχει μια κύρια δεξαμενή [10].

Τα τελευταία χρόνια γίνεται εντατική προσπάθεια για την ανάπτυξη στρατηγικών ελέγχου και περιορισμού της διασποράς των στελεχών CRE στις νοσοκομειακές μονάδες. Το 2012, το ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) ξεκίνησε ένα πρόγραμμα επιτήρησης γνωστό ως EuSCAPE (European survey of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*) με σκοπό τη μελέτη της επιδημιολογίας των CRE και την επίγνωση σχετικά με την εξάπλωση τους στην Ευρώπη [11]. Έχουν δοθεί διάφορες κατευθυντήριες οδηγίες για τον έλεγχο των CRE με σημαντικότερες αυτές του ECDC [12], του US CDC (US Centers for Disease Control and Infection) [13] και του ESCMID (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) [14]. Αυτό που διαφαίνεται είναι ότι η ανίχνευση, η διάγνωση και η επιβεβαίωση της παρουσίας των καρβαπενεμασών είναι σημαντική για την επιτήρηση, τον έλεγχο και τη θεραπεία των λοιμώξεων. Ιδανικά, η ταχεία ανίχνευση των καρβαπενεμασών στη μονάδα περίθαλψης θα εξασφάλιζε και την ταχεία εφαρμογή μέτρων για τον περιορισμό της εξάπλωσης του υπεύθυνου ανθεκτικού βακτηριακού στελέχους.

1.2. Αντιβιοτικά β-λακτάμης

Τα αντιβιοτικά β-λακτάμης περιλαμβάνουν τις πενικιλίνες, τις κεφαλοσπορίνες, τις καρβαπενέμες και τις μονομπακτάμες. Κοινό χαρακτηριστικό αυτών των αντιβιοτικών αποτελεί ο δακτύλιος β-λακτάμης, ο οποίος είναι απαραίτητος για την αντιβακτηριακή τους δράση.

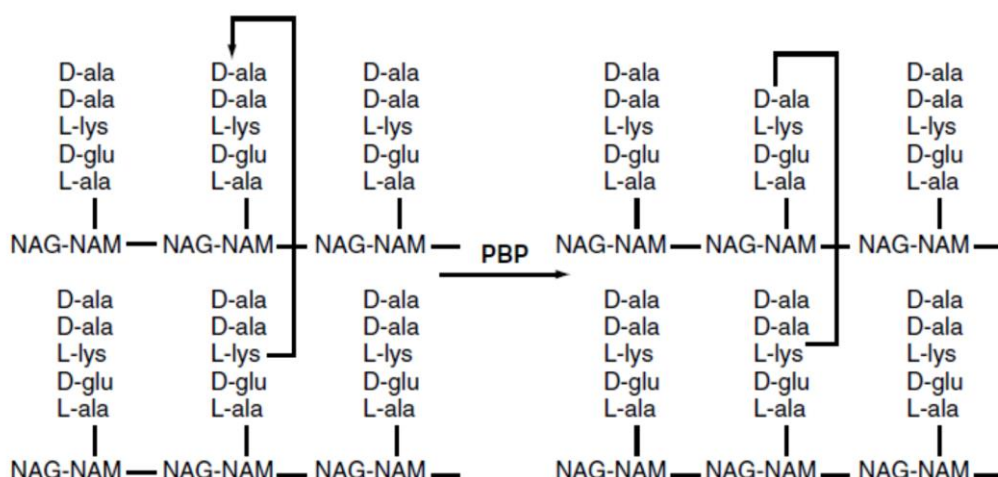
1.2.1 Μηχανισμός δράσης

Η αντιβακτηριδιακή δράση της πενικιλίνης, όπως και όλων των αντιβιοτικών β-λακτάμης, οφείλεται στην αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων.

Γενικότερα, το κυτταρικό τοίχωμα τόσο των θετικών όσο και των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων αποτελείται από πεπτιδογλυκάνη που τα προστατεύει από την ωσμωτική λύση. Το κυτταρικό τοίχωμα των θετικών κατά Gram βακτηρίων είναι ένα

στρώμα σημαντικού πάχους αποτελούμενο από 50-100 μόρια πεπτιδογλυκάνης, ενώ στα Gram αρνητικά βακτήρια αποτελείται από 1-2 μόρια. Στα Gram αρνητικά υπάρχει επιπλέον και μια εξωτερική λιποπολυσακχαριδική μεμβράνη. Το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων σχηματίζεται με μια σειρά βημάτων στην οποία εμπλέκονται τουλάχιστον 30 ένζυμα. Η βασική υπομονάδα της πεπτιδογλυκάνης αποτελείται από το δισακχαρίτη N-ακετυλο-γλυκοζαμίνη (NAG) και το N-ακετυλομουραμικό (NAM) πενταπεπτίδιο (Σχήμα 1.2).

Η πενικιλίνη για παράδειγμα, αναστέλλει τα ένζυμα που καταλύουν το τελικό στάδιο στη συναρμολόγηση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος, που είναι ο σχηματισμός χιαστών δεσμών (cross-links) που γεφυρώνουν τις μονάδες της πεπτιδογλυκάνης συμβάλλοντας στη δομική ακεραιότητά της [7].



Σχήμα 1.2. Δράση τρανσπεπτιδάσης των πενικιλο-δεσμευτικών πρωτεϊνών (PBPs). NAG: N-ακετυλογλυκοζαμίνη, NAM: N-ακετυλο-μουραμικό [7].

Πιο συγκεκριμένα, η πεπτιδογλυκάνη αποτελείται από μακριές αλυσίδες από NAG και NAM πενταπεπτίδια. Το πενταπεπτίδιο αποτελείται από αμινοξέα που εναλλάσσονται μεταξύ των L- και D-στερεοϊσομερών καταλήγοντας στο άκρο σε D-αλανυλ-D-αλανίνη (Σχήμα 1.2). Στο τρίτο αμινοξύ του πενταπεπτιδίου συνδέεται ένα μεγαλύτερο πεπτίδιο, το οποίο γεφυρώνει διαφορετικές πολυσακχαριδικές αλυσίδες. Το μεγαλύτερο αυτό πεπτίδιο στη συνέχεια συνδέεται με την

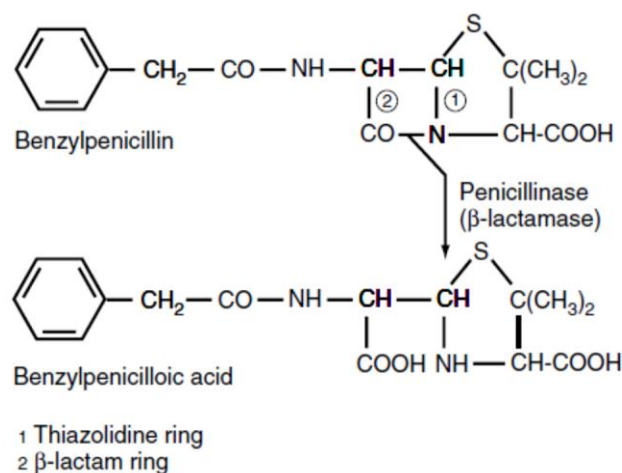
προτελευταία D-αλανίνη ενός άλλου πενταπεπτιδίου, μια αντίδραση που καταλύεται από μια τρανσπεπτιδάση. Η αντίδραση αυτή είναι ευαίσθητη σε αναστολή από την πενικιλίνη. Οι αντιδράσεις αυτές που είναι ευαίσθητες στην πενικιλίνη καταλύονται από μια οικογένεια πρωτεϊνών, τις πενικιλίνο-δεσμευτικές πρωτεΐνες (Penicillin-binding proteins, PBPs) [15]. Τα βακτήρια παράγουν τέσσερα είδη PBPs, τα οποία είναι δομικά όμοια και πιθανόν προέρχονται από τις πρωτεάσες σερίνης. Οι PBPs αναστέλλονται από τα β-λακταμικά αντιβιοτικά όταν αυτά συνδέονται μη αντιστρεπτά στο ενεργό κέντρο σερίνης, λόγω ομοιότητας του β-λακταμικού δακτύλιου με την D-αλανυλ-D-αλανίνη [16]. Τα αντιβιοτικά β-λακτάμης αναστέλλουν ταυτόχρονα πολλές PBPs, ενώ παράλληλα ενεργοποιούνται μεμβρανικοί αυτολυτικοί μηχανισμοί του κυττάρου. Οι PBPs αποτελούν περίπου το 1% των μεμβρανικών πρωτεϊνών και διαφέρουν στην ικανότητα δέσμευσης των β-λακταμικών αντιβιοτικών, γεγονός που εξηγεί γιατί τα αντιβιοτικά β-λακτάμης διαφέρουν ως προς τις αντιβακτηριακές τους ιδιότητες και το φάσμα δράσης τους [7].

1.2.2. Πενικιλίνες

Η βασική δομική μονάδα των πενικιλινών αποτελείται από ένα θειαζολιδινικό δακτύλιο, το β-λακταμικό δακτύλιο και μια πλευρική αλυσίδα (Σχήμα 1.3). Η πλευρική αλυσίδα καθορίζει κυρίως το αντιβακτηριδιακό φάσμα και τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες της συγκεκριμένης πενικιλίνης. Η εμφάνιση μικροοργανισμών που παράγουν β-λακταμάσες, όπως ο *Staphylococcus aureus*, οδήγησε στην έρευνα για ανάπτυξη ενώσεων ανθεκτικών στην υδρόλυση από τις β-λακταμάσες και πιο δραστικών από την πενικιλίνη G έναντι των θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Έτσι, μετά την απομόνωση της βασικής δομικής μονάδας της πενικιλίνης, 6-αμινο-πενικιλανικό οξύ, ακολούθησε η ανάπτυξη πολυάριθμων ημισυνθετικών πενικιλινών με διαφορετικές αντιμικροβιακές και φαρμακοκινητικές ιδιότητες [7].

Οι πενικιλίνες ανάλογα με την αντιβακτηριδιακή τους δράση ταξινομούνται σε πέντε κατηγορίες που αλληλεπικαλύπτονται μεταξύ τους: 1) φυσικές πενικιλίνες (πενικιλίνη G και πενικιλίνη), 2) πενικιλίνες ανθεκτικές στις πενικιλινάσες

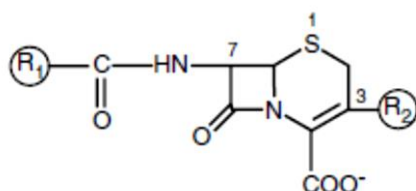
(μεθικιλίνη, ναφκιλίνη και ισοξαζουλ-πενικιλίνες), 3) αμινοπενικιλίνες (αμπικιλίνη και αμοξικιλίνη), 4) καρβοξυπενικιλίνες (καρμπενικιλίνη και τικαρκιλίνη) και 5) ακυλ-ουρεΐδοπενικιλίνες (αζλοκιλίνη, μεζλοκιλίνη και πιπερακιλίνη). Οι καρβοξυπενικιλίνες και οι ουρεΐδοπενικιλίνες αναφέρονται επίσης ως αντιψευδομοναδικές πενικιλίνες [7].



Σχήμα 1.3. Δομή της πενικιλίνης και θέση δράσης των β -λακταμασών [7].

1.2.3. Κεφαλοσπορίνες

Οι περισσότερες κεφαλοσπορίνες είναι ημισυνθετικά παράγωγα της κεφαλοσπορίνης C. Το βασικό δομικό στοιχείο τους είναι ο πυρήνας 7-αμινοκεφαλοσπορανικού οξέος που αποτελείται από ένα β -λακταμικό δακτύλιο συνδεδεμένο με ένα εξαμελή διυδροθειαζινικό δακτύλιο (Σχήμα 1.4) [7].



Σχήμα 1.4. Ο βασικός δομικός πυρήνας των κεφαλοσπορινών [7].

Διαφορετικές υποκαταστάσεις στις θέσεις C1, C3 και C7 του βασικού πυρήνα οδήγησαν στις γνωστές κεφαλοσπορίνες που χρησιμοποιούνται σήμερα. Η εισαγωγή μιας ακυλομάδας στη θέση C7 και η αντικατάσταση στη συνέχεια ενός υδρογόνου από τη μεθοξυ-ομάδα οδήγησε στη δημιουργία της ομάδας των κεφαμυκινών, που περιλαμβάνει την κεφοξιτίνη, την κεφμεταζόλη και την κεφοτετάνη. Η υποκατάσταση αυτή είχε ως αποτέλεσμα να ενισχυθεί η αντοχή στις β-λακταμάσες που παράγονται από τα αερόβια και αναερόβια Gram αρνητικά βακτήρια [17]. Ωστόσο, οι ενώσεις αυτές έχουν μικρότερη τάση δέσμευσης για τις PBP των Gram θετικών βακτηρίων [7].

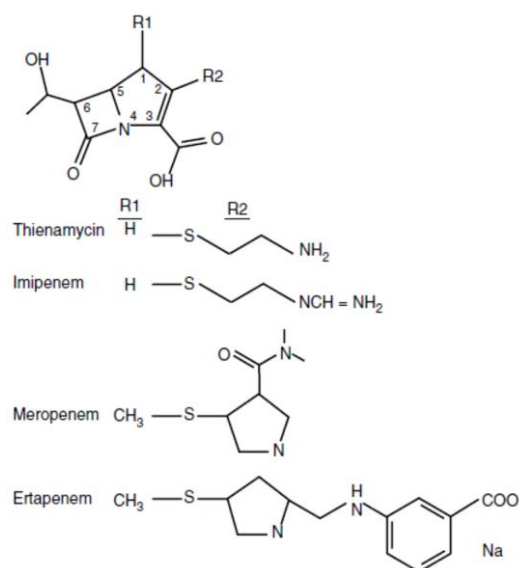
Οι κεφαλοσπορίνες ταξινομούνται σε πέντε κατηγορίες βάσει κυρίως του φάσματος της αντιμικροβιακής τους δράσης. Οι κεφαλοσπορίνες α' γενεάς δρουν κυρίως έναντι των Gram θετικών βακτηρίων. Η β' γενεά έχει αυξημένη δραστηριότητα έναντι των Gram αρνητικών βακτηρίων αλλά διατηρεί σε διάφορους βαθμούς τη δραστηριότητα έναντι των Gram θετικών κόκκων. Οι κεφαμυκίνες κατατάσσονται στη β' γενεά. Οι κεφαλοσπορίνες γ' γενεάς έχουν εξαιρετική δραστηριότητα έναντι των Gram αρνητικών, ωστόσο για κάποιες ενώσεις αυτής της ομάδας, η δράση κατά των Gram θετικών κόκκων είναι ελαττωμένη. Η τέταρτη γενεά έχει το ευρύτερο αντιμικροβιακό φάσμα και από τις πέντε κατηγορίες. Η τρίτη και η τέταρτη γενεά μαζί αποτελούν τις κεφαλοσπορίνες εκτεταμένου φάσματος (extended spectrum). Η πέμπτη ομάδα αναφέρεται ως οι κεφαλοσπορίνες που είναι δραστικές κατά του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη χρυσίζοντα σταφυλόκοκκου (Methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA) και προς στιγμή περιλαμβάνει την κεφταρολίνη και την κεφτομπιρόλη. Επιπλέον, η δράση τους έναντι των Gram αρνητικών είναι παρόμοια με των κεφαλοσπορινών γ' γενεάς [7].

1.2.4. Καρβαπενέμες

Οι καρβαπενέμες είναι αντιβιοτικά β-λακτάμης με αποδεδειγμένη αποτελεσματικότητα έναντι σοβαρών λοιμώξεων που προκαλούνται από βακτήρια που παράγουν εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (Extended-spectrum β-lactamases, ESBLs) [18]. Από τις καρβαπενέμες, η ιμιπενέμη, η μεροπενέμη, η ντοριπενέμη, η ερταπενέμη, η πανιπενέμη και η διαπενέμη χρησιμοποιούνται

παγκοσμίως ως αποτέλεσμα της αυξανόμενης ανθεκτικότητας στις κεφαλοσπορίνες από τα μικρόβια της οικογένειας των *Enterobacteriaceae* [19]. Έχουν ευρύ φάσμα δράσης, το μεγαλύτερο από όλες τις β-λακτάμες, και δρουν έναντι Gram θετικών, Gram αρνητικών και αναερόβιων βακτηρίων [20]. Αυτό οφείλεται κυρίως στη μεγάλη σταθερότητά τους έναντι στη δράση των β-λακταμασών [7].

Ο πυρήνας της καρβαπενέμης διαφέρει από τον αντίστοιχο των πενικιλινών στην αντικατάσταση του θείου από μια μεθυλενομάδα και την παρουσία ενός διπλού δεσμού στον πενταμελή δακτύλιο (Σχήμα 1.5). Επίσης, οι πενικιλίνες και οι κεφαλοσπορίνες περιέχουν μια ακυλαμινομάδα που συνδέεται σε θέση *cis* στο β-δακτύλιο, ενώ οι καρβαπενέμες έχουν υδροξυαιθυλομάδα σε *trans* διαμόρφωση στη θέση C-6 [7]. Σε αυτή την *trans* διαμόρφωση οφείλεται η εξαιρετική σταθερότητά τους έναντι των β-λακταμασών. Επιπλέον, οι καρβαπενέμες διαπερνούν την εξωτερική μεμβράνη των Gram αρνητικών βακτηρίων μέσω της μεμβρανικής πρωτεΐνης OprD, σε αντίθεση με τις κεφαλοσπορίνες και τις πενικιλίνες που χρησιμοποιούν τις OmpC και OmpF [21]. Αυτή η ιδιότητά τους, σε συνδυασμό με τη σταθερότητά τους έναντι των β-λακταμασών έχει ως αποτέλεσμα να έχουν ευρύ αντιβακτηριακό φάσμα, αλλά και να μην παρουσιάζουν διασταυρούμενη αντοχή με τα υπόλοιπα β-λακταμικά αντιβιοτικά [7].



Σχήμα 1.5. Ο κύριος πυρήνας δομής και οι αντίστοιχες υποκαταστάσεις των καρβαπενεμών [7].

1.2.5. Μονομπακτάμες

Οι μονομπακτάμες είναι δραστικές μόνο έναντι των αερόβιων Gram αρνητικών βακτηρίων [22]. Η αζτρεονάμη είναι η μόνη μονομπακτάμη σε κλινική χρήση. Χρησιμοποιείται κυρίως για τη θεραπεία λοιμώξεων από αερόβια Gram αρνητικά βακτήρια σε ασθενείς με αλλεργία στην πενικιλίνη ή άλλες β-λακτάμες [7].

1.3. Μηχανισμοί αντοχής των βακτηρίων στα αντιβιοτικά

1.3.1. Απόκτηση γονιδίων αντοχής-Μεταβίβαση αντοχής

Η γενετική ποικιλομορφία αποτελεί ένα απαραίτητο στοιχείο για την εξέλιξη των μικροβίων. Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες ασκούν πιέσεις στους βακτηριακούς πληθυσμούς ευνοώντας την επιβίωση των μικροοργανισμών που έχουν την ικανότητα αντοχής σε αυτούς. Οι μεταβολές στο γονιδίωμα των μικροβίων μπορούν να πραγματοποιηθούν μέσω διαφόρων μηχανισμών.

Ένας μηχανισμός είναι οι σημειακές μεταλλάξεις σε ένα νουκλεοτιδικό ζεύγος. Οι μεταλλάξεις αυτές μπορούν να μεταβάλλουν την ειδικότητα ενός ενζύμου ως προς ένα υπόστρωμα ή το στόχο ενός αντιμικροβιακού παράγοντα, παρεμποδίζοντας τη δράση του. Για παράδειγμα, σημειακές μεταλλάξεις σε κρίσιμα τμήματα γονιδίων των “παλαιών” β-λακταμασών (π.χ. TEM-1, SHV-1) ευθύνονται για την εμφάνιση των νεότερων εκτεταμένου φάσματος β-λακταμασών (ESBL) [23].

Ένας δεύτερος μηχανισμός συνίσταται στον ανασυνδυασμό μεγάλων τμημάτων DNA. Τέτοιοι ανασυνδυασμοί περιλαμβάνουν την αναστροφή, την αντιγραφή, την απαλοιφή, την εισαγωγή και τη μετάθεση μεγάλων τμημάτων του DNA από μια θέση του βακτηριακού χρωμοσώματος ή πλασμιδίου σε μια άλλη θέση. Αυτές οι αναδιατάξεις ολόκληρων τμημάτων του βακτηριακού γονιδιώματος προκαλούνται συχνά από ειδικά μεταθετά γενετικά στοιχεία που ονομάζονται ιντεγκρόνια, τρανσποζόνια ή αλληλουχίες εισαγωγής τα οποία έχουν την ικανότητα να παρεμβάλλονται, να ανασυνδυάζονται και να μετατίθενται ανεξάρτητα από το υπόλοιπο βακτηριακό γονιδίωμα [24].

Ένας τρίτος μηχανισμός σχετίζεται με την απόκτηση “ξένου” DNA το οποίο μεταφέρεται μέσω πλασμιδίων, βακτηριοφάγων, “γυμνών” αλληλουχιών DNA ή μεταθετών γενετικών στοιχείων από άλλα βακτήρια (οριζόντια μετάδοση). Οι μηχανισμοί αυτοί παρέχουν στα βακτήρια τη δυνατότητα να αναπτύσσουν αντοχή σε οποιοδήποτε αντιμικροβιακό παράγοντα. Κατ’ αυτό τον τρόπο, όταν δημιουργηθεί ένα γονίδιο αντοχής στα αντιβιοτικά, μπορεί να διαδοθεί μεταξύ των βακτηρίων μέσω της μεταμόρφωσης, της μεταγωγής, της βακτηριακής σύζευξης και της μετάθεσης γενετικών στοιχείων [23].

Από την άλλη, γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά φαίνεται να υπήρχαν πριν από τη χρήση των αντιβιοτικών στη θεραπεία των λοιμώξεων και πιθανόν προέρχονταν από βακτήρια που παρήγαγαν αντιβιοτικά [23]. Έτσι, υπάρχουν στελέχη πολλών ειδών βακτηρίων που χρησιμοποιούν αντιβιοτικά ως κύρια πηγή άνθρακα. Τα βακτήρια αυτά παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα αντοχής σε πολλές κατηγορίες αντιβιοτικών. Τέτοιου είδους βακτηριακά στελέχη φαίνεται να αποτελούν πηγή νέων γονιδίων αντοχής για τα παθογόνα για τον άνθρωπο βακτήρια [25]. Η πίεση επιλογής που ασκείται στους μικροβιακούς πληθυσμούς από τα αντιβιοτικά ευνοεί την επικράτηση των στελεχών που έχουν την ικανότητα να ανθίστανται στα αντιβιοτικά. Αυτοί οι ανθεκτικοί πληθυσμοί πολλαπλασιάζονται και διασπείρουν τα γονίδια αντοχής κάθετα στις επόμενες γενεές και οριζόντια σε ευαίσθητα στελέχη του ίδιου είδους ή και άλλων ειδών. Παρόλο που κάποια γονίδια αντοχής αποτελούν μεταβολικό “φόρτο” για τα βακτήρια, πολλοί μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει στρατηγικές ώστε να ελαττώνουν το κόστος καταστέλλοντας την έκφραση των γονιδίων όταν αυτή δεν είναι απαραίτητη και ενεργοποιώντας την όταν εκτίθενται στα αντιβιοτικά [26].

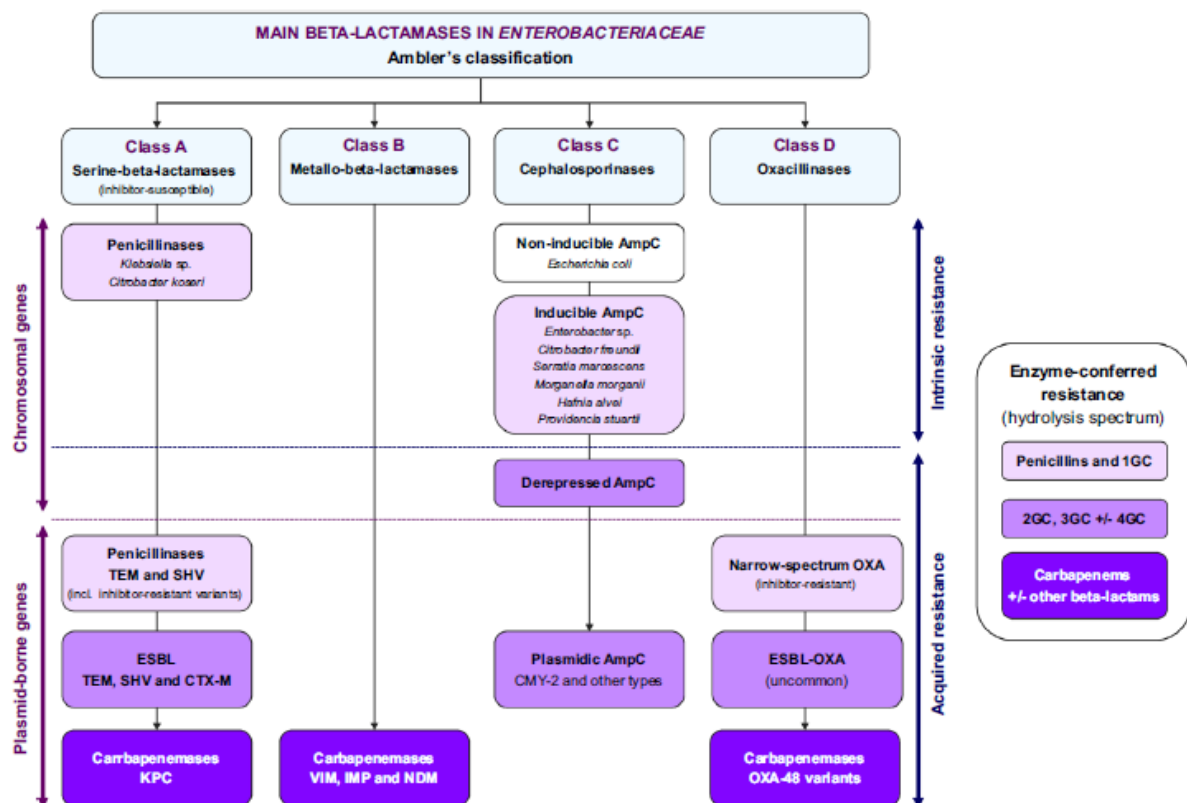
1.3.2. Μηχανισμοί αντοχής των Εντεροβακτηριοειδών στα β-λακταμικά αντιβιοτικά

Τέσσερις είναι οι κύριοι μηχανισμοί αντοχής των εντεροβακτηριοειδών στα αντιβιοτικά β-λακτάμης. Αυτοί περιλαμβάνουν την παραγωγή β-λακταμασών, τη μειωμένη διαπερατότητα μεμβράνης, την αντλία εκροής και την τροποποίηση στόχου

δράσης του αντιβιοτικού. Οι μηχανισμοί αυτοί μπορούν να συνδυαστούν και να συνυπάρχουν σε ίδια ή διαφορετικά στελέχη που απομονώνονται από τον ίδιο ασθενή. Ο σημαντικότερος και συχνότερος μηχανισμός είναι η παραγωγή β-λακταμασών [7].

1.3.2.1. β-λακταμάσες

Οι β-λακταμάσες είναι ένζυμα τα οποία αδρανοποιούν τα αντιβιοτικά β-λακτάμης διασπώντας τον αμιδικό δεσμό του β-λακταμικού δακτυλίου. Κωδικοποιούνται είτε σε χρωμοσωμικά γονίδια ή σε μεταθετά γονίδια που βρίσκονται σε πλασμίδια και τρανσποζόνια (Σχήμα 1.6) [27]. Επιπλέον, τα γονίδια των β-λακταμασών (*bla*) συχνά βρίσκονται σε ιντεγκρόνια, τα οποία μεταφέρουν ταυτόχρονα παράγοντες ανθεκτικότητας σε πολλά διαφορετικά αντιβιοτικά [7].



Σχήμα 1.6. Ενδογενείς και επίκτητες β-λακταμάσες [27].

Πίνακας 1.1. Ταξινόμηση β-λακταμασών κατά Ambler [7].

Τάξη	Ενεργό κέντρο	Τύπος ενζύμου	Υποστρώματα	Παραδείγματα
A	Σερίνη	Πενικιλινάσες		
		Ευρέως φάσματος	Βενζυλπενικιλίνη, αμινοπενικιλίνες, καρβοξυπενικιλίνες, ουρέιδοπενικιλίνες, στενού φάσματος κεφαλοσπορίνες	PC1 στον <i>S. aureus</i> TEM-1, SHV-1 σε <i>E. Coli</i> , <i>K.pneumoniae</i> και άλλα Gram (-)
		Εκτεταμένου φάσματος (ESBL)	Υποστρώματα του ευρέως φάσματος συν τις οξυ-ιμινο β-λακτάμες (κεφουροξίμη, κεφταζιδίμη, κεφτριαξόνη) και αζτρεονάμη	Στα <i>Enterobacteriaceae</i> : TEM-derived, SHV-derived, CTX-M derived, PER-1, VEB-1, VEB-2, GES-1, GES-2 IBC-2 στην <i>P.aeruginosa</i>
		Καρβαπενεμάσες	Υποστρώματα του εκτεταμένου φάσματος συν κεφαμυκίνες και καρβαπενέμες	KPC-1, KPC-2, KPC-3 στην <i>K.pneumoniae</i> NMC/IMI, SME family
B	Μεταλλο-β-λακταμάσες (Zn^{2+})	Καρβαπενεμάσες	Υποστρώματα του εκτεταμένου φάσματος συν κεφαμυκίνες και καρβαπενέμες	IMP, VIM, GIM, SPM, SIM σε <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter spp</i>
C	Σερίνη	Κεφαλοσπορινάσες	Υποστρώματα του εκτεταμένου φάσματος συν κεφαμυκίνες	Ένζυμα τύπου AmpC στα <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>A.baumannii</i>
D	Σερίνη	Οξακυλλινάσες		
		Ευρέως φάσματος	Αμινοπενικιλίνες, ουρέιδοπενικιλίνες, κλοξακυλλίνη, μεθικιλίνη, οξακυλλίνη και κάποιες στενού φάσματος κεφαλοσπορίνες	OXA-family σε <i>P.aeruginosa</i>
		Εκτεταμένου φάσματος	Υποστρώματα του ευρέως φάσματος συν οξυ-ιμινο-β-λακτάμες και μονομπακτάμες	OXA-derived σε <i>P.aeruginosa</i>
		Καρβαπενεμάσες	Υποστρώματα εκτεταμένου φάσματος συν κεφαμυκίνες και καρβαπενέμες	OXA-derived σε <i>Acinetobacter spp</i>

Πίνακας 1.2. Λειτουργική ταξινόμηση των β-λακταμασών σύμφωνα με την τελευταία αναθεώρηση από Bush *et al* [28].

Ομάδα	Μοριακή Τάξη	Υπόστρωμα	Αναστολή από:		Χαρακτηριστικά	Παραδείγματα
			CA ή TZB	EDTA		
1	C	Κεφαλοσπορίνες	Όχι	Όχι	Μεγαλύτερη υδρόλυση των κεφαλοσπορινών από τη βενζυλπενικιλίνη υδρολύουν τις κεφαμυκίνες	<i>E. Coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
2a	A	Πενικιλίνες	Ναι	Όχι	Μεγαλύτερη υδρόλυση της βενζυλοπενικιλίνης από τις κεφαλοσπορίνες	PC1
2b	A	Πενικιλίνες, πρώτες κεφαλοσπορίνες	Ναι	Όχι	Παρόμοια υδρόλυση της βενζυλοπενικιλίνης και των κεφαλοσπορινών	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Εκτεταμένου φάσματος κεφαλοσπορίνες, μονομπακτάμες	Ναι	Όχι	Αυξημένη υδρόλυση των οξυ-ιμινο-β-λακταμών (κεφοταξίμη, κεφταζιδίμη, κεφτριαξόνη, κεφεπιμη, αζτρεονάμη)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	A	Πενικιλίνες	Όχι	Όχι	Ανθεκτικότητα σε κλαβουλανικό οξύ, σουλμπακτάμη και ταζομπακτάμη	TEM-30, SHV-10
2c	A	Καρμπενικιλίνη	Ναι	Όχι	Αυξημένη υδρόλυση της καρμπενικιλίνης	PSE-1, CARB-3
2d	D	Κλοξακιλλίνη	Ποικίλλει	Όχι	Αυξημένη υδρόλυση της κλοξακιλλίνης ή της οξακιλλίνης	OXA-1, OXA-10
2e	A	Εκτεταμένου φάσματος κεφαλοσπορίνες	Ναι	Όχι	Υδρολύει κεφαλοσπορίνες. Αναστέλλεται από τι κλαβουλανικό αλλά όχι από την αζτρεονάμη	CepA
2f	A	Καρβαπενέμες	Ποικίλλει	Όχι	Αυξημένη υδρόλυση των καρβαπενεμών, οξυ-ιμινο-β-λακταμών, κεφαμυκινών	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B (B1)	Καρβαπενέμες	Όχι	Ναι	Ευρέως φάσματος υδρόλυση των καρβαπενεμών αλλά όχι των μονομπακτάμων	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
	B (B3)					L-1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	B (B2)	Καρβαπενέμες	Όχι	Ναι	Εκλεκτική υδρόλυση των καρβαπενεμών	CphA, Sfh-1

CA: Κλαβουλανικό οξύ, TZB: Ταζομπακτάμη

Υπάρχουν δύο συστήματα ταξινόμησης των β-λακταμασών τα οποία είναι σήμερα σε χρήση. Η μοριακή ταξινόμηση κατά Ambler βασίζεται στην αλληλουχία των αμινοξέων και κατατάσσει τις β-λακταμάσες σε τέσσερις τάξεις, τις A, C και D, οι οποίες χρησιμοποιούν τη σερίνη για την υδρόλυση των β-λακταμών και την τάξη B που περιλαμβάνει μεταλλοένζυμα, τα οποία χρησιμοποιούν δισθενή ιόντα Zn για την υδρόλυση του υποστρώματος (Πίνακας 1.1). Η λειτουργική ταξινόμηση προτάθηκε από τους Bush-Jacoby-Medeiros και λαμβάνει υπόψη το είδος του υποστρώματος καθώς και την ευαισθησία στους αναστολείς των β-λακταμασών, όπως το κλαβουλανικό οξύ, με τέτοιο τρόπο ώστε να συσχετίζεται με τον φαινότυπο τους [28]. Οι κύριες ομάδες γενικά συσχετίζονται με την πιο ευρεία μοριακή ταξινόμηση (Πίνακας 1.2). Η αναθεωρημένη λειτουργική ταξινόμηση των β-λακταμασών από τους Bush και Jacoby [28] περιλαμβάνει στην ομάδα 1 τις κεφαλοσπορινάσες (τάξη C), στην ομάδα 2 τις ευρέως φάσματος, τις ανθεκτικές στους αναστολείς και τις εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες καθώς και τις καρβαπενεμάσες σερίνης (τάξεις A και D) και τέλος στην ομάδα 3 τις μεταλλο-β-λακταμάσες (Πίνακας 1.2).

Ένας ιδιαίτερος φαινότυπος παρατηρείται σε βακτήρια που παράγουν μια επαγωγίμη, χρωμοσωμική κεφαλοσπορινάση AmpC, κυρίως στα *Enterobacter* sp., *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens* και *Providencia* sp. Η έκφραση της AmpC επάγεται ισχυρά από την αμοξικιλίνη, το κλαβουλανικό οξύ, την κεφοξιτίνη και τις κεφαλοσπορίνες α' γενεάς. Μεταλλάξεις στο σύστημα επαγωγής μπορεί να οδηγήσουν σε μόνιμη υπερέκφραση της AmpC. Τέτοιου είδους μεταλλάξεις συμβαίνουν τυχαία, δεν προκαλούνται από τις β-λακτάμες, αλλά η χρήση τους μπορεί να προκαλέσει επιλογή των ανθεκτικών μεταλλαγμένων στελεχών. Τα μεταλλαγμένα στελέχη που υπερεκφράζουν AmpC είναι ανθεκτικά στις πενικιλίνες, στην αζτρεονάμη, στις κεφαλοσπορίνες γ' γενεάς, ακόμα και στην ερταπενέμη. Η ιμιπενέμη και η μεροπενέμη είναι οι πιο δραστικές β-λακτάμες ενώ η κεφεπίμη αποτελεί σημαντική εναλλακτική εφόσον ενδείκνυται από τον έλεγχο ευαισθησίας. Από την άλλη, σε άλλα βακτήρια, όπως το *E. coli*, εκφράζονται χαμηλά επίπεδα χρωμοσωμικής μη επαγωγίμης AmpC [29].

Η διασπορά των πλασμιδιακών β-λακταμασών αποτελεί το πιο κρίσιμο ζήτημα αναφορικά με την ανθεκτικότητα στα *Enterobacteriaceae*. Η αύξηση στην

αντίσταση στην αμπικιλίνη το 1960 αποδόθηκε στην εμφάνιση της TEM-1, μιας πλασμιδιακής β-λακταμάσης που πήρε το όνομά της από έναν Έλληνα ασθενή, τον Τεμονιέρα, που ήταν ο πρώτος στον οποίο απομονώθηκε το συγκεκριμένο στέλεχος. Η οικογένεια των β-λακταμασών TEM εξαπλώθηκε παγκοσμίως μέσω των διαφόρων εντεροβακτηριοειδών καθώς και στελεχών από *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* και *Neisseria gonorrhoeae*. Παρομοίως, τόσο οι χρωμοσωμικές όσο και οι πλασμιδιακές β-λακταμάσες τύπου SHV, με παρόμοια μοριακή δομή με τα ένζυμα TEM, διαδόθηκαν ευρέως σε στελέχη *E. coli* και *K. pneumoniae*. Σύντομα οι αρχικά ευαίσθητες στους αναστολείς, β-λακταμάσες TEM και SHV, μετατρέπονται σε παράγωγα μέσω μεταλλάξεων στο καταλυτικό τους κέντρο (TEM-derived, SHV-derived) με ικανότητα να ανθίστανται στο κλαβουλανικό οξύ ή την ταζομπακτάμη χωρίς να υδρολύουν κεφαλοσπορίνες. Στη συνέχεια, η εισαγωγή των κεφαλοσπορινών γ' γενεάς το 1980 στη θεραπεία των λοιμώξεων συνοδεύτηκε από την εμφάνιση και διασπορά των ESB, οι οποίες έχουν την ικανότητα να υδρολύουν τις κεφαλοσπορίνες γ' γενεάς και τις μονομπακτάμες. Η διασπορά τους σε νοσοκομειακά στελέχη *K. pneumoniae*, *Enterobacter sp.* και σε μικρότερο βαθμό σε *E. coli* προκάλεσε σημαντικές επιδημίες στη δεκαετία του 1990. Σήμερα, οι ESB τύπου TEM και SHV είναι ακόμα ενδημικές σε πολλές χώρες, αλλά ωστόσο η εμφάνιση στις αρχές της δεκαετίας του '90 μιας νέας τάξης ESB, γνωστής ως CTX-M τείνει να τις ξεπεράσει. Αυτό που χαρακτηρίζει επιδημιολογικά τις β-λακταμάσες τύπου CTX-M είναι ότι παρατηρούνται σε αποικισμένους ασθενείς από *E. coli* χωρίς να συνοδεύονται από κάποια λοίμωξη και χωρίς ιστορικό έκθεσης σε αντιβιοτικά ή προηγούμενης νοσηλείας (ESB κοινότητας). Η διασπορά των *Enterobacteriaceae* που παράγουν CTX-M υπήρξε μαζική κυρίως σε χώρες της Νοτιανατολικής Ασίας και της Ανατολικής Μεσογείου με εκτιμώμενα ποσοστά φορέας περίπου 60% και 30% αντίστοιχα. Σήμερα, τα ποσοστά φορέας στην κοινότητα ξεπερνούν το 5-10% και σε πολλές άλλες γεωγραφικές περιοχές και υπάρχει ανησυχία για τις αναφορές για ουρολοιμώξεις της κοινότητας, ενδοκοιλιακή σήψη ακόμα και πνευμονία που οφείλονται σε Εντεροβακτηριακά που παράγουν ESB [27].

Τα εντεροβακτηριακά στελέχη που παράγουν ESBL είναι ανθεκτικά στις περισσότερες β-λακτάμες εκτός της κεφοξιτίνης, των καρβαπενεμών και για μια ομάδα στελεχών και την τεμοκιλλίνη. Παράλληλα, τα στελέχη ESBL συχνά συνδυάζουν ανθεκτικότητα και στις κινολόνες, την κοτριμοξαζόλη και τις αμινογλυκοσίδες περιορίζοντας ακόμα περισσότερο τις εναλλακτικές των καρβαπενεμών στη θεραπεία των σοβαρών λοιμώξεων. Ωστόσο, οι TEM, SHV και CTX-M είναι β-λακταμάσες τάξης A και πολλά στελέχη ESBL παραμένουν ευαίσθητα *in vitro* στους αναστολείς των β-λακταμασών. Συνεπώς, σε μια προσπάθεια για ελάττωση της χρήσης των καρβαπενεμών ώστε να μειωθεί η εξάπλωση των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών προτείνεται η χρήση των κατάλληλων συνδυασμών β-λακτάμης/αναστολέα β-λακταμασών (συγκεκριμένα, αμοξυκιλλίνη-κλαβουλανικό οξύ, τικαρκιλλίνη-κλαβουλανικό οξύ και πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη) για τη θεραπεία λοιμώξεων από στελέχη ESBL [27]. Ο συνδυασμός αμοξυκιλλίνης-κλαβουλανικού είναι ο συχνότερα μη δραστικός (πολλά ESBL παράγουν επίσης β-λακταμάσες ανθεκτικές στο κλαβουλανικό όπως AmpC ή OXA-1), ενώ δεν υπάρχουν κλινικά δεδομένα για τον συνδυασμό τικαρκιλλίνη-κλαβουλανικό. Ωστόσο, νεότερες μελέτες έδειξαν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα για το συνδυασμό αμοξυκιλλίνης-κλαβουλανικού όταν αυτός χρησιμοποιείται σε υψηλές δόσεις [30] ή με ταυτόχρονη χορήγηση κεφαλοσπορινών γ' γενεάς όπως κεφοταξίμη, κεφτιμπουτένη και κεφποδοξίμη και κεφιξίμη [31-34]. Χαρακτηριστικά, αναφέρεται ότι το κλαβουλανικό οξύ ελαττώνει τις MIC της κεφιξίμης και της κεφτιμπουτένης για *E. coli* και *K. pneumoniae* που παράγουν ESBL λακταμάσες [31]. Από την άλλη, η σημασία του συνδυασμού πιπερακιλλίνη- ταζομπακτάμη στην θεραπεία των ESBL παραμένει αμφιλεγόμενη. Ενώ τα στελέχη ESBL δείχνουν ευαισθησία στον παραπάνω συνδυασμό *in vitro*, στην πράξη η παραγωγή πολλών β-λακταμασών όπως AmpC, η παρουσία άλλων μηχανισμών αντοχής όπως πορίνες και αντλία εκροής εκμηδενίζουν τη δράση του. Επιπλέον, η ταζομπακτάμη επηρεάζεται και από το φαινόμενο του «ενοφθαλμισμού» (“inoculum effect”) [35]. Οι νεότεροι συνδυασμοί κεφτολοζάνη-ταζομπακτάμη και κεφταζιδίμη-αβιμπακτάμη φαίνεται να παρουσιάζουν αξιόλογη αποτελεσματικότητα έναντι των στελεχών ESBL, ωστόσο ο ρόλος τους στη θεραπεία των λοιμώξεων από στελέχη που παράγουν β-λακταμάσες παραμένει υπό συζήτηση [35,36].

Η αύξηση της συχνότητας εμφάνισης των ESBL στελεχών και των πλασμιδιακών κεφαλοσπορινάσων οδήγησε σε σταδιακή αύξηση της κατανάλωσης των καρβαπενεμών. Αυτή με τη σειρά της είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση των CRE με παρόμοιο τρόπο όπως και τα ESBL. Αρχικά εμφανίστηκαν στην *K. pneumoniae* (πιο σπάνια στο *Enterobacter* sp.), ως ενδοноσοκομειακές επιδημίες (π.χ. VIM και KPC) και στη συνέχεια στην κοινότητα στο *E. coli* (NDM και παράγωγα OXA-48). Μετά την πανδημία των CTX-M, η εξάπλωση των CRE προκαλεί έντονη ανησυχία δεδομένου ότι βρίσκονται ένα βήμα πιο μπροστά από τα ESBL, όσον αφορά την πολυανθεκτικότητα: για τα περισσότερα από τα CRE στελέχη μόνο η κολιστίνη, η τιγκεκυκλίνη και η γενταμυκίνη (για μερικά στελέχη KPC) έχουν ακόμα δραστηριότητα. Οι OXA-48 αποτελούν εξαίρεση γιατί υδρολύουν τις πενικιλλίνες (με ή χωρίς αναστολέα) και τις καρβαπενέμες (χαμηλού επιπέδου ανθεκτικότητα), αλλά όχι τις καρβαπενέμες γ' γενεάς. Παρ' αυτά πολλά εντεροβακτηριακά στελέχη που παράγουν OXA-48, παράγουν επίσης και ESBL λακταμάσες καθιστώντας μη αποτελεσματικά όλα τα αντιβιοτικά β-λακτάμης. Έτσι, ενώ αρχικά περιορίζονταν σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές (ΗΠΑ και Ισραήλ για τα KPC, Ελλάδα και Ιταλία για τα VIM, Ινδία και Πακιστάν για τα NDM και Νοτιοανατολική Μεσόγειος για τα OXA-48), τα CRE εξαπλώνονται παγκοσμίως, μέσω των ταξιδιωτών και των επαναπατριζόμενων ασθενών και απομονώνονται πλέον σε άτομα που δεν έχουν παρευρεθεί σε ενδημικές περιοχές. Τέλος, θα πρέπει να επισημανθεί ότι η παραγωγή καρβαπενεμασών δεν αποτελεί το μοναδικό μηχανισμό ανθεκτικότητας στις καρβαπενέμες στα *Enterobacteriaceae*, αφού αυτός ο φαινότυπος μπορεί να παρουσιαστεί επίσης κατά τη θεραπεία στελεχών που παράγουν ESBL ή υπερεκφράζουν AmpC λόγω αποκτηθείσας μειωμένης διαπερατότητας στις καρβαπενέμες ή απώλειας πορινών της εξωτερικής μεμβράνης [27].

Οι καρβαπενεμάσες τάξης A είναι μέλη της λειτουργικής ομάδας 2f. Υδρολύουν τις καρβαπενέμες, τις κεφαλοσπορίνες, τις πενικιλλίνες και την αζτρεονάμη. Ωστόσο, η δράση τους αναστέλλεται από το κλαβουλανικό οξύ και την ταζομπακτάμη [37]. Τα ένζυμα που ταυτοποιήθηκαν αρχικά από εντεροβακτηριακά στελέχη περιλαμβάνουν τα NMC-A (Not metalloenzyme Carbapenemase-A), SME 1-2 (*Serratia marcescens* enzyme), IMI-1 (Imipenem-hydrolysing beta-lactamase), KPC 1-

3 (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemases) και GES-5 (Guiana extended-spectrum). Τα γονίδια για τις β-λακταμάσες SME, IMI και NMC-A βρίσκονται σε χρωμόσωμα και είναι σπάνιες λόγω ότι δεν σχετίζονται με κινητά στοιχεία. Η SME-1 απομονώθηκε πρώτη φορά στην Αγγλία από δύο στελέχη *S. marcescens* το 1982. Οι NMC-A και IMI απομονώθηκαν από σπάνια στελέχη *Enterobacter cloacae* στις Η.Π.Α., Γαλλία και Αργεντινή. Οι αλληλουχίες αμινοξέων των NMC-A και IMI-1 παρουσιάζουν 97% ομολογία μεταξύ τους και 70% με την SME-1. Αυτές οι χρωμοσωμικές β-λακταμάσες επάγονται από την ιμιπενέμη και την κεφοξιτίνη [38].

Οι οικογένειες β-λακταμασών KPC και GES κωδικοποιούνται σε πλασμίδια, γι' αυτό και είναι εύκολη η διασπορά τους. Τα ένζυμα KPC είναι κλινικά τα πιο σημαντικά ένζυμα μεταξύ των καρβαπενεμασών της τάξης A. Έχουν ταυτοποιηθεί κυρίως από στελέχη *K. pneumoniae*, αν και υπάρχουν κάποιες αναφορές των ενζύμων αυτών και για το *Enterobacter* sp και τη *Salmonella* sp. Το πρώτο στέλεχος KPC (KPC-1) αναγνωρίστηκε το 1996 στη Βόρεια Καρολίνα των Η.Π.Α [39]. Ακολούθησε η ανίχνευση του KPC-2, το οποίο διαφέρει από το KPC-1 σε ένα μόνο αμινοξύ, το 2003 στην ανατολική ακτή των Η.Π.Α. Από τότε μια σειρά από παράγωγα έχει επίσης ταυτοποιηθεί, πάνω από 200 στο σύνολο [40], με το KPC-2 και KPC-3 να παραμένουν τα πιο συχνά [41,42]. Μέσα σε λίγα χρόνια, τα στελέχη KPC εξαπλώθηκαν παγκοσμίως και ταυτοποιήθηκαν σε πολλά αρνητικά κατά Gram στελέχη [38]. Η πρώτη χώρα μετά τις Η.Π.Α. που αντιμετώπισε επιδημία από KPC στελέχη ήταν το Ισραήλ το 2005, όπου τα KPC στελέχη *K. pneumoniae* θεωρήθηκαν ενδημικό φαινόμενο μέχρι το 2010 [43]. Στην Ευρώπη, ενδημικές περιοχές θεωρούνται η Ελλάδα, η Ιταλία και η Πολωνία στις οποίες παρατηρούνται συχνά ενδονοσοκομειακές επιδημίες από KPC στελέχη *K. pneumoniae* [10]. Ειδικότερα για την Ελλάδα, μετά την πρώτη αναφορά για KPC-2 στέλεχος *K. pneumoniae* στην Κρήτη το 2007 και μέσα σε δύο χρόνια [44,45], το πολυανθεκτικό παθογόνο διαδόθηκε σε όλες τις τριτοβάθμιες νοσοκομειακές δομές του Ελλαδικού χώρου. Σύμφωνα με τα δεδομένα του EARS-Net του ECDC, η επιδημιολογία των KPC στελεχών της *K. pneumoniae* στην Ελλάδα θεωρήθηκε ότι βρίσκεται σε ενδημικό στάδιο από το 2010, ενώ από το 2011 η ανθεκτικότητα στις καρβαπενέμες, κυρίως λόγω παραγωγής KPC, παρέμεινε σταθερά πάνω από 60% στις διεισδυτικές λοιμώξεις από *K. pneumoniae* [43].

Η οικογένεια GES/IBC των β-λακταμασών είναι μια οικογένεια που δεν απαντάται τόσο συχνά. Περιγράφηκε αρχικά το 2000 σε αναφορές για το IBC-1 (Integron-borne cephalosporinase) που απομονώθηκε από *E. cloacae* στην Ελλάδα και του GES-1 (Guiana extended spectrum) που απομονώθηκε από *K. pneumoniae* στη Γαλλική Γουιάνα. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα της οικογένειας GES βρίσκονται σε ιντεγκρόνια σε πλασμίδια [38]. Η οικογένεια GES περιλαμβάνει 24 μέλη και όλα διαθέτουν την ικανότητα να υδρολύουν πενικιλίνες και ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες, γι' αυτό και αρχικά ταξινομήθηκαν ως ESBL β-λακταμάσες. Στη συνέχεια βρέθηκε ότι λόγω αντικατάστασης συγκεκριμένων αμινοξέων στο ενεργό κέντρο κάποια από αυτά επεκτείνουν το φάσμα δράσης τους και στις καρβαπενέμες. Πιο συγκεκριμένα, τα GES-2, GES-4, GES-5, GES-6, GES-11, GES-14 και GES-18 υδρολύουν αποτελεσματικά την ιμιπενέμη. Παρόλο που είναι σχετικά σπάνια, τα ένζυμα GES έχουν ανευρεθεί παγκοσμίως. Αυτά για τα οποία έχει διαπιστωθεί σημαντική δράση καρβαπενεμάσης είναι τα εξής: το GES-2 στην *P. aeruginosa*, όπου ένας κλώνος αποτέλεσε το αίτιο ενδονοσοκομειακής επιδημίας στη Νότιο Αφρική και το GES-5 σε *Enterobacteriaceae* και *P. aeruginosa*, για το οποίο υπάρχουν εκτεταμένες αναφορές στη Νότιο Αμερική (Βραζιλία) καθώς και σποραδικές αναφορές στην Τουρκία και τη Νότιο Κορέα. Τα GES-11 και GES-14 έχουν ταυτοποιηθεί μόνο στο *Acinetobacter baumannii* και το GES-18 έχει ταυτοποιηθεί στη *P. aeruginosa* αλλά όχι στα *Enterobacteriaceae* [10]. Είναι αξιοσημείωτο ότι το ένζυμο GES-5 το οποίο διαθέτει σημαντική δράση καρβαπενεμάσης εξαπλώθηκε ευρέως πέρα από τις νοσοκομειακές δομές και στο περιβάλλον της Ν. Αμερικής, αποτελώντας ουσιαστικά το μόνο ένζυμο τύπου GES που υδρολύει τις καρβαπενέμες και βρίσκεται στα *Enterobacteriaceae* [10].

Οι μεταλλο-β-λακταμάσες (Metallo-β-lactamases, MBLs) τάξης B υδρολύουν τις καρβαπενέμες και είναι γνωστές για την ανθεκτικότητά τους στους αναστολείς των β-λακταμασών και την ευαισθησία τους στις ενώσεις που δεσμεύουν μεταλλοϊόντα, όπως το EDTA. Η υδρόλυση των β-λακταμών βασίζεται στην αλληλεπίδραση τους με τα ιόντα Zn^{2+} στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Ωστόσο, δεν υδρολύουν την αζτρεονάμη [38]. Οι πιο γνωστές οικογένειες ενζύμων MBL είναι οι VIM (Verona integrin-encoded), IMP (Imipenemase) και NDM (New Delhi metallo-β-

lactamase), ενώ άλλες όπως οι GIM-1 (German imipenemase) και οι KHM-1 έχουν βρέθει σποραδικά. Οι πρώτες οι β-λακταμάσες που ταυτοποιήθηκαν ήταν οι IMP σε διάφορα παθογόνα Gram αρνητικά βακτήρια όπως τα *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* και *Acinetobacter*. Από τα εντεροβακτηριοειδή, η IMP-1 βρέθηκε στη *S. marcescens* που απομονώθηκε από κλινικό δείγμα στην Ιαπωνία το 1991 [46]. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 98 είδη IMP [47], ενώ οι καρβαπενεμάσες τύπου IMP έχουν διαδοθεί παγκοσμίως. Ωστόσο, η συχνότητα εμφάνισης των IMP είναι πολύ μικρότερη από τα KPC, VIM, NDM και τα OXA-48. Πιο συχνά παρατηρούνται στην Ιαπωνία, την Ταϊβάν και την ανατολική Κίνα, ενώ σποραδικά έχουν αναφερθεί και σε πολλές άλλες χώρες, προκαλώντας σε κάποιες περιπτώσεις ενδονοσοκομειακές επιδημίες [10].

Ένας άλλος τύπος ενζύμου MBL είναι ο VIM. Το VIM-1 ταυτοποιήθηκε πρώτη φορά στην Ιταλία το 1997 [48] και έπειτα το VIM-2 βρέθηκε στη Γαλλία σε ένα στέλεχος *P. aeruginosa* που είχε απομονωθεί το 1996 [49]. Η οικογένεια VIM περιλαμβάνει 41 ένζυμα τα οποία έχουν βρεθεί κυρίως στην *P. aeruginosa* και σε εντεροβακτηριακά στελέχη. Το VIM-2 είναι το πιο συχνά αναφερόμενο MBL παγκοσμίως και ενδημεί κυρίως στη Νότια Ευρώπη (Ελλάδα, Ισπανία και Ιταλία) και τη Νοτιανατολική Ασία (Νότια Κορέα και Ταϊβάν). Από την Ευρώπη, Η Ελλάδα είναι ενδημική σε *Enterobacteriaceae* που παράγουν VIM-1 [10]. Πολλές μελέτες στον Ελλαδικό χώρο έχουν αναφέρει την εξάπλωση σε εθνικό επίπεδο στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν VIM-1, αλλά το ένζυμο αυτό έχει επίσης ταυτοποιηθεί και σε *E. coli*, *C. freundii*, *M. morganii*, *Serratia sp* και *Klebsiella oxytoca* [50,51].

Σχετικά πρόσφατα, η β-λακταμάση KHM-1 ταυτοποιήθηκε στην Ιαπωνία σε ένα στέλεχος *C. freundii* το οποίο είχε απομονωθεί το 1997. Η MBL λακταμάση GIM-1 ταυτοποιήθηκε αρχικά σε ένα στέλεχος *P. aeruginosa* στη Γερμανία και στη συνέχεια επίσης σε *S. marcescens*, *E. cloacae* και *Acinetobacter pittii*. Ανησυχητικό είναι ότι βρέθηκε και σε άλλα εντεροβακτηριοειδή συμπεριλαμβανομένου των *E. coli*, *C. freundii* και *K. oxytoca* ξανά στη Γερμανία. Άλλα MBLs που έχουν περιγραφεί περιλαμβάνουν τα SPM-1, SIM-1, DIM-1, TMB-1 και AIM-1 τα οποία όμως δεν έχουν βρεθεί σε *Enterobacteriaceae*, αλλά κυρίως σε στελέχη *Pseudomonas* ή *Acinetobacter* [10].

Μία από τις πιο σημαντικές κλινικά καρβαπενεμάσες MBL είναι η NDM-1, η οποία περιγράφηκε το 2009 σε στελέχη *K. pneumoniae* και *E. coli* σε Σουηδό ασθενή Ινδικής καταγωγής μετά από προηγηθείσα νοσηλεία του στο Ν. Δελχί [52]. Από την πρώτη περιγραφή του NDM-1, έχουν αναφερθεί 67 παράγωγά του [53], τα περισσότερα προερχόμενα από την Ασία. Συγκριτικά με το NDM-1, τα NDM-4, NDM-5 και NDM-7 παρουσιάζουν αυξημένη δραστηριότητα έναντι των καρβαπενεμών. Μια λεπτομερής ανάλυση της ανθεκτικότητας των NDM δείχνει τη συσχέτισή τους και με άλλους μηχανισμούς αντίστασης στα αντιβιοτικά, όπως τις πλασμιδιακές κεφαλοσπορινάσες AmpC, τις ESBL β-λακταμάσες, άλλους τύπους καρβαπενεμασών (OXA-48, VIM και KPC) και ένζυμα που προκαλούν ανθεκτικότητα στις αμινογλυκοσίδες (16S RNA μεθυλάσες), στις κινολόνες (Qnr), στις μακρολίδες, τη χλωραμφενικόλη και τη σουλφαμεθοξαζόλη. Συνεπώς, πολλά στελέχη που παράγουν NDM-1 παραμένουν ευαίσθητα μόνο στην κολιστίνη, στη φωσφομυκίνη και στην τιγκεκυκλίνη. Η κύρια προέλευση των *Enterobacteriaceae* που παράγουν NDM είναι η ευρύτερη περιοχή της Ινδίας (Πακιστάν, Ινδία και Σρι Λάνκα). Τα στελέχη που παράγουν NDM έχουν απομονωθεί τόσο στην κοινότητα όσο και στο περιβάλλον. Μέσω των ταξιδιωτών και του διεθνούς τουρισμού διαδόθηκαν παγκοσμίως. Η παραγωγή καρβαπενεμασών NDM από εντεροβακτηριακά στελέχη είναι η πιο συχνή συγκριτικά με άλλες καρβαπενεμάσες σε ευρωπαϊκές χώρες, όπως το Ηνωμένο Βασίλειο και η Γαλλία. Άλλες χώρες με σημαντική εμφάνιση των στελεχών NDM περιλαμβάνουν τις βαλκανικές χώρες, χώρες της αραβικής χερσονήσου και της Βόρειας Αφρικής [10]. Μεταξύ 2013 και 2015 υπήρξαν πολλές σποραδικές αναφορές στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν NDM στην Ευρώπη και ιδιαίτερα στην περιοχή της Μεσογείου, χωρίς καμία να βρίσκεται σε ενδημική κατάσταση [43]. Αξιοσημείωτη είναι ότι η ταυτοποίηση των NDM δεν συσχετίζεται πάντα με προέλευση από την περιοχή της Ινδίας, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι υπάρχουν δευτερεύοντες δεξαμενές (reservoir) προέλευσης των στελεχών αυτών [10]. Χαρακτηριστική είναι η εμφάνιση αυτόχθονων αλλά και εισαγόμενων στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν NDM-1 στην Τουρκία [54] και την Ελλάδα [55,56]. Συχνά ενέχονται σε επιδημίες, με μία από τις πρώτες αναφορές στον ελλαδικό χώρο να προέρχεται από την περιοχή της Ηπείρου [56]. Ανησυχητική είναι η αυξανόμενη απομόνωση στελεχών *E.coli* που παράγουν NDM, δεδομένου ότι το *E. coli* είναι ένα

παθογόνο που σχετίζεται συχνά με λοιμώξεις της κοινότητας, όπως λοιμώξεις του γαστρεντερικού και του ουροποιητικού [10].

Οι β-λακταμάσες τάξης D, οι οποίες ονομάζονται και OXA από το οξασιλινάσες, περιλαμβάνουν πάνω από 400 ένζυμα, 232 από τα οποία παρουσιάζουν δράση έναντι των καρβαπενεμών [43]. Οι β-λακταμάσες τύπου OXA ήταν από τις πρώτες που ανιχνεύτηκαν και από τις συχνότερα αναφερόμενες πλασμιδιακού τύπου λακταμάσες στα τέλη της δεκαετίας του '70 και αρχές του '80, οπότε και περιγράφονταν ως πενικιλινάσες που μπορούν και υδρολύουν την οξακιλλίνη και την κλοξακιλλίνη [38]. Είναι αξιοσημείωτο ότι όλες οι β-λακταμάσες τάξης D παρουσιάζουν ασθενή δράση καρβαπενεμάσης, η οποία όμως δεν οδηγεί σε υψηλή ανθεκτικότητα στις καρβαπενέμες αν δεν συνδυάζεται με διαταραχές στη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης [10]. Χαρακτηριστικό είναι ότι ενώ τα περισσότερα ένζυμα τύπου OXA έχουν ταυτοποιηθεί στο *Acinetobacter*, τα OXA-48 και τα παράγωγά τους έχουν ταυτοποιηθεί στα *Enterobacteriaceae*. Το πρώτο στέλεχος που βρέθηκε να παράγει OXA-48 ήταν *K. pneumoniae* που απομονώθηκε στην Τουρκία το 2003, όπου και παρατηρήθηκε ταχεία διασπορά του προκαλώντας πολλές ενδονοσοκομειακές επιδημίες. Η επιδημία τέθηκε υπό έλεγχο και το 2015 η Τουρκία θεωρήθηκε ενδημική σε *K. pneumoniae* τύπου OXA-48 [43]. Σύντομα διαπιστώθηκε σημαντική διασπορά και σε άλλες χώρες κυρίως της Μέσης Ανατολής, της Βόρειας Αφρικής αλλά και της Ευρώπης, ιδιαίτερα στις χώρες της Μεσογείου [33]. Ένας από τους κύριους παράγοντες που ενισχύουν τη διασπορά του γονιδίου *bla*_{OXA-48} σε διάφορα εντεροβακτηριοειδή είναι η ιδιαίτερη ικανότητα του πλασμιδίου στο οποίο βρίσκεται το γονίδιο να μεταφέρεται με μεγάλη αποτελεσματικότητα μέσω σύζευξης σε οποιοδήποτε εντεροβακτηριακό είδος [10].

1.3.2.2. Μειωμένη διαπερατότητα κυτταροπλασματικής μεμβράνης

Από την αρχή της χρήσης των αντιβιοτικών ήταν γνωστό ότι η πενικιλίνη είναι δραστική έναντι των θετικών κατά Gram βακτηρίων αλλά όχι έναντι των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Η διαφορά αυτή οφείλεται κυρίως στην ύπαρξη της εξωτερικής μεμβράνης, η οποία αποτελεί φραγμό για την είσοδο στο κύτταρο για πολλά αντιβιοτικά. Βρίσκεται εξωτερικά του τείχους της πεπτιδογλυκάνης των

αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, ενώ απουσιάζει στα Gram θετικά βακτήρια. Το εξωτερικό της τμήμα αποτελείται κυρίως από λιποπολυσακχαρίτες που παρεμποδίζουν την είσοδο των υδρόφοβων αντιβιοτικών. Από την άλλη, είσοδος των υδρόφιλων αντιβιοτικών μέσω της εξωτερικής μεμβράνης διευκολύνεται από την παρουσία των πορινών, πρωτεϊνών που διατάσσονται με τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματίζουν κανάλια διάχυσης, μέσω των οποίων τα αντιβιοτικά διαπερνούν τη μεμβράνη. Η ταχύτητα διάχυσης των αντιβιοτικών μέσω της εξωτερικής μεμβράνης εξαρτάται τόσο από τον αριθμό και τις ιδιότητες των καναλιών πορίνης αλλά και από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του αντιβιοτικού. Γενικά, όσο αυξάνεται το μέγεθος, το αρνητικό φορτίο και η υδροφοβικότητα του αντιβιοτικού, τόσο μικρότερη είναι και η πιθανότητα να διασχίσει την εξωτερική μεμβράνη. Μικρά υδρόφιλα διπολικά ιόντα, όπως η ιμιπενέμη, διαπερνούν πιο εύκολα τη μεμβράνη συγκριτικά με μεγαλύτερα μόρια με υψηλό φορτίο όπως η καρμπενικιλίνη [7].

Μεταλλάξεις που έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια συγκεκριμένων πορινών μπορούν να παρατηρηθούν σε στελέχη που απομονώνονται από κλινικά δείγματα και σχετίζονται με την αυξημένη ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά β-λακτάμης. Ανθεκτικότητα στις αμινογλυκοσίδες και τις καρβαπενέμες που παρουσιάζεται κατά τη διάρκεια της θεραπείας έχει συσχετιστεί με τη μη παραγωγή πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης [7].

1.3.2.3. Ενεργότητα αντλίας εκροής

Η ύπαρξη ενεργού αντλίας εκροής αντιβιοτικών αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο ως συνήθης μηχανισμός ανθεκτικότητας σε πολλά παθογόνα βακτήρια. Οι αντλίες εκροής, είτε χρωμοσωμιακές ή πλασμιδιακές, είναι υπεύθυνες για την ενδογενή ή την επίκτητη ανθεκτικότητα των βακτηρίων σε πολλά αντιβιοτικά. Οι αντλίες μπορεί να έχουν περιορισμένο αριθμό υποστρωμάτων ή πολλά υποστρώματα οπότε και είναι γνωστές ως αντλίες MDR (Multi-Drug Resistance). Ταξινομούνται σε διάφορες οικογένειες βάση της αλληλουχίας των αμινοξέων τους και χωρίζονται επίσης σε δύο κατηγορίες ανάλογα με το αν χρησιμοποιούν το ATP ή την ενέργεια πρωτονίου ως πηγή ενέργειας [57].

Η εξαρτώμενη από ενέργεια εκροή των αντιβιοτικών εκτός του βακτηριακού κυττάρου ανακαλύφθηκε τη δεκαετία του 1970, αρχικά με την Ρ-γλυκοπρωτεΐνη στα κύτταρα των θηλαστικών και αργότερα με τις πρωτεΐνες Tet σε στελέχη *E.coli* ανθεκτικά στις τετρακυκλίνες. Η επακόλουθη ανακάλυψη στα τέλη της δεκαετίας του 1990 των αντλιών MDR στα *E. coli* και *Pseudomonas aeruginosa*, με κύριο εκπρόσωπο τη μεγάλη οικογένεια αντλιών εκροής RND (Resistance-Nodulation Division), αποτέλεσε μεγάλη συνεισφορά στην κατανόηση των μηχανισμών ανθεκτικότητας. Από τότε έχουν ταυτοποιηθεί αντλίες MDR σε πολλά είδη κλινικά σημαντικών παθογόνων βακτηρίων όπως *Enterococcus faecium*, *S.aureus*, *K.pneumoniae*, *A.baumannii*, *P. aeruginosa* και *Enterobacter* sp [58].

Στα εντεροβακτηριακά, ο κύριος τύπος αντλίας που εκφράζεται είναι η *AcrB* της οικογένειας RND. Από τις β-λακτάμες οι περισσότερες κεφαλοσπορίνες και πενικιλίνες αποτελούν υποστρώματα της *AcrB*. Ο συνδυασμός της έκφρασης των αντλιών εκροής με μειωμένη παραγωγή ή απώλεια πορινών φαίνεται να είναι επίσης σημαντικός για την αυξημένη ανθεκτικότητα των εντεροβακτηριακών στις β-λακτάμες. Μικρά και υδρόφιλα μόρια, όπως η αμπικιλίνη και η κεφαλοθίνη διεισδύουν ταχύτατα μέσω των πορινών OmpF και OmpC σε *E. coli*, με αποτέλεσμα να παραμένουν δραστικά έναντι στελεχών που φέρουν αντλία εκροής. Σε αυτές τις περιπτώσεις και μόνο όταν υπάρχει μειωμένη έκφραση ή απώλεια πορινών παρατηρείται αισθητό αποτέλεσμα λόγω της εκροής. Επιπλέον, σε στελέχη *K.pneumoniae* όπου ως γνωστό η παρουσία β-λακταμασών είναι ο κύριος μηχανισμός ανθεκτικότητας στις β-λακτάμες, έρευνες έδειξαν ότι η παρουσία αντλιών εκροής μπορεί να συνεισφέρει σημαντικά στην ανθεκτικότητα [58].

1.3.2.4. Τροποποίηση στόχου δράσης του αντιβιοτικού

Οι β-λακτάμες, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, αναστέλλουν τα βακτήρια μέσω σύνδεσής τους με τις πρωτεΐνες PBP της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Αυτές οι πρωτεΐνες-στόχοι καταλύουν τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων. Μεταβολές στις PBPs μπορούν να οδηγήσουν σε ανθεκτικότητα στα β-λακταμικά αντιβιοτικά.

Αυτός ο μηχανισμός ανθεκτικότητας είναι πιο συνήθης στα Gram θετικά βακτήρια με τυπικό παράδειγμα τον Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Τα στελέχη MRSA παρουσιάζουν υψηλή ανθεκτικότητα σε όλες τις β-λακτάμες λόγω της έκφρασης του γονιδίου *mecA* που κωδικοποιεί την PBP2a, μια πρωτεΐνη με χαμηλή συγγένεια προς τα β-λακταμικά αντιβιοτικά [7].

Παρόλο που σπάνια περιγράφεται στα Gram αρνητικά βακτήρια, η τροποποίηση των PBPs μπορεί να εμπλέκεται στην ανθεκτικότητα έναντι των καρβαπενεμών. Στα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες Gram αρνητικά βακτήρια, η επίδραση των τροποποιημένων PBP είναι πιο εμφανής στο *A. baumannii*, όπου η ελαττωμένη έκφραση PBP2 είναι και ο πιο συχνά παρατηρούμενος μηχανισμός ανθεκτικότητας στις καρβαπενέμες [59]. Στα *Enterobacteriaceae*, μια μετάλλαξη στην PBP2 του *P. mirabilis* συσχετίστηκε με ανθεκτικότητα στην ιμιπενέμη [60]. Όσον αφορά το *E.coli*, δεν έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα στελέχη από κλινικά δείγματα στα οποία η ανθεκτικότητα να προέρχεται από την τροποποίηση των PBP. Εντούτοις, μελέτες με σύνθεση μεταλλαγμένων στελεχών *E. coli* έδειξαν ότι η τροποποίηση των PBPs μπορεί να οδηγήσει σε ανθεκτικότητα στις καρβαπενέμες [61]. Από την άλλη, αντιφατικά είναι τα αποτελέσματα μέχρι σήμερα για την *P.aeruginosa* σχετικά με τη συνεισφορά της τροποποίησης των PBPs στην ανθεκτικότητά τους στις β-λακτάμες [62,63].

1.4. Επιδημιολογία των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες εντεροβακτηριακών στελεχών στην Ελλάδα

Το πρώτο εντερικό βακτήριο που παρήγαγε VIM ήταν ένα *E. coli*, το οποίο απομονώθηκε το Νοέμβριο του 2001 και καταγράφηκε στις αρχές του 2003, σε ένα νοσοκομείο του Πειραιά [64]. Από τότε καταγράφηκαν κι άλλες σποραδικές απομονώσεις στελεχών *E.coli* με παραγωγή VIM [65,66] αλλά και εξάρσεις κρουσμάτων [67]. Στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν VIM καταγράφηκαν μεταξύ Σεπτεμβρίου και Δεκεμβρίου του 2002 στη ΜΕΘ τριών νοσοκομείων της Αθήνας [68]. Στη συνέχεια έξαρση κρουσμάτων στελεχών MBL *P. mirabilis* περιγράφηκε σε γενικό νοσοκομείο στη Θεσσαλονίκη κατά την περίοδο Ιουνίου 2004- Μαρτίου 2005 [69] καθώς και σε εξωτερικούς ασθενείς που σχετίζονταν με το Γενικό Νοσοκομείο στις

Σέρρες [70]. Επίσης υπήρξαν και σποραδικές αναφορές παραγωγής MBL σε *E. cloacae* το 2003 [71], σε *Enterobacter aerogenes* το 2004 [64], σε *M. morganii* το 2005 [72] και σε *Providencia stuartii* το 2007 [73]. Όπως αναφέρθηκε από τους Vatoroulos *et al* [74], το σύστημα παρακολούθησης της μικροβιακής αντοχής στην Ελλάδα κατέγραψε αύξηση των ανθεκτικών στην ιμιπενέμη στελεχών *K. pneumoniae* από <1% το 2001 στο 20% σε στελέχη από νοσοκομειακές κλινικές και 50% από ΜΕΘ το 2006.

Την ίδια χρονική περίοδο όπου οι Ρουλού *et al* ανακοινώνουν για πρώτη φορά τη διασπορά στελεχών *K. pneumoniae* που παράγει VIM-1 στην κοινότητα [75], οι Tsakris *et al* [76] και Cuzon *et al* [77] αναφέρουν τα πρώτα περιστατικά *K. pneumoniae* που φέρουν το γονίδιο KPC-2 και την εμφάνιση και διασπορά τους σε ελληνικό νοσοκομείο [45]. Ακολούθησαν διάφορες μελέτες που ανέφεραν τη διασπορά των VIM και KPC-2 *K. pneumoniae* σε ελληνικά νοσοκομεία [44,51,78-81] καθώς και κλινικές μελέτες όπου αποτυπώνονταν η αξιοσημείωτη ελάττωση της ευαισθησίας των στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάση στη φωσφομυκίνη, τις αμινογλυκοσίδες, τις κινολόνες και την κολιστίνη [82,83]. Αυτή η επιδημική έξαρση φαίνεται να είναι πολυκλωνική χωρίς να επικρατεί κάποιος συγκεκριμένος κλώνος [84], ενώ ταυτόχρονα από το 2007 υπάρχει μια ταχέως εξελισσόμενη επιδημική έξαρση της *K. pneumoniae* που φέρει τα γονίδια KPC-2 και SHV-12 και ανήκει στον κλώνο ST258 [44,77]. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι το 2007, το ποσοστό στελεχών *K. pneumoniae* που ήταν ανθεκτικά στις καρβαπενέμες έφτανε στην Ελλάδα το 46%, το υψηλότερο ανάμεσα σε 33 χώρες της Ευρώπης [85]. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι τα ποσοστά των εντερικών βακτηρίων πλην της *K. pneumoniae* με ανθεκτικότητα στην ιμιπενέμη παρέμειναν χαμηλά, παρά τις περιστασιακές αναφορές για διασπορά του *bla_{VIM}* σε άλλα είδη [85]. Στις αρχές του 2010 εμφανίστηκαν και τα πρώτα στελέχη *K. pneumoniae* που συμπαραγάγουν VIM και KPC [86] ενώ την ίδια χρονική περίοδο αναφέρθηκαν και περιστατικά λοιμώξεων του ουροποιητικού από στελέχη *K. pneumoniae* ανθεκτικά στις καρβαπενέμες σε παιδιατρικούς ασθενείς και βρέφη στην κοινότητα μετά από νοσηλεία στη Μονάδα Εντατικής Νοσηλείας Νεογνών [87].

Το 2010 ξεκινάει το εθνικό σχέδιο δράσης «ΠΡΟΚΡΟΥΣΤΗΣ» από τον Ελληνικό Οργανισμό Δημόσιας Υγείας (ΕΟΔΥ) με σκοπό τη συστηματική επιτήρηση και περιορισμό του ποσοστού της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά των βακτηρίων *K.*

pneumoniae, *A. baumannii* και *P. aeruginosa* στα ελληνικά νοσοκομεία. Τρία χρόνια μετά αναφέρεται μια στασιμότητα στην αλματώδη αύξηση των ποσοστών ανθεκτικότητας της *K. pneumoniae* στις καρβαπενέμες, η οποία όμως συνοδεύτηκε από αύξηση στα ποσοστά ανθεκτικότητας στην γενταμικίνη, την κολιστίνη και την τιγκεκυκλίνη [88]. Το 2011, η Ελλάδα παραμένει πρώτη στην Ευρώπη με τα υψηλότερα ποσοστά ανθεκτικότητας στα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *Enterobacterales* με επικρατούσα την *K. pneumoniae* [89].

Οι Voulgari *et al* μελετούν για πρώτη φορά, κατά την περίοδο 2011-2012, την έξαρση κρουσμάτων *K. pneumoniae* που παράγουν OXA-48 στην Ελλάδα [90]. Ωστόσο, πολλές άλλες μελέτες την ίδια περίοδο επισημαίνουν την επικράτηση των KPC [91,92]. Μια πολυκεντρική μελέτη από το 2009 ως το 2013 αναφέρει την εμφάνιση του NDM-1 [56]. Την ίδια περίοδο, μελέτες τονίζουν τις περιορισμένες δυνατότητες στη θεραπεία των λοιμώξεων από CRE και την επακόλουθη υψηλή θνητότητα και ταυτόχρονα επισημαίνουν τη σταδιακή αύξηση της ανθεκτικότητας των μικροβίων αυτών στην κολιστίνη. Από την άλλη, ο συνδυασμός κεφταζιδίμη-αβιμπακτάμη φάνηκε να έχει αποτελέσματα έναντι των ανθεκτικών στελεχών *K. pneumoniae* [93,94]. Το 2013, ο Rolain *et al* [95] δήλωσαν ότι τα ποσοστά των CRE *K. pneumoniae* έχουν αυξηθεί σε ενδημικό ποσοστό για τη Ρουμανία, την Ιταλία και την Ελλάδα, με την Ελλάδα να έρχεται πρώτη για άλλη μία φορά.

Μεταξύ του 2014 και του 2016, οι Galani *et al* μελέτησαν 394 στελέχη *K. pneumoniae* από 15 νοσοκομεία. Τα στελέχη ήταν κυρίως KPC και ακολουθούνταν από τα NDM [96]. Κατά την περίοδο αυτή και συγκεκριμένα από τον Απρίλιο του 2014 ως το Νοέμβριο του 2015, παράλληλα με την έξαρση κρουσμάτων KPC-2 που είναι ο πιο συχνός τύπος στον Ελλαδικό χώρο, διαπιστώνεται για πρώτη φορά μια έξαρση κρουσμάτων από στελέχη *K. pneumoniae* που φέρουν το αλλήλιο KPC-9 [97]. Τα στελέχη αυτά ανευρίσκονται για πρώτη φορά στην Αιματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, ανήκουν στον κλώνο ST258 και εμπεριέχονται ως αντικείμενο μελέτης στην παρούσα διατριβή.

Κατά τη διάρκεια των 8 ετών, από 2010-2017, το EARS-Net, το Ελληνικό δίκτυο για την επιτήρηση της αντιμικροβιακής ανθεκτικότητας (WHO NET Greece) και 4 κλινικές μελέτες κατέδειξαν σημαντική μείωση στην ευαισθησία στις καρβαπενέμες και άλλα αντιβιοτικά, όπως αμπικιλίνη/σουλμπακτάμη, κολιστίνη, φωσφομυκίνη

κ.α, στελεχών *K. pneumoniae* και άλλων Gram αρνητικών παθογόνων που παράγουν καρβαπενεμάση [98-103]. Οι Papadimitriou-Olivgeris *et al* στη μελέτη που πραγματοποίησαν σε ασθενείς με σηψαιμία από *K. pneumoniae* ανθεκτική στις καρβαπενέμες διαπίστωσαν μεγαλύτερη συχνότητα παρουσίας MBL στελεχών το 2018 συγκριτικά με το 2015-2017 [100]. Μεταξύ 2016 και 2018, οι Chatzidimitriou *et al* μελέτησαν 47 στελέχη που απομονώθηκαν σε δύο νοσοκομεία και παρατήρησαν ότι το γονίδιο *bla_{KPC}* ανιχνεύτηκε σε πάνω από τα μισά στελέχη, με το *bla_{NDM}* και το *bla_{VIM}* να ακολουθούν και διαπίστωσαν ότι τα περισσότερα στελέχη ήταν ευαίσθητα στα αντιβιοτικά κεφταζιδίμη-αβιμπακτάμη και εραβακυκλίνη [98]. Από το 2003 ως το 2018 απομονώθηκε πληθώρα στελεχών της *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάση, όπως VIM, NDM-1, KPC και OXA-48 με το KPC να κυριαρχεί. Τα ποσοστά της ανθεκτικής στην καρβαπενέμη *K. pneumoniae* παρέμειναν σε ενδημικό επίπεδο και τα Βαλκάνια θεωρήθηκαν ως δεξαμενή των ανθεκτικών στελεχών [104,105]. Μέχρι το 2020 συνεχίζεται η επικράτηση των γονιδίων *bla_{KPC}* καθώς και η συμπαραγωγή περισσότερων από μία καρβαπενεμάση με αποτέλεσμα τη δημιουργία πολυανθεκτικών στελεχών [106-108]. Αναδρομικές μελέτες για την περίοδο 2010-2018 δείχνουν ότι τα στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάση παραμένουν ευαίσθητα στην τιγκεκυκλίνη [109,110]. Από το 2018 ως το 2020, διάφορες μελέτες χαρακτήρισαν μοριακά στελέχη με ανθεκτικότητα στο συνδυασμό κεφταζιδίμη-αβιμπακτάμη [111-113].

Κατά την περίοδο 2018-2022 πολυάριθμες μελέτες σε ελληνικά νοσοκομεία έδειξαν την εξάπλωση των κλώνων ST15, ST323, ST39 και ST11 της *K. pneumoniae* [114,115]. Συνδυάζοντας δεδομένα από τρεις μελέτες, οι Tryfinopoulou *et al* έδειξαν ότι υπάρχει μετατόπιση στην κατανομή των κλώνων της ανθεκτικής στις καρβαπενέμες *K. pneumoniae* με την πάροδο των ετών [116]. Τα τελευταία 10 χρόνια, οι κλώνοι ST11 και ST258/512 διαδόθηκαν ευρέως στην Ελλάδα. Το 2009 και το 2010, ο ST258/512 ήταν ο πιο συχνός κλώνος, ενώ το 2022 επικράτησε ο ST11. Τελευταία, το 2022, εμφανίστηκε ο κλώνος ST323 που φέρει το γονίδιο *bla_{KPC-2}* [116].

1.5. Ανίχνευση των εντεροβακτηριοειδών στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες στο εργαστήριο

1.5.1. Διαλογή των στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες

Η ανίχνευση των μικροοργανισμών που παράγουν καρβαπενεμάσες στο εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας αποτελεί μια εξαιρετικά σημαντική υπόθεση δεδομένου ότι καθορίζει την κατάλληλη επιλογή των θεραπευτικών αντιβιοτικών σχημάτων καθώς και των κατάλληλων μέτρων για το περιορισμό εξάπλωσης των ανθεκτικών λοιμογόνων στελεχών. Γι' αυτό το σκοπό έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι ανίχνευσης της παραγωγής καρβαπενεμασών από κλινικά στελέχη.

Αρχικά, διαλογή των στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάση μπορεί να γίνει απευθείας στα κλινικά δείγματα. Μία μέθοδος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί είναι η δοκιμασία CDC, η οποία προτάθηκε από το CDC (Centers for Disease Control and Prevention) των ΗΠΑ. Η μέθοδος αυτή σχεδιάστηκε για την ανίχνευση των στελεχών *K. pneumoniae* και *E.coli* που παράγουν καρβαπενεμάσες. Βασίζεται στον εμπλουτισμό ορθικών επιχρισμάτων σε εμπλουτιστικό ζωμό που περιέχει δίσκο των 10 µg ερταπενέμης ή μεροπενέμης και ανακαλλιέργεια σε MacConkey άγαρ, απ' όπου επιλέγονται στη συνέχεια τα στελέχη που ζυμώνουν τη λακτόζη για περαιτέρω ταυτοποίηση και έλεγχο ευαισθησίας [117]. Όμως η μέθοδος αυτή, εκτός ότι είναι χρονοβόρα και επίπονη, παρουσιάζει χαμηλή ευαισθησία και ειδικότητα [118,119]. Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια κυκλοφόρησαν χρωμογόνα θρεπτικά υλικά, όπως π.χ. τα ChromID CARBATM (bioMerieux), BrillianceTM CRE (Oxoid), Colorex KPC (Biomed Diagnostics) κτλ, τα οποία παρουσιάζουν αποδεκτή ειδικότητα και ευαισθησία που κυμαίνεται από 53-100% [120]. Ωστόσο, τα υλικά αυτά αποτυγχάνουν σε αρκετές περιπτώσεις να ανιχνεύσουν καρβαπενεμάσες με χαμηλούς ρυθμούς υδρόλυσης, όπως οι OXA-48 [121]. Επιπλέον, οι δυσκολίες στην ερμηνεία τους, ο περιορισμένος χρόνος ζωής τους και τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα σε στελέχη ESBL ή AmpC σε συνδυασμό με απώλεια πορινών αποτελούν τα κύρια μειονεκτήματά τους που εμποδίζουν την καθιέρωσή τους στην καθημερινή διαγνωστική πρακτική του εργαστηρίου [120].

Πίνακας 1.3. Τα κλινικά όρια ευαισθησίας και οι τιμές cut-off για τα *Enterobacteriaceae* που παράγουν καρβαπενεμάσες (σύμφωνα με τη μεθοδολογία της EUCAST [122]).

Καρβαπενέμη	MIC (mg/L)		Διάμετρος ζώνης (mm) διάχυσης δίσκων με δίσκους 10μg	
	S/I	Cut-off	S/I	Cut-off
Μεροπενέμη	≤2	>0,125	≥22	<28
Ερταπενέμη	≤0,5	>0,125	≥25	<25

Σε καλλιεργήματα βακτηρίων, η διαλογή των πιθανών στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάση βασίζεται αρχικά στα αποτελέσματα του ελέγχου ευαισθησίας που πραγματοποιείται είτε με αυτοματοποιημένα συστήματα ή με δοκιμασίες διάχυσης δίσκων. Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες των CLSI και EUCAST, ο προσδιορισμός της MIC (Minimum Inhibitory Concentration, mg/L) αρκεί για τη λήψη θεραπευτικών αποφάσεων. Κάποιοι μηχανισμοί ανθεκτικότητας που ανιχνεύονται μέσω ειδικών δοκιμασιών δεν οδηγούν πάντα σε ανθεκτικότητα κλινικής σημασίας και συνεπώς η ανίχνευση αυτή πραγματοποιείται μόνο για επιδημιολογικούς λόγους. Η EUCAST πρότεινε τιμές cut-off για τη μεροπενέμη και την ερταπενέμη (Πίνακας 1.3) για την ανίχνευση μηχανισμών αντοχής κλινικής ή/και επιδημιολογικής σημασίας [122]. Ειδικότερα, η μεροπενέμη αποτελεί για την EUCAST το αντιβιοτικό με την καλύτερη συσχέτιση μεταξύ ευαισθησίας και ειδικότητας. Η ερταπενέμη είναι η πιο ευαίσθητη καρβαπενέμη, αλλά έχει χαμηλή ειδικότητα σε είδη όπως το *Enterobacter spp*, λόγω της αστάθειας που παρουσιάζει στις ESBL και τις AmpC β-λακταμάσες σε συνδυασμό με απώλεια πορινών. Η ιμιπενέμη δεν θεωρείται αξιόπιστη και δεν προτείνεται πλέον από την EUCAST ως αντιβιοτικό διαλογής για τα στελέχη που παράγουν καρβαπενεμάσες. Όπως προτείνεται από την EUCAST, τα στελέχη με ζώνη αναστολής 25-27 mm πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω για παραγωγή καρβαπενεμάσης, μόνο αν παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη και/ή τεμοκιλλίνη. Ειδικότερα η υψηλή ανθεκτικότητα στην τεμοκιλλίνη (MIC >128 mg/l) θεωρείται φαινοτυπικός δείκτης των

β-λακταμασών τύπου OXA-48. Ωστόσο, επειδή υπάρχουν κι άλλοι μηχανισμοί ανθεκτικότητας που μπορεί να οδηγήσουν σε αυτό τον φαινότυπο, η παρουσία των ενζύμων τύπου OXA-48 πρέπει να επιβεβαιωθεί και με άλλες μεθόδους [122].

Τα πιο συνηθισμένα αυτοματοποιημένα συστήματα που χρησιμοποιούνται σήμερα [Vitek 2 (bioMerieux), Phoenix (BD Diagnostics) and Micro-Scan (Siemens)] μπορεί να μην ανιχνεύσουν αξιόπιστα όλους τους τύπους των καρβαπενεμασών [123]. Επίσης, ενδιάμεση ευαισθησία ή ακόμα και ευαισθησία στις καρβαπενέμες έχει παρατηρηθεί για όλους τους τύπους καρβαπενεμασών [124]. Αυτό το φαινόμενο παρατηρείται πιο συχνά με τις καρβαπενεμάσες τύπου OXA-48/OXA-181 [125]. Τέλος, θα πρέπει να υπογραμμιστεί ότι ο προσδιορισμός των MIC των καρβαπενεμών σε μικροοργανισμούς που παράγουν KPC ή MBL μπορεί να παρουσιάσει προβλήματα. Υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν ασυμφωνία και μικρή αναπαραγωγισιμότητα μεταξύ των αποτελεσμάτων για τις περισσότερες από τις συμβατικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται. Εν μέρει, τα προβλήματα αυτά μπορεί να οφείλονται στην επίδραση του πυκνού εναιωρήματος και στις χαμηλές MIC που παρατηρούνται γι' αυτές τις β-λακταμάσες στα *Enterobacteriaceae*. Συνεπώς, απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή κατά την παρασκευή του βακτηριακού εναιωρήματος ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιούνται αυτοματοποιημένα συστήματα. Από την άλλη, ο ενοφθαλμισμός μικρότερης ποσότητας βακτηρίου αποτελεί πιθανή αιτία ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων στην ανίχνευση των KPC β-λακταμασών. Όσον αφορά τις μεθόδους διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιβιοτικών όπως είναι τα E-test, έχουν παρατηρηθεί ασυμφωνίες στα αποτελέσματα, ενώ δεν θεωρούνται κατάλληλες για βακτήρια που παράγουν KPC, τα οποία λόγω της ετερογενούς ανάπτυξής τους δυσχεραίνουν την ερμηνεία τους. Οι μέθοδοι μικροαραίωσης ζωμού και διάχυσης δίσκων θεωρούνται οι πιο αξιόπιστες για την ανίχνευση ανθεκτικότητας προερχόμενη από όλους τους τύπους των καρβαπενεμασών [126].

Η ασυμφωνία που υπάρχει μεταξύ των κατευθυντήριων οδηγιών των CLSI και EUCAST καθώς και το γεγονός ότι οι MIC των καρβαπενεμών σε στελέχη που παράγουν καρβαπενεμάση είναι σε κάποιες περιπτώσεις κάτω από τις τιμές cut-off, επηρεάζουν αρνητικά την αρχική αυτή διαδικασία της διαλογής. Γι' αυτό, αν οποιοδήποτε εντεροβακτηριακό στέλεχος παρουσιάζει χαμηλή ευαισθησία στις καρβαπενέμες θα πρέπει να μελετάται περαιτέρω [120]. Το επόμενο βήμα μετά τη

διαδικασία της διαλογής είναι η διενέργεια των κατάλληλων φαινοτυπικών δοκιμασιών [122].

1.5.2. Φαινοτυπικές δοκιμασίες ανίχνευσης καρβαπενεμασών

1.5.2.1. Μέθοδοι που βασίζονται στη χρήση αναστολέα

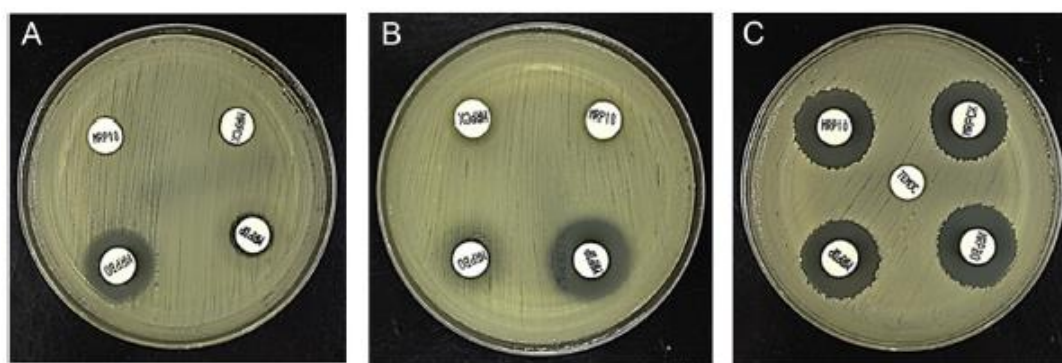
Αυτές οι μέθοδοι βασίζονται στην ικανότητα συγκεκριμένων ενώσεων, όπως το αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA), το διπικολινικό οξύ (DPA) και το φαινυλβορονικό οξύ (PBA), να αναστέλλουν με ειδικό τρόπο τις καρβαπενεμάσες. Έτσι, οι καρβαπενεμάσες MBL αναστέλλονται από τα EDTA και DPA (χηλικά αντιδραστήρια), ενώ το PBA αναστέλλει τα ένζυμα KPC [127,128]. Λαμβάνοντας υπόψη ότι το PBA αναστέλλει επίσης και άλλες β-λακταμάσες όπως οι AmpC, χρησιμοποιείται η κλοξακιλλίνη, η οποία αναστέλλει τις AmpC χωρίς να δρα έναντι των KPC και άλλων τάξης A καρβαπενεμασών, για τη διαφοροποίηση των KPC από τις AmpC [129].

Η χρήση δίσκου τεμοκιλλίνης έχει προταθεί ως αντιπροσωπευτικός δείκτης για τα OXA-48 και τις παραλλαγές τους. Ανθεκτικότητα στην τεμοκιλλίνη παρατηρείται και σε μικροοργανισμούς που παράγουν MBL, KPC ή που μπορεί να μην έχουν και καθόλου καρβαπενεμάση. Επειδή όμως οι OXA-48 προσδίδουν υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητα στην τεμοκιλλίνη, τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη που δεν παρουσιάζουν αναστολή από το PBA ή το DPA και έχουν ζώνη αναστολής για την τεμοκιλλίνη ≤ 11 mm (απουσία ζώνης αναστολής) ή MIC ≥ 128 mg/L θεωρούνται πιθανά για παραγωγή OXA-48 [122].

Οι μέθοδοι που βασίζονται σε αναστολείς όχι μόνο επιβεβαιώνουν την ύπαρξη καρβαπενεμασών αλλά επίσης προσφέρουν τη δυνατότητα της διάκρισης μεταξύ των τάξεων των καρβαπενεμασών. Επιπλέον, αυτές οι δοκιμασίες χαρακτηρίζονται για την ευκολία στη χρήση και το μικρό τους κόστος. Ωστόσο, τα αποτελέσματα είναι διαθέσιμα μετά από 24 ώρες και η ερμηνεία τους είναι κάποιες φορές δύσκολη και αμφισβητήσιμη έτσι ώστε να απαιτούνται επιπλέον δοκιμασίες για επιβεβαίωση.

1.5.2.1.1. Μέθοδος συνδυασμού δίσκων (CDT)

Η διαφορά στη διάμετρο της ζώνης αναστολής ενός δίσκου καρβαπενέμης (συνήθως μεροπενέμης ή ιμιπενέμης) σε σύγκριση με την αντίστοιχη ζώνη ενός δίσκου που περιέχει συνδυασμό καρβαπενέμης με έναν αναστολέα μετριέται σε χιλιοστά μετά από επώαση με το υπό δοκιμασία εντεροβακτηριακό στέλεχος. Υπάρχουν διαθέσιμα εμπορικά αντιδραστήρια, όπως το KPC+MBL ID kit (Rosco Diagnostics) και το MASTDISCS™ ID (MAST Diagnostics), για τα οποία τα κριτήρια ερμηνείας για τη διαφορά στις ζώνες αναστολής έχουν προτυποποιηθεί από τον κατασκευαστή (Σχήμα 1.7). Οι μέθοδοι αυτές παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία (90-100%) και ειδικότητα (96-100%) για τα *Enterobacteriaceae*, ειδικά για την ανίχνευση των καρβαπενεμασών τάξης A [120].



Σχήμα 1.7. Αποτελέσματα του φαινοτυπικού τεστ KPC+MBL ID kit (Rosco Diagnostica, Denmark). Α) *K. pneumoniae* που παράγει KPC: Το PBA προκαλεί αύξηση >4 mm στη ζώνη αναστολής της μεροπενέμης, Β) *K. pneumoniae* που παράγει NDM: Το DPA προκαλεί αύξηση >5 mm στη ζώνη αναστολής της μεροπενέμης, Γ) *K. pneumoniae* που παράγει OXA-48: Καμία συνέργεια με το PBA και/ή το DPA και η ζώνη αναστολής της τεμοκιλλίνης είναι <10 mm. Περιεχόμενο δίσκων: MPM10: μεροπενέμη 10 µg, MPMCX: μεροπενέμη 10 µg + κλοξακιλλίνη, MRPBO: μεροπενέμη 10 µg + βορονικό οξύ, MRPDP: μεροπενέμη 10 µg + διπικολινικό οξύ, TEMOC: τεμοκιλλίνη 30 µg [120].

Πίνακας 1.4. Ερμηνεία των φαινοτυπικών δοκιμασιών με μεθόδους διάχυσης δίσκων [122].

β-λακταμάση	Συνέργεια που παρατηρείται ως αύξηση στη διάμετρο της ζώνης αναστολής (mm) σε ένα δίσκο μεροπενέμης 10 μg				Τεμοκιλλίνη MIC>128 mg/L ή διάμετρος ζώνης αναστολής <11 mm
	DPA/EDTA	APBA/PBA	DPA+APBA	CLX	
MBL	+	-	-	-	Ποικίλλει ¹
KPC	-	+	-	-	Ποικίλλει ¹
MBL+KPC²	Ποικίλλει	Ποικίλλει	+	-	Ποικίλλει ¹
OXA-48-like	-	-	-	-	Ναι
AmpC+απώλεια πορινών	-	+	-	+	Ποικίλλει ¹
ESBL+απώλεια πορινών	-	-	-	-	Όχι

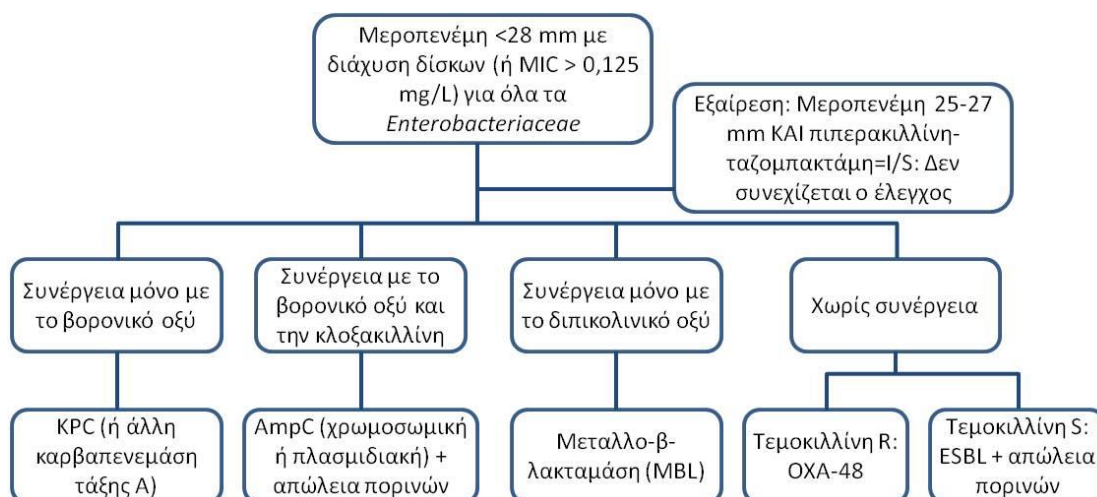
Συντομογραφίες: MBL=metallo-β-lactamase, KPC=*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase,

DPA=διπικολινικό οξύ, EDTA=αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ, APBA=αμινοφαινυλβορονικό οξύ,

PBA=φαινυλβορονικό οξύ, CLX=κλοξακιλλίνη.

¹ Το τεστ ευαισθησίας στην τεμοκιλλίνη συστήνεται μόνο σε περιπτώσεις που δεν παρατηρείται συνέργεια για τη διαφοροποίηση ανάμεσα στα ESBL+απώλεια πορινών και στα ένζυμα OXA-48-like.

² Υπάρχει μια εργασία που υποστηρίζει τη χρήση εμπορικών ταμπλετών που περιέχουν διπλούς αναστολείς (DPA ή EDTA συν APBA ή PBA) [130] αλλά δεν έχει ακόμα επιβεβαιωθεί από πολυκεντρικές μελέτες. Ο συνδυασμός αυτός προσδίδει υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητα στις καρβαπενέμες και είναι σπάνιος εκτός Ελλάδας.



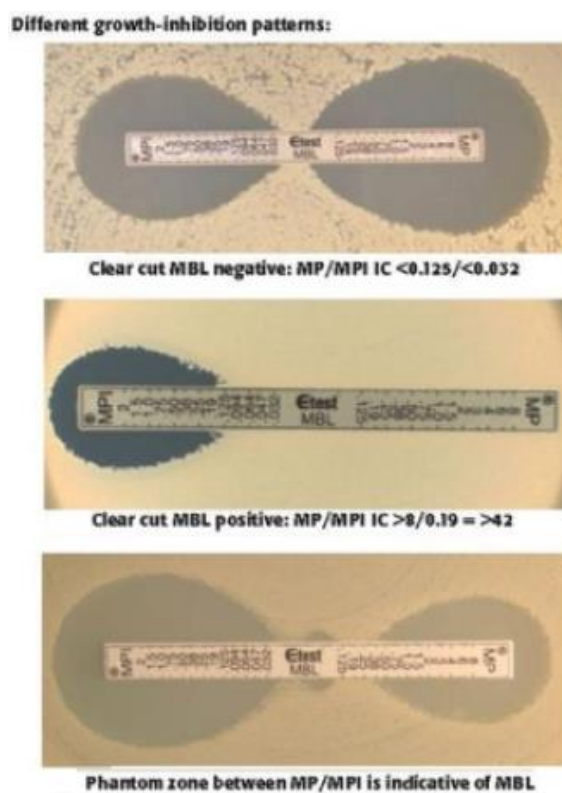
Σχήμα 1.8. Αλγόριθμος ανίχνευσης των καρβαπενεμασών [122].

Η ερμηνεία αυτών των δοκιμασιών βασίζεται στην αρχή ότι οι καρβαπενεμάσες τύπου Α αναστέλλονται από το βορονικό οξύ (PBA) και οι τύπου Β αναστέλλονται από το διπικολινικό οξύ (DPA) και το EDTA. Η κλοξακιλλίνη, η οποία αναστέλλει τις β-λακταμάσες AmpC, προστίθεται για τη διάκριση μεταξύ της υπερπαραγωγής AmpC σε συνδυασμό με απώλεια πορινών από την παραγωγή καρβαπενεμάσης. Συνέργεια μπορεί να μην έχουμε και στην περίπτωση που έχουμε συνδυασμό διαφορετικών καρβαπενεμασών π.χ KPC και MBL. Στην περίπτωση αυτή απαιτείται μοριακός έλεγχος. Ο αλγόριθμος για την ερμηνεία αυτών των τεστ συνοψίζεται στον Πίνακα 1.4 και στο Σχήμα 1.8 [122].

1.5.2.1.2. Ταινίες βαθμιδωτής διάχυσης

Έχουν σχεδιαστεί διάφορα είδη ταινιών βαθμιδωτής διάχυσης (ή διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιβιοτικού) για την ανίχνευση των καρβαπενεμασών, ειδικότερα για MBL. Βασίζονται στο συνδυασμό μιας β-λακτάμης και β-λακτάμης/αναστολέα β-λακταμάσης (είτε EDTA για MBL ή βορονικό οξύ για KPC). Οι ταινίες Etest® MBL IP/IPI (bioMérieux) περιέχουν ένα εύρος επτά αραιώσεων ιμιπενέμης (4-256 µg/ml) και ιμιπενέμη (1-64 µg/ml) συνδυασμένη με σταθερή συγκέντρωση EDTA. Οι ταινίες MBL MP/MPI (bioMérieux) (Σχήμα 1.9) περιέχουν αυξανόμενες συγκεντρώσεις μεροπενέμης (0,125-8 µg/ml) στο ένα άκρο

και μεροπενέμη (0,032-2 µg/ml) με EDTA (σταθερή συγκέντρωση) στο άλλο άκρο. Η MIC διαβάζεται στο κάθε άκρο της ταινίας μετά από επώαση 18-24 ώρες στους 35 °C. Σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, η ελάττωση της MIC της καρβαπενέμης κατά 3 αραιώσεις παρουσία του αναστολέα ή η παρουσία παραμορφωμένης έλλειψης στην πλευρά IPI ή MPI της ταινίας, ερμηνεύονται ως θετικό για MBL (Σχήμα 1.9). Οι ταινίες μεροπενέμης έχουν αποδειχθεί πιο αποτελεσματικές από τις αντίστοιχες της ιμιπενέμης για την ανίχνευση των στελεχών που παράγουν ένζυμα MBL. Οι μέχρι σήμερα μελέτες που αξιολογούν την αποτελεσματικότητα των ταινιών αυτών αναφέρουν υψηλή ευαισθησία (82-94%) και ειδικότητα (97-100%). Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση για να επιβεβαιωθεί η αποτελεσματικότητά τους [120].

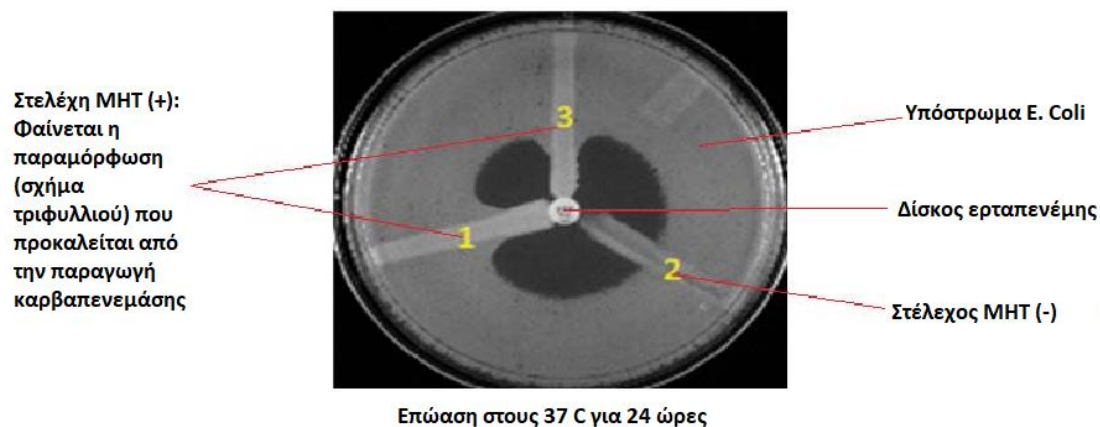


Σχήμα 1.9. Ερμηνεία των ταινιών Etest® MBL MP/MPI (BioMerieux) μετά από επώαση με το υπό διερεύνηση ανθεκτικό στέλεχος που παράγει καρβαπενεμάση (φωτο: Από το επίσημο site της BioMerieux: www.biomerieux-diagnostics.com).

1.5.2.2. Μέθοδοι που βασίζονται στην υδρόλυση/απενεργοποίηση καρβαπενέμης

1.5.2.2.1. Τροποποιημένο Hodge τεστ (Modified Hodge Test, MHT)

Το MHT είναι μια τροποποιημένη εκδοχή του Hodge τεστ που περιγράφηκε από τους Hodge *et al* για την ανίχνευση των στελεχών *Neisseria gonorrhoeae* που παράγουν πενικιλινάση [131] και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση καρβαπενεμασών σύμφωνα με τις οδηγίες του CLSI [132]. Η δοκιμασία συνίσταται στον ενοφθαλμισμό του υπό διερεύνηση στελέχους με τη μορφή γραμμής κοντά σε ένα δίσκο ερταπενέμης ή μεροπενέμης, ο οποίος έχει τοποθετηθεί σε ένα τρυβλίο ενοφθαμισμένο με ευαίσθητο στις καρβαπενέμες μικροοργανισμό (*E. coli* ATCC 25922). Μετά από επώαση, η παρουσία παραμορφωμένης ζώνης αναστολής (σχήμα τριφυλλιού, Σχήμα 1.10) ερμηνεύεται ως θετικό αποτέλεσμα. Το CLSI προτείνει ως θετικό control της μεθόδου ένα στέλεχος που παράγει καρβαπενεμάση τύπου KPC (*Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705) [132].



Σχήμα 1.10. Τροποποιημένο Hodge test όπου φαίνεται το αποτέλεσμα από στέλεχος που δεν παράγει καρβαπενεμάση (2) και από στελέχη που παράγουν καρβαπενεμάση (1 και 3).

Έχει διαπιστωθεί ότι το MHT παρουσιάζει σημαντικά μειονεκτήματα:

- α) δεν ξεχωρίζει τους διαφορετικούς τύπους των καρβαπενεμασών,
- β) κάποιες φορές είναι δύσκολη η ερμηνεία των αποτελεσμάτων,

- γ) είναι χρονοβόρο (απαιτεί τουλάχιστον 24-48 ώρες),
- δ) έχει χαμηλή ειδικότητα, με ψευδώς θετικά αποτελέσματα για στελέχη με υπερέκφραση AmpC ή ESBL (CTX-M), και
- ε) έχει χαμηλή ευαισθησία, με ασθενή ανίχνευση των NDM.

Γι' αυτό συστήνεται τα θετικά ή διφορούμενα αποτελέσματα να επιβεβαιώνονται με περαιτέρω δοκιμασίες, ιδιαίτερα σε περιοχές όπου αφθονούν τα στελέχη που παράγουν ESBL [120].

Ως συνέπεια της περιορισμένης απόδοσης αυτής της δοκιμασίας, προτάθηκαν τροποποιήσεις, όπως η προσθήκη $ZnSO_4$ [133] ή κλοξακιλλίνης [134] στο άγαρ. Οι Pasteran *et al* διαπίστωσαν ότι η προσθήκη του Triton X-100 (μη ιονικός επιφανειακός δρων παράγοντας) βελτιώνει την ανίχνευση των καρβαπενεμασών NDM-1, επειδή η ουσία αυτή διαλύει τις μεμβρανικές λιποπρωτεΐνες κι επομένως και τις δεσμευμένες στη μεμβράνη καρβαπενεμάσες, όπως είναι τα ένζυμα NDM. Η βελτιωμένη έκδοση του MHT ονομάστηκε Triton Hodge Test (THT) [135].

Λόγω της μειωμένης ευαισθησίας και ειδικότητας του MHT, αλλά και της δυσκολίας χρήσης των προτεινόμενων τροποποιήσεών του, οι οποίες δεν φαίνεται να λύνουν όλα τα προβλήματα, η EUCAST δεν προτείνει τη χρήση του [122].

1.5.2.2.2. Χρωματομετρικές (βιοχημικές) μέθοδοι

Οι χρωματομετρικές μέθοδοι βασίζονται στην ενζυματική υδρόλυση του β-λακταμικού δακτυλίου μιας καρβαπενέμης παρουσία της καρβαπενεμάσης, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση του pH που με τη σειρά της οδηγεί στη χρωματική αλλαγή ενός πεχαμετρικού δείκτη (είτε ερυθρό της φαινόλης για το CarbaNP ή κυανό της βρωμοθυμόλης για το Blue-CARBA) [120].

Τα κυριότερα πλεονεκτήματα αυτών των μεθόδων είναι η ταχύτητα, δίνουν αποτέλεσμα σε χρόνο <2 ώρες, η απλότητα και η ευκολία στη χρήση. Επιπλέον, έχει αναφερθεί η δυνατότητα εφαρμογής του τεστ απευθείας στις αιμοκαλλιέργειες. Εν τούτοις, απαιτείται μια εμπειρία στην ανάγνωση και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων για τη διαπίστωση της όχι πάντα εμφανούς χρωματικής αλλαγής [120].

Διάφορα εμπορικά κιτ κυκλοφορούν στην αγορά, όπως τα RAPIDEC® CARBA-NP (bioMérieux), Rapid CARB Screen (Pro Lab Diagnostics Inc), Neo-Rapid CARB (BioConnections), Rapid CARB Blue kit (Rosco Diagnostica) και β CARBA test™ (BIO-RAD).

Μελέτες αξιολόγησης του Carba-NP αναφέρουν ειδικότητα 100% και ευαισθησία 90-100% για την ανίχνευση καρβαπενεμάσης στα *Enterobacteriaceae*. Ωστόσο διαπιστώθηκε μη ικανοποιητική ανίχνευση καρβαπενεμασών με μικρή ικανότητα υδρόλυσης, όπως οι OXA-48 και οι GES-5. Επιπλέον, ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα βρέθηκαν για βλενώδη στελέχη λόγω ατελούς βακτηριακής λύσης [120]. Από την άλλη, στο Blue-CARBA γίνεται απευθείας ενοφθαλμισμός βακτηριακών αποικιών χωρίς να προηγείται λύση των κυττάρων. Μια πρώτη αξιολόγηση του Blue-CARBA έδειξε υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα για τα ένζυμα τάξεως A και B αλλά μη ικανοποιητική ευαισθησία για την ανίχνευση των OXA-48 [122].

1.5.2.2.3. Μέθοδος αναστολής καρβαπενέμης (Carbapenem Inhibition Method, CIM)

Η μέθοδος αυτή συνίσταται στην εμβάπτιση ενός δίσκου μεροπενέμης (10 µg) σε ένα εναιώρημα του υπό εξέταση εντεροβακτηριακού στελέχους. Αν το στέλεχος αυτό παράγει καρβαπενεμάση, το αποτέλεσμα είναι η απενεργοποίηση του αντιβιοτικού, επιτρέποντας την πλήρη ανάπτυξη ενός ευαίσθητου στελέχους (*E. coli* ATCC 29522) μετά από επώαση όλη νύχτα. Από την άλλη, η εμφάνιση ζώνης αναστολής ≥ 20 mm είναι ενδεικτική της απουσίας καρβαπενεμάσης στο εξεταζόμενο στέλεχος.

Μελέτες έδειξαν ότι η μέθοδος αυτή παρουσιάζει ευαισθησία 98-100% και ειδικότητα 100% και ανιχνεύει όλα τα στελέχη που παράγουν KPC, NDM, VIM, IMP ή OXA-48, ακόμα κι αν παρουσίαζαν χαμηλές MIC για τις καρβαπενέμες. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή αποτυγχάνει να ανιχνεύσει μερικά στελέχη που παράγουν καρβαπενεμάσες GES-6, πιθανότατα λόγω της χαμηλής υδρολυτικής ικανότητας αυτών των καρβαπενεμασών. Στα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου συγκαταλέγονται το χαμηλό κόστος και η ευκολία στην ερμηνεία των

αποτελεσμάτων, ενώ στα μειονεκτήματα η αδυναμία ανίχνευσης των καρβαπενεμασών GES-6 καθώς και ο χρόνος, τουλάχιστον 18 ωρών, που απαιτείται για την ανάγνωση των αποτελεσμάτων [120,122].

1.5.2.2.4. Μέθοδος αμύλου-ιωδίου

Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει ταινίες εμποτισμένες με ιμιπενέμη και άμυλο, οι οποίες ενοφθαλμίζονται με το υπό εξέταση στέλεχος και επωάζονται για 10 λεπτά. Στο επόμενο βήμα, προστίθεται διάλυμα ιωδίου και ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η αλλαγή χρώματος από σκούρο σε διαυγές είναι ενδεικτική της παρουσίας καρβαπενεμάσης. Έχει αναφερθεί ευαισθησία και ειδικότητα 100% για την ανίχνευση εντεροβακτηριοειδών στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες KPC. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για τη χρησιμότητα της μεθόδου αυτής και για την ανίχνευση άλλων τύπων καρβαπενεμασών [120].

1.5.2.2.5. Φασματοφωτομετρικές μέθοδοι

Οι φασματοφωτομετρικές τεχνικές, κυρίως η φασματοφωτομετρία υπεριώδους (UV) και μάζας (MS) χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο για την ανίχνευση βακτηρίων που παράγουν καρβαπενεμάση.

1.5.2.2.5.1. Φασματοφωτομετρία υπεριώδους (UV)

Η μέθοδος αυτή θεωρείται από πολλούς συγγραφείς ως μέθοδος αναφοράς για την ανίχνευση της καρβαπενεμάσης σε μικροοργανισμούς που υπάρχει υποψία παραγωγής της. Για την ανίχνευση της καρβαπενεμάσης συνήθως ένα βακτηριακό εναιώρημα προστίθεται σε ρυθμιστικό διάλυμα καρβαπενέμης (ιμιπενέμης) και η υδρόλυση του β-λακταμικού δακτυλίου μετρείται στο φάσμα UV [136]. Ο τύπος του ενζύμου προκύπτει από τα δεδομένα της υδρόλυσης παρουσία ή απουσία αναστολέων [120]. Οι Bernabeu *et al* περιέγραψαν μια φασματοφωτομετρική μέθοδο UV, η οποία βασίζεται στην ανάλυση της υδρόλυσης της ιμιπενέμης με ευαισθησία 100% και ειδικότητα 98,5% [137]. Οι Dortet *et al* σε μια άλλη μελέτη παρουσιάζουν ευαισθησία και ειδικότητα της μεθόδου 100% [138]. Η ανάγκη ειδικού

εξοπλισμού (φασματοφωτόμετρο UV) καθώς και ειδικής εκπαίδευσης χειρισμού αυτών των μηχανημάτων αποτελούν σημαντικούς περιορισμούς για τη χρήση αυτής της μεθόδου [120].

1.5.2.2.5.2. Φασματομετρία μάζας

Η φασματομετρία μάζας MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry) βασίζεται στην ανάλυση του φάσματος των προϊόντων αποδόμησης της καρβαπενέμης μετά από ενζυματική υδρόλυση από το βακτήριο υπό μελέτη. Η εφαρμογή της μεθόδου αυτής έχει αναφερθεί από το 2011 με καλά αποτελέσματα. Έχουν περιγραφεί διάφορα πρωτόκολλα, αλλά δεν υπάρχει ακόμα διαθέσιμο ένα προτυποποιημένο. Διάφορες μελέτες έδειξαν ευαισθησία που κυμαίνεται από 77-100% και ειδικότητα 94-100%. Ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα παρατηρούνται για τα OXA-48 [120]. Οι Paragiannitsis *et al* έδειξαν ότι η προσθήκη NH_4HCO_3 βελτιώνει την ευαισθησία στην ανίχνευση των OXA-48 (98% από 77%) [139].

Παρόλο που η μέθοδος αυτή είναι ταχεία (περίπου 4 ώρες) και έχει μικρό κόστος, τα κυριότερα μειονεκτήματα που παρουσιάζει είναι τα εξής: α) στις περισσότερες μελέτες δεν παρέχονται οδηγίες ως προς τον προσδιορισμό του τύπου της καρβαπενεμάσης, β) υπάρχει ένα στάδιο επώασης που παρατείνει το χρόνο και γ) απαιτείται ειδικός εξοπλισμός, ειδικά διαμορφωμένο λογισμικό και εκπαιδευμένο προσωπικό για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων [120].

1.5.2.2.6. Ηλεκτροχημική μέθοδος

Οι Bogaerts *et al* ανέπτυξαν μια νέα ηλεκτροχημική μέθοδος για την ανίχνευση των εντεροβακτηριοειδών που παράγουν καρβαπενεμάση, το BYE Carba test (Bogaerts-Yunus-Glupczynski). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ανίχνευση διακυμάνσεων στην αγωγιμότητα ενός ηλεκτροδίου που είναι ευαίσθητο σε μεταβολές στο pH και στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό που συνοδεύουν την υδρόλυση της ιμιπενέμης από μια καρβαπενεμάση. Οι διακυμάνσεις της ηλεκτροχημικής αντίστασης μετρώνται και τα αποτελέσματα αποτυπώνονται σε καμπύλες. Το BYE Carba test ανιχνεύει την παρουσία των καρβαπενεμασών σε

λιγότερο από 35 λεπτά. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, το BYE Carba test παρουσιάζει ευαισθησία 95% και ειδικότητα 100% [140].

1.5.2.3. Ανοσοχρωματογραφικές μέθοδοι

Οι ανοσοχρωματογραφικές μέθοδοι βασίζονται στην αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος και έχουν εμπορευματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια με σκοπό την εύκολη και ταχεία (<20 min) ανίχνευση συγκεκριμένων καρβαπενεμασών.

Οι πρώτες αξιολογήσεις των δοκιμασιών αυτών έδειξαν πολύ καλά αποτελέσματα. Οι Notake *et al* βρήκαν ευαισθησία και ειδικότητα της τάξεως του 100% στην ανίχνευση διαφορετικών τύπων ενζύμων MBL τύπου IMP χρησιμοποιώντας το IMP MBL IC assay Kit (Quick Chaser IMP) [141]. Οι Glupczynski *et al* διαπίστωσαν επίσης πολύ καλά αποτελέσματα στην ανίχνευση των KPC και OXA-48 καρβαπενεμασών χρησιμοποιώντας τα τεστ OXA-48-K-SeT® και KPC-K-SeT® (Coris BioConcept). Επιπλέον κατέληξαν ότι το τεστ για OXA-48 ανιχνεύει σωστά διαφορετικές καρβαπενεμάσες OXA-48-like, αλλά όχι στελέχη OXA-48 χωρίς δράση καρβαπενεμάσης [142].



Σχήμα 1.11. Νεότερες ανοσοχρωματογραφικές δοκιμασίες πολλαπλής ταυτόχρονης ανίχνευσης καρβαπενεμασών. Αριστερά: Το Resist-5 O.O.K.N.V. από την Coris BioConcept που ανιχνεύει OXA-48, OXA-163, KPC, NDM και VIM. Δεξιά: Το NG-Test Carba 5 από την NG Biotech που ανιχνεύει KPC, OXA, VIM, NDM και VIM.

Τα τελευταία χρόνια έκαναν την εμφάνισή τους ανοσοχρωματογραφικές δοκιμασίες με ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών (multiplex) ειδών καρβαπενεμασών απευθείας από στελέχη ή αιμοκαλλιέργεια. Τέτοια είναι το Resist-5 O.O.K.N.V. από την Coris BioConcept και το NG-Test Carba 5 από την NG Biotech (Σχήμα 1.11). Από μελέτες που αξιολόγησαν τις αποδόσεις των δοκιμασιών αυτών στην ανίχνευση καρβαπενεμασών προκύπτει ότι το Resist-4 O.O.K.N.V. παρουσιάζει μειωμένη ευαισθησία στην ανίχνευση των NDM καρβαπενεμασών [143,144]. Από την άλλη, το Carba 5 παρουσίασε μειωμένη ευαισθησία σε στελέχη που συμπαράγουν NDM και OXA [144].

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι όλες οι ανοσοχρωματογραφικές μέθοδοι ανιχνεύουν γνωστές καρβαπενεμάσες ή μικρές παραλλαγές τους που ανήκουν στις συγκεκριμένες οικογένειες που αναζητούνται. Νεοεμφανιζόμενες παραλλαγές των γνωστών ενζύμων μπορεί να μην ανιχνευτούν αξιόπιστα, και εννοείται ότι καρβαπενεμάσες που δεν ανήκουν στις οικογένειες καρβαπενεμασών που αποτελούν τον στόχο μιας συγκεκριμένης δοκιμασίας δεν θα ανιχνευτούν. Η ευαισθησία μιας ανοσοχρωματογραφικής μεθόδου για την ανίχνευση της παρουσίας καρβαπενεμάσης σε ένα βακτηριακό στέλεχος μπορεί να βελτιωθεί και να φτάσει στο 100% αν συνδυαστεί και με μια άλλη μέθοδο π.χ. zCIM (Carbapenem Inactivation Method τροποποιημένη με προσθήκη ψευδαργύρου) [144].

1.5.3. Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης των καρβαπενεμασών

Οι μοριακές τεχνικές αποτελούν ακόμα το gold standard και θεωρούνται πιο αξιόπιστες από τις φαινοτυπικές μεθόδους στην ανίχνευση των εντεροβακτηριακών στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες. Οι τεχνικές αυτές περιλαμβάνουν τις μεθόδους που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ή PCR (Polymerase Chain Reaction), τεχνικές που βασίζονται στην υβριδοποίηση και το WGS (Whole Genome Sequencing).

1.5.3.1. Μέθοδοι που βασίζονται στην PCR

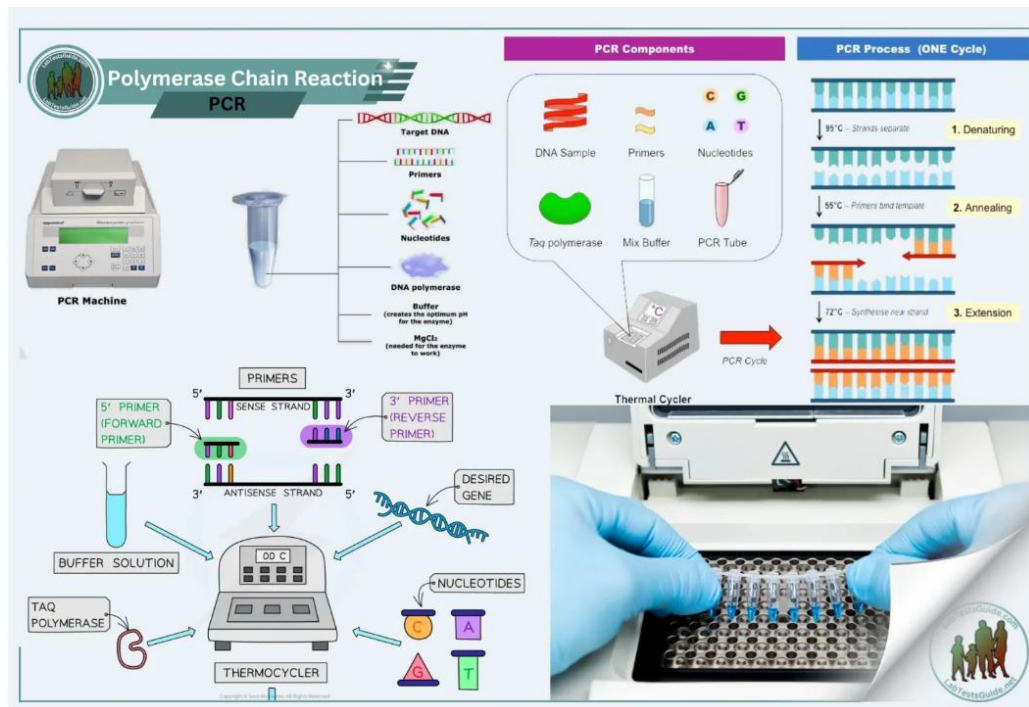
Η PCR είναι μια απλή, ενζυματική μέθοδος, η οποία επιτρέπει την ανίχνευση και ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA, το οποίο μπορεί να προέρχεται από διάφορα βιολογικά υλικά, ιστούς και οργανισμούς, όπως είναι το περιφερικό αίμα, το δέρμα, οι τρίχες, η σίελος και τα μικρόβια. Αρκούν ίχνη DNA για να παραχθεί αρκετή ποσότητα, επαρκής για ανάλυση με τις συμβατικές εργαστηριακές μεθόδους. Γι' αυτό το λόγο, η PCR θεωρείται μια ευαίσθητη μέθοδος [145].

Η μέθοδος της PCR απαιτεί την παρουσία του εκμαγείου DNA, των εκκινητών (primers), των νουκλεοτιδίων και της DNA πολυμεράσης. Η DNA πολυμεράση είναι το ένζυμο το οποίο απαιτείται για τη σύνδεση των νουκλεοτιδίων μεταξύ τους ώστε να σχηματιστεί το τελικό προϊόν της PCR. Τα νουκλεοτίδια περιλαμβάνουν τις τέσσερις βάσεις: αδενίνη, θυμίνη, κυτοσίνη και γουανίνη (A,T,C, G) που βρίσκονται στο DNA. Οι εκκινητές είναι μικρά τμήματα DNA με προκαθορισμένη αλληλουχία συμπληρωματική ως προς το DNA-στόχο και αποτελούν το σημείο έναρξης από το οποίο ξεκινά η DNA πολυμεράση να επεκτείνει την αλυσίδα του τελικού προϊόντος. Το μέγεθος των εκκινητών κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 10 και 30 νουκλεοτιδίων ώστε να επιτευχθεί επαρκής ειδικότητα ως προς την υβριδοποίηση των αλληλουχιών DNA που μας ενδιαφέρει [146]. Το μίγμα όλων αυτών τοποθετείται στον θερμικό κυκλοποιητή που επιτρέπει την πραγματοποίηση επαναλαμβανόμενων κύκλων ενίσχυσης του DNA σε τρία βασικά βήματα, της αποδιάταξης του DNA, του υβριδισμού των εκκινητών και της επέκτασης του νεοσχηματιζόμενου μορίου. Στον κυκλοποιητή αυξομειώνεται η θερμοκρασία σε διακριτά, ακριβή, προγραμματισμένα βήματα. Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται αρχικά πάνω από το σημείο τήξεως των δύο συμπληρωματικών αλυσίδων DNA του DNA-στόχου, με αποτέλεσμα το διαχωρισμό των αλυσίδων του (αποδιάταξη). Στη συνέχεια, η θερμοκρασία ελαττώνεται για να επιτρέψει τη σύνδεση των εκκινητών στα τμήματα-στόχους του DNA, μια διαδικασία που ονομάζεται υβριδοποίηση. Η υβριδοποίηση μεταξύ εκκινητών και DNA στόχου πραγματοποιείται μόνο εφόσον πρόκειται για συμπληρωματικές αλληλουχίες. Ακολουθεί αύξηση της θερμοκρασίας ξανά κατά την οποία η DNA πολυμεράση επεκτείνει τους εκκινητές προσθέτοντας νουκλεοτίδια στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα DNA (Σχήμα 1.12). Η DNA πολυμεράση που

χρησιμοποιείται συνήθως είναι η πολυμεράση Taq, η οποία προέρχεται από το θερμοανθεκτικό βακτήριο *Thermus aquaticus*, το οποίο ανθίστανται σε θερμοκρασίες πάνω από 100°C [147]. Με κάθε επανάληψη του κύκλου των τριών βημάτων, ο αριθμός των αντιγράφων μορίων DNA διπλασιάζεται [145].

Για την ανίχνευση των προϊόντων της PCR χρησιμοποιούνται κυρίως δύο μέθοδοι: 1) χρώση του προϊόντος DNA με χημική χρωστική, όπως το βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο παρεμβάλλεται μεταξύ των δύο αλυσίδων ή 2) με επισήμανση των εκκινητών ή των νουκλεοτιδίων με φθορίζουσες ενώσεις πριν τη διαδικασία της PCR. Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την ανάλυση των προϊόντων της PCR είναι η ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αγαρόζης, η οποία διαχωρίζει τα προϊόντα DNA με βάση το μέγεθος και το φορτίο (Σχήμα 1.13). Για τον καθορισμό του μεγέθους του προϊόντος χρησιμοποιούνται μοριακοί δείκτες που είναι προκαθορισμένα προϊόντα DNA γνωστού μεγέθους που ηλεκτροφορούνται ταυτόχρονα με το προϊόν DNA της PCR. Τυπικά, όταν η PCR χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της παρουσίας ή της απουσίας ενός συγκεκριμένου προϊόντος DNA, ονομάζεται ποιοτική PCR [145].

Η ποσοτική real-time ή qRT-PCR παρέχει παραπάνω πληροφορίες από την απλή ανίχνευση του DNA. Η qRT-PCR επιτρέπει τόσο την ανίχνευση όσο και τη μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος της PCR σε πραγματικό χρόνο, κατά τη διάρκεια που αυτό συντίθεται. Οι δύο κοινές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση του προϊόντος είναι 1) φθορίζουσες χρωστικές που παρεμβάλλονται μη ειδικά στη διπλή έλικα του DNA και 2) ειδικοί ως προς την αλληλουχία DNA ανιχνευτές επισημασμένοι με φθοριούχες ενώσεις, οι οποίοι επιτρέπουν την ανίχνευση μόνο μετά από υβριδοποίηση του ανιχνευτή με τη συμπληρωματική του αλληλουχία στο DNA-στόχο (Σχήμα 1.14). Σε αντίθεση με την PCR τελικού σημείου, η real time PCR επιτρέπει την παρακολούθηση του επιθυμητού προϊόντος σε οποιοδήποτε σημείο της διαδικασίας ενίσχυσης μέσω μέτρησης του εκπέμποντος φθορισμού [48].

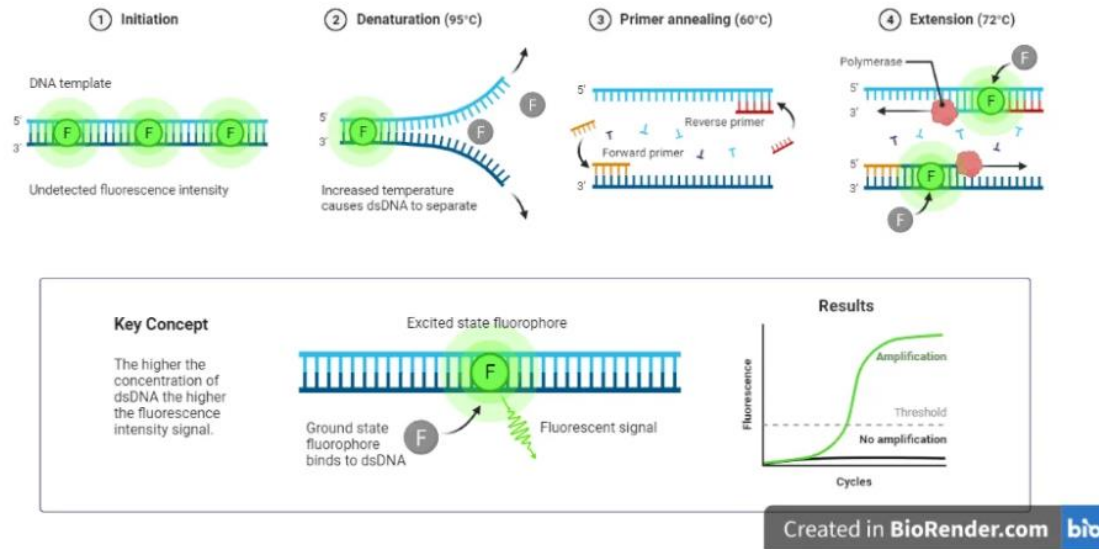


Σχήμα 1.12. Σχηματική αναπαράσταση της αρχής της μεθόδου PCR (Φώτο: Από <https://www.labtestsguide.com/polymerase-chain-reaction-pcr/>).

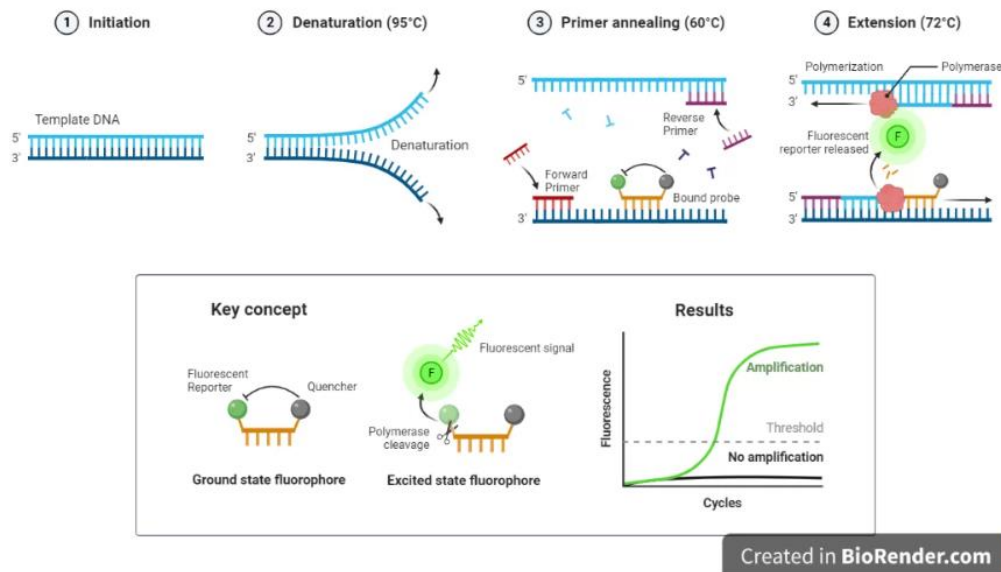


Σχήμα 1.13. Ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αгарόζης και ερμηνεία (Φώτο από: <https://www.labxchange.org/library/items/lb:LabXchange:a03c81b4:html:1>).

1) Fluorescent Dye-Based Real Time PCR (qPCR)



2) Fluorescent Probe-Based Real Time PCR (qPCR)



Σχήμα 1.14. Οι δύο μέθοδοι ανίχνευσης του προϊόντος της ποσοτικής *real-time PCR*: 1) Με φθορίζουσες χρωστικές που παρεμβάλλονται μη ειδικά στη διπλή έλικα του DNA και 2) με ειδικούς ως προς την αλληλουχία DNA του προϊόντος ανιχνευτές επισημασμένους με φθοριούχες ενώσεις, οι οποίοι επιτρέπουν την ανίχνευση μόνο μετά από υβριδοποίηση του ανιχνευτή με τη συμπληρωματική του αλληλουχία στο DNA-στόχο (Φώτο από: <https://clinicalsci.info/real-time-pcr/>).

Υπάρχουν πολλά πλεονεκτήματα με τη χρήση της PCR. Πρώτον, είναι μια απλή τεχνική ως προς την κατανόησή της και τη χρήση της και παρέχει αποτελέσματα σε λίγο χρόνο. Είναι μια πολύ ευαίσθητη τεχνική που έχει τη δυνατότητα να παράγει εκατομμύρια ως δισεκατομμύρια αντίγραφα ενός συγκεκριμένου προϊόντος DNA. Από την άλλη, υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί στη χρήση της. Λόγω της μεγάλης της ευαισθησίας σαν τεχνική, οποιαδήποτε μορφή επιμόλυνσης του δείγματος ακόμα κι από ίχνη DNA μπορεί να δώσει λανθασμένα αποτελέσματα. Επιπλέον, για το σχεδιασμό των εκκινητών της PCR, απαιτείται γνώση της αλληλουχίας του DNA. Συνεπώς, η PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για την επιβεβαίωση της παρουσίας ή της απουσίας ενός γνωστού παθογόνου ή γονιδίου. Ένα άλλο πρόβλημα που μπορεί να προκύψει είναι ότι οι εκκινητές μπορεί να υβριδοποιηθούν μη ειδικά με αλληλουχίες που είναι παρόμοιες και όχι εντελώς ταυτόσημες με το DNA-στόχο. Επίσης, μη κατάλληλα νουκλεοτίδια μπορεί να εισαχθούν στην αλληλουχία της PCR από την DNA πολυμεράση, αν και σε πολύ χαμηλό ποσοστό [145].

Οι περισσότερες από τις μοριακές τεχνικές για την ανίχνευση ανθεκτικότητας στις καρβαπενέμες είναι μέθοδοι που βασίζονται στην PCR. Χρησιμοποιούνται είτε ως μέθοδος αναφοράς ή για την αντιμετώπιση προβλημάτων σε αποτελέσματα που προέρχονται από τις φαινοτυπικές μεθόδους. Όταν υπάρχει υποψία παρουσίας καρβαπενεμάσης, η PCR είναι η ταχύτερη μέθοδος για να προσδιοριστεί η οικογένεια των β-λακταμασών. Οι τεχνικές PCR μπορούν να εφαρμοστούν σε βακτηριακές αποικίες δίνοντας αποτέλεσμα μέσα σε 4-6 ώρες ή απευθείας σε κλινικά δείγματα οπότε στην περίπτωση της real time-PCR το αποτέλεσμα είναι εφικτό μέσα σε μία ώρα [148].

Οι Queenan και Bush παρουσίασαν σε μία ανασκόπηση μια σειρά από δημοσιευμένους εκκινητές (primers) που είχαν χρησιμοποιηθεί σε simplex PCR και ανίχνευαν όλες τις μέχρι τότε γνωστές οικογένειες και υποομάδες β-λακταμασών [38]. Ωστόσο, η παραδοσιακή μέθοδος της PCR που ταυτοποιεί ένα μόνο γονίδιο (simplex) είναι χρονοβόρα, δεδομένου ότι ένα στέλεχος πρέπει να ελεγχθεί για όλες τις πιθανές οικογένειες καρβαπενεμασών. Συνεπώς, γι' αυτό το λόγο προτάθηκε και αναπτύχθηκε η multiplex PCR, η οποία επιτρέπει την ταυτόχρονη ταυτοποίηση

πολλών γονιδίων που κωδικοποιούν καρβαπενεμάσες, σε μικρότερο χρόνο και με υψηλά επίπεδα ευαισθησίας και ειδικότητας.

Από το 2006 ως το 2012, έχουν παρουσιαστεί πολλά συστήματα real-time multiplex PCR για την ταχεία ανίχνευση των περισσότερων καρβαπενεμασών όπως KPC, OXA-48, VIM, IMP και NDM. Επιπλέον, διάφορες τροποποιημένες μέθοδοι προτάθηκαν για να υπερκεράσουν την ανακρίβεια που οφειλόταν στην ποικιλομορφία των OXA-48 like καρβαπενεμασών, όπως μία μέθοδος real-time PCR, η οποία βασίζεται σε υψηλή ανάλυση της τήξεως και μία μέθοδος multiplex PCR η οποία χρησιμοποιεί ανιχνευτές πεπτιδίου-νουκλεϊκού οξέος, οι οποίες κατάφεραν να ταυτοποιήσουν αποτελεσματικά τα γονίδια ανθεκτικότητας σε μίγμα στελεχών *Enterobacteriaceae* [149].

1.5.3.2. Τεχνικές που βασίζονται στην υβριδοποίηση (microarrays)

Οι τεχνικές αυτές επιτρέπουν την ταυτόχρονη ανίχνευση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων με μία μόνο αντίδραση. Τα microarrays (επίσης γνωστά και ως DNA chips) είναι μικροσκοπικά μέρη DNA με μοναδική αλληλουχία (ονομάζονται ανιχνευτές). Το DNA των βακτηρίων υβριδοποιείται με τις συμπληρωματικές βάσεις των ανιχνευτών που βρίσκονται μέσα σε ειδικά slides τα οποία στη συνέχεια σαρώνονται και έτσι ανιχνεύεται μόνο η υβριδοποίηση στις θέσεις στόχο του ανιχνευτή [148].

Η τεχνολογία αυτή έχει επίσης χρησιμοποιηθεί και για την ανίχνευση και ταυτοποίηση πολλών γονιδίων καρβαπενεμασών. Το 2010, οι Ulyashova *et al* ανέπτυξαν μια μέθοδο microarray για να ταυτοποιήσουν επτά διαφορετικούς τύπους καρβαπενεμασών (KPC, VIM, OXA, IMP, SPM, SIM, και GIM). Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει διάφορα βήματα, ένα από τα οποία είναι η ταυτόχρονη ενίσχυση των γονιδίων β-λακταμάσης με τη χρήση multiplex PCR ακολουθούμενη από υβριδοποίηση των ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών με επισημασμένο DNA. Η μέθοδος αυτή δοκιμάστηκε σε στελέχη *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. Coli* και *K. pneumoniae* τα οποία παράγουν KPC-3, VIM-1, VIM-2, VIM-4, VIM7, IMP-2, IMP-1, SPM-1, OXA-40, OXA-23, OXA-51 and OXA-58. Οι ερευνητές κατέληξαν ότι η μέθοδος

αυτή ταυτοποίησε με ακρίβεια όλα τα γονίδια των καρβαπενεμασών των στελεχών που εξετάστηκαν [148].

Τα τελευταία χρόνια, πολλές εμπορικές μέθοδοι που βασίζονται στα microarrays αναπτύχθηκαν, όπως το Verigene (BC-GN), το BioFire και το Check-Points. Για παράδειγμα το Verigene (BC-GN) αναπτύχθηκε για να ανιχνεύει τα οχτώ πιο συχνά βακτηριακά παθογόνα απευθείας στις καλλιέργειες αίματος και τους έξι πιο σημαντικούς τύπους β-λακταμάσης (IMP, KPC, NDM, OXA, VIM και CTX-M). Το Verigene (BC-GN) δοκιμάστηκε σε διάφορες μελέτες και βρέθηκε ότι παρουσιάζει εξαιρετική ευαισθησία και ειδικότητα. Το πλεονέκτημα μιας μεθόδου microarray έναντι των τεχνικών που βασίζονται στην PCR είναι ο αριθμός των διαθέσιμων στόχων προς διερεύνηση. Η PCR μπορεί να στοχεύσει περίπου 4-5 αλληλουχίες DNA τη φορά ενώ τα microarrays μπορούν να ανιχνεύσουν εκατοντάδες χιλιάδες στόχων. Όμως, παρόλο αυτό το πλεονέκτημα των microarrays, κάποιοι περιορισμοί της μεθόδου όπως το ότι είναι επίπονη και έχει υψηλό κόστος, περιορίζουν τη χρήση της στην ρουτίνα ενός κλινικού εργαστηρίου [148].

1.5.3.3. Προσδιορισμός της αλληλουχίας ολόκληρου του γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing, WGS)

Το WGS είναι η διαδικασία προσδιορισμού ολόκληρης της αλληλουχίας DNA του γονιδιώματος ενός οργανισμού. Το WGS έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως ως εργαλείο έρευνας αλλά τελευταία η χρήση του έχει επεκταθεί και σε κλινικό επίπεδο. Αποτελεί μέθοδο προσδιορισμού της αλληλουχίας της επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS) με δυνατότητα να αναλύει το DNA κατά μήκος ολόκληρου του γονιδιώματος σε μικρό χρόνο και με σχετικά χαμηλό κόστος. Έχει ήδη χρησιμοποιηθεί για επιδημιολογικές μελέτες σε επιδημίες από *E. coli* O104:H4, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica*, ανθεκτικό στη μεθικιλίνη *S. aureus* (MRSA), και ανθεκτική στις καρβαπενέμες *K. pneumoniae*. Επιπλέον, το WGS αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για την ανάπτυξη νέων αντιβακτηριακών φαρμάκων επειδή επιτρέπει την ταχεία ταυτοποίηση όλων των γνωστών μηχανισμών ανθεκτικότητας ανάμεσα σε αυτούς και των καρβαπενεμασών. Επίσης, το WGS μπορεί να ταυτοποιήσει και άλλους μηχανισμούς ανθεκτικότητας, όπως μεταλλάξεις στις

πορίνες και τύπους πλασμιδίων που φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας. Τα δεδομένα από το WGS μπορούν επίσης να βοηθήσουν μελλοντικές μελέτες νέων μηχανισμών ανθεκτικότητας ή παραγόντων μολυσματικότητας. Ωστόσο, το WGS διατηρεί ένα υψηλό κόστος και απαιτεί αυτοποιοιμένα συστήματα για την ανάλυση δεδομένων [148].

1.6. Λοιμώξεις από εντεροβακτηριακά

1.6.1. Γενικά χαρακτηριστικά των εντεροβακτηριακών

Τα *Enterobacteriaceae* αποτελούν μία μεγάλη οικογένεια αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, τα οποία ταξινομούνται στην κλάση *Gamma proteobacteria*, τάξη *Enterobacterales* και στην κατηγορία *Pseudomonadota* [150,151]. Οι σύγχρονες εξελίξεις στη μοριακή τεχνολογία, την ταξινόμια και τη φυλογενετική ανάλυση συνέβαλε στην αύξηση του αριθμού των μελών της οικογένειας *Enterobacteriaceae*, η οποία το 2020 απαριθμούσε 68 γένη και 355 είδη [152]. Τα μέλη της οικογένειας *Enterobacteriaceae* είναι μη-σπορογόνα και τα περισσότερα είναι κινητά, οξειδάση αρνητικά και καταλάση θετικά με ελάχιστες εξαιρέσεις. Συχνά ζυμώνουν την D-γλυκόζη και άλλους υδατάνθρακες με παραγωγή οξέος και αερίου και ανάγουν τα νιτρικά σε νιτρώδη [150].

Τα βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae* βρίσκονται στο χώμα, στο νερό, στα φρούτα, στο κρέας, στα αυγά, στα λαχανικά, σε σπόρους, ανθοφόρα φυτά και δέντρα, σε έντομα, ζώα και στον άνθρωπο. Ειδικότερα στα ζώα και στον άνθρωπο αρκετά μέλη της οικογένειας αποτελούν μέρος της χλωρίδας του εντέρου. Κάποια από αυτά είναι παθογόνα για τον άνθρωπο όπως τα είδη *Salmonella*, *Shigella*, *K. pneumoniae*, *Yersinia pestis*, διάφοροι ορότυποι του *E. coli* και η *Yersinia enterocolitica* προκαλώντας μια πληθώρα ασθενειών όπως λοιμώξεις του γαστρεντερικού, του αναπνευστικού, του ουροποιητικού, τραυμάτων και εγκαυμάτων, σοβαρές ενδοκοιλιακές λοιμώξεις, μηνιγγίτιδα και σηψαιμία. Από την άλλη, κάποια άλλα είναι ευκαιριακά παθογόνα προκαλώντας λοίμωξη κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες όπως σε περίπτωση μειωμένης άμυνας του ξενιστή [150].

Έχουν ταυτοποιηθεί διάφοροι λοιμογόννοι παράγοντες στα εντεροβακτηριακά. Οι πιο κοινοί παράγοντες λοιμογονικότητας περιλαμβάνουν τη λιποπρωτεϊνική κάψα, τα μαστίγια, τους κροσσούς/πρωτεΐνες προσκόλλησης, το σύστημα μεταφοράς σιδήρου, τα συστήματα έκκρισης πρωτεϊνών και το αντιγόνο ECA (Enterobacterial Common Antigen). Οι κροσσοί και οι πρωτεΐνες προσκόλλησης διευκολύνουν την προσκόλληση των βακτηρίων στα επιθηλιακά κύτταρα και τις εξωκυττάρειες πρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας του ξενιστή. Οι κροσσοί μπορεί να εμφανίζουν τροπισμό ως προς τον ιστό στον οποίο προσκολλώνται λόγω της εξειδίκευσης των υποδοχέων, όπως για παράδειγμα η προσκόλληση σε ουροεπιθηλιακά κύτταρα. Από την άλλη, τα συστήματα μεταφοράς σιδήρου ενισχύουν τη λοιμογονικότητα των βακτηρίων μέσω του ανταγωνισμού με τον ξενιστή στην πρόσληψη σιδήρου. Τα σημαντικότερα συστήματα μεταφοράς σιδήρου στα εντεροβακτηριακά είναι η εντερομπακτίνη και η αερομπακτίνη. Τέλος, τα συστήματα έκκρισης πρωτεϊνών εμπλέκονται στην έκκριση πολλών ενζύμων και τοξινών, κάποια από τα οποία είναι κυρίως υπεύθυνα για τα συμπτώματα της νόσου [153].

1.6.2. Ανθεκτικότητα των εντεροβακτηριακών στα αντιβιοτικά

1.6.2.1. Γενικά

Επειδή τα εντεροβακτηριακά αποτελούν κοινό αίτιο τόσο νοσοκομειακών λοιμώξεων όσο και λοιμώξεων της κοινότητας, είναι ιδιαίτερα σημαντικά όσον αφορά την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά. Η οικογένεια των εντεροβακτηριακών έχει εξελιχθεί μέσα στο χρόνο και έχουν την εγγενή ικανότητα να αναπτύσσουν αντίσταση στα αντιμικροβιακά φάρμακα. Λόγω της σύνθεσης των β-λακταμασών ευρέως φάσματος, τα εντεροβακτηριακά ανέπτυξαν αντίσταση στις κεφαλοσπορίνες γ' γενεάς καθιστώντας δύσκολη την αντιμετώπισή τους. Καθώς αυξάνονταν οι λοιμώξεις από εντεροβακτηριακά που παράγουν ESBL, η ιατρική κοινότητα οδηγήθηκε στις καρβαπενέμες ως εμπειρική θεραπεία πρώτης γραμμής. Ωστόσο, η αυξανόμενη χρήση των καρβαπενεμών για τη θεραπεία των πιθανών λοιμώξεων από ESBL οδήγησε σε μια πιο σοβαρή κατάσταση: την εμφάνιση των εντεροβακτηριακών που παράγουν καρβαπενεμάση [154,155]. Σύμφωνα με τη λίστα προτεραιότητας των

παθογόνων βακτηρίων του ΠΟΥ (WHO Bacterial Priority Pathogens List) για το 2024, τα ανθεκτικά στην καρβαπενέμη εντεροβακτηριακά ταξινομούνται στην κρίσιμη ομάδα ως τα παθογόνα βακτήρια που αποτελούν τη μεγαλύτερη απειλή για τη δημόσια υγεία λόγω περιορισμένων επιλογών στη θεραπεία, υψηλό φορτίο νόσου (θνητότητα και θνησιμότητα) και αυξητικές τάσεις στην αντιμικροβιακή ανθεκτικότητα με λίγες ή καθόλου θεραπευτικές εναλλακτικές [156]. Επιπλέον, το CDC τα έχει ταξινομήσει στην κατηγορία των απειλών για τη δημόσια υγεία που απαιτούν επείγουσα και επιθετική αντιμετώπιση [157].

Σύμφωνα με την ετήσια επιδημιολογική αναφορά του EARS-Net για την αντιμικροβιακή ανθεκτικότητα στις χώρες της ΕΕ/ΕΖ για το 2023, περισσότερα από τα μισά στελέχη *E. coli* και σχεδόν το ένα τρίτο των στελεχών *K. pneumoniae* που καταγράφηκαν, ήταν ανθεκτικά σε τουλάχιστον μία ομάδα των υπό επιτήρηση αντιμικροβιακών ενώ συχνή ήταν η συνδυασμένη ανθεκτικότητα σε διάφορες ομάδες αντιμικροβιακών. Ανάμεσα στις ομάδες αντιμικροβιακών υπό επιτήρηση και για τα δύο είδη, ο σταθμισμένος ανάλογα με τον πληθυσμό της ΕΕ/ΕΖ μέσος όρος των ποσοστών ανθεκτικότητας ήταν γενικότερα υψηλότερος για την *K. pneumoniae* συγκριτικά με το *E. coli*. Η ανθεκτικότητα στις καρβαπενέμες παρέμεινε σπάνια για το *E. coli* (μόλις 0,3%), ενώ σχεδόν το ένα τρίτο των χωρών της ΕΕ/ΕΖ κατέγραψαν ποσοστά ανθεκτικότητας στις καρβαπενέμες πάνω από 10% για την *K. pneumoniae* (ο σταθμισμένος μέσος όρος για το σύνολο των χωρών της ΕΕ/ΕΖ ήταν 13,3%). Είναι αξιοσημείωτο ότι η *K. pneumoniae* παρουσίασε τη μεγαλύτερη αύξηση (+2,9%) στον σταθμισμένο ανάλογα με τον πληθυσμό μέσο όρο στην ανθεκτικότητα στις καρβαπενέμες για την περίοδο 2019-2023, επιδεικνύοντας μια σημαντική αυξητική τάση. Επιπλέον, σημαντική αυξητική τάση υπήρξε και στην επίπτωση των διεισδυτικών λοιμώξεων από *K. pneumoniae* ανθεκτική στις καρβαπενέμες, με αύξηση κατά 57,5% το 2023 συγκριτικά με το 2019. Γενικά, τα χαμηλότερα ποσοστά ανθεκτικότητας καταγράφηκαν σε χώρες της Βόρειας Ευρώπης ενώ τα υψηλότερα σε χώρες της Νότιας και Ανατολικής Ευρώπης (Σχήμα 1.1) [8].

1.6.3. Λοιμώξεις από εντεροβακτηριακά ανθεκτικά στις καρβαπενέμες (Carbapenem Resistant *Enterobacteriaceae*: CRE)

1.6.3.1. Παράγοντες που επιδρούν στον αποικισμό από CRE

Οι λοιμώξεις από CRE μπορεί να ξεκινήσουν με φυσικό τρόπο από βακτήρια που βρίσκονται στην πεπτική οδό ενός υγιούς ατόμου, όπως επίσης στο χώμα, το νερό, τα απόβλητα, τα φυτά (φρούτα, λαχανικά και βότανα), τα γαλακτοκομικά προϊόντα και το ωμό κρέας ανάλογα με το είδος του βακτηρίου. Οι κύριες πηγές μόλυνσης στις υγειονομικές μονάδες είναι οι αποικισμένοι/μολυσμένοι ασθενείς, οι βιομεμβράνες στον ιατρικό εξοπλισμό, νεροχύτες, νιπτήρες, σιφώνια, τουαλέτες, το σύστημα αποχέτευσης και τα μολυσμένα στηθοσκόπια του υγειονομικού προσωπικού [155].

Της λοίμωξης από CRE προηγείται συνήθως ο αποικισμός, αρχικά στον γαστρεντερικό σωλήνα, ωστόσο συχνά αποικίζονται και άλλα συστήματα όπως το αναπνευστικό και το ουροποιητικό. Αφού συμβεί ο αποικισμός με CRE, μπορεί να επιμείνει από μέρες ως μήνες. Ο μέσος χρόνος αποικισμού είναι συνήθως στους 3 μήνες, αλλά σε σημαντικό ποσοστό φορέων μπορεί να διαρκέσει και περισσότερο [158]. Η ενδεχόμενη πιθανότητα αποικισμού του ορθού στους νοσηλευόμενους ασθενείς επηρεάζεται από την ενδημικότητα των CRE στη συγκεκριμένη υγειονομική δομή. Από μελέτες που έχουν γίνει προκύπτει ότι σε συνθήκες υψηλής ενδημικότητας, η συνολική πιθανότητα για αποικισμό από CRE φτάνει στο περίπου 5% [159,160]. Επιπλέον, η πιθανότητα αποικισμού με CRE αυξάνεται με το χρόνο νοσηλείας του ασθενούς και ακόμα περισσότερο αν ακολουθήσει νοσηλεία του ασθενούς στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ) [158]. Μελέτη έδειξε αύξηση του ποσοστού αποικισμού των ασθενών με CRE μετά την εισαγωγή τους στο νοσοκομείο κατά 4,2% την ημέρα και ο μέσος ρυθμός αποικισμού αυξήθηκε από 13% την ημέρα εισαγωγής σε 89% την 15^η μέρα νοσηλείας [161]. Επίσης, μια άλλη μελέτη έδειξε συσχέτιση του αποικισμού από CRE με τη χορήγηση καρβαπενέμης, την πρόσφατη νοσηλεία εντός 30 ημερών, τη νοσηλεία σε θάλαμο με πολλούς ασθενείς, τη νοσηλεία για ≥ 4 ημέρες και τη διασωλήνωση [162]. Αντιθέτως, το ποσοστό αποικισμού σε άτομα της κοινότητας κατά την εισαγωγή τους στο νοσοκομείο είναι αμελητέο [159].

Πίνακας 1.5. Παράγοντες κινδύνου για αποικισμό ή λοίμωξη από CRE [161].

Παράγοντας κινδύνου
Προηγούμενος αποικισμός από CRE
Προηγηθείσα χορήγηση αντιβιοτικών
Αντιβιοτικά β-λακτάμης ευρέως φάσματος και κεφαλοσπορίνες
Κινολόνες
Αμινογλυκοσίδες
Μετρονιδαζόλη
Βανκομυκίνη
Καρβαπενέμες
Διάρκεια αντιμικροβιακής θεραπείας
Σοβαρή νόσος (βαθμολογία APACHE, SOFA)
Συννοσηρότητες
Σακχαρώδης διαβήτης
Κακοήθεια
Νευρολογική δυσλειτουργία
Μεταμόσχευση συμπαγούς οργάνου ή βλαστοκυττάρων
Κακή γενική κατάσταση
Πολλαπλή νοσηρότητα
Παιδιά: προωρότητα, νεκρωτική εντεροκολίτιδα
Χειρουργικές και μη-χειρουργικές επεμβατικές διαδικασίες
Χειρουργική επέμβαση
Ενδοφλέβιοι καθετήρες και ουροκαθετήρες
Μηχανικός αερισμός
Τραχειοστομία
Νοσηλεία
ΜΕΘ
Διακομιδή σε άλλη κλινική
Συννοσηλεία με φορέα CRE
Παρατεταμένη νοσηλεία
Διακομιδή σε άλλο νοσοκομείο
Νοσηλεία σε ίδρυμα αποκατάστασης
Ταξίδι σε χώρες υψηλής ενδημικότητας

Γενικά οι συνθήκες που οδηγούν σε μεγαλύτερη έκθεση στην υγειονομική περίθαλψη και στα αντιβιοτικά καθώς και σε ευαισθησία έναντι των λοιμώξεων αποτελούν ανεξάρτητους παράγοντες κινδύνου για αποικισμό και λοίμωξη από CRE (Πίνακας 1.5). Η χρήση των αντιβιοτικών ευρέως φάσματος είναι πιθανόν ο καθοριστικός παράγοντας για την επίμονη φορεία CRE. Η προηγούμενη χορήγηση

ευρέως φάσματος αντιβιοτικών β-λακτάμης και κεφαλοσπορινών, κινολονών, αμινογλυκοσίδων, μετρονιδαζόλης, βανκομυκίνης και καρβαπενεμών έχει αναγνωριστεί ως ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για αποικισμό από CRE. Επιπλέον, σημαντικό ρόλο στην επίδραση των αντιβιοτικών στον αποικισμό παίζει η διάρκεια της θεραπείας. Παρόλο που η προηγούμενη έκθεση στις καρβαπενέμες είναι ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου, δεν είναι απαραίτητη, δεδομένου ότι υπάρχει σε ποσοστό 15-75% των αποικισμένων ασθενών. Επιπρόσθετα, η χρήση ιατρικών συσκευών και η προηγηθείσα επαφή με φορείς των CRE παρουσιάζουν σημαντική συσχέτιση με τον αποικισμό από CRE. Οι κύριοι παράγοντες κινδύνου για αποικισμό είναι η εισαγωγή στη ΜΕΘ, η διακομιδή σε άλλες κλινικές, η παρατεταμένη νοσηλεία καθώς και η συννοσηλεία σε θάλαμο με έναν ήδη αποικισμένο ασθενή. Επίσης, θα πρέπει να έχουμε υπόψη το ταξιδιωτικό ιστορικό και την προηγούμενη νοσηλεία των ασθενών σε χώρες με υψηλή ενδημικότητα σε CRE [158].

1.6.3.2. Από τον αποικισμό με CRE στη λοίμωξη

Τα στελέχη CRE, όπως τα περισσότερα εντεροβακτηριακά συνήθως αποικίζουν το γαστρεντερικό σωλήνα όπου και δεν προκαλούν νόσο. Η παθογένεια ξεκινά όταν εμφανίζονται σε συνήθως άσηπτες περιοχές όπως το αίμα, τα ούρα ή η περιτοναϊκή κοιλότητα. Τα CRE μπορούν επίσης να αποικίσουν το δέρμα και το αναπνευστικό προκαλώντας δυνητικά λοιμώξεις του δέρματος και των μαλακών μορίων, λοιμώξεις σχετιζόμενες με καθετήρες και αναπνευστικές λοιμώξεις. Η παθογένεια αυτών των πολυανθεκτικών βακτηρίων σχετίζεται συχνά με τη χρήση συσκευών όπως οι καθετήρες και η διασωλήνωση [158].

Το ποσοστό των ασθενών που αναπτύσσουν λοίμωξη μετά από αποικισμό με CRE εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του ασθενή όπως η ηλικία, η ανοσοκαταστολή και οι συννοσηρότητες [163] και από τη διεισδυτικότητα του στελέχους. Ειδικότερα οι ασθενείς που εισάγονται στη ΜΕΘ βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο για λοίμωξη από CRE λόγω βαριάς νόσησης, ανοσοκαταστολής, κακή θρέψη, συννοσηρότητες και κατάσταση πολυανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά [164]. Μια συστηματική μελέτη αναφέρει ότι ο κίνδυνος λοίμωξης σε ασθενείς αποικισμένους με CRE είναι κατά

μέσο όρο στο 16,5% [165]. Μια αναδρομική μελέτη κοόρτης έδειξε επίσης ότι ασθενείς της ΜΕΘ αποικισμένοι με CRE διατρέχουν διπλάσιο κίνδυνο ανάπτυξης λοίμωξης από CRE σε σύγκριση με μη αποικισμένους ασθενείς [166]. Επιπλέον, μια άλλη μελέτη αναφέρει ότι 47% των αποικισμένων ασθενών που εισήχθησαν στη ΜΕΘ ανέπτυξαν λοίμωξη με CRE εντός χρονικού διαστήματος 30 ημερών, ποσοστό 10,8 φορές μεγαλύτερο συγκριτικά με τους μη αποικισμένους ασθενείς [167]. Στην ίδια μελέτη βρέθηκε ότι ο αποικισμός με CRE αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα πρόβλεψης για τη συστηματική λοίμωξη από CRE.

1.6.3.3. Κλινικά χαρακτηριστικά των λοιμώξεων από CRE

Οι λοιμώξεις που προκαλούνται από CRE αποτελούν σημαντικό αίτιο θνητότητας και θνησιμότητας παγκοσμίως. Ως CRE ορίζονται από το CDC τα *Enterobacteriaceae* τα οποία είναι ανθεκτικά *in vitro* σε οποιαδήποτε καρβαπενέμη. Αυτό σημαίνει MIC $\geq$ 2 mg/mL για την ερταπενέμη, ή MIC $\geq$ 4 mg/mL για τη ντοριπενέμη, τη μεροπενέμη ή την ιμιπενέμη [13]. Επιπλέον, τα εντεροβακτηριακά που παράγουν καρβαπενεμάση θεωρούνται επίσης CRE ανεξάρτητα από την MIC της καρβαπενέμης. Όσον αφορά τα εντεροβακτηριακά που έχουν εγγενή ανθεκτικότητα στην ιμιπενέμη, όπως τα *Morganella morganii*, *Proteus spp* και *Providencia spp*, απαιτείται ανθεκτικότητα σε μία από τις υπόλοιπες καρβαπενέμες [168].

Όπως και τα ευαίσθητα στις καρβαπενέμες εντεροβακτηριακά, τα CRE έχει αναφερθεί ότι προκαλούν διάφορα είδη λοιμώξεων. Στις περισσότερες αναφορές, οι λοιμώξεις του ουροποιητικού είναι οι πιο συχνές. Παρότι λιγότερο συχνές από τις ουρολοιμώξεις, οι λοιμώξεις αιματικής ροής και οι πνευμονίες συσχετίζονται με μεγαλύτερη θνητότητα. Επίσης όπως συμβαίνει και με τα υπόλοιπα εντεροβακτηριακά, είναι δύσκολο να διακριθεί η λοίμωξη από τον αποικισμό σε ασθενείς με στελέχη CRE τα οποία έχουν απομονωθεί από κλινικά δείγματα από μη στείρες περιοχές όπως τα ούρα, τα πτύελα και τα τραύματα [168].

Όπως προκύπτει από μετα-αναλύσεις [169-171], υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα θανάτου για ασθενείς με λοίμωξη από CRE συγκριτικά με τη λοίμωξη από εντεροβακτηριακά ευαίσθητα στις καρβαπενέμες. Όπως αναφέρει η μετα-ανάλυση από τους Zhou *et al*, υπάρχει μεγάλη ετερογένεια μεταξύ των δημοσιεύσεων όσον

αφορά την επίπτωση της ανθεκτικότητας στη θνητότητα των ασθενών [171]. Κατατάσσοντας τις δημοσιεύσεις σε κατηγορίες ανάλογα με τη χρονική περίοδο που δημοσιεύτηκαν, διαπίστωσαν ότι η επίπτωση της ανθεκτικότητας στη θνητότητα ήταν μεγαλύτερη σε εργασίες που δημοσιεύτηκαν την περίοδο 2017-2020 συγκριτικά με τις χρονικές περιόδους 2011-2013 και 2014-2016. Αυτή η σταδιακή αύξηση της επίδρασης της ανθεκτικότητας στη θνητότητα με το έτος δημοσίευσης αποδόθηκε στην προοδευτική ελάττωση των διαθέσιμων αποτελεσματικών αντιβιοτικών έναντι των λοιμώξεων από CRE καθώς και στην ανάπτυξη επιπλέον ανθεκτικότητας σε σημαντικά για τη θεραπεία αντιβιοτικά όπως η κολιστίνη, καθιστώντας τη θεραπεία των λοιμώξεων CRE ολοένα και πιο δύσκολη [171].

Έχουν εξεταστεί διάφοροι παράγοντες κινδύνου για θνητότητα από λοίμωξη με CRE με αντικρουόμενα αποτελέσματα. Αυτοί οι παράγοντες κινδύνου μπορεί να σχετίζονται με τον ασθενή (ηλικία, φύλο, συννοσηρότητες), το είδος της λοίμωξης, το είδος της θεραπείας ή το είδος του μικροοργανισμού [171]. Για παράδειγμα, σε μια μετα-ανάλυση από τους Martin *et al* αναφέρεται ότι η θνητότητα δεν επηρεάζεται τόσο από τα χαρακτηριστικά των ασθενών όσο από παράγοντες σχετιζόμενους με τη θεραπεία και το μικροοργανισμό. Έτσι, από τη μελέτη αυτή προέκυψε αυξημένη θνητότητα για λοιμώξεις από στελέχη που παράγουν KPC καρβαπενεμάση συγκριτικά με τα στελέχη που παράγουν άλλου τύπου καρβαπενεμάσες ενώ η μονοθεραπεία προκαλεί επίσης αύξηση στη θνητότητα συγκριτικά με τη θεραπεία με συνδυασμό αντιβιοτικών [170]. Επιπλέον, οι ασθενείς με CRE έχουν αυξημένο κίνδυνο για καθυστερημένη χορήγηση δραστικού αντιμικροβιακού φαρμάκου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την καθυστέρηση της κατάλληλης θεραπείας, γεγονός που οδηγεί σε αύξηση της θνητότητας στην ομάδα αυτή των ασθενών [170]. Η μετα-ανάλυση από τους Xu *et al* αναφέρει αύξηση της θνητότητας σε ασθενείς με λοιμώξεις αιματικής ροής, εισαγωγή στη ΜΕΘ και μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων και μειωμένη θνητότητα σε ασθενείς με λοίμωξη του ουροποιητικού [169]. Επιπλέον, η λοίμωξη από *K. pneumoniae* που παράγει καρβαπενεμάση KPC αναφέρεται και σε αυτή τη μελέτη ως παράγοντας αύξησης της θνητότητας λόγω της πιθανής αυξημένης διεισδυτικότητας του συγκεκριμένου στελέχους καθώς και το γεγονός ότι το *bla_{KPC}* φέρει γονίδια ανθεκτικότητας και σε άλλα αντιβιοτικά οδηγώντας σε πολυανθεκτικότητα [169].

1.6.3.4. Μέτρα ελέγχου και πρόληψης των λοιμώξεων από CRE

Τα μέτρα ελέγχου και πρόληψης των λοιμώξεων από CRE σε όλους τους χώρους παροχής υπηρεσιών υγείας βασίζονται αρχικά στο βασικό κορμό μέτρων που ισχύουν γενικά για τον έλεγχο και την πρόληψη των λοιμώξεων καθώς και από τα επιπρόσθετα μέτρα που εφαρμόζονται σε ειδικές περιπτώσεις ή όταν αποτύχουν τα γενικά μέτρα. Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του ECDC [12], τα γενικά μέτρα ελέγχου και πρόληψης των λοιμώξεων συνοψίζονται στα εξής:

- *Επιτήρηση της κατανάλωσης και της ορθολογικής χρήσης των αντιβιοτικών.*
Τα αντιμικροβιακά φάρμακα συνταγογραφούνται ευρέως αλλά μπορεί να μην είναι απαραίτητα μέχρι και το 50% των περιπτώσεων. Είναι σημαντικό να εξασφαλίζεται η διατήρηση της αποτελεσματικότητας των υπαρχόντων αντιμικροβιακών για τη θεραπεία των λοιμώξεων από CRE. Γι' αυτό το σκοπό, θα πρέπει οι χώροι παροχής υπηρεσιών υγείας (νοσοκομεία, κέντρα φυσικής αποκατάστασης κτλ) να διαθέτουν πρόγραμμα διαχείρισης αντιβιοτικών για να εξασφαλίζεται η κατάλληλη χρήση των αντιμικροβιακών φαρμάκων, πρωτόκολλα για την επιλογή των κατάλληλων αντιμικροβιακών φαρμάκων για την εμπειρική θεραπεία (και προφύλαξη) ειδικά προσαρμοσμένα για το συγκεκριμένο χώρο παροχής υπηρεσιών υγείας και βασισμένα στις κατευθυντήριες οδηγίες της χώρας που βρίσκεται αλλά και στην τοπική μικροβιακή ευαισθησία. Στη χώρα μας έχει διαμορφωθεί το θεσμικό πλαίσιο για τον έλεγχο των λοιμώξεων και την αντιμετώπιση της μικροβιακής αντοχής στα ελληνικά νοσοκομεία με την εισήγηση και συμβολή του ΕΟΔΥ (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας) με στόχο την υλοποίηση Προγραμμάτων Ελέγχου Λοιμώξεων στα ελληνικά νοσοκομεία [172]. Επίσης ο ΕΟΔΥ προχώρησε στη σύνταξη κατευθυντήριων οδηγιών για την ορθολογική επιλογή αντιμικροβιακής θεραπείας για τον νοσηλευόμενο ασθενή, για τη σωστή διαχείριση των αντιμικροβιακών παραγόντων στο νοσοκομειακό χώρο και για τη διάγνωση και θεραπεία των λοιμώξεων [172]. Παράλληλα θεσμοθετήθηκε και η δημιουργία ομάδας επιτήρησης της κατανάλωσης και της ορθής χρήσης των αντιβιοτικών (ΟΕΚΟΧΑ) στα νοσηλευτικά ιδρύματα (ΦΕΚ Β' 388/18-2-2014).

- *Υγιεινή περιβάλλοντος.* Βασική είναι η ύπαρξη πρωτοκόλλων καθαριότητας άψυχων επιφανειών και του ιατρονοσηλευτικού εξοπλισμού, η εκπαίδευση του προσωπικού καθαριότητας στην εφαρμογή των απαραίτητων διαδικασιών καθώς και η τακτική επιτήρηση της συμμόρφωσής τους. Ειδικά όσον αφορά τα τμήματα υψηλού κινδύνου πρέπει στοχευμένα να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στην χρήση των κατάλληλων απολυμαντικών και στον τρόπο απολύμανσης των άψυχων επιφανειών και του ιατρονοσηλευτικού εξοπλισμού. Επίσης, πρέπει να πραγματοποιείται έλεγχος της διαδικασίας απολύμανσης των επιφανειών που επιμολύνονται συχνότερα και ιδιαίτερα εκείνων που ανήκουν στη ζώνη του ασθενούς καθώς και έλεγχος επιμόλυνσης άψυχων επιφανειών ή κοινού ιατρονοσηλευτικού εξοπλισμού με λήψη κατάλληλων καλλιεργειών περιβάλλοντος.
- *Σύστημα διαχείρισης αποβλήτων.*
- *Κατευθυντήριες οδηγίες και διαδικασίες.*
- *Υγιεινή των χεριών.* Η διατήρηση της υγιεινής των χεριών αποτελεί ένα καλά τεκμηριωμένο μέτρο πρόληψης διασποράς των λοιμώξεων και θα πρέπει και οι ασθενείς να ενθαρρύνονται να την εφαρμόζουν σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του ΠΟΥ [173].
- *Κατάλληλες υποδομές.* Θα πρέπει να εξασφαλίζεται ότι ο αριθμός των ασθενών που διαμένουν στους θαλάμους δεν ξεπερνά το όριο πληρότητας και επίσης ότι πληρούνται οι κτιριακές προδιαγραφές για τον έλεγχο και την πρόληψη των λοιμώξεων.
- *Μικροβιολογικό εργαστήριο.* Η επιτήρηση των νοσοκομειακών λοιμώξεων και της μικροβιακής αντοχής βασίζεται στο μικροβιολογικό εργαστήριο κάθε νοσοκομείου. Η συνεργασία των κλινικών τμημάτων με το προσωπικό του μικροβιολογικού εργαστηρίου είναι καθοριστική για την έγκαιρη θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών καθώς και στον έλεγχο των επιδημιών. Το μικροβιολογικό εργαστήριο θα πρέπει να είναι σε θέση να διεκπεραιώσει τα ακόλουθα:
 1. Την έγκαιρη και έγκυρη διάγνωση των νοσοκομειακών παθογόνων με εφαρμογή επιστημονικά αποδεκτής μεθοδολογίας.

2. Την ανίχνευση μηχανισμών αντοχής στα αντιβιοτικά, παθογόνων με ιδιαίτερη επιδημιολογική σημασία.
 3. Τη συνεργασία με εξειδικευμένα εργαστήρια για την αποστολή στελεχών και την πραγματοποίηση πρόσθετων δοκιμασιών όταν απαιτείται.
 4. Την παροχή επαρκών πληροφοριών στους θεράποντες ιατρούς σχετικά με την ευαισθησία των μικροοργανισμών στα διαθέσιμα αντιβιοτικά για την αντιμετώπιση λοιμώξεων που προκαλούνται από αυτούς.
 5. Την ανίχνευση συρροών ασθενών με λοίμωξη/αποικισμό από συγκεκριμένα νοσοκομειακά παθογόνα.
 6. Την καλλιέργεια δειγμάτων από το άψυχο περιβάλλον συστηματικά ή περιστασιακά όταν αυτό κρίνεται αναγκαίο.
 7. Τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της αποστείρωσης – απολύμανσης του ιατρονοσηλευτικού εξοπλισμού με καλλιέργειες κατάλληλων δειγμάτων.
 8. Τη διασφάλιση της σωστής και ασφαλούς μεταφοράς βιολογικών δειγμάτων εντός και εκτός νοσοκομείου όταν τα δείγματα στέλνονται από τους κλινικούς ιατρούς.
 9. Την επιτήρηση της μικροβιακής αντοχής και την ενημέρωση συστηματικά της Επιτροπής Νοσοκομειακών Λοιμώξεων, της διοίκησης και των κλινικών τμημάτων για τα δεδομένα της επιτήρησης και την αναγκαιότητα άμεσης εφαρμογής των μέτρων πρόληψης και ελέγχου.
- *Επιμόρφωση του προσωπικού.* Το ιατρονοσηλευτικό προσωπικό είναι οι επαγγελματίες υγείας που έρχονται συχνότερα σε επαφή με τους ασθενείς και πρέπει με την εφαρμογή των κατάλληλων μέτρων πρόληψης να προστατεύουν τους ασθενείς, τους επισκέπτες, τους ιδίους και το υπόλοιπο προσωπικό του νοσοκομείου από τον κίνδυνο εμφάνισης νοσοκομειακής λοίμωξης. Θα πρέπει να έχουν λάβει την σωστή εκπαίδευση και να είναι σε θέση να εφαρμόζουν ανάλογα τα μέτρα πρόληψης και ελέγχου. Η εκπαίδευση αυτή θα πρέπει να επαναλαμβάνεται σε ετήσια βάση και να επικαιροποιείται όταν απαιτείται. Επιπλέον, θα πρέπει να μεριμνούν ώστε η κλινική πρακτική τους σχετικά με την πρόληψη των λοιμώξεων να είναι σύμφωνη με τις διαδικασίες που έχουν ορισθεί από τον εσωτερικό κανονισμό του νοσοκομείου και εφαρμόζονται στο κλινικό τμήμα στο οποίο εντάσσονται.

- *Στελέχωση.* Θα πρέπει να διατίθενται οι κατάλληλοι και οι αναγκαίοι πόροι σε ανθρώπινο δυναμικό.
- *Επιτήρηση.* Σημαντική είναι η συστηματική επιτήρηση των νοσοκομειακών λοιμώξεων ή των λοιμώξεων συνδεόμενων με τους χώρους παροχής υγείας. Σύμφωνα με την ελληνική νομοθεσία (ΦΕΚ Β' 388/18-2-2014) κάθε μονάδα υγείας έχει την υποχρέωση να καταρτίζει και να εφαρμόζει «Εσωτερικό Κανονισμό Ελέγχου Πρόληψη και Ελέγχου Λοιμώξεων που συνδέονται με τη νοσηλεία των ασθενών στους Χώρους Παροχής Υγείας». Επιπλέον, σε κάθε νοσοκομείο συγκροτείται με απόφαση του Διοικητικού Συμβουλίου, μετά από εισήγηση του Επιστημονικού Συμβουλίου, Επιτροπή Νοσοκομειακών Λοιμώξεων (ΕΝΛ). Η ΕΝΛ είναι το μόνο αρμόδιο όργανο για την επιτήρηση και τον έλεγχο των νοσοκομειακών λοιμώξεων σε κάθε νοσοκομείο. Καταρτίζει τον Εσωτερικό Κανονισμό Πρόληψης και Ελέγχου Λοιμώξεων καθώς και το σχέδιο δράσης για την υλοποίηση της αντίστοιχης πολιτικής και στρατηγικής για την αντιμετώπιση της μικροβιακής αντοχής και την πρόληψη των λοιμώξεων που συνδέονται με τη νοσηλεία των ασθενών στους χώρους παροχής υγείας. Εισηγείται, βάσει τεκμηριωμένων εθνικών και διεθνών κατευθυντηρίων οδηγιών, μέτρα για την πρόληψη και τον έλεγχο των νοσοκομειακών λοιμώξεων που σχετίζονται με τη παρεχόμενη φροντίδα υγείας και επιτηρεί την εφαρμογή τους σύμφωνα με τις διατάξεις της παρούσης και στο πλαίσιο των οδηγιών και κατευθύνσεων του ΕΟΔΥ.

Η διασπορά των πολυανθεκτικών μικροοργανισμών σε χώρους παροχής υπηρεσιών υγείας αποτελεί μία κρίση δημόσιας υγείας σε διεθνές επίπεδο με πολύ σημαντικές επιπτώσεις τόσο για τους ασθενείς όσο και για την λειτουργία του υγειονομικού συστήματος. Η πρόληψη της διασποράς των πολυανθεκτικών παθογόνων στο νοσοκομειακό περιβάλλον βασίζεται κυρίως στους παρακάτω άξονες:

- 1) Στην πρόληψη της οριζόντιας διασποράς των πολυανθεκτικών μικροβίων στο νοσοκομειακό περιβάλλον. Η κατηγορία αυτή των μέτρων είναι η σημαντικότερη γιατί τα πολυανθεκτικά μικρόβια μεταδίδονται από ασθενή σε ασθενή μέσω της επαφής με το προσωπικό του νοσοκομείου ή το επιμολυσμένο άψυχο περιβάλλον (επιφάνειες, κοινός εξοπλισμός).

- 2) Στην πρόληψη των λοιμώξεων από παρεμβατικούς χειρισμούς, που αποτελούν τις συχνότερες νοσοκομειακές λοιμώξεις και μπορούν σε πολύ υψηλό ποσοστό να αποφευχθούν με την εφαρμογή των κατάλληλων δεσμίδων μέτρων και είναι οι ακόλουθες: α) Βακτηριαιμίες προερχόμενες από τους κεντρικούς φλεβικούς καθετήρες, γ) ουρολοιμώξεις συνδεδεμένες με την τοποθέτηση ουροκαθετήρα, δ) λοιμώξεις κατώτερου αναπνευστικού σχετιζόμενες με μηχανική αναπνοή, ε) λοιμώξεις χειρουργικού πεδίου.
- 3) Στην έγκαιρη διάγνωση των αιτίων-παθογόνων των λοιμώξεων από πολυανθεκτικά μικρόβια που περιλαμβάνει τόσο την δυνατότητα ανίχνευσης και σωστής ταυτοποίησής τους, όσο και τη διάγνωση των ασυμπτωματικών φορέων από τους οποίους μεταδίδονται οι πολυανθεκτικοί μικροοργανισμοί και στους οποίους πρέπει να εφαρμόζονται τα ίδια μέτρα πρόληψης που εφαρμόζονται και στους ασθενείς με λοίμωξη.
- 4) Στην ορθολογική διαχείριση των αντιβιοτικών στο νοσοκομειακό χώρο.

Οι ασθενείς που είναι φορείς ή έχουν λοίμωξη από CRE μπορεί να αποτελέσουν πηγές μετάδοσης σε άλλους ασθενείς με αποτέλεσμα τη φορεία, τη λοίμωξη ή τη συρροή κρουσμάτων. Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του ECDC για την πρόληψη της εμφάνισης των CRE σε μια υγειονομική μονάδα, πρέπει πριν από την εισαγωγή τους να αναγνωριστούν οι πιθανοί φορείς CRE. Οι συνθήκες που θέτουν τα άτομα σε κίνδυνο για πιθανή φορεία από CRE είναι οι εξής: α) ιστορικό παραμονής τουλάχιστον μίας ημέρας σε μια υγειονομική δομή τους τελευταίους 12 μήνες, β) ασθενείς υπό αιμοκάθαρση ή χημειοθεραπεία τους τελευταίους 12 μήνες, γ) γνωστή προηγούμενη φορεία CRE τους τελευταίους 12 μήνες και δ) ιστορικό στενής επαφής με γνωστό φορέα CRE. Επιπλέον, παράγοντες κινδύνου για φορεία CRE αποτελούν οι εξής: α) διακομιδή ασθενών μεταξύ υγειονομικών μονάδων εντός της χώρας, β) διακομιδή ασθενών μεταξύ υγειονομικών μονάδων διαφορετικών χωρών, γ) νοσηλεία σε κλινικά τμήματα υψηλής επίπτωσης σε CRE, όπως είναι η ΜΕΘ, δ) εισαγωγή σε ιδρύματα χρονίως πασχόντων, όπως κέντρα φυσικής αποκατάστασης καθώς και οι συχνές επισκέψεις/νοσηλείες σε νοσοκομεία για την αντιμετώπιση χρόνιων νοσημάτων όπως χρόνιοι νεφροπαθείς, αιματολογικοί και ογκολογικοί ασθενείς ή ασθενείς με ρευματολογικά νοσήματα, διαβητικοί κ.ά., ε) μετάδοση στο

στενό οικογενειακό περιβάλλον από ασθενείς με πρόσφατη νοσηλεία και στ) ταξίδι σε χώρα με επιδημία ή ενδημία από στελέχη CRE.

Τα πρωταρχικά μέτρα που πρέπει να εφαρμοστούν για τα “ύποπτα” περιστατικά φορέας CRE είναι τα εξής:

- α) Απομόνωση σε μονόκλινο δωμάτιο (φυσικός διαχωρισμός),
- β) Εξέταση ορθικού επιχρίσματος για φορεία CRE ή επιχρίσματος από οποιαδήποτε άλλη εντόπιση η οποία είτε έχει μολυνθεί ή θεωρείται ότι έχει αποικιστεί,
- γ) Λήψη μέτρων ατομικής προστασίας (γάντια, μπλούζα/ποδιά μιας χρήσης) σε οποιονδήποτε εισέλθει στο δωμάτιο.

Επίσης θα πρέπει αν εξεταστούν τα εξής σενάρια, ανάλογα με το αποτέλεσμα της μικροβιολογικής εξέτασης για CRE:

-Αν η εξέταση είναι θετική για CRE, η απομόνωση του ασθενούς και τα προληπτικά μέτρα σχετικά με την επαφή συνεχίζονται. Σε αυτά προστίθενται και επιπλέον μέτρα που σχετίζονται με την απομόνωση του ασθενούς, την επαφή με τον ασθενή, την ανίχνευση των επαφών του ασθενούς, την επιλογή του νοσηλευτικού προσωπικού, την απολύμανση του χώρου κτλ, που περιγράφονται αναλυτικά στις κατευθυντήριες οδηγίες [12].

-Αν η εξέταση είναι αρνητική για CRE, θα πρέπει να εξεταστεί η διακοπή της απομόνωσης του ασθενούς και τα προληπτικά μέτρα για την επαφή με τον ασθενή, εκτός κι αν υπάρχει ένδειξη για τη συνέχισή τους.

-Αν η εξέταση για CRE είναι αρνητική και ο ασθενής έχει ιστορικό, η απόφαση για διακοπή της απομόνωσής του και διακοπή των προληπτικών μέτρων παραμένει ανοιχτή. Η απόφαση θα λαμβάνεται κατά περίπτωση έχοντας υπόψη τα εξής:

1. Την πιθανότητα ψευδώς αρνητικού τεστ. Ψευδώς αρνητικά τεστ μπορεί να προκύψουν λόγω μη προτυποποιημένων πρωτοκόλλων για δειγματοληψία και μικροβιολογική εξέταση, σφαλμάτων κατά τη δειγματοληψία ή λόγω προηγηθείσας χορήγησης αντιμικροβιακών φαρμάκων. Η προσέγγιση σε αυτή την περίπτωση μπορεί να περιλαμβάνει τη χρήση της μικροβιολογικής εξέτασης ή της PCR ή συνδυασμού αυτών καθώς και επανάληψη της δειγματοληψίας ανά τακτά χρονικά διαστήματα.

2. Ακόμα και αφού διαπιστωθεί η εξάλειψη της φορείας, έχουν αναφερθεί υποτροπές είτε λόγω αποτυχίας της εξάλειψης της φορείας ή λόγω επανανάκτησής της, δυσχεραίνοντας τη διαπίστωση αν ο ασθενής είναι ή δεν είναι ακόμα φορέας.

-Η διάρκεια της φορείας CRE είναι άγνωστη και πολυπαραγοντική. Πρέπει να ληφθεί υπόψη η πιθανότητα ψευδώς αρνητικού τεστ στην απόφαση για διακοπή των προληπτικών μέτρων [12].

Η πρόληψη και ο έλεγχος της αντιμικροβιακής ανθεκτικότητας αποτελεί μια παγκόσμια πρόκληση, η οποία δεν μπορεί να αντιμετωπιστεί από έναν μόνο οργανισμό ή μια κυβέρνηση αλλά απαιτεί συντονισμό σε διεθνές επίπεδο. Γι' αυτό το λόγο, ο ΠΟΥ ανέπτυξε μια σειρά από στρατηγικές ως μέρος του παγκόσμιου σχεδίου δράσης. Οι στόχοι που τέθηκαν από τον ΠΟΥ περιλαμβάνουν τα εξής: 1) Βελτίωση της ενημέρωσης και επίγνωσης της αντιμικροβιακής ανθεκτικότητας μέσω επικοινωνίας, επιμόρφωσης και εκπαίδευσης, 2) ενίσχυση της γνώσης μέσω στοιχείων που προκύπτουν από την έρευνα και την επιτήρηση, 3) ελάττωση της επίπτωσης των λοιμώξεων μέσω της υγιεινής και των μέτρων πρόληψης των λοιμώξεων, 4) βελτιστοποίηση της χρήσης των αντιμικροβιακών φαρμάκων στη θεραπευτική των ανθρώπων και των ζώων και 5) ανάπτυξη οικονομικού πλαισίου για βιώσιμη επένδυση που λαμβάνει υπόψη τις ανάγκες όλων των χωρών και οδηγεί στην αύξηση της επένδυσης για νέα φάρμακα, διαγνωστικά εργαλεία, εμβόλια και άλλες παρεμβάσεις [174]. Για την επίτευξη αυτών των στόχων προτείνεται ένα πλαίσιο εφαρμογής μέτρων καθώς και δείκτες παρακολούθησης και αξιολόγησης των διαδικασιών και των αποτελεσμάτων τόσο σε επίπεδο χωρών όσο και σε παγκόσμιο επίπεδο [175].

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η εργαστηριακή και κλινική διερεύνηση των λοιμώξεων από στελέχη Εντεροβακτηριακών (ιδιαίτερα Εντεροβακτηριοειδών) που εμφάνιζαν αντοχή στις καρβαπενέμες, λόγω παραγωγής β-λακταμασών τάξης A, καθώς και ο φαινοτυπικός και γονοτυπικός χαρακτηρισμός αυτών των στελεχών με ανάλυση του επιπολασμού και των προτύπων αντοχής τους στα αντιβιοτικά.

Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε αρχικά η απομόνωση από κλινικά δείγματα, η ταυτοποίηση, ο προσδιορισμός της ευαισθησίας στα συνήθη αντιβιοτικά, η ανίχνευση παραγωγής καρβαπενεμάσης καθώς και η ταυτοποίηση της τάξης της καρβαπενεμάσης μέσω φαινοτυπικών δοκιμασιών, εντεροβακτηριακών στελεχών, τα οποία ήταν ανθεκτικά στις καρβαπενέμες λόγω παραγωγής β-λακταμασών τάξης A. Μετά την εκχύλιση του γενετικού υλικού των βακτηριακών στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες τάξης A, ακολούθησε ανίχνευση και ταυτοποίηση με PCR, μέσω της χρήσης των κατάλληλων εκκινητών (primers), των γονιδίων που κωδικοποιούν καρβαπενεμάσες τάξης A (KPC) και τάξης B (VIM, NDM) καθώς και ευρέως φάσματος β-λακταμάσες (ESBLs: TEM, SHV, CTX-M). Η επιλογή των γονιδίων στόχων του βακτηριακού DNA βασίστηκε στην αυξημένη συχνότητά τους στον ελλαδικό χώρο. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε συλλογή και επεξεργασία των επιδημιολογικών και δημογραφικών στοιχείων (ηλικία, φύλο, διάγνωση, κλινική νοσηλείας, χρόνος νοσηλείας και έκβαση) των ασθενών που έφεραν τα συγκεκριμένα στελέχη στο διάστημα αυτό. Το τελικό στάδιο περιλάμβανε την επεξεργασία των στοιχείων που συλλέχθηκαν καθώς και των αποτελεσμάτων από την ανάλυση των στελεχών, ώστε να προκύψουν συμπεράσματα σχετικά με τη συμφωνία των μοριακών μεθόδων με τα αντίστοιχα αποτελέσματα των φαινοτυπικών δοκιμασιών, τη συχνότητα συνύπαρξης γονιδίων ανθεκτικότητας στις καρβαπενεμάσες τάξης A με γονίδια που κωδικοποιούν άλλες λακταμάσες (ESBLs), τη συχνότητα εμφάνισης των στελεχών αυτών σε συγκεκριμένες ομάδες ασθενών, καθώς και τη νοσηρότητα και τη θνητότητα των ασθενών που φέρουν αυτά τα στελέχη.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Βακτηριακά στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή, απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα που εστάλησαν στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων κατά τη χρονική περίοδο 2014-2015. Τα κλινικά δείγματα περιλάμβαναν: αίμα, ούρα, τραυματικό υλικό, άκρο καθετήρα, κοιλιακό επίχρισμα, πτύελα και βρογχικές εκκρίσεις, κόπρανα (ως δείγματα φορέας) και υγρά κλειστών κοιλοτήτων, όπως περιτοναϊκό υγρό και πλευριτικό υγρό. Επιπρόσθετα, συλλέχθηκε αριθμός μεταγενέστερων δειγμάτων και στελεχών της περιόδου 2021-2022, προκειμένου επιλεκτικά να ελεγχθεί η συνέχιση εμφάνισης της καρβαπενεμάσης KPC, τάξης A, ως προς το είδος του αλληλίου και του κλώνου των στελεχών.

Πίνακας 3.1. Όρια ευαισθησίας στις καρβαπενέμες για τα στελέχη *Enterobacterales* όπως προτείνονται από το CLSI [176].

	Δισκίο	Διάμετρος Ζώνης Αναστολής (mm)			MIC (μg/mL)		
		S	I	R	S	I	R
Μεροπενέμη	10 μg	≥23	20-22	≤19	≤1	2	≥4
Ιμιπενέμη	10 μg	≥23	20-22	≤19	≤1	2	≥4
Ερταπενέμη	10 μg	≥22	19-21	≤18	≤0,5	1	≥2
Ντοριπενέμη	10 μg	≥23	20-22	≤19	≤1	2	≥4

Τα κριτήρια επιλογής των στελεχών που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη ήταν τα ακόλουθα: 1) Αντοχή ή μειωμένη ευαισθησία σε τουλάχιστον μία καρβαπενέμη σύμφωνα με τα όρια ευαισθησίας στα συγκεκριμένα αντιβιοτικά, όπως αυτά προτείνονται από την CLSI [176] (Πίνακας 3.1), και 2) θετικό φαινοτυπικό έλεγχο για παραγωγή καρβαπενεμάσης τάξης A με τη μέθοδο συνδυασμού δίσκων με EDTA και φαινυλβορονικό οξύ σύμφωνα με τον αλγόριθμο του σχήματος 1.8, όπως προτείνεται

και από την EUCAST [122] ή/και θετικό φαινοτυπικό τεστ για παραγωγή καρβαπενεμάσης με το τροποποιημένο Hodge τεστ (Modified Hodge Test, MHT) με βάση τις επικαιροποιημένες οδηγίες του CLSI, 2017 [132].

Τα στελέχη αρχειοθετήθηκαν, συμπεριλήφθηκαν στη συλλογή αρχειακών στελεχών του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας του ΠΓΝΙ και αποθηκεύτηκαν στους -80 °C σε φιαλίδια με μικροσφαιρίδια Microbank™.

3.2. Αρχική απομόνωση, ταυτοποίηση και έλεγχος ευαισθησίας

Όλα τα στελέχη απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα σύμφωνα με τις συνήθειες μεθόδους καλλιέργειας και απομόνωσης βακτηριακών παθογόνων [177]. Έτσι, η αρχική απομόνωση των στελεχών έγινε μετά από ενοφθαλμισμό και επώαση σε αιματούχο και MacConkey άγαρ στους 37° C για 18-24 ώρες.

Η ταυτοποίηση των μικροβίων και ο έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά πραγματοποιήθηκαν με το Vitek 2 (bioMerieux, Marcy, l'Etoile, France). Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων βασίστηκε στα όρια ευαισθησίας που προτείνονται από το CLSI [176]. Για την κολιστίνη και την τιγκεκυκλίνη, ο έλεγχος ευαισθησίας έγινε αντίστοιχα με τη μέθοδο μικροαραίωσης σε ζωμό (ComASP® Colistin, Liofilchem, Italy) σύμφωνα με τα breakpoints της EUCAST [178] και με την χρήση ταινιών διαβαθμισμένης συγκέντρωσης (E-test) σύμφωνα με το FDA [179].

3.3. Φαινοτυπικός έλεγχος και τυποποίηση

3.3.1. Έλεγχος για παρουσία καρβαπενεμασών

Για τον έλεγχο της παρουσίας καρβαπενεμάσης, χρησιμοποιήθηκε το τροποποιημένο Hodge τεστ σύμφωνα με τις οδηγίες του CLSI, 2017 [132]. Παρασκευάστηκε εναίωρημα 0,5 McFarland από το πρότυπο στέλεχος *E. coli* ATCC 25922, το οποίο αραιώθηκε 1:10 με φυσιολογικό ορό. Στη συνέχεια, ακολούθησε ο ενοφθαλμισμός του σε τρυβλίο Mueller–Hinton agar (MH). Στο κέντρο του τρυβλίου τοποθετήθηκε δισκίο μεροπενέμης ή ερταπενέμης 10 μg. Με ένα κρικοφόρο στυλεό των 10 μl ελήφθησαν 3-5 αποικίες του υπό εξέταση μικροοργανισμού, από πρόσφατο

καλλιέργημά του σε αιματούχο άγαρ, και ενοφθαλμίστηκαν κατά μήκος ευθείας γραμμής από την άκρη του δίσκου και προς την περιφέρεια του τρυβλίου. Το μήκος αυτής της γραμμής πρέπει να είναι τουλάχιστον 20-25 mm. Σε κάθε τρυβλίο συνήθως ελεγχόταν ταυτόχρονα έως 4 στελέχη. Χρησιμοποιήθηκαν παράλληλα ένας θετικός και ένας αρνητικός μάρτυρας. Μετά από επώαση στους 37°C για 16-20 ώρες, τα τρυβλία ελέγχθηκαν για την παρουσία ενισχυμένης ανάπτυξης γύρω από τη γραμμή του εξεταζόμενου στελέχους στο σημείο τομής με τη ζώνη αναστολής του δισκίου. Αυτή είναι χαρακτηριστική και αναφέρεται και ως παραμόρφωση της ζώνης αναστολής σε σχήμα τριφυλλίου (Σχήμα 1.10). Αυξημένη ανάπτυξη συνεπάγεται θετικό τεστ για την παρουσία καρβαπενεμάσης.

3.3.2. Τυποποίηση των καρβαπενεμασών τάξης A

Συμπληρωματικά με την φαινοτυπική δοκιμασία MHT, πραγματοποιήθηκε και η τυποποίηση της τάξης της καρβαπενεμάσης με τη μέθοδο συνδυασμού δίσκων (CDT) [180]. Σε τρυβλίο MH, το οποίο είχε ενοφθαλμιστεί με ελαιώρημα 0,5 McFarland του υπό εξέταση στελέχους, τοποθετήθηκαν τέσσερα δισκία μεροπενέμης 10 µg σε απόσταση 30 mm. Στο πρώτο δισκίο δεν προστέθηκε κανένας αναστολέας, στο δεύτερο δισκίο προστέθηκε EDTA (10 µl δ. EDTA 0,1 M), στο τρίτο δισκίο προστέθηκε φαινυλβορονικό οξύ (20 µl δ. PBA, το οποίο παρασκευάστηκε με διάλυση 120 mg PBA σε 3 ml DMSO και 3 ml WFI) και τέλος στο τέταρτο δισκίο προστέθηκαν και οι δύο αναστολείς. Μετά από επώαση 18-24 ωρών έγινε σύγκριση των διαμέτρων των ζωνών αναστολής γύρω από το δισκίο της μεροπενέμης με τις αντίστοιχες διαμέτρους των ζωνών αναστολής γύρω από τα δισκία με τους αναστολείς.

Η ερμηνεία του αποτελέσματος της μεθόδου αυτής συνοψίζεται στα σχήματα 1.7 και 1.8 και στον πίνακα 1.4. Η διαφορά ≥ 5 mm της διαμέτρου των ζωνών αναστολής γύρω από τα δισκία μεροπενέμης με PBA και μεροπενέμης με PBA και EDTA σε σχέση με το απλό δισκίο μεροπενέμης (ή ιμιπενέμης), είναι ενδεικτική θετικού αποτελέσματος για την παρουσία καρβαπενεμάσης τάξης A (KPC). Από την άλλη, η διαφορά ≥ 5 mm της διαμέτρου των ζωνών αναστολής γύρω από τα δισκία

μεροπενέμης με EDTA και μεροπενέμης με PBA και EDTA σε σχέση με το απλό δισκίο μεροπενέμης (ή ιμιπενέμης), είναι ενδεικτική θετικού αποτελέσματος για την παρουσία καρβαπενεμάσης τάξης B (MBL). Θεωρείται ότι ένα στέλεχος παράγει πιθανά και τις δύο τάξεις των ενζύμων (καρβαπενεμάσες KPC και MBL), όταν η διαφορά στη διάμετρο ζώνης αναστολής γύρω από το δισκίο μεροπενέμης με PBA και EDTA σε σύγκριση με τον απλό δίσκο μεροπενέμης (ή ιμιπενέμης) είναι ≥ 5 mm ενώ οι ζώνες αναστολής γύρω από τα δισκία μεροπενέμης με PBA και μεροπενέμης με EDTA παρουσιάζουν διαφορά στη διάμετρο < 5 mm σε σχέση με το απλό δισκίο μεροπενέμης.

Στην περίπτωση που δεν παρατηρήθηκε αύξηση της διαμέτρου της ζώνης αναστολής γύρω από κανένα δισκίο που περιείχε αναστολέα, το στέλεχος θεωρήθηκε ως αρνητικό για την παραγωγή καρβαπενεμάσης.

3.4. Μοριακές τεχνικές

3.4.1. Εκχύλιση βακτηριακού DNA

Από το φιαλίδιο του αρχείου στελεχών του εργαστηρίου, έγινε ανακαλλιέργεια του κάθε στελέχους σε McConkey άγαρ. Από την ανακαλλιέργεια, λήφθηκε μια αποικία η οποία ανακαλλιεργήθηκε εκ νέου σε MC άγαρ 24 ώρες πριν τη διαδικασία της εκχύλισης, προκειμένου να έχουμε καθαρό καλλιέργημα, προερχόμενο από ένα βακτηριακό στέλεχος. Από την ανακαλλιέργεια μία αποικία, επαναιωρούνταν σε 200 μ l WFI σε κωνικό φιαλίδιο του 1,5 ml. Ακολούθησε ομογενοποίηση του εναιωρήματος με ανάδευση. Στη συνέχεια, το εναιώρημα επώαστηκε της 95 °C για 5 λεπτά και στη συνέχεια σύντομη φυγοκέντρωση (5 sec) σε 12.000g. Λήφθηκε το υπερκείμενο και τοποθετήθηκε σε νέο φιαλίδιο, το οποίο αποθηκεύτηκε στους -80 °C.

3.4.2. Ενίσχυση των γονιδίων β-λακταμασών με PCR

Η τεχνική της PCR χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της παρουσίας γονιδίων αντοχής στα β-λακταμικά αντιβιοτικά στα στελέχη υπό διερεύνηση.

Πραγματοποιήθηκαν μονοπλεκτικές αντιδράσεις PCR για την ανίχνευση των συχνότερα εμφανιζόμενων στην Ελλάδα καρβαπεμενασών και ευρέως φάσματος β-λακταμασών ESBL. Οι αλληλουχίες των εκκινητών (Invitrogen, ThermoFisher Scientific) που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση γονιδίων καρβαπενεμασών τάξεων A (KPC) και B (NDM και VIM) και ESBL (CTX-M, TEM, SHV) δίνονται στον Πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση με PCR των γονιδίων των καρβαπενεμασών και των ευρέως φάσματος β-λακταμασών.

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')	Μέγεθος (bp)	Αναφορά
<i>bla</i> _{KPC}	KPC-F1	TCGCTAAACTCGAACAGG	780	181
	KPC-R1	TTACTGCCCCGTTGACGCCCAATCC		
<i>bla</i> _{VIM}	VIMBN-F	TGGGCCATTTCAGCCAGATC	510	49
	VIMFN-R	ATGGTGTTTGGTCGCATATC		
<i>bla</i> _{NDM}	NDM(W)-F	GGGCAGTCGCTTCCAACGGT	475	49
	NDM(W)-R	GTAGTGCTCAGTGTTCGGCAT		
<i>bla</i> _{CTX-M}	CTX-M For	GGTTAAAAAATCACTGCG	873	182
	CTX M Rev	TTACAAACCGTCGGTGA		
<i>bla</i> _{TEM}	TEM F	TTGGGTGCACGAGTGGGTTA	465	182
	TEM R	TAATTGTTGCCGGGAAGCTA		
<i>bla</i> _{SHV}	SHV A	ACTGAATGAGGCGCTTCC	220	182
	SHV B	CGCACCCCGCTTGCT		

Το μίγμα της PCR που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ίδιο για όλα τα γονίδια *bla* και φαίνεται στον Πίνακα 3.3. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X (Tris pH 8,7), το οποίο περιείχε 1,5 mM MgCl₂, 400 μM dNTP, 200 ng από

κάθε εκκινητή, 1U HotStar Taq DNA πολυμεράση (Qiagen, Gmbh, Hilden, Germany) και 100-200 ng βακτηριακού DNA σε τελικό όγκο 50 μ l.

Πίνακας 3.3. Το μίγμα PCR που χρησιμοποιήθηκε για όλα τα γονίδια

Αρχικό διάλυμα (stock)	Ποσότητα	Τελική συγκέντρωση
DNA	2 μ l	100-200 ng
Buffer 10x	5 μ l	1x
MgCl ₂ (37,5 mM)	2 μ l	1,5 mM
dNTPs (10 mM)	2 μ l	400 μ M
Primer F (100 ng/ μ l)	2 μ l	200 ng
Primer R (100 ng/ μ l)	2 μ l	200 ng
Taq Polymerase (5U/ μ l)	0,2 μ l	1 U
H ₂ O	34,8 μ l	
ΣΥΝΟΛΟ	50 μ l	

Πίνακας 3.4. Οι συνθήκες της PCR που χρησιμοποιήθηκαν για όλα τα γονίδια

Κύκλος	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
Αρχική αποδιάταξη	95	5 min	1
Αποδιάταξη DNA	94	45 sec	35
Υβριδισμός εκκινητών	55	45 sec	
Επιμήκυνση εκκινητών	72	1 min	
Παράταση επιμήκυνσης	72	10 min	1

Για την ενίσχυση χρησιμοποιήθηκε συμβατικός θερμικός κυκλοποιητής (PTC-200, Pelter Thermal Cycler, MJ Research, Inc., Waltham, Massachusetts, USA) ενώ οι συνθήκες της PCR που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 3.4. Μαζί με τον πολλαπλασιασμό των δειγμάτων, σε κάθε PCR προστέθηκαν ένας θετικός και ένας αρνητικός μάρτυρας από γνωστά χαρακτηρισμένα στελέχη του αρχείου του εργαστηρίου καθώς και ένα δείγμα ελέγχου όπου στο μίγμα της PCR αντί για εκχυλισμένο προϊόν βακτηριακού στελέχους είχε προστεθεί νερό.

3.4.3. Ηλεκτροφόρηση προϊόντος πολλαπλασιασμού

Οι ηλεκτροφορήσεις των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% χρησιμοποιώντας ως ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X. Για την παρασκευή του πηκτώματος προστέθηκαν 20 μl βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) (από αρχικό διάλυμα 10 mg/ml) σε 200 ml αγαρόζης.

Αναμείχθηκαν 10 μl από το προϊόν της PCR με 2 μl χρωστικής φόρτωσης 6X (6X Loading Dye Solution) και από το προϊόν αυτό συνολικά 10 μl μεταφέρθηκαν σε μία από τις θέσεις υποδοχής της πηκτής. Η εκτίμηση του μεγέθους των προϊόντων ενίσχυσης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση δείκτη μοριακού βάρους (DNA Ladder 100 bp, Invitrogen, ThermoFisher Scientific Baltics UAB, Vilnius, Lithuania) με τμήματα DNA γνωστού μεγέθους 100-1000 bp. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 190V για 45 λεπτά σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X. Η οπτική απεικόνιση έγινε υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV).

3.4.4. Διάκριση μεταξύ των δύο αλληλίων KPC-2 και KPC-9

Αφού προηγήθηκε η ανίχνευση του *bla*_{KPC} με τη μέθοδο της PCR, τα προϊόντα πολλαπλασιασμού υποβλήθηκαν σε πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση RsaI (10 U/μL, Invitrogen™, ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) [183]. Τα δύο αλληλία KPC-2 και KPC-9 μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο διαφορετικές ομάδες ανάλογα με το μοτίβο (pattern) των προϊόντων της πέψης, την ομάδα KPC-2 like και την KPC-9 like αντίστοιχα. Το προϊόν πολλαπλασιασμού του KPC-2 μεγέθους 785 bp δίνει δύο τμήματα μήκους 42 bp και 743 bp, ενώ το προϊόν πολλαπλασιασμού του

KPC-9 ίδιου μεγέθους δίνει τρία τμήματα 42 bp, 675 bp και 68 bp. Για την πέψη χρησιμοποιήθηκαν 10 μ L του προϊόντος της PCR σε τελικό όγκο 20 μ L χρησιμοποιώντας 5 U του ενζύμου RsaI στους 37 °C για 1h και τα προϊόντα της πέψης αναλύθηκαν στη συνέχεια με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, όπως έχει ήδη περιγραφεί παραπάνω. Με αυτό τον τρόπο διαχωρίστηκαν αρχικά τα KPC-2 από τα KPC-9 στελέχη [183].

Για τον εντοπισμό των στελεχών που φέρουν το KPC-9 αλληλίο και την διάκρισή τους από την ομάδα των KPC-2 χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ARMS [183]. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη χρήση του ειδικά σχεδιασμένου εκκινητή ώστε να διακρίνει ανάμεσα στα δύο αλληλία. Πιο συγκεκριμένα, με προσθήκη επιπλέον βάσεων στο 3' άκρο του ειδικού εκκινητή KPC-R-9-arms (5'-GTCATTTGCCGTACCATGCG-3') κατέστη δυνατή η πιο αποτελεσματική διάκριση των δύο αλληλίων [183-185]. Συνεπώς, κατά την PCR παράγεται ένα προϊόν ενίσχυσης μεγέθους 638 bp μόνο όταν υπάρχει το αλληλίο KPC-9.

Η αντίδραση PCR-ARMS για κάθε αλληλίο πραγματοποιήθηκε σε μίγμα το οποίο περιείχε: 50 ng DNA, ρυθμιστικό διάλυμα 1x, 2,5 mM $MgCl_2$, 200 μ M dNTP, 0,25 μ M εκκινητή ARMS, 0,25 μ M εκκινητή KPC-F1 (Πίνακας 3.2) και 2,5 U Taq DNA πολυμεράση (Hytest Ltd., Turku, Finland) σε τελικό όγκο 25 μ L. Η αντίδραση ενίσχυσης πραγματοποιήθηκε σε συμβατικό θερμικό κυκλοποιητή (PTC-200, Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Inc., Waltham, Massachusetts, USA) κάτω από τις ακόλουθες συνθήκες: 95°C για 5 min, 35 κύκλοι των 94°C για 45 s, 55°C για 45 s και 72°C για 1 min και ένα τελικό στάδιο επιμήκυνσης στους 72°C για 10 min. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν με διαδικασία όπως περιγράφεται παραπάνω. Η διάκριση ανάμεσα στην ομάδα των KPC-2 και του KPC-9 καθορίστηκε από την απουσία ή την παρουσία, αντίστοιχα, των ενισχυμένων προϊόντων DNA.

3.4.5. Μοριακή τυποποίηση με Multi Locus Sequence Typing (MLST)

Η μέθοδος MLST βασίζεται στην άμεση διαφοροποίηση στην αλληλουχία DNA επτά διατηρημένων γονιδίων (housekeeping genes) που εδράζονται στο χρωμόσωμα των βακτηρίων και κωδικοποιούν ένζυμα που συμμετέχουν σε απαραίτητες

αντιδράσεις του μεταβολισμού τους και χαρακτηρίζει τα στελέχη από το μοναδικό τους αλληλικό προφίλ τους. Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει το στάδιο του πολλαπλασιασμού με PCR, το οποίο ακολουθείται από την αλληλούχιση του DNA. Η μετέπειτα διαδικασία περιλαμβάνει τρία στάδια: 1) τη συλλογή δεδομένων, 2) την ανάλυση των δεδομένων και 3) την ανάλυση των αλληλουχιών. Στο στάδιο της συλλογής δεδομένων, στοιχειοθετείται η διαφοροποίηση στις αλληλουχίες μέσω του προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των τμημάτων των γονιδίων. Στο δεύτερο στάδιο, όλες οι διαφορετικές αλληλουχίες για καθένα από τα διατηρημένα γονίδια που προσδιορίζονται ως ξεχωριστά αλλήλια σημαίνονται με ένα αριθμό. Οι αλληλουχίες που διαφέρουν ακόμα και σε ένα νουκλεοτίδιο θεωρούνται διαφορετικά αλλήλια. Με αυτό τον τρόπο, κάθε βακτηριακό στέλεχος χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένο συνδυασμό αλληλίων (allelic profile) και κατατάσσεται σε έναν τύπο αλληλουχιών (Sequence Type, ST). Όταν βρεθούν νέοι τύποι αλληλίων, αυτοί αποθηκεύονται στη βάση δεδομένων. Στο τελικό στάδιο της ανάλυσης, εξετάζεται η συσχέτιση μεταξύ των στελεχών μετά από σύγκριση των αλληλικών προφίλ τους. Τα στελέχη που φέρουν τα ίδια επτά αλλήλια θεωρούνται ότι ανήκουν στον ίδιο κλώνο. Η υψηλή διακριτική ικανότητα της MLST και το γεγονός ότι η συσσώρευση νουκλεοτιδικών αλλαγών στα διατηρημένα γονίδια είναι μια σχετικά αργή διαδικασία και το αλληλικό προφίλ ενός βακτηριακού στελέχους είναι αρκετά σταθερό στο χρόνο, την καθιστούν ιδανική μέθοδο για την επιδημιολογία σε παγκόσμιο επίπεδο. Όλες οι αλληλουχίες που αντιστοιχούν σε ένα συγκεκριμένο αριθμό αλληλίου καθώς και τα αλληλικά προφίλ που έχουν αποδοθεί σε συγκεκριμένο τύπο αλληλουχίας ST, έχουν καταχωρηθεί στη βάση δεδομένων www.pubmlst.org.

Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκε MLST (κλασική και core genome) σε αντιπροσωπευτικά στελέχη *K. pneumoniae* από τη χρονική περίοδο 2014-2015 (συνολικά N=32) και 2021-2022 (N=3). Ο πολλαπλασιασμός των γενετικών στόχων καθώς και ο καθαρισμός των προϊόντων ενίσχυσης (NucleoSpin Extract II kit, Macherey-Nagel, Germany) διενεργήθηκαν στο εργαστήριό μας, ενώ η αλληλούχιση του DNA των προϊόντων ενίσχυσης για τα γονίδια της MLST πραγματοποιήθηκε σε εξειδικευμένα εργαστήρια. Δώδεκα (12) στελέχη της περιόδου 2014-2015

υποβλήθηκαν σε NGS ανάλυση και από την επεξεργασία των δεδομένων του NGS έγινε τυποποίηση αλληλουχίας πολλαπλών θέσεων MLST του «βασικού» γονιδιώματος (core genome MLST, cgMLST). Για το σκοπό αυτό, με χρήση του λογισμικού SeqSphere+ 3.5.0 (Ridom, Germany), έγινε σύγκριση των δεδομένων NGS των στελεχών με τις αλληλουχίες γονιδιωμάτων και δεδομένων NGS που είναι διαθέσιμες στις βάσεις δεδομένων NCBI (National Center for Biotechnology Information) και του Ινστιτούτου Pasteur και αποδόθηκαν οι αντίστοιχοι κλώνοι στα μικροβιακά στελέχη. Σε όλα τα υπόλοιπα στελέχη πραγματοποιήθηκε ενίσχυση με PCR των επτά συντηρημένων γονιδίων της *K. pneumoniae* (*rpoB*, *gapA*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *infB*, *tonB*) εφαρμόζοντας την κλασική MLST μεθοδολογία. Για όλα τα γονίδια MLST που ελέγχθηκαν, εφαρμόστηκε το ίδιο πρωτόκολλο PCR με ξεχωριστό μείγμα αντίδρασης χρησιμοποιώντας τους ειδικούς εκκινητές για κάθε γονίδιο αντίστοιχα (Πίνακας 3.5) [186]. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR δίνονται στον Πίνακα 3.6) [186].

Πίνακας 3.5. Τα γονίδια και οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την τυποποίηση των στελεχών *K. pneumoniae* με τη μέθοδο MLST

Γονίδιο	Προϊόν	Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')	Μέγεθος (bp)
<i>rpoB</i>	β-υπομονάδα της RNA πολυμεράσης	F:Vic3oF	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGGCGAAATGGCWGAGAACCA	1119
		R:Vic2oR	TTGTGAGCGGATAACAATTTTCGAGTCTTCGAAGTTGTAACC	
<i>gapA</i>	3-φωσφορική αφυδρογονάση της γλυκεριναλδεϋδης	F:gapA173oF	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTATGAAATATGACTCCACTCACGG	706
		R:gapA181oR	TTGTGAGCGGATAACAATTTCTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT	
<i>mdh</i>	Αφυδρογονάση του μηλικού	F:mdh130oF	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTGA CCAACTCGCTTCAGGTTTCAG	800
		R:mdh867oR	TTGTGAGCGGATAACAATTTCCCGTTTTTCCCCAGCAGCAG	
<i>pgi</i>	Φωσφογλυκοζοϊσομεράση	F:pgi1FoF	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC	610
		R:pgi1RoR	TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT	
<i>phoE</i>	Φωσφορίνη	F:phoE604.1oF	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAACTACCGCAACACCGACTTCTTCGG	646
		R:phoE604.2oR	TTGTGAGCGGATAACAATTTCTGATCAGAAGTGGTAGGTGAT	
<i>infB</i>	Παράγοντας 2 (IF-2) της έναρξης της μετάφρασης	F:infB1FoF	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACTCGCTGCTGGACTATATTCG	506
		R:infB1RoR	TTGTGAGCGGATAACAATTTTCGCTTCAGCTCAAGAACTTC	
<i>tonB</i>	Περιπλασματικός μετατροπέας ενέργειας	F:tonB1FoF	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACTTTATACCTCGGTACATCAGGTT	583
		R:tonB2RoR	TTGTGAGCGGATAACAATTTCAATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG	

Πίνακας 3.6. Οι συνθήκες PCR που χρησιμοποιήθηκαν για όλα τα γονίδια της μεθόδου MLST

Κύκλος	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
Αρχική αποδιάταξη	94	2 min	1
Αποδιάταξη DNA	94	30 s	35
Υβριδισμός εκκινητών	50	1 min	
Επιμήκυνση εκκινητών	72	30 s	
Παράταση επιμήκυνσης	72	5 min	1

3.4.6. Δημογραφικά-Επιδημιολογικά δεδομένα ασθενών

Τα επιδημιολογικά και δημογραφικά δεδομένα των ασθενών, από τα δείγματα των οποίων απομονώθηκαν τα υπό μελέτη στελέχη, συλλέχθηκαν από το αρχείο των ασθενών του ΠΓΝΙ. Τα δεδομένα αυτά συνιστώνται στα εξής: φύλο, ηλικία, είδος ασθενούς (νοσηλευόμενος ή εξωτερικός ασθενής), είδος κλινικής (π.χ. παθολογική, χειρουργική κτλ), διάγνωση εισαγωγής, μέρες νοσηλείας, συννοσηρότητες (ιστορικό), αποικισμός ή λοίμωξη, όργανο/σύστημα ή σημείο λοίμωξης/αποικισμού, έκβαση της νόσου.

3.4.7. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Μετά τη συλλογή των δεδομένων και τον έλεγχο για την ορθότητά τους, έγινε εισαγωγή τους στο Microsoft Excel 2021. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε πίνακες με τη μορφή ποσοστών και μέσο όρο $\pm$ SD (Standard Deviation). Για τη σύγκριση κατηγορικών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία χ^2 ή ο έλεγχος Fisher (Fisher's exact test). Η γραφική παράσταση των καμπυλών επιβίωσης 30 ημερών των ασθενών με φορεία/λοίμωξη από στελέχη KPC-2 και KPC-9 πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Kaplan-Meier ενώ η σύγκρισή τους έγινε με τη δοκιμασία log-rank. Ως σημείο έναρξης ορίστηκε η ημέρα της πρώτης θετικής καλλιέργειας του στελέχους KPC. Το συμβάν ενδιαφέροντος ήταν ο θάνατος ενώ τα

περικεκομμένα δεδομένα (censoring) εφαρμόστηκαν για το τέλος της παρακολούθησης των ασθενών (εξαγωγή των ασθενών ή ημέρα 30, ότι προηγήθηκε). Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό λογισμικό SPSS v. 27 (IBM). Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας που χρησιμοποιήθηκε ήταν το $p < 0,05$.

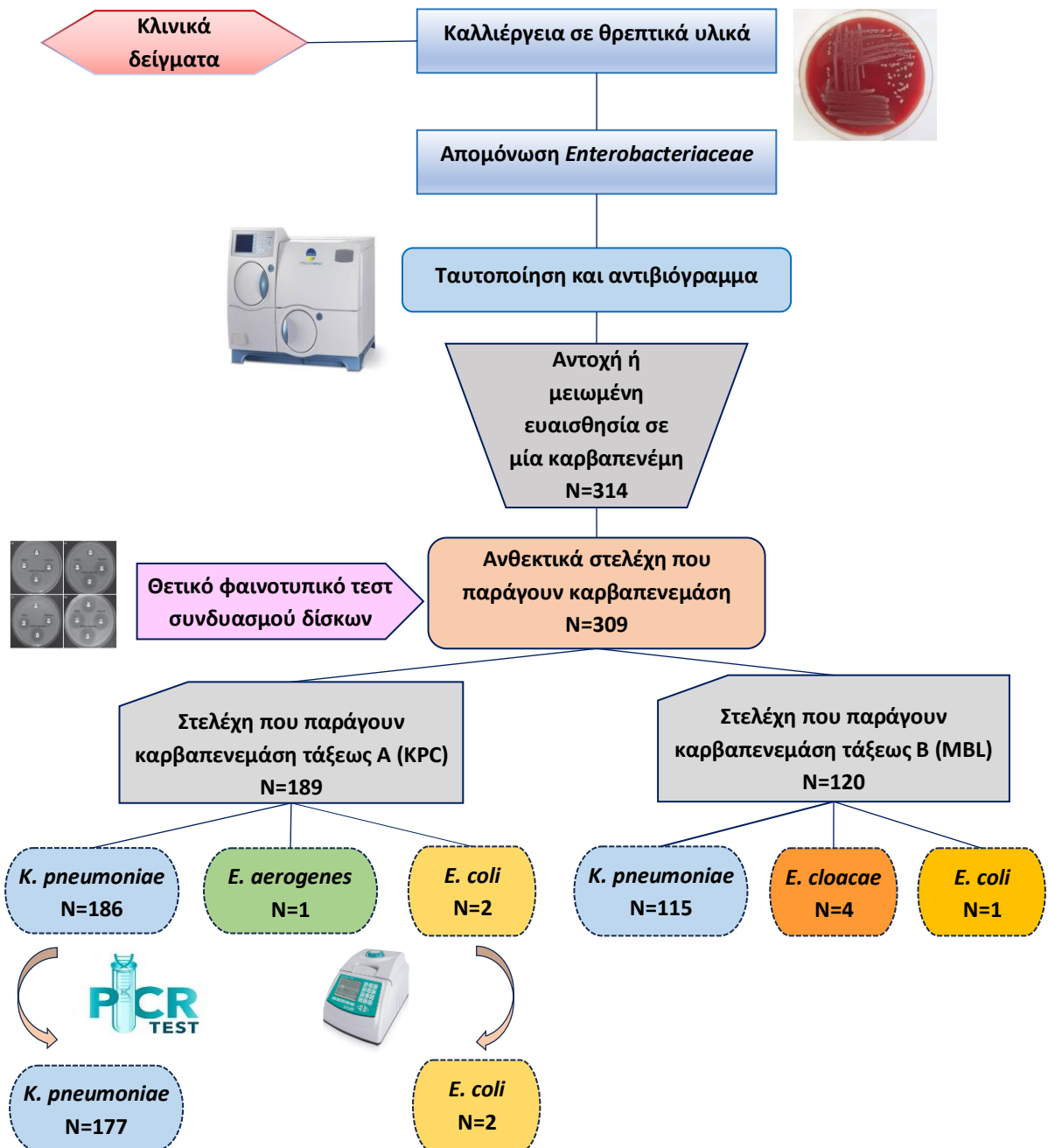
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Κλινικά δείγματα

Κατά τη διάρκεια της διετούς μελέτης (Ιανουάριος 2014-Δεκέμβριος 2015), απομονώθηκαν, από κλινικά δείγματα των ασθενών που νοσηλεύτηκαν στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ιωαννίνων (ΠΓΝΙ) κατά τη συγκεκριμένη χρονική περίοδο, συνολικά 314 στελέχη εντεροβακτηριακών με αντοχή ή μειωμένη ευαισθησία σε τουλάχιστον μία καρβαπενέμη. Σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στο Σχήμα 4.1, αρχικά πραγματοποιήθηκε η απομόνωση των εντεροβακτηριακών στελεχών με βάση τις γενικές αρχές της κλασικής καλλιέργειας και απομόνωσης παθογόνων μικροοργανισμών και στη συνέχεια η ταυτοποίηση και ο έλεγχος ευαισθησίας τους στα αντιβιοτικά. Τα εντεροβακτηριακά στελέχη με αντοχή ή μειωμένη ευαισθησία σε τουλάχιστον μία καρβαπενέμη (N=314) ελέγχθηκαν για την παραγωγή καρβαπενεμάσης τάξεως A ή B μέσω του φαινοτυπικού τεστ συνδυασμού δίσκων. Θετικό φαινοτυπικό τεστ είχαν 309 στελέχη, από τα οποία τα 163 απομονώθηκαν το 2014 και 146 το 2015. Από τα 309 στελέχη, τα 189 παρουσίασαν φαινότυπο συμβατό με παραγωγή KPC καρβαπενεμάσης και τα 120 φαινότυπο MBL. Με βάση το φαινοτυπικό τεστ, ταυτοποιήθηκαν 101 στελέχη KPC το 2014 (62,0%) και 88 το 2015 (60,3%). Δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά για τα δύο έτη ($\chi^2=0,093$, $p=0,815$).

Η κατανομή όλων των ανθεκτικών εντεροβακτηριακών στελεχών ανά κλινικό δείγμα φαίνεται στον Πίνακα 4.1. Από τα στελέχη με επιβεβαιωμένη γονοτυπικά παραγωγή καρβαπενεμάσης KPC, τα 177 ήταν *K. pneumoniae* και τα δύο ήταν *E. coli*. Τα στελέχη *E. coli* με παραγωγή KPC απομονώθηκαν και τα δύο από δείγματα ούρων. Από τα 177 στελέχη, τα 97 απομονώθηκαν το 2014 (54,8%) και τα 80 (45,2%) το 2015. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στον αριθμό των στελεχών για τα δύο έτη ($p=0,201$). Η κατανομή των κλινικών δειγμάτων από τα οποία απομονώθηκαν τα KPC στελέχη *K. pneumoniae* φαίνεται στον Πίνακα 4.2. Από τους Πίνακες 4.1 και 4.2 παρατηρούμε ότι είναι παρόμοια η κατανομή των στελεχών στα κλινικά δείγματα είτε πρόκειται για τον συνολικό αριθμό των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών ή για τα ανθεκτικά στελέχη που παράγουν KPC καρβαπενεμάση. Συγκεκριμένα, πιο συχνά απομονώθηκαν ανθεκτικά στελέχη από ούρα, σε ποσοστό που ξεπερνά το

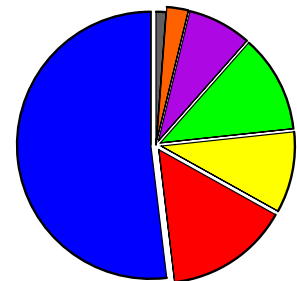
50%. Ακολουθούν το αίμα, τα δείγματα αναπνευστικού και το τραυματικό υλικό/πύον.



Σχήμα 4.1. Διάγραμμα ροής της διαδικασίας επιλογής των στελεχών KPC που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

Πίνακας 4.1. Κατανομή των ανθεκτικών σε μία ή περισσότερες καρβαπενέμες εντεροβακτηριακών στελεχών ανά κλινικό δείγμα.

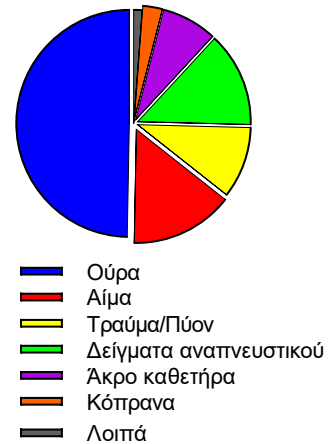
Κλινικό δείγμα	Αριθμός στελεχών	Ποσοστό (%)
Ούρα	163	51,9
Αίμα	47	15,0
Τραυματικό υλικό/Πύον	31	9,8
Βρογχικές εκκρίσεις	24	7,7
Με Προστατευμένη Βρογχική Βούρτσα (PBB)	1	0,3
Πτύελα	11	3,5
Υλικό ενδοτραχειακής αναρρόφησης	1	0,3
Άκρο ενδαγγειακού καθετήρα	24	7,7
Εγκεφαλονωτιαίο υγρό	1	0,3
Πλευριτικό υγρό	1	0,3
Κολπικό επίχρισμα	1	0,3
Δείγμα χοληδόχου κύστης	1	0,3
Κόπρανα	8	2,6
Σύνολο	314	100



- Ούρα
- Αίμα
- Τραύμα/Πύον
- Δείγματα αναπνευστικού
- Άκρο καθετήρα
- Κόπρανα
- Λοιπά

Πίνακας 4.2. Κατανομή των στελεχών *K. pneumoniae* με επιβεβαιωμένη μοριακά παραγωγή καρβαπενεμάσης KPC ανά κλινικό δείγμα.

Κλινικό δείγμα	Αριθμός στελεχών	Ποσοστό (%)
Ούρα	88	49,7
Αίμα	26	14,7
Τραυματικό υλικό /Πύον	18	10,2
Βρογχικές εκκρίσεις	16	9,0
Με Προστατευμένη Βρογχική Βούρτσα (PBB)	1	0,6
Πτύελα	7	3,9
Άκρο ενδαγγειακού καθετήρα	14	7,9
Πλευριτικό υγρό	1	0,6
Κολπικό επίχρισμα	1	0,6
Κόπρανα	5	2,8
Σύνολο	177	100



4.2. Κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών

Τα στελέχη *E. coli* απομονώθηκαν από δύο νοσηλευόμενους άνδρες, ηλικίας 84 ετών στη Νευρολογική Κλινική και 51 ετών στην Κλινική Φυσικής Ιατρικής και Αποκατάστασης (ΦΙΑ). Από τα 177 στελέχη *K. pneumoniae*, τα 15 προέρχονταν από ασθενείς που προσήλθαν στα Εξωτερικά Ιατρεία/Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών, ενώ τα 162 από νοσηλευόμενους ασθενείς.

Πίνακας 4.3. Κατανομή των νοσηλευόμενων ασθενών ανά κλινική νοσηλείας.

Κλινική	Ασθενείς (n) με απομόνωση <i>K. pneumoniae</i>	Ποσοστό (%)
Αιματολογική	12	8,1
Γαστρεντερολογική	1	0,7
Καρδιολογική	1	0,7
Καρδιοχειρουργική	6	4,0
Μονάδα Ακτινοθεραπείας	1	0,7
ΜΕΘ	34	22,8
ΜΕΠΚ	2	1,3
Νευρολογική	16	10,7
Νευροχειρουργική	11	7,4
Νεφρολογική	5	3,4
Ογκολογική	5	3,4
Ορθοπεδική	2	1,3
Ουρολογική	2	1,3
Παθολογική	20	13,4
Παιδιατρική	2	1,3
Πνευμονολογική	12	8,1
Ρευματολογική	2	1,3
ΦΙΑ	7	4,7
Χειρουργική	8	5,4
Σύνολο	149	100



ΜΕΘ: Μονάδα Εντατικής Θεραπείας

ΜΕΠΚ: Μονάδα Εντατικής Παρακολούθησης Καρδιολογικών Περιστατικών

Τα 162 νοσοκομειακά στελέχη *K. pneumoniae* προήλθαν από 149 ασθενείς. Σε κάποιες περιπτώσεις έχουμε απομόνωση περισσότερων από ένα στέλεχος από τον ίδιο ασθενή. Πρόκειται για ασθενείς με χρόνια νοσήματα και συχνές νοσηλείες ή

ασθενείς με μακροχρόνια νοσηλεία σε μία ή περισσότερες κλινικές. Εκτός από έναν ασθενή όπου δύο στελέχη απομονώθηκαν εντός χρονικού διαστήματος 11 ημερών από διαφορετικά δείγματα, όλα τα υπόλοιπα στελέχη απομονώθηκαν από δείγματα του ιδίου ασθενή σε χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 15 ημερών και ενώ είχαν αρνητικοποιηθεί ενδιάμεσα. Η κατανομή των ασθενών ανά κλινική στην οποία νοσηλεύονταν τη χρονική στιγμή λήψης του δείγματος, φαίνεται στον Πίνακα 4.3. Παρατηρείται η επικράτηση της ΜΕΘ στα ανθεκτικά στελέχη, με την Παθολογική και τη Νευρολογική Κλινική να ακολουθούν. Τα κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά των νοσηλευόμενων ασθενών συνοψίζονται στον Πίνακα 4.4.

Πίνακας 4.4. Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των νοσηλευόμενων ασθενών (N=149), από τους οποίους απομονώθηκαν στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάση KPC.

Ηλικία (έτη, μέσος όρος)	65±17
Φύλο	Άνδρες: 83 (55,7%), Γυναίκες: 66 (44,3%)
Ασθενείς με LOS>2^α	107 (71,8%)
Έκβαση	Βελτίωση: 91 (61,1%), Θάνατος: 58 (39,9%)
Συννοσηρότητες	Ελεύθερο Ατομικό Αναμνηστικό: 49 (32,9%) Σακχαρώδης Διαβήτης: 10 (6,7%) Αρτηριακή Υπέρταση: 10 (6,7%) Καρδιαγγειακές διαταραχές: 22 (14,8%) Διαταραχές αναπνευστικού: 7 (4,7%) Νευρολογικές διαταραχές: 30 (20,1%) Νεφρικές διαταραχές/ Διαταραχές ουροποιητικού: 8 (5,4%) Αιματολογικά νοσήματα/κακοήθειες: 12 (8,0%) Κακοήθειες όγκοι: 15 (10,0%) Λοιπές διαταραχές ^β : 10 (6,7%)

^αLOS=Μέρες νοσηλείας πριν την εμφάνιση της λοίμωξης (Length of stay)

^β Στις λοιπές διαταραχές περιλαμβάνονται οι διαταραχές του γαστρεντερικού, του μυοσκελετικού, των λιπιδίων, των ενδοκρινών αδένων και αυτοάνοσα νοσήματα (όπως η ψωρίαση).

Από τους 42 ασθενείς με LOS ≤ 2 , οι 26 (61,9%) είχαν νοσηλευτεί τουλάχιστον μία φορά το τελευταίο εξάμηνο στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ιωαννίνων.

4.3. Ευαισθησία στα αντιβιοτικά

Όλα τα KPC στελέχη *K. pneumoniae* παρουσίασαν ανθεκτικότητα σε όλα τα διαθέσιμα, κατά την περίοδο της μελέτης, αντιβιοτικά β-λακτάμης και τους συνδυασμούς αυτών με αναστολείς των β-λακταμασών (αμοξυκιλλίνη/κλαβουλανικό οξύ, πιπερακιλλίνη, πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη, τικαρκιλλίνη, τικαρκιλλίνη/κλαβουλανικό οξύ, αμπικιλλίνη, αμπικιλλίνη/σουλμπακτάμη, κεφαλοθίνη, κεφιξίμη, κεφοταξίμη, κεφοξιτίνη, κεφταζιδίμη, κεφτριαξόνη, κεφουροξίμη, κεφεπίμη, μεροπενέμη, ιμιπενέμη, ερταπενέμη) καθώς και στην αζτρεονάμη. Η συνολική ευαισθησία των στελεχών αυτών στα υπόλοιπα αντιβιοτικά φαίνεται στον Πίνακα 4.5.

Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 4.5 και το σχήμα 4.2, τα στελέχη αυτά παρουσιάζουν υψηλή ανθεκτικότητα (>90%) στις κινολόνες, στη νιτροφουραντοΐνη και στον συνδυασμό τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη. Από την άλλη, διατηρούν σε υψηλό ποσοστό (86,4%) ευαισθησίας στη γενταμυκίνη και σε αρκετά μικρότερο βαθμό στις υπόλοιπες αμινογλυκοσίδες (αμικασίνη: 17,5% και τομπραμυκίνη: 5,1%). Επίσης, υψηλά ποσοστά ευαισθησίας παρατηρούνται έναντι της τιγκεκυκλίνης (84,8%) και της κολιστίνης (73,4%). Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 4.6, υψηλός αριθμός στελεχών παρουσιάζει ανθεκτικότητα ταυτόχρονα σε διάφορες ομάδες αντιβιοτικών, β-λακταμικά (κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες) και κινολόνες, ενώ συνολικά 4 στελέχη εμφανίζουν ανθεκτικότητα στα β-λακταμικά (κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες), σε κινολόνες και αμινογλυκοσίδες. Κανένα στέλεχος δεν εμφάνισε ανθεκτικότητα ταυτόχρονα σε όλα τα αντιβιοτικά (pan-resistant).

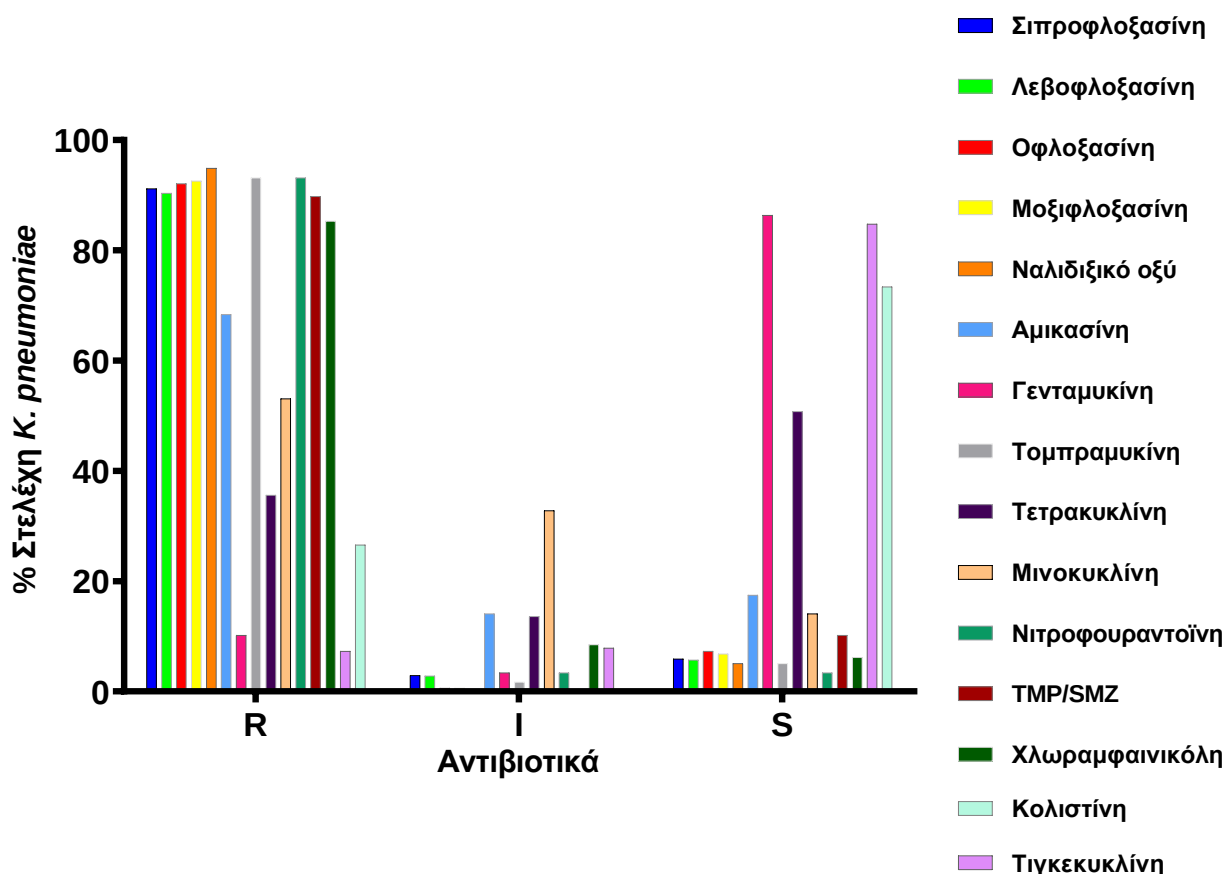
Πίνακας 4.5. Συνολική ευαισθησία των στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν KPC στα αντιβιοτικά (σύμφωνα με τα όρια ευαισθησίας που ορίζει το CLSI).

Αντιμικροβιακό	R*	I*	S*
	n (%)	n (%)	n (%)
Σιπροφλοξασίνη	162 (91,5)	5 (2,8)	10 (5,7)
Λεβοφλοξασίνη	160 (90,4)	5 (2,8)	12 (6,8)
Οφλοξασίνη	163 (92,1)	1 (0,6)	13 (7,3)
Μοξιφλοξασίνη	164 (92,6)	1 (0,6)	12 (6,8)
Ναλιδιξικό οξύ	168 (94,9)	0	9 (5,1)
Αμικασίνη	121 (68,4)	25 (14,1)	31 (17,5)
Γενταμικίνη	18 (10,2)	6 (3,4)	153 (86,4)
Τομπραμυκίνη	165 (93,2)	3 (1,7)	9 (5,1)
Τετρακυκλίνη	63 (35,6)	24 (13,6)	90 (50,8)
Μινοκυκλίνη	94 (53,1)	58 (32,8)	25 (14,1)
Νιτροφουραντοΐνη	165 (93,2)	6 (3,4)	6 (3,4)
Τριμεθοπρίμη/Σουλφαμεθοξαζόλη	159 (89,8)	0	18 (10,2)
Χλωραμφαινικόλη	151 (85,3)	15 (8,5)	11 (6,2)
Τιγκεκυκλίνη	13 (7,3)	14 (7,9)	150 (84,8)
Κολιστίνη	47 (26,6)	0	130 (73,4)

* R= ανθεκτικό, I= ενδιάμεση ευαισθησία και S= ευαίσθητο

Πίνακας 4.6. Ανθεκτικότητα των στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν KPC σε συνδυασμούς αντιβιοτικών.

Ομάδες αντιβιοτικών	2014	2015	ΣΥΝΟΛΙΚΑ
			N (%)
β-λακταμικά +κινολόνες	87	71	158 (89,3%)
β-λακταμικά+κινολόνες+αμινογλυκοσίδες	2	2	4 (2,3%)

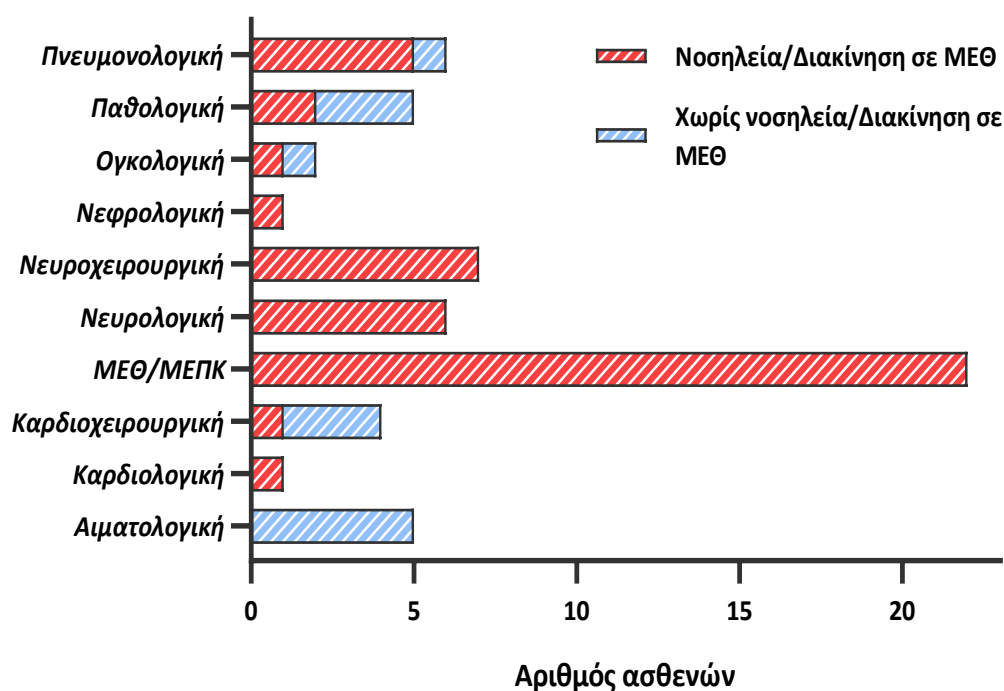


Σχήμα 4.2. Προφίλ ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά των 177 στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάση KPC (R=ανθεκτικό, I=ενδιάμεση ευαισθησία και S=ευαίσθητο).

4.4. Έκβαση των ασθενών με αποικισμό/λοίμωξη με στέλεχος KPC

Η συνολική θνητότητα των ασθενών με αποικισμό/λοίμωξη με στέλεχος KPC ήταν 39,6% (59/149) και ακόμα μεγαλύτερη, στο 61,5% (16/26) στους ασθενείς με λοίμωξη αιματικής ροής. Το μέσο χρονικό διάστημα από την απομόνωση ως τη θανατηφόρα κατάληξη ήταν 29 ± 4 μέρες, ενώ ποσοστό 16,8% των ασθενών κατέληξε εντός 14 ημερών από την απομόνωση του στελέχους KPC. Στο Σχήμα 3.3 φαίνεται η κατανομή των ασθενών με θανατηφόρα κατάληξη ανάλογα με την κλινική νοσηλείας τη χρονική στιγμή που απομονώθηκε το στέλεχος KPC. Επίσης στο ίδιο σχήμα φαίνονται στα ιστογράμματα η αναλογία των περιστατικών για τα οποία υπήρξε νοσηλεία/διακίνηση στις μονάδες εντατικής παρακολούθησης (ΜΕΘ/ΜΕΠΚ). Συνολικά ποσοστό 78,0% (46/59) των ασθενών με θανατηφόρα κατάληξη νοσηλεύτηκε έστω και για μικρό χρονικό διάστημα σε ΜΕΘ/ΜΕΠΚ (Σχήμα 4.3). Οι

περισσότεροι ασθενείς, γενικά, χαρακτηρίζονται από μακρά παραμονή στη ΜΕΘ, σοβαρά υποκείμενα νοσήματα με ιστορικό συχνών νοσηλειών και σοβαρές συννοσηρότητες, πιθανοί συνδυαστικοί, με την απομόνωση KPC, παράγοντες που οδήγησαν σε θανατηφόρα έκβαση.



Σχήμα 4.3. Κατανομή των ασθενών με αποικισμό/λοίμωξη με στέλεχος KPC και θανατηφόρα κατάληξη ανά κλινική νοσηλείας. Επίσης στα ιστογράμματα απεικονίζεται η αναλογία των ασθενών με νοσηλεία/διακίνηση σε ΜΕΘ (κόκκινο χρώμα) συγκριτικά με τους ασθενείς που δεν εισήχθησαν σε ΜΕΘ (μπλε χρώμα).

4.5. Φαινοτυπικές και μοριακές δοκιμασίες

Ο έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά όλων των εντεροβακτηριοειδών που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα κατά τη διετία 2014-2015, ανέδειξε 314 στελέχη με ανθεκτικότητα ή μειωμένη ευαισθησία σε τουλάχιστον μία καρβαπενέμη σύμφωνα με τα όρια ευαισθησίας που προτείνονται από το CLSI (Πίνακας 3.1).

Από το σύνολο των 314 στελεχών που υποβλήθηκε σε φαινοτυπικό έλεγχο συνδυασμού δίσκων, απέβη θετικός ο έλεγχος για 309 στελέχη. Από αυτά, τα 189 παρουσίασαν συνέργεια καρβαπενέμης-PBA, ενδεικτική της παραγωγής καρβαπανεμάσης KPC και τα υπόλοιπα 120 παρουσίασαν συνέργεια καρβαπενέμης-EDTA, ενδεικτική της παραγωγής καρβαπενεμάσης MBL (Σχήμα 4.1). Στη φάση αυτή,

στελέχη με ένδειξη ταυτόχρονης παραγωγής KPC και MBL κατά τον φαινοτυπικό έλεγχο, συμπεριελήφθησαν στην κατηγορία των KPC προκειμένου να ελεγχθούν περαιτέρω γονοτυπικά για τον έλεγχο παρουσίας γονιδίων KPC ή/και MBL. Συνολικά, βάση των φαινοτυπικών δοκιμασιών, 189 στελέχη παράγουν καρβαπενεμάση KPC και από αυτά τα 186 είναι *K. pneumoniae*, ένα ανήκει στο είδος *E. aerogenes* και δύο είναι *E. coli* (Σχήμα 4.1).

Από τα 186 στελέχη *K. pneumoniae* με θετικό φαινοτυπικό τεστ για παραγωγή καρβαπενεμάσης τάξεως A, τα 177 επιβεβαιώθηκαν με PCR ως στελέχη που παράγουν καρβαπενεμάση KPC (Σχήμα 4.1). Από τα 9 στελέχη που παρουσίασαν φαινότυπο KPC(+) αλλά δεν ανιχνεύτηκε το *bla_{KPC}* γονίδιο με την PCR, 4 στελέχη παρήγαγαν β-λακταμάσες κυρίως ESBL(+) (ένα CTX-M και τρία TEM) και 4 MBL [από τα οποία δύο ήταν NDM(+) συνδυαστικά με CTX-M(+), ένα NDM(+) χωρίς ESBL γονίδια και ένα VIM(+) μαζί με CTX-M(+) και TEM(+)]. Ένα στέλεχος επίσης ήταν αρνητικό σε όλα τα γονίδια ανθεκτικότητας που ελέγχθηκαν. Από τα 4 ESBL(+) στελέχη, τα τρία ήταν TEM(+) και το ένα CTX-M(+) (Πίνακας 4.7).

Πίνακας 4.7. Οι συνδυασμοί γονιδίων αντοχής που ανιχνεύτηκαν στα KPC(-) στελέχη *K. pneumoniae*.

α/α	CTX-M	TEM	SHV	VIM	NDM
1	+	-	-	-	+
2	+	+	-	+	-
3	-	+	-	-	-
4	-	-	-	-	+
5	+	-	-	-	-
6	-	+	-	-	-
7	+	-	-	-	+
8	-	-	-	-	-
9	-	+	-	-	-

Πίνακας 4.8. Οι συνδυασμοί γονιδίων αντοχής που ανιχνεύτηκαν στα στελέχη *Klebsiella pneumoniae* με φαινότυπο KPC+MBL.

α/α	KPC	CTX-M	TEM	SHV	VIM	NDM
1	+	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-
3	+	+	+	-	-	-
4	+	+	+	+	-	-
5	+	-	+	-	-	-
6	-	+	-	-	-	+
7	-	+	+	-	+	-
8	+	-	-	+	-	-
9	+	-	-	+	-	-
10	+	-	+	-	-	-
11	+	-	+	+	-	-

Επιπλέον, όπως αναφέρθηκε παραπάνω κάποια στελέχη *K. pneumoniae* εμφάνισαν φαινότυπο KPC+MBL. Στον Πίνακα 4.8 καταγράφονται οι συνδυασμοί γονιδίων ανθεκτικότητας γι' αυτά τα στελέχη και διαφαίνεται ότι σε ένα σύνολο 11 στελεχών, τα 9 επιβεβαιώθηκαν ως KPC (7 από τα οποία σε συνδυασμό με ESBL γονίδια) και τα 2 MBL (ένα NDM και ένα VIM σε συνδυασμό με γονίδια ESBL). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το μοναδικό στέλεχος που βρέθηκε να φέρει ταυτόχρονα γονίδια αντοχής *bla*_{KPC} και *bla*_{NDM} παρουσίασε θετικό φαινοτυπικό τεστ μόνο για παραγωγή KPC.

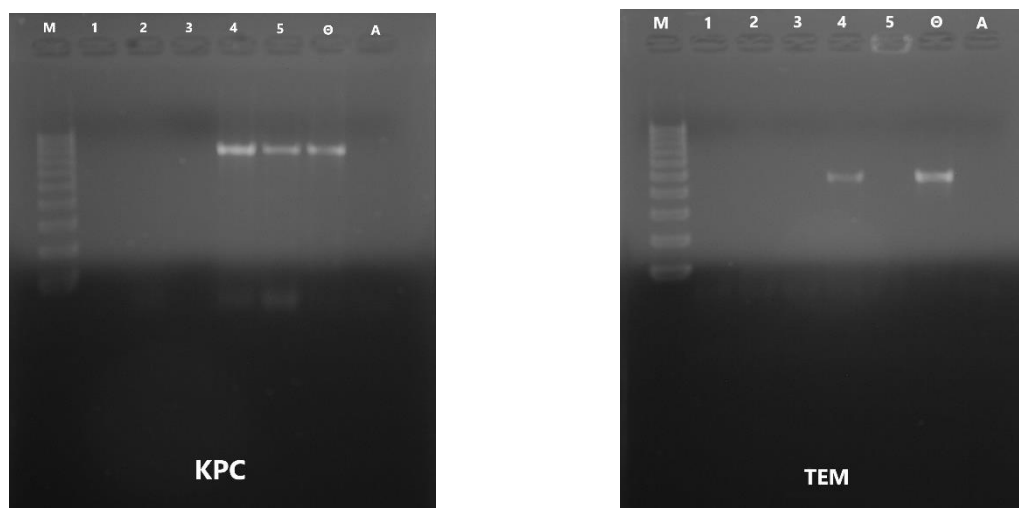
Όσον αφορά το τροποποιημένο Hodge τεστ, αυτό ήταν θετικό για τα 176 από τα 177 KPC(+)στελέχη *K. pneumoniae*. Χαρακτηριστικά θα αναφέρουμε ότι στο σύνολο των 5 στελεχών που βρέθηκε γονίδιο MBL, στις δύο περιπτώσεις το Hodge τεστ ήταν αρνητικό (ένα NDM και ένα VIM) και στις τρεις θετικό (τρία NDM). Αυτό είναι και ενδεικτικό της χαμηλότερης ευαισθησίας του τεστ στην ανίχνευση καρβαπανεμάσης στα MBL σε σχέση με τα KPC στελέχη. Επιπλέον το MHT βρέθηκε

θετικό στα τρία από τα τέσσερα στελέχη ESB_L (το CTX-M και τα δύο TEM) και στο αρνητικό σε όλα τα γονίδια ανθεκτικότητας στέλεχος. Όσον αφορά τα δύο KPC(+) στελέχη *E. coli*, το ένα εμφάνισε θετικό και το άλλο αρνητικό MHT τεστ.

Σχετικά με τα άλλα εντεροβακτηριοειδή (πλήν *K. pneumoniae*) που βρέθηκαν με φαινότυπο KPC(+), από το μοριακό έλεγχο επιβεβαιώθηκε ότι τα δύο στελέχη *E. coli* φέρουν το γονίδιο *bla*_{KPC} και επιπλέον ένα από αυτά φέρει και το γονίδιο *bla*_{TEM}. Επίσης, από την PCR διαπιστώθηκε ότι το *E. aerogenes* δεν είναι στέλεχος KPC αλλά ESB_L(+) και συγκεκριμένα φέρει το γονίδιο *bla*_{TEM} (Πίνακας 4.9).

Πίνακας 4.9. Οι συνδυασμοί γονιδίων αντοχής που ανιχνεύτηκαν στα υπόλοιπα απομονωθέντα εντεροβακτηριοειδή με φαινότυπο KPC(+) (πλην *K. pneumoniae*).

Μικροοργανισμός	KPC	CTX-M	TEM	SHV	VIM	NDM
<i>E. coli</i>	+	-	+	-	-	-
<i>E. coli</i>	+	-	-	-	-	-
<i>E. aerogenes</i>	-	-	+	-	-	-



Σχήμα 4.4. Ηλεκτροφόρηση μετά από ενίσχυση με PCR των γονιδίων Α) *bla*_{KPC} και Β) *bla*_{TEM} (M=Μοριακός δείκτης 100 bp, 1-5=δείγματα, Θ=Θετικός μάρτυρας, Α=Αρνητικός μάρτυρας).

Στο Σχήμα 4.4 παρατηρούμε εικόνες ηλεκτροφόρησης για τα γονίδια *bla*_{KPC} και *bla*_{TEM} μετά από πολλαπλασιασμό με PCR. Με τη βοήθεια του δείκτη μοριακών βαρών, οι ζώνες για το *bla*_{KPC} και *bla*_{TEM} αντιστοιχούν στις αναμενόμενες βάση του μοριακού βάρους του πολλαπλασιαζόμενου προϊόντος της PCR (780bp και 465bp αντίστοιχα).

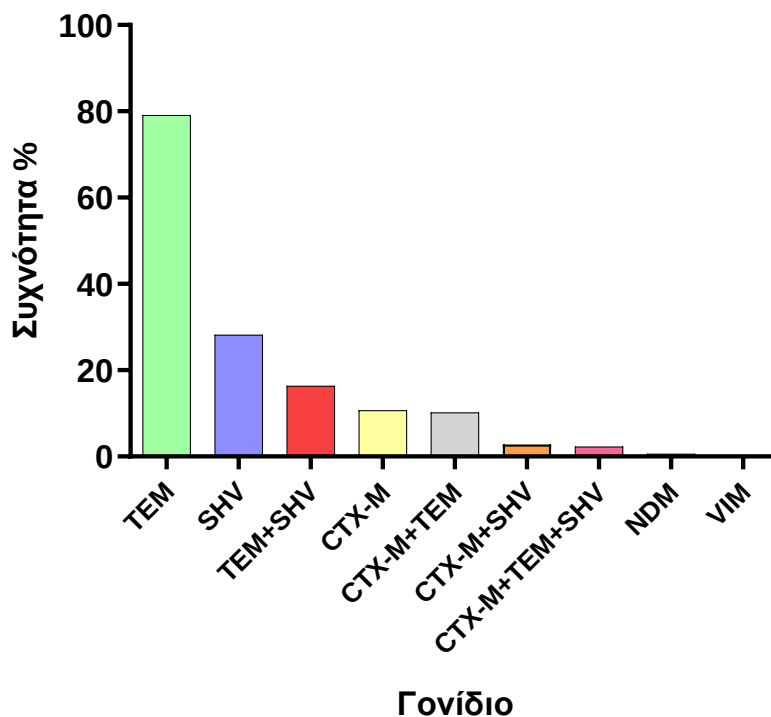
Σε όλα τα στελέχη *K. pneumoniae* που επιβεβαιώθηκε η παρουσία του γονιδίου *bla*_{KPC} (N=177) ελέγχθηκε και η παρουσία των γονιδίων *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{NDM} και *bla*_{VIM}, η συχνότητα των οποίων φαίνεται στον Πίνακα 4.10 και στο σχήμα 4.5.

Πίνακας 4.10. Συχνότητα εμφάνισης γονιδίων λακταμασών στα στελέχη που φέρουν το γονίδιο *bla*_{KPC}.

Γονίδια	Συχνότητα n (%)
<i>bla</i> _{CTX-M}	19 (10,7)
<i>bla</i> _{TEM}	140 (79,1)
<i>bla</i> _{SHV}	50 (28,2)
<i>bla</i> _{NDM}	1 (0,6)
<i>bla</i> _{VIM}	0
<i>bla</i> _{CTX-M} και <i>bla</i> _{TEM}	18 (10,2)
<i>bla</i> _{CTX-M} και <i>bla</i> _{SHV}	5 (2,8)
<i>bla</i> _{TEM} και <i>bla</i> _{SHV}	29 (16,4)
<i>bla</i> _{CTX-M} και <i>bla</i> _{TEM} και <i>bla</i> _{SHV}	4 (2,3)

Παρατηρούμε ότι τα στελέχη KPC φέρουν σε μεγαλύτερη συχνότητα το γονίδιο *bla*_{TEM}, ενώ μετὰ ακολουθεί με μεγάλη διαφορά το γονίδιο *bla*_{SHV} και τελευταίο το *bla*_{CTX-M}. Ένα στέλεχος συμπαράγει καρβαπενεμάση NDM ενώ κανένα στέλεχος δεν συμπαράγει καρβαπενεμάση VIM. Από τους συνδυασμούς των γονιδίων ESB, πιο συχνά συναντάμε τον συνδυασμό *bla*_{TEM} και *bla*_{SHV} και δεύτερο

πιο συχνό τον συνδυασμό *bla*_{CTX-M} και *bla*_{TEM}. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι 18 από τα 19 στελέχη που φέρουν το *bla*_{CTX-M}, δηλαδή ποσοστό 94,7%, φέρουν ταυτόχρονα και το γονίδιο *bla*_{TEM}. Από την άλλη, 29 από τα 50 στελέχη που φέρουν το γονίδιο *bla*_{SHV}, ποσοστό 58,0%, φέρουν επίσης το γονίδιο *bla*_{TEM}. Τέλος διαπιστώνουμε ότι ο συνδυασμός και των τριών ESB� γονιδίων, *bla*_{CTX-M} και *bla*_{TEM} και *bla*_{SHV}, είναι σπάνιος και παρατηρείται σε μόλις 2,3% των στελεχών ΚΡC.



Σχήμα 4.5. Συχνότητα εμφάνισης των γονιδίων των λακταμασών και των συνδυασμών αυτών στα στελέχη που παράγουν καρβαπενεμάση ΚΡC.

4.6. Παραλλαγές των στελεχών ΚΡC-Διάκριση των αλληλίων ΚΡC-2 και ΚΡC-9

4.6.1. Επιδημιολογικά δεδομένα της ενδονοσοκομειακής διασποράς του αλληλίου ΚΡC-9

Σε 47 (26,6%) από τα 177 στελέχη *K. pneumoniae* ΚΡC που επιβεβαιώθηκαν με τις μοριακές μεθόδους, ανιχνεύθηκε το ΚΡC-9 αλλήλιο με τη μέθοδο ARMS. Στον Πίνακα 4.11 φαίνεται η κατανομή τους στα κλινικά δείγματα από τα οποία

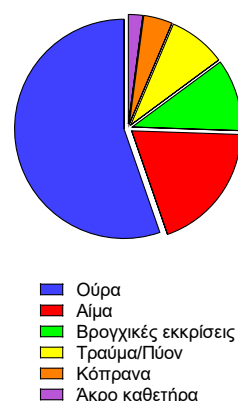
απομονώθηκαν, με τα ούρα να αποτελούν το κλινικό δείγμα με τη μεγαλύτερη συχνότητα απομόνωσης (55,3%) των KPC-9 ανθεκτικών στελεχών.

Τα 47 KPC-9 στελέχη απομονώθηκαν από 41 ασθενείς. Στον Πίνακα 4.12 φαίνεται η κατανομή των ασθενών στα διάφορα Τμήματα/Κλινικές του νοσοκομείου. Παρατηρούμε ότι τα περισσότερα στελέχη απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα ασθενών της ΜΕΘ (26,9%), ενώ παράλληλα σημαντικός αριθμός στελεχών απομονώθηκαν από την Αιματολογική (17,1%) και τη Νευρολογική κλινική.

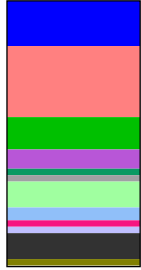
Τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών από τους οποίους απομονώθηκαν στα στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν KPC-9 καρβαπενεμάση, φαίνονται στον Πίνακα 4.13. Πρόκειται για 24 άνδρες (58,5%) και 17 γυναίκες (41,5%) με μέσο όρο ηλικίας 65 ± 21 έτη. Είκοσι πέντε ασθενείς (61,0%) παρουσίασαν βελτίωση και 16 (39,0%) είχαν θανατηφόρα κατάληξη. Στον Πίνακα 4.14 βλέπουμε τη σύγκριση των δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών από τους οποίους απομονώθηκε το στέλεχος KPC-2 με αυτούς που φέρουν το στέλεχος KPC-9. Παρατηρούμε την αυξημένη επίπτωση του KPC-9 σε ασθενείς με αιματολογικά νοσήματα/κακοήθειες συγκριτικά με το KPC-2.

Πίνακας 4.11. Κατανομή των KPC-9 στελεχών ανά κλινικό δείγμα

Κλινικό δείγμα	Αριθμός στελεχών	Ποσοστό (%)
Ούρα	26	55,3
Αίμα	9	19,2
Βρογχικές εκκρίσεις	5	10,7
Τραύμα/Πύον	4	8,5
Κόπρανα	2	4,2
Άκρο ενδαγγειακού καθετήρα	1	2,1
Σύνολο	47	100



Πίνακας 4.12. Κατανομή των ασθενών από τους οποίους απομονώθηκαν τα στελέχη KPC-9 ανά Τμήμα/Κλινική του νοσοκομείου.

Κλινική	Αριθμός ασθενών	Ποσοστό (%)	
Αιματολογική	7	17,1	
ΜΕΘ	11	26,9	
Νευρολογική	5	12,2	
Νευροχειρουργική	3	7,3	
Ουρολογική	1	2,4	
Ουρολογικό Ε.Ι.	1	2,4	
Παθολογική	4	9,8	
Παιδιατρική	2	4,9	
Πνευμονολογική	1	2,4	
Ρευματολογική	1	2,4	
ΦΙΑ	4	9,8	
Χειρουργική	1	2,4	
Σύνολο	41	100	

ΜΕΘ: Μονάδα Εντατικής Θεραπείας, ΦΙΑ: Φυσικής Ιατρικής και Αποκατάστασης, Ε.Ι.:Εξωτερικό Ιατρείο

Οι 29 (70,7%) από τους 41 ασθενείς παρουσίαζαν LOS (μέρες νοσηλείας πριν την εμφάνιση της λοίμωξης) ≥ 2 ημέρες. Από τους υπόλοιπους, οι 6 ήταν ασθενείς με χρόνια νοσήματα και συχνές νοσηλείες, δύο ασθενείς προσήλθαν ως διακομιδή από τη ΜΕΘ άλλου νοσοκομείου ή από ιδιωτικό κέντρο αποκατάστασης, ενώ για τρεις ασθενείς δεν υπήρχαν εκτενείς πληροφορίες για το ιστορικό τους. Ο ασθενής που προσήλθε στο Ε.Ι. είχε νοσηλευτεί προ διμήνου στην ουρολογική κλινική.

Πίνακας 4.13. Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των 41 ασθενών από τους οποίους απομονώθηκαν τα στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάση KPC-9.

Ασθενής (α/α)	Ηλικία (έτη)	Φύλο	Κλινική	Κλινικό δείγμα	LOS (μέρες)	Αιτία εισαγωγής	Συννοσηρόσητες	Έκβαση
1	69	Θ	ΜΕΘ	Αίμα	28	Θυρεοειδεκτομή	Μυασθένεια, αναπνευστική ανεπάρκεια	Βελτίωση
2	58	Θ	ΜΕΘ	Ούρα	12	Εγκεφαλική αιμορραγία	-	Θάνατος
3	77	Θ	Π/Θ	Τραύμα	1	Λευκοπενία, θρομβοπενία	Επιληψία	Βελτίωση
4	19	Α	ΑΙΜ/Κ	Αίμα	29	Λευκοκυττάρωση	ΟΜΛ	Θάνατος
5	69	Α	Ν/Κ	Ούρα	17	Πνευμονία	ΑΕΕ	Θάνατος
6	89	Θ	Π/Θ	Ούρα	1	Διαβητική Κετοξέωση	ΣΔ	Θάνατος
7	53	Α	ΦΙΑ	Ούρα	202	Εγκεφαλικό έμφρακτο	-	Βελτίωση
8	78	Θ	Ν/Χ	Ούρα	33	Τραύμα κεφαλής	-	Βελτίωση
9	49	Θ	ΜΕΘ	Ούρα	37	Αναπνευστική ανεπάρκεια	-	Θάνατος
10	1	Θ	Π/Δ	Τραύμα	11	Δερματίτιδα	Ατοπικό έκζεμα	Βελτίωση
11	80	Α	ΑΙΜ/Κ	Αίμα	12	Αναιμία	ΟΜΛ	Θάνατος
12	77	Α	ΜΕΘ	Αίμα	1	Αναπνευστική ανεπάρκεια	-	Θάνατος
13	75	Θ	Ρ/Κ	Ούρα	4	Νόσημα του συνδετικού ιστού	ΡΑ, οστεοπόρωση	Βελτίωση
14	53	Α	ΑΙΜ/Κ	Αίμα	13	Λευκοκυττάρωση	ΟΜΛ	Βελτίωση
15	38	Θ	ΑΙΜ/Κ	Κόπρανα	15	Λευκοκυττάρωση, αναιμία	ΟΜΛ	Βελτίωση
16	68	Θ	Ν/Κ	Ούρα	27	Λοίμωξη αναπνευστικού	Επιληψία	Βελτίωση
17	78	Α	ΑΙΜ/Κ	Ούρα	0	Πυρετός	ΟΜΛ	Βελτίωση
18	1	Θ	Π/Δ	Ούρα	0	Λοίμωξη	Δτχ ουροποιητικού	Βελτίωση
19	80	Α	Π/Θ	Ούρα	1	ΑΕΕ	-	Βελτίωση
20	66	Α	Ν/Χ	Αίμα	32	Τραυματική υποσκληρίδιος	-	Θάνατος
21	39	Α	ΜΕΘ	Αίμα	1	Ψυχικές δтч οφειλόμενες σε χρήση	Ψυχικές δтч, εθισμός σε ουσίες	Βελτίωση
22	55	Α	ΜΕΘ	Βρογχικές εκκρίσεις	7	Εγκεφαλικό έμφρακτο	-	Βελτίωση
23	72	Α	ΜΕΘ	Βρογχικές εκκρίσεις	18	Πνευμοθώρακας, αναπνευστική	Υπέρταση, ΑΕΕ, ΧΑΠ	Βελτίωση
24	73	Α	ΑΙΜ/Κ	Τραύμα	0	Λευκοκυττάρωση	ΧΛΛ	Βελτίωση
25	78	Α	Χ/Κ	Ούρα	10	Αιμορραγία γαστρεντερικού	Καρκίνος εντέρου	Βελτίωση
26	80	Θ	ΦΙΑ	Ούρα	62	Εγκεφαλικό έμφρακτο	Κολπική μαρμαρυγή	Βελτίωση

27	83	Θ	N/X	Ούρα	90	Υποσκληρίδιος αιμορραγία	-	Θάνατος
28	79	A	E.I.	Ούρα	-	-	Νεφρολιθίαση	Βελτίωση
29	89	Θ	Π/Θ	Ούρα	0	Αναιμία	-	Θάνατος
30	70	A	N/K	Αίμα	158	Εγκεφαλίτιδα	Απομυελινωτικό νόσημα	Θάνατος
31	68	Θ	ΑΙΜ/Κ	Ούρα	12	Αναιμία	Δρεπανοκυτταρική αναιμία	Θάνατος
32	78	A	ΦΙΑ	Τραύμα	44	Εγκεφαλική	-	Βελτίωση
33	83	Θ	ΜΕΘ	Ούρα	55	Υπαραχνοειδής αιμορραγία	-	Θάνατος
34	61	A	N/K	Ούρα	2	Επιληψία	Νευροεκφυλιστικό νόσημα	Βελτίωση
35	62	A	N/K	Ούρα	83	Εγκεφαλική αιμορραγία, ΠΕ	-	Θάνατος
36	34	Θ	ΜΕΘ	Ούρα	11	Status epilepticus	Επιληψία, ψωρίαση, θυρεοειδίτιδα	Βελτίωση
37	71	A	ΜΕΘ	Αίμα	60	Πυρετός	ΑΥ, αλκοολική ηπατική νόσος	Θάνατος
38	83	A	ΜΕΘ	Βρογχικές εκκρίσεις	19	Πνευμονία	-	Θάνατος
39	61	Θ	ΦΙΑ	Ούρα	94	Αφαίρεση όγκου	Καρκίνος εγκεφάλου	Βελτίωση
40	83	A	Π/Κ	Βρογχικές εκκρίσεις	12	Πνευμονία	ΣΔ, ΧΑΠ	Βελτίωση
41	66	A	ΟΥΡ/Κ	Ούρα	0	Λοίμωξη ουροποιητικού	Καρκίνος ουρ. κύστης, ΣΔ, ΑΥ, δυσλιπιδαιμία, ΣΝ	Βελτίωση

LOS= Μέρες νοσηλείας πριν την εμφάνιση λοίμωξης, A=Άρρεν, Θ=Θήλυ, ΔΤΧ= Διαταραχές, ΟΜΛ=Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία, ΧΛΛ=Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία, ΑΕΕ=Αγγειακό Εγκεφαλικό Επεισόδιο, ΑΥ=Αρτηριακή Υπέρταση, ΣΔ=Σακχαρώδης Διαβήτης, ΣΝ=Στεφανιαία Νόσος, ΧΑΠ=Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια, ΜΕΘ=Μονάδα Εντατικής Θεραπείας, Π/Θ=Παθολογική Κλινική, ΑΙΜ/Κ=Αιματολογική Κλινική, Ν/Κ=Νευρολογική Κλινική, Ν/Χ=Νευροχειρουργική Κλινική, ΦΙΑ=Τμήμα Φυσικής Ιατρικής και Αποκατάστασης, Π/Κ=Πνευμονολογική Κλινική, Ρ/Κ=Ρευματολογική Κλινική, Ε.Ι.=Εξωτερικό Ιατρείο

Η ασθενής με α/α 15 (Πίνακας 4.13) με ιστορικό συχνών νοσηλειών στην αιματολογική κλινική παρουσίαζε για μεγάλο διάστημα φορεία. Το στέλεχος ΚΡC-9 απομονώθηκε από αυτή την ασθενή δύο φορές σε ορθοπρωκτικό επίχρισμα και μία φορά σε δείγμα αίματος, μετά την πάροδο 8 μηνών από την αρχική του απομόνωση και ταυτοποίηση. Δέκα ασθενείς εμφάνισαν σοβαρή βακτηριαιμία και από αυτούς οι 6 είχαν θανατηφόρα κατάληξη. Η θνητότητα στους ασθενείς με βακτηριαιμία αγγίζει το 60% συγκριτικά αυξημένη σε σχέση με τη συνολική θνητότητα των ασθενών (39%). Όπως είναι αναμενόμενο, η εισαγωγή των ασθενών στη ΜΕΘ οδηγεί σε αύξηση της θνητότητας (54,5%).

Πίνακας 4.14. Σύγκριση των δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών από τους οποίους απομονώθηκαν τα δύο αλληλικά KPC-2 και KPC-9.

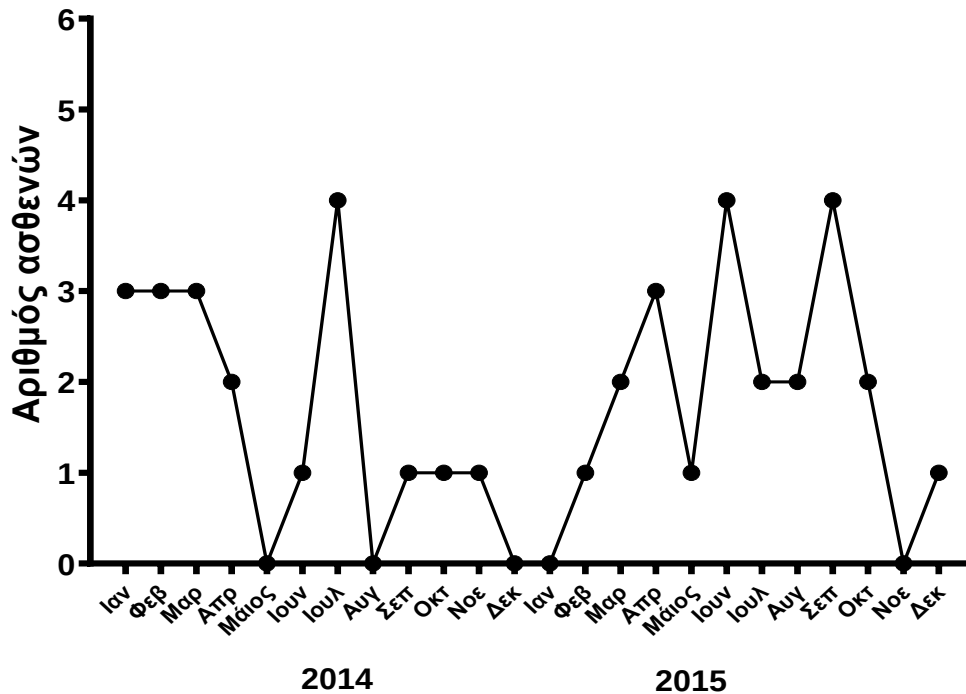
		Συνολικά (N, %)	KPC-2 (N, %)	KPC-9 (N, %)
Ηλικία (έτη, μέσος όρος $\pm$ SD^a)		65 $\pm$ 17	65 $\pm$ 15	64 $\pm$ 21
Φύλο	Άνδρες	83 (55,7)	61 (56,0)	22 (55,0)
	Γυναίκες	66 (44,3)	48 (44,0)	18 (45,0)
Σύνολο		149 (100)	109 (100)	40 (100)
LOS>2^b		107 (71,8)	78 (71,6)	29 (72,5)
Έκβαση	Βελτίωση	91 (61,1)	66 (61,1)	25 (61,0)
	Θάνατος	58 (39,9)	42 (39,9)	16 (39,0)
Συννοσηρότητες				
Ελεύθερο ατομικό αναμνηστικό		49 (32,9)	35 (32,1)	14 (35,0)
Σακχαρώδης Διαβήτης		10 (6,7)	6 (5,5)	4 (10,0)
Υπέρταση		10 (6,7)	7 (6,4)	3 (7,5)
Καρδιαγγειακές διαταραχές		22 (14,8)	21 (19,3)	1 (2,5)
Διαταραχές του αναπνευστικού		7 (4,7)	5 (4,6)	2 (5,0)
Νευρολογικές διαταραχές		30 (20,1)	21 (19,3)	9 (22,5)
Διαταραχές νεφρών/ουροποιητικού		8 (5,4)	7 (6,4)	1 (2,5)
Αιματολογικά νοσήματα/κακοήθειες		12 (8,0)	5 (4,6)	7 (17,5)
Κακοήθειες όγκοι		15 (10,0)	12 (11,0)	3 (7,5)
Λοιπές διαταραχές ^γ		10 (6,7)	6 (5,5)	4 (10,0)
Μεταφορά σε άλλη κλινική		88 (59,1)	68 (62,4)	20 (50,0)
Μεταφορά σε ΜΕΘ/ΜΕΠΚ		58 (38,9)	45 (41,3)	13 (32,5)

^a SD= Standard Deviation

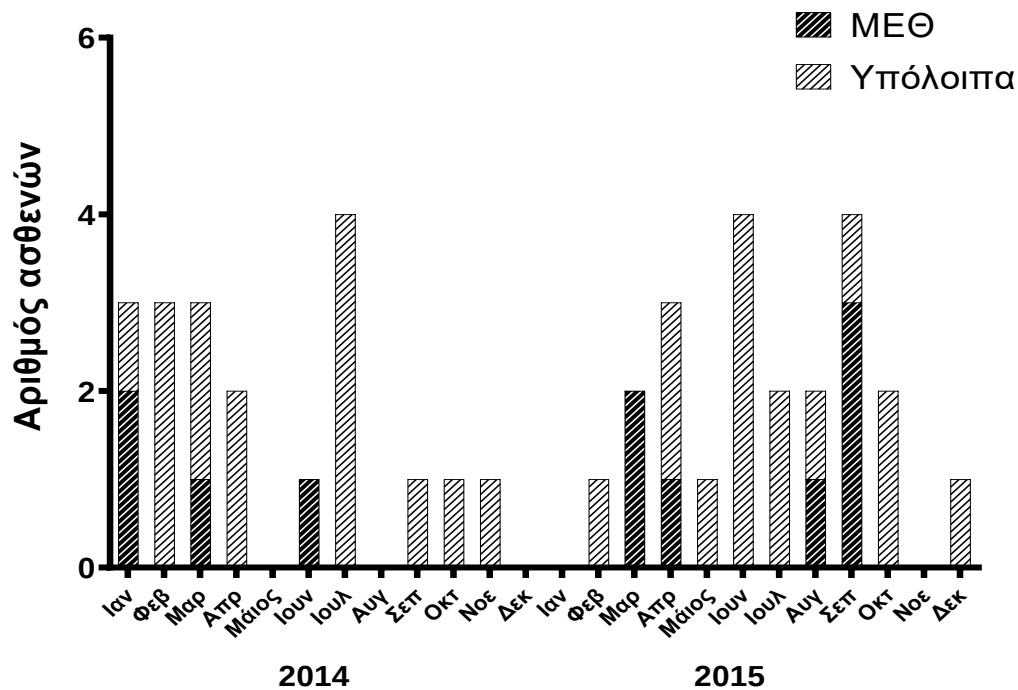
^b LOS= Length of Stay before infection

^γ Στις λοιπές διαταραχές περιλαμβάνονται οι διαταραχές του γαστρεντερικού, του μυοσκελετικού, των λιπιδίων, των ενδοκρινών αδένων και αυτοάνοσα νοσήματα (όπως η ψωρίαση).

Στο Σχήμα 4.6 φαίνεται η καταγραφή των κρουσμάτων KPC-9 κατά τη διάρκεια της διετίας, ενώ στο Σχήμα 4.7 βλέπουμε την κατανομή τους ανάλογα με την κλινική προέλευσής τους (ΜΕΘ/υπόλοιπες κλινικές).



Σχήμα 4.6. Καταγραφή των κρουσμάτων *K. pneumoniae* KPC-9 κατά την περίοδο 2014-2015.



Σχήμα 4.7. Κατανομή των κρουσμάτων *K. pneumoniae* KPC-9 κατά την περίοδο 2014-2015 ανάλογα με την κλινική προέλευσής τους.

Αυτή η έξαρση των κρουσμάτων που βλέπουμε στα δύο παραπάνω σχήματα μπορεί να διακριθεί σε δύο κύματα έξαρσης, το πρώτο από τον Ιανουάριο ως το Νοέμβριο του 2014 και το δεύτερο από Φεβρουάριο ως το Δεκέμβριο του 2015. Το πρώτο κύμα ξεκινάει με δύο κρούσματα από τη ΜΕΘ, από τα οποία το ένα διακινήθηκε ενδονοσοκομειακά επίσης σε Νευρολογική και Πνευμονολογική Κλινική. Στη συνέχεια, μέχρι το τέλος του πρώτου κύματος υπάρχει διασπορά σε διάφορες κλινικές του νοσοκομείου. Χαρακτηριστικό είναι ότι μέσα σε αυτό το κύμα εμφανίζονται τα 5 από τα συνολικά 7 κρούσματα της Αιματολογικής κλινικής.

Το δεύτερο κύμα ξεκινά με έναν ασθενή που νοσηλεύεται στη Νευροχειρουργική Κλινική μετά από 32 μέρες νοσηλείας και ακολουθούν 2 κρούσματα στη ΜΕΘ με προέλευση το ένα από Ψυχιατρική και το άλλο από Νευρολογική Κλινική. Το δεύτερο κύμα συνεχίζεται με εμφάνιση κρουσμάτων σε μικρότερο ποσοστό και σε άλλες κλινικές. Παρατηρούμε ότι ο μεγαλύτερος αριθμός των κρουσμάτων συσσωρεύεται στις κλινικές ΜΕΘ, Ν/Κ, Ν/Χ, ΦΙΑ (23 στο σύνολο) δεδομένου ότι υπάρχει σημαντική διακίνηση ασθενών μεταξύ αυτών των κλινικών, όπως προκύπτει από το ιστορικό διακίνησης των ασθενών. Φαίνεται επίσης να υπάρχει μια δεύτερη σημαντική εστία στην Αιματολογική κλινική (σύνολο 7 κρουσμάτων), ενώ τα υπόλοιπα κρούσματα εμφανίζονται σποραδικά στις υπόλοιπες κλινικές. Η πλειοψηφία των ασθενών με $LOS \geq 2$ (σύνολο 29), όπου σε αυτούς προστίθενται και 6 ασθενείς με χρόνια νοσήματα και συχνές νοσηλείες καθώς και ένας ασθενής από διακομιδή από τη ΜΕΘ άλλου νοσοκομείου, ένας ασθενής από κέντρο αποκατάστασης και ένας ασθενής με πρόσφατη νοσηλεία στην ΟΥΡ/Κ, συνηγορεί υπέρ της ενδονοσοκομειακής διασποράς του στελέχους έναντι της διασποράς στην κοινότητα.

Τέλος, στο πλαίσιο παρακολούθησης της συνέχισης εμφάνισης στελεχών ΚΡC-9 μεταγενέστερα από την περίοδο της μελέτης, ελέγχθηκαν μοριακά 16 τυχαία επιλεγόμενα ΚΡC στελέχη από την διετία 2021-2022. Από αυτά, 11 ήταν ΚΡC-2 και 5 ΚΡC-9.

4.6.2. Συγκριτικά αποτελέσματα ευαισθησίας στα αντιμικροβιακά φάρμακα των στελεχών KPC-2 και KPC-9

Όλα τα KPC-9 στελέχη παρουσίασαν ανθεκτικότητα στις πενικιλίνες (αμπικιλίνη και πιπερακιλλίνη), στους συνδυασμούς αντιβιοτικών β-λακτάμης με αναστολείς των β-λακταμασών (αμοξυκιλλίνη-κλαβουλανικό, πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη), κεφοξιτίνη, εκτεταμένου φάσματος κεφαλοσπορίνες (κεφταζιδίμη, κεφοναξίμη, κεφεπίμη) και την αζτρεονάμη. Επιπλέον, όλα τα στελέχη ήταν ανθεκτικά στις κινολόνες (σιπροφλοξασίνη, λεβοφλοξασίνη και οφλοξασίνη), ενώ όσον αφορά τις αμινογλυκοσίδες, 1 στέλεχος εμφάνισε ευαισθησία στην αμικασίνη και 1 στέλεχος στην τομπραμυκίνη, ενώ 46 από τα 47 στελέχη ήταν ευαίσθητα στη γενταμυκίνη (Πίνακας 4.15). Όσον αφορά την τιγκεκυκλίνη, τα KPC-9 στελέχη διατηρούν υψηλή ευαισθησία (78,7%) σε παρόμοια επίπεδα με τα KPC-2 (86,9%) ενώ στην περίπτωση της κολιστίνης φαίνεται ότι τα KPC-9 έχουν σημαντικά χαμηλότερη ευαισθησία (46,8%) συγκριτικά με τα KPC-2 (Πίνακας 4.14).

Στον Πίνακα 4.16 καταγράφεται ο αριθμός των ανθεκτικών στελεχών για τα KPC-2 και τα KPC-9 έναντι των συνδυασμών τριών και τεσσάρων ομάδων αντιβιοτικών. Παρατηρούμε ότι τα KPC-9 στελέχη είναι όλα ανθεκτικά ταυτόχρονα σε κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες και κινολόνες αλλά κανένα δεν συνδυάζει ταυτόχρονα και ανθεκτικότητα στις αμινογλυκοσίδες.

Η κατανομή των MIC για τις κεφαλοσπορίνες φαίνονται στον Πίνακα 4.17. Σχετικά με τις καρβαπενέμες, εκτός από ένα στέλεχος σε κάθε κατηγορία με ενδιάμεση ευαισθησία στην ιμιπενέμη, όλα τα υπόλοιπα παρουσιάζουν ανθεκτικότητα με τιμές MIC που ποικίλλουν όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.18. Επίσης, η κατανομή των MIC για τις αμινογλυκοσίδες, τις κινολόνες, τη νιτροφουραντοΐνη, το συνδυασμό τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη (SXT), την κολιστίνη και την τιγκεκυκλίνη καταγράφεται στους Πίνακες 4.19-4.24.

Πίνακας 4.15. Σύγκριση της ευαισθησίας των στελεχών *K. pneumoniae* KPC-2 και KPC-9 στα αντιβιοτικά.

	R* n(%)		I* n(%)		S* n(%)	
	KPC-2	KPC-9	KPC-2	KPC-9	KPC-2	KPC-9
Σιπροφλοξασίνη	115 (88,5)	47 (100)	5 (3,8)	0	10 (7,7)	0
Λεβοφλοξασίνη	113 (87,0)	47 (100)	5 (3,8)	0	12 (9,2)	0
Οφλοξασίνη	116 (89,2)	47 (100)	1 (0,8)	0	13 (10,0)	0
Μοξιφλοξασίνη	117 (90,0)	47 (100)	7 (5,4%)	0	6 (4,6)	0
Ναλιδιξικό οξύ	121 (93,1)	47 (100)	0	0	9 (6,9)	0
Αμικασίνη	79 (60,8)	41 (87,2)	20 (15,4)	5 (10,7)	31 (23,8)	1 (2,1)
Γενταμικίνη	18 (13,9)	0	5 (3,8)	1 (2,1)	107 (82,3)	46 (97,9)
Τομπραμυκίνη	119 (91,5)	46 (97,9)	3 (2,3)	0	8 (6,2)	1 (2,1)
Τετρακυκλίνη	50 (38,5)	13 (27,7)	11 (8,5)	13 (27,7)	69 (53,0)	21 (44,6)
Μινοκυκλίνη	62 (47,7)	32 (68,1)	47 (36,1)	11 (23,4)	21 (16,2)	4 (8,5)
Νιτροφουραντοΐνη	118 (90,8)	47 (100)	6 (4,6)	0	6 (4,6)	0
TMP/SMX**	117 (90,0)	42 (89,4)	0	0	13 (10,0)	5 (10,6)
Χλωραμφαινικόλη	109 (83,8)	42 (89,4)	10 (7,7)	5 (10,6)	11 (8,5)	0
Τιγκεκυκλίνη	10 (7,7)	3 (6,4)	7 (5,4)	7 (14,9)	113 (86,9)	37 (78,7)
Κολιστίνη	22 (16,9)	25 (53,2)	0	0	108 (83,1)	22 (46,8)

* R= ανθεκτικό, I= ενδιάμεση ευαισθησία και S= ευαίσθητο

** TMP/SMX=Τριμεθοπρίμη/Σουλφαμεθοξαζόλη

Πίνακας 4.16. Ανθεκτικότητα των στελεχών *K. pneumoniae* KPC-2 και KPC-9 σε συνδυασμούς αντιβιοτικών.

Ομάδες αντιβιοτικών	2014	2015	ΣΥΝΟΛΙΚΑ N (%)
KPC-2 (N=130)			
Κεφαλοσπορίνες+καρβαπενέμες+κινολόνες	66	45	111 (85,4)
Κεφαλοσπορίνες+καρβαπενέμες+κινολόνες +αμινογλυκοσίδες	2	2	4 (3,1)
KPC-9 (N=47)			
Κεφαλοσπορίνες+καρβαπενέμες+κινολόνες	21	26	47 (100)
Κεφαλοσπορίνες+καρβαπενέμες+κινολόνες +αμινογλυκοσίδες	0	0	0

Πίνακας 4.17. Κατανομή των MICs στις κεφαλοσπορίνες για τα στελέχη KPC-2 και KPC-9.

Στέλεχος/Αντιβιοτικό	MIC (mg/L)/Αριθμός στελεχών							
	2	4	≥4	8	16	24	32	≥64
KPC-2, N=130								
Κεφεπίμη	9	4		35	10		6	66
Κεφοταξίμη		2		34	9		14	71
Κεφοξιτίνη				5	5	1	18	101
Κεφταξιδίμη					20	1		109
Κεφτριαξόνη					5		6	119
Κεφιξίμη			130					
Κεφουροξίμη								130
KPC-9, N=47								
Κεφεπίμη				3	9		5	30
Κεφοταξίμη				2			8	37
Κεφοξιτίνη					2		8	37
Κεφταξιδίμη								47
Κεφτριαξόνη								47
Κεφιξίμη			47					
Κεφουροξίμη								47

Πίνακας 4.18. Κατανομή των MICs στις καρβαπενέμες για τα στελέχη KPC-2 και KPC-9.

Στέλεχος/Αντιβιοτικό	MIC (mg/L)/Αριθμός στελεχών					
	1	2	4	8	≥8	≥16
KPC-2, N=130						
Ιμιπενέμη		1 (I)		19 (R)		110 (R)
Μεροπενέμη				6 (R)		124 (R)
Ερταπενέμη			7 (R)		123 (R)	
KPC-9, N=47						
Ιμιπενέμη		1 (I)		9 (R)		37 (R)
Μεροπενέμη						47 (R)
Ερταπενέμη			2 (R)		45 (R)	

Πίνακας 4.21. Κατανομή των MICs στη νιτροφουραντοΐνη για τα στελέχη KPC-2 και KPC-9.

Στέλεχος/Αντιβιοτικό	MIC (mg/L)/Αριθμός στελεχών					
	≤16 (S)	32 (S)	64 (I)	128 (R)	256 (R)	≥512 (R)
KPC-2, N=130						
Νιτροφουραντοΐνη	2	4	6	6	53	59
KPC-9, N=47						
Νιτροφουραντοΐνη					31	16

Πίνακας 4.22. Κατανομή των MICs στο SXT για τα στελέχη KPC-2 και KPC-9.

Στέλεχος/Αντιβιοτικό	MIC (mg/L)/Αριθμός στελεχών			
	≤20 (S)	40 (S)	160 (R)	≥320 (R)
KPC-2, N=130				
TMP/SMZ	10	3		117
KPC-9, N=47				
TMP/SMZ	4	1	2	40

Πίνακας 4.23. Κατανομή των MICs στην κολιστίνη για τα στελέχη KPC-2 και KPC-9.

Στέλεχος/Αντιβιοτικό	MIC (mg/L)/Αριθμός στελεχών					
	≤0,5 (S)	1 (S)	2 (S)	4 (R)	8 (R)	≥16 (R)
KPC-2, N=130						
Κολιστίνη	91	7	10	5	4	13
KPC-9, N=47						
Κολιστίνη	20	2		3	5	17

Πίνακας 4.24. Κατανομή των MICs στην τιγκεκυκλίνη για τα στελέχη KPC-2 και KPC-9.

Στέλεχος/Αντιβιοτικό	MIC (mg/L)/Αριθμός στελεχών						
	≤0,5 (S)	0,75 (S)	1 (S)	1,5 (S)	2 (S)	4 (R)	≥16 (R)
KPC-2, N=130							
Τιγκεκυκλίνη	15	4	24	12	58	7	10
KPC-9, N=47							
Τιγκεκυκλίνη	9	4	6	2	16	7	3

Από τη στατιστική ανάλυση προέκυψε ότι στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των MIC των KPC-2 και KPC-9 υπάρχει μόνο για την κεφταζιδίμη (Πίνακας 4.25). Στο Σχήμα 4.8 βλέπουμε τα ιστογράμματα για τις MIC της κεφταζιδίμης για τα δύο αλλήλια. Το ποσοστό των στελεχών KPC-9 με $\text{MIC} \geq 64 \text{ mg/L}$ είναι στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερο από το ποσοστό των στελεχών KPC-2 με την ίδια MIC.

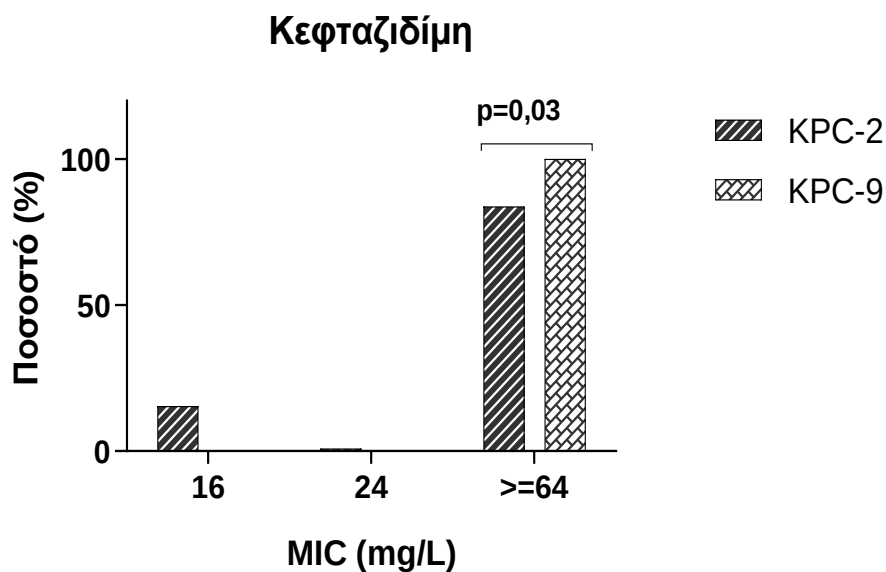
Παρομοίως, η στατιστική ανάλυση σχετικά με την σύγκριση των KPC-2 και KPC-9 όσον αφορά τις κατηγορίες I, S και R για τα αντιβιοτικά που υπήρχαν ευαίσθητα στελέχη, έδειξε ότι στατιστικά σημαντική διαφορά έχουμε στην περίπτωση της αμικασίνης και της κολιστίνης (Πίνακας 4.26). Στα Σχήματα 4.9 και 4.10 βλέπουμε τα ιστογράμματα για την αμικασίνη και την κολιστίνη, αντίστοιχα. Παρατηρούμε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντικά αυξημένο ποσοστό ανθεκτικών στην αμικασίνη στελεχών KPC-9 συγκριτικά με τα KPC-2 και ταυτόχρονα στατιστικά σημαντικά μείωση του ποσοστού ευαίσθητων στην αμικασίνη στελεχών KPC-9 συγκριτικά με τα KPC-2. Παρομοίως και στην περίπτωση της κολιστίνης το ποσοστό των ανθεκτικών στελεχών είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο για τα στελέχη KPC-9 συγκριτικά με τα KPC-2.

Πίνακας 4.25. Αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης για τη σύγκριση των KPC-2 και KPC-9 όσον αφορά την MIC των διαφόρων αντιμικροβιακών παραγόντων με τη μέθοδο Pearson χ^2 ή Fisher's exact test (επίπεδο σημαντικότητας $p < 0,05$).

Αντιμικροβιακό	Pearson χ^2	p
Κεφαλοσπορίνες *		
Κεφοξιτίνη	2,425	0,658
Κεφοταξίμη	16,490	0,002 **
Κεφοξιτίνη	2,425	0,658
Κεφταζιδίμη	8,614	0,013
Κεφτριαξόνη	4,240	0,120
Κεφεπίμη	18,805	0,002 **
Καρβαπενέμες		
Μεροπενέμη	2,245	0,344
Ιμιπενέμη	1,484	0,686
Ερταπενέμη	0,091	0,763
Αμινογλυκοσίδες		
Αμικασίνη	13,207	0,010 **
Γενταμυκίνη	17,261	0,002 **
Τομπραμυκίνη	2,334	0,311
Κινολόνες		
Σιπροφλοξασίνη	5,925	0,205
Λεβοφλοξασίνη	6,799	0,147
Μοξιφλοξασίνη	5,073	0,280
Οφλοξασίνη	5,496	0,240
Υπόλοιπα		
Νιτροφουραντοΐνη	12,171	0,033 **
Τριμεθοπρίμη/Σουλφαμεθοξαζόλη	5,659	0,129
Κολιστίνη	31,455	<0,001 **
Τιγκεκυκλίνη	10,420	0,108

* Οι τιμές της MIC για όλα τα στελέχη (KPC-2 και KPC-9) ανήκαν στην ίδια κατηγορία στην περίπτωση της κεφουροξίμης ($MIC \geq 64$) και της κεφιξίμης ($MIC \geq 4$).

** Δεν ανευρέθηκαν σημαντικές διαφορές στο post-hoc τεστ μετά την εφαρμογή της διόρθωσης Bonferroni [187].

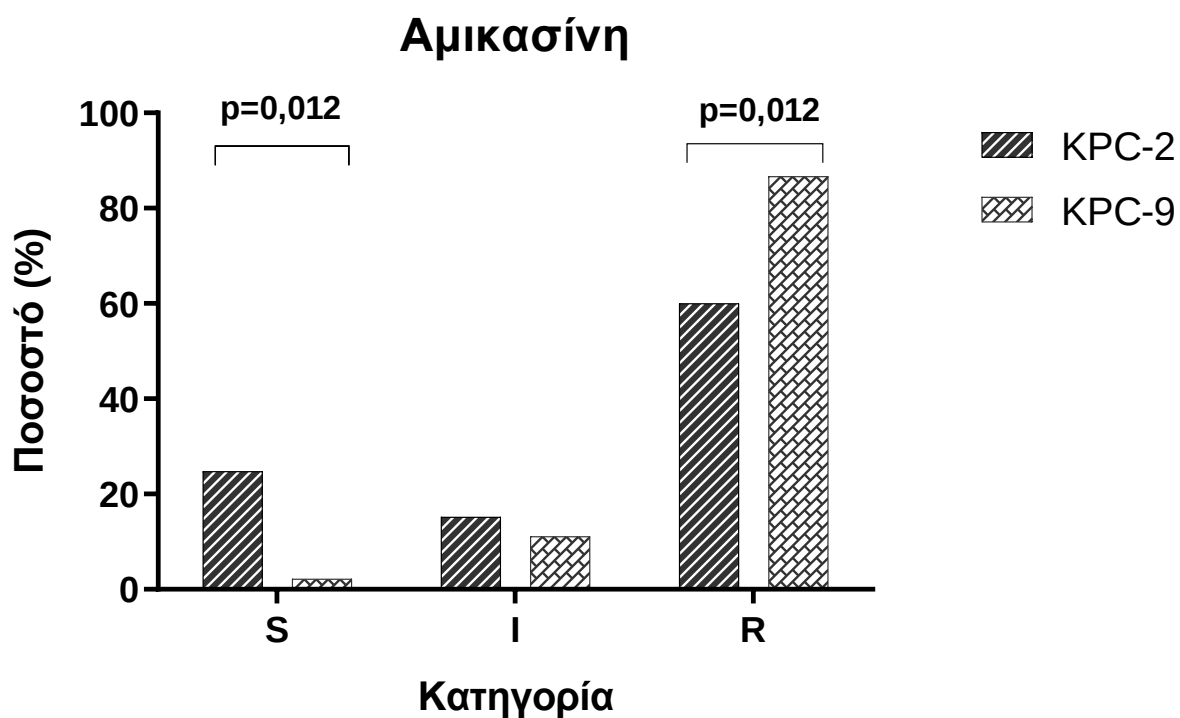


Σχήμα 4.8. Ιστογράμμο των MIC της κεφταζιδίμης για τα στελέχη KPC-2 και KPC 9.

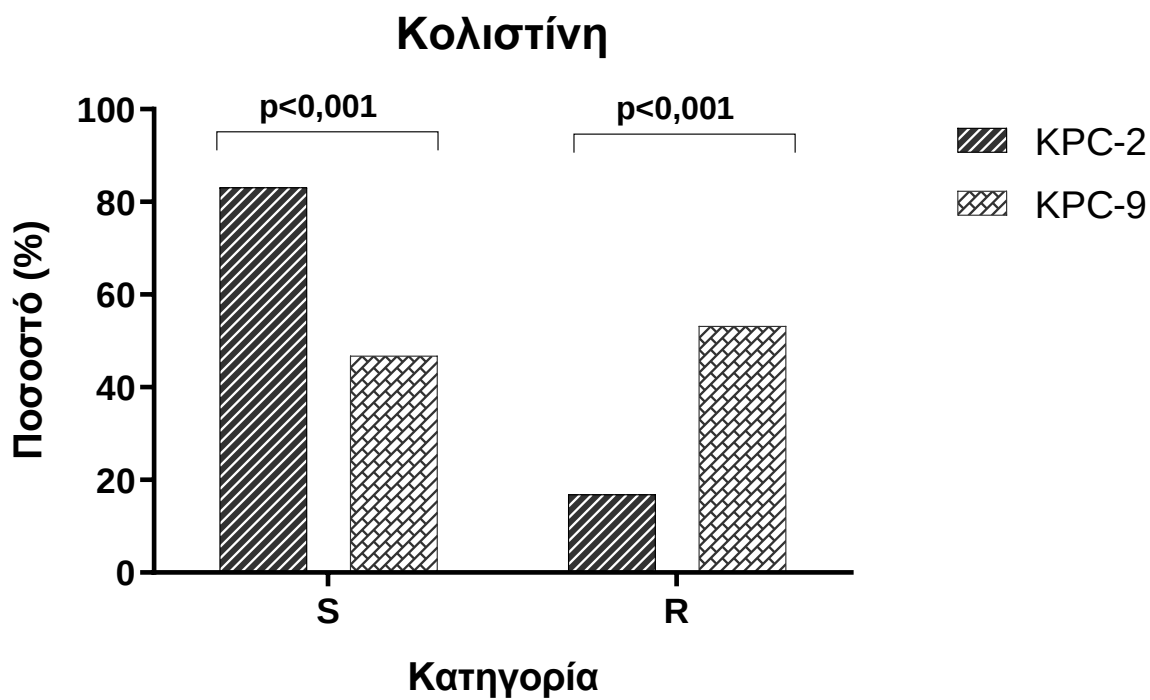
Πίνακας 4.26. Αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης για τη σύγκριση των KPC-2 και KPC-9 όσον αφορά την κατηγορία S, I και R των διαφόρων αντιμικροβιακών παραγόντων με τη μέθοδο Pearson χ^2 ή Fisher's exact test (επίπεδο σημαντικότητας $p < 0,05$).

Αντιμικροβιακό	Pearson χ^2	p
Αμινογλυκοσίδες		
Αμικασίνη	13,123	0,001
Γενταμικίνη	7,776	0,020*
Τομπραμικίνη	2,334	0,311
Κινολόνες		
Σιπροφλοξασίνη	5,925	0,052
Λεβοφλοξασίνη	6,799	0,033*
Μοξιφλοξασίνη	5,073	0,079
Οφλοξασίνη	5,496	0,064
Υπόλοιπα		
Νιτροφουραντοΐνη	4,654	0,098
Τριμεθοπρίμη/Σουλφαμεθοξαζόλη	0,015	0,901
Κολιστίνη	23,283	<0,001
Τιγκεκυκλίνη	4,301	0,116

*Δεν ανευρέθηκαν σημαντικές διαφορές στο post-hoc τεστ μετά την εφαρμογή της διόρθωσης Bonferroni [187].



Σχήμα 4.9. Ιστόγραμμα της κατανομής των στελεχών KPC-2 και KPC-9 στις κατηγορίες S, I και R ανάλογα με την ευαισθησία τους στην αμικασίνη.



Σχήμα 4.10. Ιστόγραμμα της κατανομής των στελεχών KPC-2 και KPC-9 στις κατηγορίες S, I και R ανάλογα με την ευαισθησία τους στην κολιστίνη.

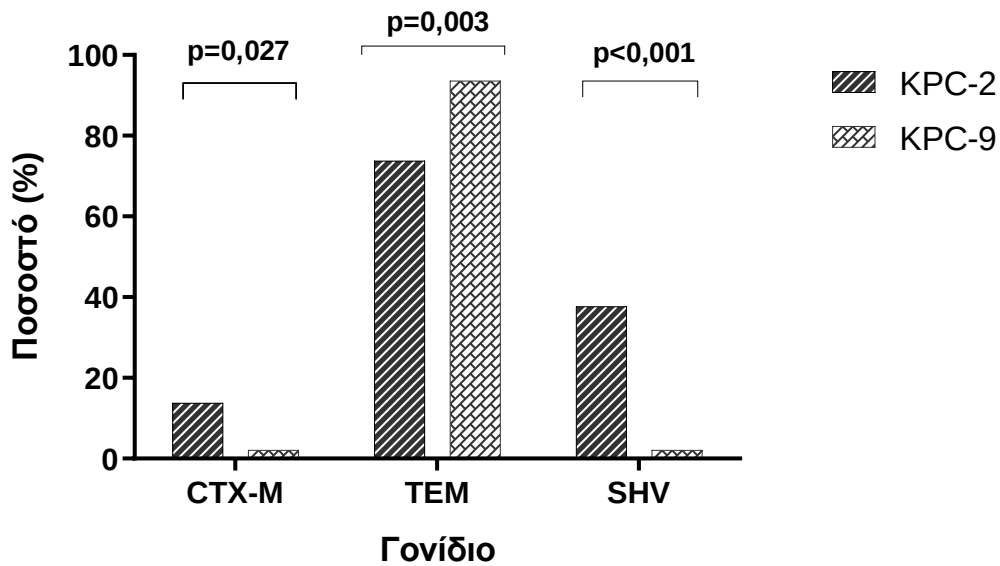
4.6.3. Συχνότητα εμφάνισης των γονιδίων ESB� στα στελέχη KPC-2 και KPC-9

Στον Πίνακα 4.27 φαίνεται η κατανομή των γονιδίων ESB� (CTX-M, TEM και SHV) και παραγωγής καρβαπενεμασών που ανιχνεύτηκαν στα KPC-2 και KPC-9 στελέχη. Όσον αφορά τα MBL γονίδια, το ένα στέλεχος που βρέθηκε να συμπαραγάγει KPC και MBL (NDM) ήταν KPC-2. Από τα δεδομένα του πίνακα είναι φανερό ότι τα στελέχη KPC-9 κατά συντριπτική πλειοψηφία φέρουν το γονίδιο TEM. Επιπλέον, ένα στέλεχος φέρει μόνο το γονίδιο SHV, ενώ το γονίδιο CTX-M εμφανίζεται σε ένα στέλεχος σε συνδυασμό με το γονίδιο TEM. Από την άλλη, τα στελέχη KPC-2 φέρουν, συγκριτικά με τα υπόλοιπα γονίδια ESB�, το TEM σε μεγαλύτερη συχνότητα (73,8%), το οποίο συχνά συνδυάζεται με το SHV (22,3%) και το CTX-M (13,1%). Οι συνδυασμοί CTX-M+SHV και TEM+CTX-M+SHV απαντούν λιγότερο συχνά με ποσοστά αντίστοιχα 3,8 και 3,1 % (Πίνακας 4.27).

Από τη στατιστική ανάλυση προκύπτει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά τη συχνότητα εμφάνισης και για τα τρία ESB� γονίδια (CTX-M, TEM και SHV) στα στελέχη KPC-9 και KPC-2. Οι διαφορές αυτές απεικονίζονται στο ιστόγραμμα του σχήματος 4.11.

Πίνακας 4.27. Συχνότητα εμφάνισης των γονιδίων ESB� στα στελέχη KPC-2 και KPC-9.

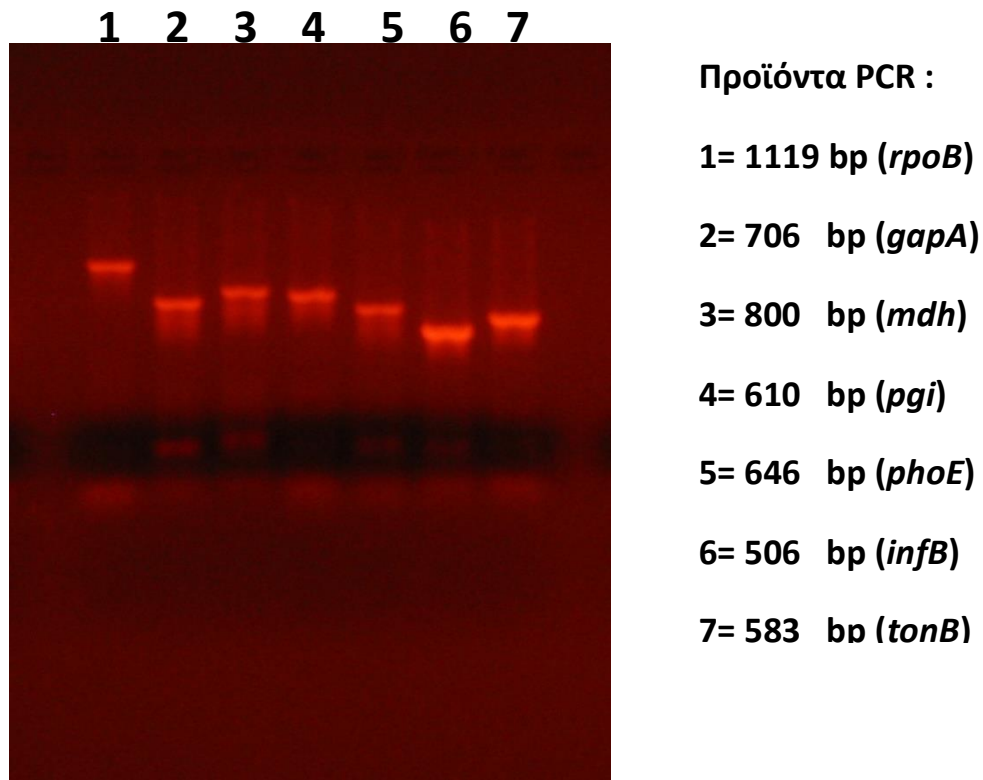
Γονίδια	Συχνότητα n (%)	
	KPC-2	KPC-9
<i>bla</i> _{CTX-M}	18 (13,8)	1 (2,1)
<i>bla</i> _{TEM}	96 (73,8)	44 (93,6)
<i>bla</i> _{SHV}	49 (37,7)	1 (2,1)
<i>bla</i> _{NDM}	1 (0,8)	0
<i>bla</i> _{VIM}	0	0
<i>bla</i> _{CTX-M} και <i>bla</i> _{TEM}	17 (13,1)	1 (2,1)
<i>bla</i> _{CTX-M} και <i>bla</i> _{SHV}	5 (3,8)	0
<i>bla</i> _{TEM} και <i>bla</i> _{SHV}	29 (22,3)	0
<i>bla</i> _{CTX-M} και <i>bla</i> _{TEM} και <i>bla</i> _{SHV}	4 (3,1)	0



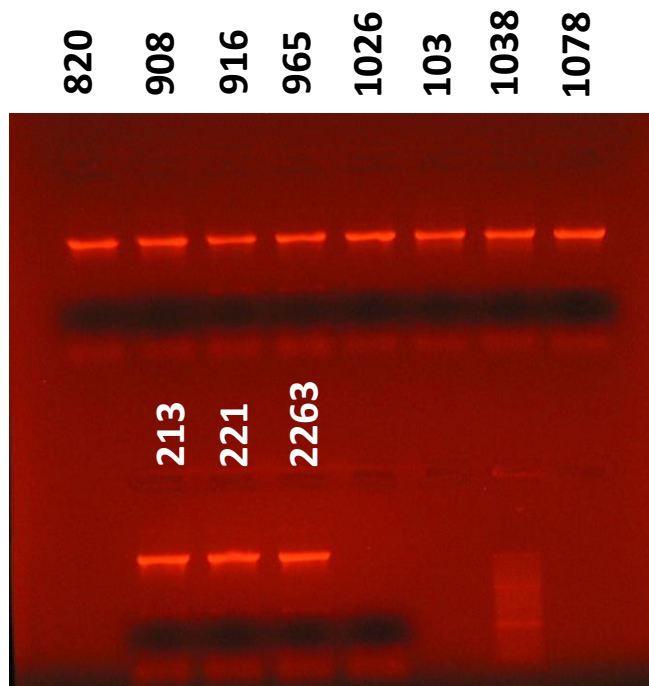
Σχήμα 4.11. Σύγκριση των συχνοτήτων εμφάνισης των γονιδίων *ESBL* στα στελέχη *KPC-2* και *KPC-9*.

4.6.4. Αποτελέσματα τυποποίησης MLST

Στο Σχήμα 4.12 αποτυπώνεται η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πολλαπλασιασμού της PCR για τα επτά γονίδια της MLST για στέλεχος *KPC* της μελέτης (αριθμός στελέχους, n=1085). Στο Σχήμα 4.13 βλέπουμε την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πολλαπλασιασμού της PCR για το πρώτο γονίδιο της MLST (*groB*) για κάποια από τα στελέχη που επιλέχτηκαν αντιπροσωπευτικά. Τα στελέχη με αρίθμηση 820, 908, 916 και 965 είναι από το έτος 2014, τα 1026, 1035, 1038 και 1078 από το 2015 και τα στελέχη 2138, 2211 και 2263 από το 2021. Συνολικά 32 στελέχη τυποποιήθηκαν με τη μέθοδο MLST (και cgMLST, [100]) από τα έτη 2014, 2015 και 2021 και βρέθηκε ότι όλα ανήκουν στον κλώνο ST 258.



Σχήμα 4.12. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πολλαπλασιασμού των επτά γονιδίων της *MLST* για ένα από τα *KPC* στελέχη *K. pneumoniae*.



Σχήμα 4.13. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πολλαπλασιασμού του πρώτου γονιδίου (*rpoB*) της *MLST* για αντιπροσωπευτικά στελέχη.

4.6.5. Σύγκριση των στελεχών KPC-2 και KPC-9 αναφορικά με την έκβαση των ασθενών

Στον Πίνακα 4.28 βλέπουμε την έκβαση των νοσηλευόμενων ασθενών μετά την απομόνωση στελεχών KPC-2 και KPC-9 από τα κλινικά δείγματά τους. Παρατηρούμε ότι τα ποσοστά για τη θανατηφόρα κατάληξη των ασθενών είναι παρόμοια και για τους δύο υπότυπους του KPC και αυτό επιβεβαιώνεται και από την στατιστική ανάλυση κατά την οποία δεν προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά ($\chi^2=0,004$, $p=1,00$). Όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.29 παρόμοια αποτελέσματα προκύπτουν και από τη σύγκριση της έκβασης ασθενών με μικροβιαμία από στελέχη KPC-2 και KPC-9 ($\chi^2=0,016$, $p=1,00$).

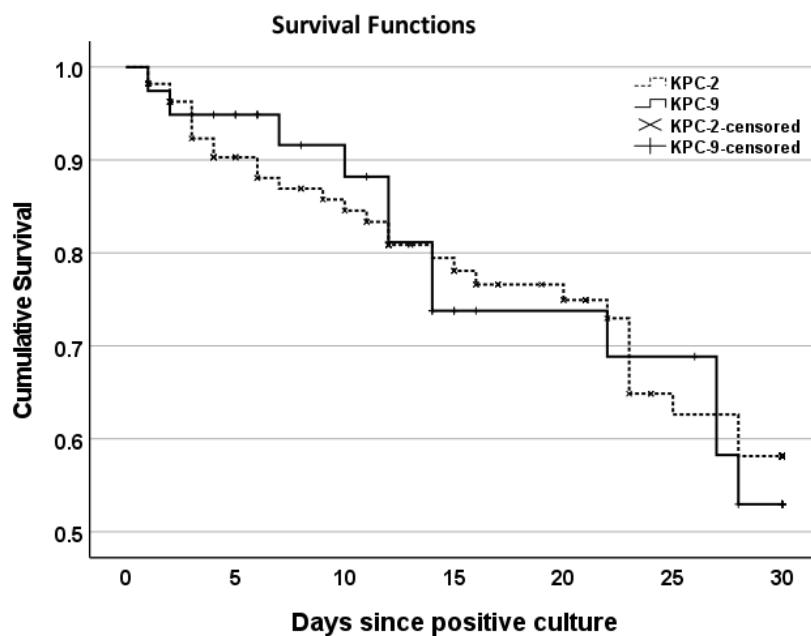
Πίνακας 4.28. Έκβαση των ασθενών με λοίμωξη από στελέχη KPC-2 και KPC-9.

Στέλεχος	Βελτίωση N (%)	Θάνατος N (%)	Σύνολο
KPC-2	66 (60,6)	43 (39,4)	109
KPC-9	24 (60,0)	16 (40,0)	40

Πίνακας 4.29. Έκβαση των ασθενών με λοίμωξη αιματικής ροής από στελέχη KPC-2 και KPC-9.

Στέλεχος	Βελτίωση N (%)	Θάνατος N (%)	Σύνολο
KPC-2	6 (37,5)	10 (62,5)	16
KPC-9	4 (40,0)	6 (60,0)	10

Στο Σχήμα 4.14 βλέπουμε τις καμπύλες Kaplan-Meier της συνολικής επιβίωσης 30 ημερών των ασθενών μετά την απομόνωση των στελεχών KPC-2 και KPC-9 από τα κλινικά δείγματά τους. Η σύγκριση των καμπυλών της συνολικής επιβίωσης 30 ημερών των ασθενών με φορεία/λοίμωξη από στέλεχος KPC-2 έναντι των ασθενών με στέλεχος KPC-9 δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά ($\chi^2=0,023$, $p=0,880$).



Σχήμα 4.14. Καμπύλες Kaplan-Meier που δείχνουν τη συνολική επιβίωση των ασθενών μετά την απομόνωση του στελέχους KPC-2 συγκριτικά με τους ασθενείς από τους οποίους απομονώθηκε το στέλεχος KPC-9.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα εργασία αφορούσε στην μελέτη των λοιμώξεων που προκαλούνται από εντεροβακτηριακά στελέχη ανθεκτικά στις καρβαπενέμες μέσω παραγωγής καρβαπενεμασών τάξης A και εστιάστηκε ιδιαίτερα στον χαρακτηρισμό και την τυποποίηση αυτών των στελεχών.

Η μελέτη αυτή επικεντρώθηκε στην απομόνωση των στελεχών CRE από όλα τα κλινικά δείγματα που παρελήφθησαν από το Μικροβιολογικό Εργαστήριο του ΠΓΝΙ κατά τη διάρκεια των ετών 2014-2015 και τη μελέτη του φαινοτύπου και γονοτύπου των στελεχών αυτών σε συνδυασμό με τα κλινικά και δημογραφικά δεδομένα των ασθενών. Συμπεριλήφθηκαν και κλινικά δείγματα από μη στείρες περιοχές (ούρα, πτύελα, τραυματικό υλικό) που σχετίστηκαν με λοιμώξεις, παρά την δυσκολία στη διάκριση ανάμεσα στη λοίμωξη και τον αποικισμό. Από τα εντεροβακτηριακά και κυρίως εντεροβακτηριδιοειδή με φαινοτυπική επιβεβαίωση της παραγωγής καρβαπενεμάσης, η συντριπτική πλειοψηφία αφορούσε στελέχη *K. pneumoniae*. Ειδικότερα, στα επιβεβαιωμένα με PCR απομονωθέντα στελέχη που παράγουν καρβαπενεμάση KPC, βρέθηκαν 177 *K. pneumoniae* και μόλις 2 στελέχη *E. coli*. Αυτό είναι γενικά αναμενόμενο και κατά τη χρονική διάρκεια της μελέτης, αλλά και στην παρούσα περίοδο, βάσει και της ετήσιας αναφοράς του EARS-Net για τις διεισδυτικές λοιμώξεις για το έτος 2023, όπου η ανθεκτικότητα του *E. coli* στις καρβαπενέμες συνεχίζει να παραμένει σπάνια (μόλις 0,3%) [8]. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι και τα δύο επιβεβαιωμένα KPC στελέχη *E. coli* απομονώθηκαν από δείγματα ούρων και δεν σχετίζονταν με λοίμωξη αιματικής ροής, κάτι που συνάδει επίσης με τα αποτελέσματα του EARS-Net [8].

Σε σύνολο 309 στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάση, τα 189 (61%) ήταν KPC και τα 120 MBL (39%) βάσει των φαινοτυπικών δοκιμασιών. Το εύρημα αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με την επιδημιολογική εικόνα για τα στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάση που επικρατούσε στον ελληνικό χώρο την περίοδο 2014-2015 που απομονώθηκαν τα στελέχη της διατριβής. Η μελέτη των Galani *et al* από 15 νοσοκομεία κατά την περίοδο 2014-2016 έδειξε την επικράτηση των KPC με ποσοστό 66,5%, με τα NDM και VIM να ακολουθούν με ποσοστά 13,7% και 8,4% αντίστοιχα. Επίσης, στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκαν στελέχη που παράγουν δύο

τύπους καρβαπενεμάσης (5,6%) και στελέχη OXA-48 (3,6%) [96]. Στην παρούσα μελέτη, από τα στελέχη KPC που απομονώθηκαν βρέθηκε ένα στέλεχος το οποίο συμπαραγάγει KPC και NDM. Η μοριακή επιδημιολογία των στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάσες παραμένει η ίδια μέχρι σήμερα στον Ελλαδικό χώρο, με τη σταθερή επικράτηση των KPC ακολουθούμενα από τα NDM [188-190]. Εξαίρεση αποτελεί μία επταετή μελέτη βακτηριακίων από στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάση, η οποία διεξήχθη στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Πατρών και διαπίστωσε μια σταδιακή μείωση των στελεχών KPC συνοδευόμενη από σημαντική αύξηση των MBL και ιδιαίτερα των VIM. Η μεταβολή αυτή στο γονότυπο των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *K. pneumoniae* αποδόθηκε στην εισαγωγή στη θεραπευτική αγωγή, ιδιαίτερα στις ΜΕΘ, του συνδυασμού κεφταζιδίμη/αβιμπακτάμη, ο οποίος παρουσιάζει ιδιαίτερη αποτελεσματικότητα στη θεραπεία των λοιμώξεων από στελέχη KPC [191].

Από τους υπότυπους του KPC, κυρίως το KPC-2 ενδημεί στον ελλαδικό χώρο. Η απομόνωση στελεχών KPC-3 αναφέρεται σποραδικά [192-194] τα τελευταία χρόνια και πρόσφατα απομονώθηκε στέλεχος το οποίο συμπαραγάγει KPC-3 και NDM-1 [194]. Κατά την περίοδο 2014-2015 γίνεται και η πρώτη επιβεβαιωμένη αναφορά των στελεχών KPC-9, ως αίτιο έξαρσης κρουσμάτων στο ΠΓΝΙ [97], μέρος των οποίων εμπεριέχονται σε αυτή τη διατριβή. Το KPC-9 εμφανίστηκε πρώτη φορά το 2012 στο Ισραήλ παράλληλα με την έξαρση κρουσμάτων του KPC-3 [195]. Διαφέρει από το KPC-3 σε ένα αμινοξύ και θεωρείται ότι προέρχεται από την εξέλιξη αυτού του αλληλίου. Στην παρούσα μελέτη, στο σύνολο των 177 στελεχών KPC που απομονώθηκαν, τα 130 (73,4%) ανήκαν στο KPC-2 αλληλίο και τα 47 (26,6%) στο KPC-9 αλληλίο. Παρατηρούμε ότι την περίοδο αυτή υπήρξε σημαντική διασπορά των KPC-9 στο νοσοκομείο μας. Η έξαρση των κρουσμάτων KPC-9 φαίνεται να πραγματοποιείται σε δύο κύματα, το ένα το 2014 και το άλλο το 2015 με χαρακτηριστική συσσώρευση κρουσμάτων στην αιματολογική κλινική κατά τη διάρκεια του πρώτου κύματος. Βάσει του ιστορικού διακίνησης των ασθενών πιθανολογείται η ενδονοσοκομειακή διασπορά. Από την αρχική αναγνώριση παρουσίας του KPC-9 στο Νοσοκομείο μας [97], μέχρι σήμερα, δεν υπήρξε άλλη αναφορά της παρουσίας των KPC-9 στον ελλαδικό χώρο, ως παραλλαγής KPC που ενέχεται σε επιδημικές εξάρσεις σε

Νοσοκομείο, πλην της σποραδικής απομόνωσης στελέχους KPC-23 σε Νοσοκομείο της Βόρειας Ελλάδας το οποίο εμφάνισε ανθεκτικότητα στον συνδυασμό κεφταζιδίμη/αβιμπακτάμη [192]. Το KPC-23, το οποίο διαφέρει από το KPC-3 και το KPC-2 κατά ένα και δύο αμινοξέα αντίστοιχα, φαίνεται να είναι η πλήρης μορφή του KPC-9. Η σύγκριση νουκλεοτιδίων της πλήρους αλληλούχησης των *bla*_{KPC-9} και *bla*_{KPC-23} έδειξε ότι ουσιαστικά μοιράζονται την ίδια αλληλουχία εκτός από μια πρόσθετη περιοχή 13 νουκλεοτιδίων απευθείας έναντι του 5' άκρου του *bla*_{KPC-9} που εμφανίζεται στην αλληλουχία αναφοράς του *bla*_{KPC-23} [183]. Θα είχε ιδιαίτερα ενδιαφέρον να προσδιοριστεί η έναρξη εμφάνισης στο ΠΓΝΙ των KPC-9 στελεχών σε κλινικό δείγμα ή δείγμα ελέγχου φορείας (screening), προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω η επιδημιολογική ή εξελικτική του προέλευση, εντούτοις αυτό δεν κατέστη εφικτό λόγω της μη διάθεσης προγενέστερων KPC κλινικών στελεχών από το αρχείο του εργαστηρίου Μικροβιολογίας. Θα πρέπει επιπρόσθετα να λάβουμε υπόψη ότι στην Ελλάδα δεν καταγράφεται συστηματικά ο γονότυπος των ανθεκτικών στην καρβαπενέμη μικροβιακών στελεχών, αλλά πραγματοποιείται κυρίως για ερευνητικούς λόγους. Η παρουσία εντούτοις των KPC-9 στελεχών δεν φαίνεται να ήταν παροδική, δεδομένης της συνέχισης απομόνωσης τέτοιων στελεχών το 2021-2022, σε ποσοστό ανάλογο του ποσοστού κατά το διάστημα 2014-2015 (31,25% ν 27,7% αντίστοιχα).

Όλα τα στελέχη KPC αυτής της μελέτης που ελέγχθηκαν βρέθηκε ότι ανήκουν στον κλώνο ST258. Δεδομένα από 15 νοσοκομεία, ένα εκ των οποίων και το ΠΓΝΙ, τα οποία συμμετείχαν σε πρόγραμμα του ECDC ευρωπαϊκής επιτήρησης σε γενετικό επίπεδο των ανθεκτικών σε καρβαπενέμες ή/και κολιστίνη Εντεροβακτηριακών για την περίοδο 2013-2022 στην Ελλάδα, έδειξαν ότι πάνω από 90% των στελεχών *K. pneumoniae* με ανθεκτικότητα/μειωμένη ευαισθησία στις καρβαπενέμες ανήκουν κυρίως σε πέντε κλώνους κατά σειρά μειωμένης συχνότητας: ST258/512, ST11, ST39, ST147 και ST323 [116]. Οι κλώνοι ST258/512, ST11 και ST147 θεωρούνται κλώνοι υψηλού κινδύνου και κυριαρχούν επίσης και σε άλλες χώρες της ΕΕ/ΕΖ αλλά και παγκοσμίως. Το Νοσοκομείο μας συμμετείχε στη μελέτη από το 2019 και μετέπειτα, όπου οι κλώνοι που ανήκαν τα *K. pneumoniae* KPC στελέχη ήταν κυρίως ο ST11 και με μικρότερη συχνότητα ο ST258/512 και ο νεοεμφανιζόμενος κλώνος ST39.

Ευρύτερα στον ελλαδικό χώρο, ενώ ο κλώνος *K. pneumoniae* ST258/512 ήταν ο πιο συχνός τα έτη 2009 και 2010 και κυριαρχούσε στις ανασκοπήσεις του ECDC τα έτη 2013, 2014 και 2019, ο κλώνος ST11 ήταν ο πιο συχνός το 2022 [116]. Ο τύπος στελέχους ST11 έχει συσχετιστεί με μεγάλο αριθμό κρουσμάτων που οφείλονται σε ενδονοσοκομειακή διασπορά και υπάρχουν ενδείξεις ταχείας εξάπλωσής του μετά την αρχική εμφάνιση σε νοσοκομειακό περιβάλλον. Τα δεδομένα από την παρούσα μελέτη για το 2014 και 2015, με τον κλώνο ST258 να κυριαρχεί αποκλειστικά στα ελεγχθέντα στελέχη, συνάδουν με τα αποτελέσματα της μελέτης του ECDC αναφορικά με τα υπόλοιπα νοσοκομεία της Ελλάδος που συμμετείχαν την περίοδο αυτή [116]. Οι κλώνοι ST39 και ST323 δεν υπήρχαν το 2013 και 2014, σύμφωνα με τα δεδομένα του ECDC, αλλά εμφανίστηκαν το 2019 και 2022, αντίστοιχα, με μικρή παρουσία του ST39 και σε στελέχη του ΠΓΝΙ. Ιδιαίτερα για τον κλώνο ST323 αναφέρεται ταχεία εξάπλωσή του σε έξι ελληνικά νοσοκομεία το 2022 σε Αττική, Πελοπόννησο και Κρήτη αλλά όχι σε νοσοκομεία της Βόρειας και Κεντρικής Ελλάδας [116]. Στην παρούσα μελέτη, η τυποποίηση περιορισμένων αντιπροσωπευτικών στελεχών KPC για το έτος 2021 έδειξε, παρόλ' αυτά, τη σταθερή επικράτηση του κλώνου ST258.

Η εξέλιξη της πολυανθεκτικότητας στα εντεροβακτηριακά φαίνεται να συνοδεύεται και από την παρουσία πολλαπλών γονιδίων που κωδικοποιούν διαφορετικού τύπου β-λακταμάσες. Έτσι, παράλληλα με το γονίδιο *bla*_{KPC}, στα στελέχη της μελέτης μας ανιχνεύτηκαν επίσης τα εξής γονίδια ESBL: TEM (79,1%), SHV (33,3%) και CTX-M (10,7%). Επιπλέον, ο πιο συχνός συνδυασμός ήταν ο TEM+SHV (20,9%), ενώ 4 στελέχη έφεραν και τα τρία γονίδια *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} και *bla*_{CTX-M}. Παρατηρούμε την επικράτηση του *bla*_{TEM} έναντι των άλλων δύο γονιδίων ESBL. Γενικά αναφέρεται ότι τα ένζυμα TEM και SHV επικρατούσαν τις δεκαετίες του '80 και '90 και συσχετιζόνταν με ενδονοσοκομειακή διασπορά της *K. pneumoniae*, ενώ τα CTX-M παρατηρούνταν λιγότερο συχνά. Όμως από τη δεκαετία του 2000 και μετά υπήρξε ταχύτατη διασπορά των CTX-M, τα οποία δεν περιορίστηκαν μόνο ενδονοσοκομειακά αλλά επεκτάθηκαν και στην κοινότητα με συνέπεια η *K. pneumoniae* να αποτελεί το πιο σημαντικό παθογόνο που παράγει αυτά τα ένζυμα [196]. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνουν και τα αποτελέσματα από το πρόγραμμα

ATLAS (Antimicrobial Testing Leadership and Surveillance), μία παγκόσμια βάση δεδομένων επιτήρησης, για την περίοδο 2017-2019 [197]. Σύμφωνα με τα δεδομένα από το ATLAS, οι γονότυποι του CTX-M αποτέλεσαν για την περίοδο 2017-2019 την πλειοψηφία των ESBL (86,7%) τόσο παγκοσμίως όσο και στην Ευρώπη (83,9%). Μια αντίστοιχη μελέτη για την Ευρώπη, η οποία βασίστηκε στο παγκόσμιο πρόγραμμα επιτήρησης INFORM (International Network for Optimal Resistance Monitoring) για την περίοδο 2013-2017, αναφέρει επίσης την επικράτηση του CTX-M-15 σε όλες τις χώρες της Ευρώπης που συμμετείχαν στο πρόγραμμα εκτός από την Ελλάδα, όπου το SHV ήταν ο πιο συνηθισμένος τύπος [198]. Αν και συστηματική ανασκόπηση για τη συχνότητα των διαφόρων τύπων ESBL στην Ελλάδα δεν φαίνεται να υπάρχει, μεμονωμένες μελέτες από ελληνικά νοσοκομεία δείχνουν τη συχνή παρουσία των γονιδίων *bla*_{TEM} και *bla*_{SHV} σε KPC στελέχη *K. pneumoniae* σε υψηλά ποσοστά, όπως και στην παρούσα μελέτη [45,108,199]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η σύγκριση των στελεχών KPC-2 με τα KPC-9 όσον αφορά τη συχνότητα των γονιδίων ESBL, όπου παρατηρείται ότι τα στελέχη KPC-9 εκφράζουν σχεδόν αποκλειστικά τη β-λακταμάση TEM (93,6%). Αυτό πιθανά να οφείλεται στην μεταγενέστερη εμφάνιση της παραλλαγής KPC-9 συγκριτικά με τα KPC-2.

Η διενέργεια φαινοτυπικών δοκιμασιών έχει προταθεί ως μια απλή και οικονομική μέθοδος για την ανίχνευση της παραγωγής καρβαπενεμάσης σε όλα τα εργαστήρια. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων των φαινοτυπικών με τις μοριακές μεθόδους για τα στελέχη της δικής μας μελέτης ανέδειξε τις δυσκολίες κατά τη χρήση των φαινοτυπικών δοκιμασιών στην καθημερινή ρουτίνα του κλινικού εργαστηρίου. Αναφορικά με το MHT, διαπιστώθηκαν ψευδώς θετικά τεστ σε τέσσερις περιπτώσεις στελέχους *K. pneumoniae*, από τις οποίες οι τρεις αφορούσαν στελέχη ESBL (δύο TEM και ένα CTX-M) και ένα στέλεχος αρνητικό σε όλα τα γονίδια που αναζητήθηκαν μέσω των μοριακών μεθόδων (Πίνακας 4.7). Το γεγονός αυτό μπορεί να ερμηνευτεί τόσο από την πιθανή παρουσία άλλων τύπων καρβαπενεμασών π.χ. OXA-48 που δεν κωδικοποιούνται από τα γονίδια *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} και *bla*_{VIM} που αναζητήσαμε με τις μοριακές μεθόδους όσο και στην πιθανά χαμηλότερη ειδικότητα του τεστ στις περιπτώσεις των στελεχών με υπερέκφραση AmpC ή CTX-M ESBL. Επίσης, το MHT τεστ παρουσίασε ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα στην περίπτωση ενός KPC και δύο

MBL στελεχών (ένα NDM και ένα VIM από τα πέντε MBL στελέχη). Παρόμοια ευρήματα και από άλλες μελέτες [200-202] συντέλεσαν στο γεγονός ότι το συγκεκριμένο τεστ δεν προτείνεται πλέον ως η ενδεδειγμένη φαινοτυπική μέθοδος για την ανίχνευση παραγωγής καρβαπενεμάσης από EUCAST και CLSI αλλά στη θέση του προτείνονται εναλλακτικά οι χρωματομετρικές μέθοδοι (CarbaNP-test, Blue-Carba test, β Carba testTM), η μέθοδος αναστολής καρβαπενέμης (CIM), η ανίχνευση της υδρόλυσης της καρβαπενέμης με φασματομετρία μάζας MALDI-TOF MS και η ανοσοχρωματογραφία [122,176].

Όσον αφορά τη δοκιμασία συνδυασμού δίσκων, διαπιστώσαμε ότι 177 από τα 186 στελέχη *K.pneumoniae* με θετικό CDT τεστ για καρβαπενεμάση τάξεως A επιβεβαιώθηκαν ως KPC από την PCR. Από τα 9 στελέχη που δεν ανιχνεύτηκε το *bla*_{KPC} γονίδιο, 4 στελέχη ήταν ESBL, 4 MBL και ένα στέλεχος ήταν αρνητικό σε όλα τα γονίδια ανθεκτικότητας που ελέγχθηκαν. Η μη ανίχνευση του γονιδίου *bla*_{KPC} σε αυτά τα 9 στελέχη δεν αποκλείει την ύπαρξη γονιδίων άλλων καρβαπενεμασών τάξης A όπως GES, SME κτλ, αν και αυτά δεν αναστέλλονται συνήθως από το PBA, καθώς και τον συνδυασμό AmpC με ESBL που μπορεί να εμφανίσει ψευδώς θετικά αποτελέσματα [182]. Και τα δύο στελέχη *E. coli* με θετικό CDT τεστ επιβεβαιώθηκαν ως KPC (+) με τις μοριακές μεθόδους. Από τα 11 στελέχη *K.pneumoniae* που παρουσίασαν φαινότυπο KPC+MBL, τα 9 στελέχη επιβεβαιώθηκαν ως KPC και τα δύο ως MBL (Πίνακας 3.8). Οι ερμηνείες για αποτελέσματα ψευδώς θετικά ή αρνητικά περιλαμβάνουν την πιθανή παραγωγή διαφορετικών καρβαπενεμασών τάξεως A και B από αυτές που ελέγχθηκαν, τη μειωμένη ευαισθησία του CDT τεστ σε στελέχη που παράγουν ταυτόχρονα δύο διαφορετικούς τύπους καρβαπενεμάσης [130] καθώς και τη βακτηριοκτόνο δράση του EDTA. Ειδικότερα, το EDTA μπορεί να έχει βακτηριοκτόνο δράση μέσω αύξησης της διαπερατότητας των μεμβρανών στα βακτήρια [203], ενώ η δράση του ως χηλικό αντιδραστήριο μπορεί να είναι μη ειδική (ως προς τα MBL) επηρεάζοντας άλλες κυτταρικές λειτουργίες [204].

Στην παρούσα μελέτη, όλα τα στελέχη KPC παρουσίασαν αυξημένες MIC για όλες τις καρβαπενέμες που εξετάστηκαν (Πίνακας 4.17). Χαρακτηριστικά, για τη μεροπενέμη το 96,6% (171/177) των στελεχών εμφάνισαν MIC $\geq$ 16 mg/L. Μία πολυκεντρική μελέτη από ελληνικά νοσοκομεία των Galani *et al* της ίδιας περιόδου,

2014-2016, αναφέρει παρόμοια αποτελέσματα με 89% (234/262) των KPC στελεχών *K. pneumoniae* να έχουν MIC $\geq$ 16 mg/L [103], ενώ παράλληλα σε μια μελέτη από τρία νοσοκομεία της Κρήτης τα 34 στελέχη KPC που απομονώθηκαν παρουσίασαν όλα MIC $>$ 16 mg/L [205]. Παρόμοια εικόνα όσον αφορά τις MIC για τις καρβαπενέμες σε στελέχη KPC παρατηρείται και σε πιο πρόσφατες μελέτες [114,191]. Από τις αμινογλυκοσίδες, τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα έναντι των στελεχών KPC, παρουσίασε η γενταμυκίνη (86,4%) με την αμικασίνη να ακολουθεί με μεγάλη διαφορά με ποσοστό ευαισθησίας 17,5% και τελευταία την τομπραμυκίνη με ποσοστό μόλις 5,1%. Συνολικά, 93,8% των στελεχών KPC ήταν ανθεκτικό σε τουλάχιστον μία από τις αμινογλυκοσίδες που ελέγχθηκαν (γενταμυκίνη, αμικασίνη, τομπραμυκίνη). Παρόμοια αποτελέσματα για την περίοδο 2014-2016 αναφέρει μια πολυκεντρική μελέτη από 14 νοσοκομεία σε 6 πόλεις της Ελλάδας με την ανθεκτικότητα στις αμινογλυκοσίδες που εξετάστηκαν να κυμαίνεται στο 92%. Στην ίδια μελέτη, η αποτελεσματικότητα των αμινογλυκοσίδων έναντι των στελεχών *K. pneumoniae* ανθεκτικών στην καρβαπενέμη ήταν κατά σειρά μειούμενης ευαισθησίας: γενταμυκίνη (43%), αμικασίνη (18%) και τομπραμυκίνη (11%) [99]. Ειδικότερα για τη γενταμυκίνη, η μελέτη των Galani *et al* αναφέρει περίπου 85% (223/262) ευαισθησία των KPC στελεχών *K. pneumoniae* έναντι της γενταμυκίνης κατά τη χρονική περίοδο 2014-2016 [103]. Σύμφωνα με τα δεδομένα του EARS-Net για τη χώρα μας, η ανθεκτικότητα των στελεχών *K. pneumoniae* στις αμινογλυκοσίδες (γενταμυκίνη/νετιλμυκίνη/τομπραμυκίνη) παρέμεινε σχεδόν σταθερή στο 50-55% για τα έτη 2015-2019 [206] με μια μικρή αυξητική τάση στη συνέχεια για να φτάσει το 64,7% κατά μέσο όρο το 2023 [9]. Μια επταετής μελέτη των βακτηριαιμιών από στελέχη *K. pneumoniae* ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στο ΠΓΝΠ (Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Πατρών) παρατήρησε την αύξηση του ποσοστού ανθεκτικότητας στη γενταμυκίνη από 57,3% το 2015 στο 84,3% το 2021 [191]. Δεδομένου ότι οι αμινογλυκοσίδες αποτελούν σε συνδυασμό με άλλα αντιβιοτικά μια σημαντική επιλογή στη θεραπεία των απειλητικών για τη ζωή λοιμώξεων, η αυξανόμενη εμφάνιση εντεροβακτηριακών στελεχών με ανθεκτικότητα στις καρβαπενέμες και υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητα στις αμινογλυκοσίδες προκαλεί παγκόσμια ανησυχία για την αποτελεσματική θεραπεία αυτών των λοιμώξεων [207,208].

Τα υψηλά ποσοστά (>90%) ανθεκτικότητας που παρατηρήθηκαν για όλες τις κινολόνες που εξετάστηκαν είναι σε γενικές γραμμές αναμενόμενα. Οι κινολόνες διαθέτουν υψηλή βιοδιαθεσιμότητα, ευρύ αντιμικροβιακό φάσμα, πολύ καλή απορρόφηση στην από του στόματος χορήγηση, σχετικά μεγάλο χρόνο ημιζωής και μικρό αριθμό παρενεργειών και γι' αυτό χρησιμοποιούνται πολύ συχνά στη θεραπεία των περισσότερων λοιμώξεων που οφείλονται σε Gram αρνητικά βακτήρια [209]. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν εκτεταμένα για περιορισμό της χρήσης των καρβαπενεμών στην πυελονεφρίτιδα από εντεροβακτηριακά ESBL αλλά και σε συνδυαστική θεραπεία με καρβαπενέμες για λοιμώξεις από μη ευαίσθητα στις καρβαπενέμες στελέχη *K. pneumoniae* [210]. Όμως, η ευρεία χρήση τους έχει οδηγήσει σε αυξημένη ανθεκτικότητα, η οποία πλέον συνδυάζεται πολύ συχνά με ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά β-λακτάμης [210,211]. Το EARS-Net αναφέρει ποσοστό ανθεκτικότητας της *K.pneumoniae* στις κινολόνες για τη χώρα μας στο 66,4% το 2015 [206], με μια μικρή αυξητική τάση στα επόμενα έτη που άγγιξε το 76,9% το 2023 [9]. Τα στελέχη της παρούσας μελέτης, παρουσιάζουν υψηλή ανθεκτικότητα (>90%) στις κινολόνες, ενώ ο συνδυασμός ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά β-λακτάμης και κινολόνες φτάνει το 89,3%.

Ο περιορισμός στις επιλογές για τη θεραπεία των λοιμώξεων από τα πολυανθεκτικά βακτήρια οδήγησε στη χρήση της εγκεκριμένης, το 2005 από το FDA, τιγκεκυκλίνης καθώς και την επαναφορά ενός ακόμα παλαιότερου αντιβιοτικού, της κολιστίνης [211,212]. Τα στελέχη *K. pneumoniae* της μελέτης μας παρουσίασαν ικανοποιητικά ποσοστά ευαισθησίας της τάξης του 84,8% και 73,4% για την τιγκεκυκλίνη και την κολιστίνη, αντίστοιχα. Ανάλογα αποτελέσματα καταγράφονται στην πολυκεντρική μελέτη των Galani *et al* για την περίοδο 2014-2016, όπου για τα KPC στελέχη *K. pneumoniae* αναφέρεται ευαισθησία 88,5% (232/262) για την τιγκεκυκλίνη και 65% (171/262) για την κολιστίνη [103]. Επίσης, η 10ετής μελέτη (2005-2014) από τους Spyrgoroulou *et al* στο ΠΓΝΠ αναφέρει σημαντική αύξηση των ποσοστών ανθεκτικότητας από 0% το 2005 στο 33% για την τιγκεκυκλίνη και 39% για την κολιστίνη το 2014 σε στελέχη *K. pneumoniae* ανθεκτικά στις καρβαπενέμες [213]. Μεταγενέστερες δημοσιευμένες εργασίες καταγράφουν αυξητική τάση στα ποσοστά ανθεκτικότητας και για τα δύο αντιβιοτικά. Χαρακτηριστικά οι Protonatariou *et al*

αναφέρουν αύξηση των ποσοστών ανθεκτικότητας για τιγκεκυκλίνη και κολιστίνη από 23,5% και 15,8 % το 2016 σε 61,1% και 27,8% το 2019, αντίστοιχα [214]. Επίσης, οι Papadimitriou-Olivgeris *et al* στην επταετή μελέτη τους (2015-2021) αναφέρουν ποσοστά ανθεκτικότητας 60,3% και 29,7% για τιγκεκυκλίνη και κολιστίνη, αντίστοιχα [191]. Στην ίδια μελέτη επισημαίνεται ότι ενώ υπήρξε μια σταθερή άνοδο από το 2005 ως το 2014 της ανθεκτικότητας έναντι της κολιστίνης, αυτή παρέμεινε σταθερή από το 2015 ως το 2021. Αντιθέτως, το ποσοστό ανθεκτικότητας στην τιγκεκυκλίνη αυξήθηκε σταθερά από 51% το 2015 στο 92,2% το 2021 [191]. Παρόλ' αυτά, με βάση αποτελέσματα καταγραφής αντοχών του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας του ΠΓΝΙ για το έτος 2021/2022, η αντοχή των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες *K. pneumoniae* στελεχών στην τιγκεκυκλίνη ήταν 3% και 1%, ενώ στην κολιστίνη 17% και 21%, για το 2021 και 2022 αντίστοιχα. Τα μειωμένα ποσοστά αντοχής συγκριτικά με προγενέστερα έτη της μελέτης, ιδιαίτερα για την τιγκεκυκλίνη, απορρέει πιθανά από την μειωμένη τάση χορήγησης αυτών και την αντικατάστασή τους από νεότερα αντιμικροβιακά, ειδικά του μηχανισμού αντοχής στις καρβαπενέμες, όπως κεφταζιδίμη-αβιμπακτάμη, μεροπενέμη-βαμπορμπακτάμη, κ.τ.λ.

Η σύγκριση της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά των δύο αλληλίων KPC-2 και KPC-9 ανέδειξε σημαντική αύξηση της MIC για την κεφταζιδίμη. Έχει βρεθεί ότι η αντικατάσταση αμινοξέων στο KPC-2 οδηγεί σε διαφορετικά αλληλία τα οποία είναι λιγότερα σταθερά ένζυμα αλλά με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην κατάλυση της ενζυματικής υδρόλυσης της κεφταζιδίμης. Έτσι, το KPC-9 παρουσιάζει 25 φορές μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην υδρόλυση της κεφταζιδίμης σε σύγκριση με το KPC-2. Η καταλυτική ικανότητα δεν συμβαδίζει πάντα με την αύξηση στην MIC, αφού αυτή επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες όπως η πρωτεϊνική έκφραση, η σταθερότητα και η διαλυτότητα. Η αύξηση στην αποτελεσματικότητα της υδρόλυσης της κεφταζιδίμης και κατ' επέκταση και της MIC μετά από μετάλλαξη έχει παρατηρηθεί και σε άλλες β-λακταμάσες τάξεως A, όπως τα TEM και τα CTX-M. Το KPC-2 είναι ένα πολύ σταθερό ένζυμο και τα αλληλία του που φέρουν μεταλλάξεις παρουσιάζουν μεγαλύτερη σταθερότητα από άλλα ένζυμα τάξεως A. Αυτή τη στιγμή δεν υπάρχουν μελέτες για την πιθανή δομή του ενεργού κέντρου του KPC-9 αλλά μπορούμε να πιθανολογήσουμε ότι οι μεταλλάξεις που φέρει σε σχέση με το KPC-2

θα μπορούσαν να επηρεάσουν το ενεργό κέντρο του ενζύμου και την ικανότητά του να δεχτεί κι άλλα υποστρώματα [215]. Το *bla*_{KPC-9} διαφέρει από τα *bla*_{KPC-3} και *bla*_{KPC-2} κατά ένα και δύο νουκλεοτίδια αντίστοιχα και γενετικά είναι πιο κοντά στο *bla*_{KPC-3}. Ωστόσο, η ανάλυση cgMLST στελεχών KPC-2 και KPC-9 που περιλαμβάνονται σε αυτή τη μελέτη, έδειξε ότι τα KPC-9 έχουν πολύ στενή σχέση και με τα KPC-2. Συγκεκριμένα, έχουν ακριβώς τον ίδιο τύπο κάψας και τα πλασμίδια τους έχουν υψηλή ομολογία αλληλουχίας (100% στο 95% της αλληλουχίας του πλασμιδίου του KPC-2). Επιπλέον, το γονιδίωμα των στελεχών της KPC-9 ομάδας διέφερε μόνο κατά 15 νουκλεοτιδικές «αναντιστοιχίες» από το πιο κοντινό γενετικά KPC-2 στέλεχος. Διαφαίνεται, βάσει των παραπάνω, ότι το KPC-9 στο Νοσοκομείο μας δεν είχε εξωγενή προέλευση, αλλά αποτέλεσε μέρος του επιδημικού κύματος των KPC-2 [97].

Από τη σύγκριση των δεδομένων ευαισθησίας στα αντιβιοτικά των στελεχών KPC-2 και KPC-9 προκύπτουν αυξημένα ποσοστά ανθεκτικότητας για την αμικασίνη και την κολιστίνη για το KPC-9 συγκριτικά με το KPC-2. Είναι γνωστό ότι τα πλασμίδια σε ανθεκτικά στις καρβαπενέμες εντεροβακτηριακά στελέχη μπορεί να φέρουν και γονίδια που επηρεάζουν την ευαισθησία και σε άλλα αντιβιοτικά. Η ανθεκτικότητα στις αμινογλυκοσίδες στα εντεροβακτηριακά οφείλεται σε διάφορους μηχανισμούς, όπως η μειωμένη διαπερατότητα της μεμβράνης, οι αντλίες εκροής, η τροποποίηση του στόχου δράσης (ριβοσωμάτων) ή η έκφραση ενζύμων που τροποποιούν τις αμινογλυκοσίδες (AME: Aminoglycoside Modifying Enzymes). Τα ένζυμα AME αποτελούν το πιο σημαντικό μηχανισμό ανθεκτικότητας στα στελέχη *K. pneumoniae*. Οι Almaghrabi *et al* μελέτησαν με MLST στελέχη *K. pneumoniae* ανθεκτικά στις καρβαπενέμες, από τα οποία τα περισσότερα (47 στα 50) ανήκαν στον κλώνο ST258 και παρήγαγαν κυρίως KPC-2 και KPC-3 καρβαπενεμάσες. Η ανίχνευση των γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα AME έδειξε μεγάλη ετερογένεια ανάμεσα στα στελέχη όσον αφορά τον τύπο του AME αλλά και συνδυασμούς διαφορετικών γονιδίων AME [216]. Υπάρχουν πολλές ενδείξεις ότι τα στελέχη ST258 *K. pneumoniae* παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια παρόλο που θεωρούνται ότι ανήκουν σε ένα συγκεκριμένο τύπου στελέχους βάσει των μοριακών επιδημιολογικών κριτηρίων [217,218]. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα ευρήματα από μελέτες του γονιδιώματος στελεχών ST258 *K. pneumoniae*, που καταδεικνύουν τη μεγάλη ετερογένεια τόσο μεταξύ

στελεχών που απομονώθηκαν από ένα κέντρο όσο και μεταξύ στελεχών από δείγματα αιματικής ροής του ιδίου ασθενή που είχαν ληφθεί με χρονική διαφορά [217,219]. Από την άλλη, ένα φαινόμενο το οποίο μπορεί να ερμηνεύσει τη διαφορετική ευαισθησία έναντι των αντιβιοτικών στελεχών που ανήκουν σε διαφορετικό ή ακόμα και στο ίδιο KPC αλλήλιο είναι η ετεροανθεκτικότητα, η οποία οφείλεται στην παρουσία διαφορετικών υποπληθυσμών με διαφορετικές ευαισθησίες στα αντιβιοτικά. Το φαινόμενο της ετεροανθεκτικότητας στην *K. pneumoniae* έχει αναφερθεί για διάφορα αντιβιοτικά όπως οι β-λακτάμες, η κολιστίνη, οι τετρακυκλίνες και οι αμινογλυκοσίδες. Επίσης, έχει προταθεί ότι τα στελέχη με ετεροανθεκτικότητα στην αμικασίνη οφείλονται στην αυξημένη έκφραση γονιδίων ανθεκτικότητας στις αμινογλυκοσίδες [220]. Επιπλέον, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι οι σημειακές μεταλλάξεις, τα στοιχεία εισαγωγής (insertion sequences) ή μικρές μεταλλάξεις γονιδίων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά έχουν ως αποτέλεσμα έναν μικρό αριθμό στελεχών με διαφορετικό φαινότυπο και ανθεκτικότητα στις αμινογλυκοσίδες [221,222]. Από την άλλη, η ετεροανθεκτικότητα στην κολιστίνη στελεχών *K. pneumoniae* ανθεκτικών στις καρβαπενέμες αποτέλεσε το αντικείμενο μελέτης σε 13 νοσοκομεία από 6 χώρες της Ευρώπης. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι υπάρχει μεγάλη ετερογένεια ως προς τον τύπο στελέχους στα ετεροανθεκτικά στελέχη και την ύπαρξη διαφόρων στοιχείων εισαγωγής στο γονίδιο *mgrB* [223]. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι σε 2 από τα 8 στελέχη KPC-9, μέρος και αυτής της μελέτης, που χαρακτηρίστηκαν με NGS βρέθηκε το στοιχείο εισαγωγής IS5 στο γονίδιο *mgrB* [97]. Τελικά, όλα αυτά τα δεδομένα ενισχύουν το συμπέρασμα ότι η συρροή κρουσμάτων του KPC-9 στο νοσοκομείο μας αποτελεί μέρος του επιδημικού κύματος KPC-2 και η προέλευση της δεν είναι από εξωγενείς πηγές.

Η συνολική θνητότητα των ασθενών με αποικισμό/λοίμωξη με στέλεχος KPC ήταν 39,6% και ακόμα μεγαλύτερη, στο 61,5% στους ασθενείς με λοίμωξη αιματικής ροής. Τα ποσοστά θνητότητας για τα δύο αλλήλια, KPC-2 και KPC-9, δεν παρουσίασαν εντούτοις, στατιστικά σημαντική διαφορά. Το μέσο χρονικό διάστημα από την απομόνωση ως τη θανατηφόρα κατάληξη ήταν 29 ± 4 μέρες, ενώ ποσοστό 16,8% των ασθενών κατέληξε εντός 14 ημερών από την απομόνωση του στελέχους KPC. Υπάρχει

μεγάλη ποικιλία στα ποσοστά θνητότητας από λοιμώξεις με ΚΡC στελέχη *K. pneumoniae* που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Αυτό οφείλεται κυρίως στους διαφορετικούς, ως προς την ηλικία και τις συννοσηρότητες, πληθυσμούς που αναλύονται στις διάφορες μελέτες καθώς και στη δυσκολία του διαχωρισμού του αποικισμού από τη λοίμωξη [224]. Ενδεικτικά αναφέρουμε τις συστηματικές ανασκοπήσεις και μετα-αναλύσεις από τους Ramos-Costaneda *et al* και τους L. Xu *et al*, οι οποίοι εκτίμησαν τη θνητότητα από λοιμώξεις από ΚΡC στελέχη *K. pneumoniae* στο 41% και 47,66%, αντίστοιχα, ποσοστά ανάλογα με την παρούσα μελέτη [169,225]. Επιπρόσθετα, ποσοστό 78,0% των ασθενών της μελέτης μας που είχαν θανατηφόρα κατάληξη νοσηλεύτηκε έστω και για μικρό χρονικό διάστημα σε ΜΕΘ/ΜΕΠΚ. Αυτό είναι αναμενόμενο και καταγεγραμμένο και σε άλλες μελέτες, όπως αυτή των Moraes *et al*, όπου οι ασθενείς που παρέμειναν σε ΜΕΘ πάνω από 24 ώρες είχαν περίπου 4 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να αποικιστούν από ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *K. pneumoniae* [226]. Επιπλέον, η νοσηλεία στη ΜΕΘ είναι και ενδεικτική της κρισιμότητας της κατάστασης των ασθενών. Ειδικότερα στην περίπτωση των λοιμώξεων αιματικής ροής από στελέχη *K. pneumoniae* ανθεκτικά στην καρβαπενέμη, τα ποσοστά θνητότητας εμφανίζονται γενικά υψηλά [227,228].

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην εργασία αυτή περιγράφεται η διασπορά των εντεροβακτηριακών στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες τάξεως Α στο ΠΓΝΙ κατά την περίοδο 2014-2015. Παρατηρήσαμε την επικράτηση των στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάσες ΚΡC έναντι των ΜΒL. Διαπιστώσαμε την ύπαρξη δύο διαφορετικών αλληλίων της καρβαπενεμάσης ΚΡC, το ΚΡC-2 και ΚΡC-9. Από την καταγραφή των στελεχών ΚΡC παρατηρήσαμε ότι παράλληλα με το επιδημικό κύμα των ΚΡC-2, λαμβάνει χώρα και συρροή κρουσμάτων ΚΡC-9. Το επιδημικό κύμα των ΚΡC-9 φαίνεται να συνδέεται άμεσα με την παρουσία των στελεχών ΚΡC-2 στο νοσοκομείο μας και να οφείλεται σε ενδοноσοκομειακή διασπορά. Όλα τα στελέχη ΚΡC από αυτή τη χρονική περίοδο αλλά και μετέπειτα χρονολογικά ανήκουν στον ίδιο τύπο στελέχους ST258. Η παρουσία των ΚΡC συνοδεύεται και από την παρουσία

πολλαπλών γονιδίων ESB_L, με συχνότερα τα TEM και SHV και τελευταίο το CTX-M, σε αντίθεση με τα επιδημιολογικά δεδομένα της επικράτησης του SHV στον ελλαδικό χώρο και του CTX-M παγκοσμίως στο συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Στα KPC-9 απαντάται σχεδόν αποκλειστικά η β-λακταμάση TEM. Αναδεικνύονται οι δυσκολίες στην εφαρμογή των φαινοτυπικών δοκιμασιών για την ανίχνευση καρβαπενεμασών και ιδιαίτερα για το MHT τεστ του οποίου η χρήση δεν προτείνεται πλέον από EUCAST και CLSI. Τα στελέχη KPC-9 παρουσίασαν αυξημένες MIC για την κεφταζιδίμη και αυξημένα ποσοστά ανθεκτικότητας για αμικασίνη και κολιστίνη συγκριτικά με τα στελέχη KPC-2. Η θνητότητα από KPC στελέχη *K. pneumoniae* στο νοσοκομείο μας είναι υψηλή, ιδιαίτερα στις λοιμώξεις της αιματικής ροής και δεν επηρεάζεται από τον τύπο του αλληλίου. Από τη μελέτη αυτή γίνεται φανερό η ετερογένεια ως προς τα γονίδια αντοχής που παρουσιάζουν τα στελέχη *K. pneumoniae*, τα οποία απομονώθηκαν εντός του ίδιου νοσοκομείου καθώς και η ανάγκη για την εφαρμογή προληπτικών και περιοριστικών μέτρων για την αντιμετώπιση της διασποράς των πολυανθεκτικών παθογόνων στο νοσοκομείο μας.

7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη διατριβή αυτή πραγματοποιήθηκε εργαστηριακή και κλινική διερεύνηση των λοιμώξεων από στελέχη Εντεροβακτηριακών με αντοχή στις καρβαπενέμες, λόγω παραγωγής β-λακταμασών τάξης A. Τα Εντεροβακτηριακά στελέχη απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα ασθενών που νοσηλεύτηκαν στο ΠΓΝΙ κατά τη διετία 2014-2015 και ακολούθησε η ταυτοποίηση και ο προσδιορισμός της ευαισθησίας στα συνήθη αντιβιοτικά. Τα στελέχη που παρουσίασαν μειωμένη ευαισθησία ή αντοχή σε τουλάχιστον μία καρβαπενέμη ελέγχθηκαν περαιτέρω για την ανίχνευση παραγωγής καρβαπενεμάσης μέσω φαινοτυπικών δοκιμασιών (Modified Hodge test, δοκιμασία συνδυασμού δίσκων). Τα στελέχη με θετικό φαινότυπο για παραγωγή β-λακταμασών τάξης A χαρακτηρίστηκαν επίσης γονοτυπικά μέσω ανίχνευσης και ταυτοποίησης με PCR, με χρήση των κατάλληλων εκκινητών (primers), των γονιδίων που κωδικοποιούν καρβαπενεμάσες τάξης A (KPC) και τάξης B (VIM, NDM) καθώς και ευρέως φάσματος β-λακταμάσες (ESBLs: TEM, SHV, CTX-M). Συνολικά, 177 στελέχη *K. pneumoniae* και δύο στελέχη *E. coli* επιβεβαιώθηκαν μέσω της PCR ότι παράγουν καρβαπενεμάση KPC. Μέσω της μεθόδου ARMS, βρέθηκε ότι από τα 177 στελέχη *K. pneumoniae*, τα 130 ανήκαν στον υπότυπο KPC-2 ενώ τα 47 ήταν KPC-9. Τα στελέχη και από τα δύο αλληλίες ανήκαν στον τύπο στελέχους ST258. Τα στελέχη KPC-9 εμφάνισαν συρροή κρουσμάτων παράλληλα με τα KPC-2, η οποία πιθανότατα οφείλεται σε ενδονοσοκομειακή διασπορά και συνεχίζεται μέχρι και σήμερα στο ΠΓΝΙ. Η σύγκριση των δύο αλληλίων όσον αφορά την ευαισθησία τους στα συνήθη αντιβιοτικά, ανέδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση στην MIC για την κεφταζιδίμη ($p=0,03$) και υψηλότερη ανθεκτικότητα στην αμικασίνη ($p=0,012$) και την κολιστίνη ($p<0,001$) για το KPC-9 σε σύγκριση με το KPC-2. Η στατιστική ανάλυση έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά τη συχνότητα εμφάνισης και για τα τρία ESBL γονίδια (CTX-M, TEM και SHV) στα στελέχη KPC-9 και KPC-2. Τα στελέχη KPC-9 κατά συντριπτική πλειοψηφία (93,6%) φέρουν το γονίδιο TEM. Από την άλλη, τα στελέχη KPC-2 φέρουν, συγκριτικά με τα υπόλοιπα γονίδια ESBL, το TEM σε μεγαλύτερη συχνότητα (73,8%), το οποίο συχνά συνδυάζεται με το SHV (22,3%) και το CTX-M (13,1%). Η θνητότητα από KPC στελέχη *K. pneumoniae* στο νοσοκομείο μας είναι υψηλή (39,6%), ιδιαίτερα στις λοιμώξεις της αιματικής ροής (61,5%) και δεν

επηρεάζεται από τον τύπο του αλληλίου. Από τη μελέτη αυτή γίνεται φανερή η ετερογένεια ως προς τα γονίδια αντοχής που παρουσιάζουν τα στελέχη *K. pneumoniae*, τα οποία απομονώθηκαν εντός του ίδιου νοσοκομείου καθώς και η ανάγκη για την εφαρμογή προληπτικών και περιοριστικών μέτρων για την αντιμετώπιση της διασποράς των πολυανθεκτικών παθογόνων στο νοσοκομείο μας.

8. ABSTRACT

“Study of the infections caused by carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, producing class A beta-lactamases”

Alexandra Myari

In this thesis, we focused on the laboratory and clinical investigation of infections caused by carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, producing class A beta lactamases. Bacterial strains were isolated from clinical samples of patients hospitalized in University General Hospital of Ioannina during 2014-2015 and consequently identified and tested for their susceptibility against clinically important antimicrobials. Bacterial strains with reduced susceptibility or resistant to at least one carbapenem were further tested for carbapenemase activity by utilizing phenotypic tests (Modified Hodge Test, Combination Disc Test). The strains presenting positive phenotype for production of class A beta lactamases were further characterized by means of PCR using the appropriate primers, targeting genes encoding class A (KPC) and B (VIM, NDM) carbapenemases as well as extended spectrum β -lactamases (ESBLs: TEM, SHV, CTX-M). 177 *K. pneumoniae* clinical strains were confirmed by PCR as KPC-producers. Using the ARMS method, we identified the presence of the KPC-2 in 130 and KPC-9 allele in 47 out of 177 strains. The strains of both alleles belonged to the ST258 sequence type. KPC-9 was responsible for a distinct outbreak, part of the KPC-2 outbreak, still ongoing in our hospital till today. Comparison of the two alleles antimicrobial susceptibility profiles revealed statistically significant increase in MIC for ceftazidime ($p=0.03$) and higher resistance to amikacin ($p=0.012$) and colistin ($p<0.001$) for KPC-9 compared to KPC-2 allele. KPC-2 and KPC-9 alleles differed significantly in respect to the frequency of co-harboured ESBL genes. The majority of KPC-9 strains (93.6%) co-harboured *bla*_{TEM}. On the other hand, KPC-2 strains co-harboured most frequently *bla*_{TEM} (73.8%), often in combination with *bla*_{SHV} (22.3%) and *bla*_{CTX-M} (13.1%). Mortality related to *K. pneumoniae* KPC strains was high in our hospital (39.6%), especially in the case of blood stream infections (61.5%), not affected by the type of KPC allele. This study demonstrated the heterogeneity of resistance

genes in carbapenem-resistant *K. pneumoniae* within a single hospital setting and the need for immediate containment measures.

9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Akram F, Imtiaz M, Haq I ul. Emergent crisis of antibiotic resistance: A silent pandemic threat to 21st century. *Microbial Pathogenesis*. 2023 Jan;174:105923.
2. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T*. 2015 Apr;40(4):277-83.
3. Golkar Z, Bagasra O, Pace DG. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *J Infect Dev Ctries*. 2014 Feb 13;8(02):129-36.
4. What is fuelling the world's antimicrobial resistance crisis? [Internet]. [cited 2024 Dec 11]. Available from: <https://www.unep.org/news-and-stories/story/what-fuelling-worlds-antimicrobial-resistance-crisis>
5. Dadgostar P. Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. *Infect Drug Resist*. 2019 Dec;12(12):3903-10.
6. Jonas OB. Drug-resistant infections: A threat to our economic future (vol. 2) : Final report [Internet]. [cited 2024 Dec 11]. Available from: <http://documents.worldbank.org/curated/en/323311493396993758/final-report>
7. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 9th ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2019.
8. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) EU targets on antimicrobial resistance•[Internet]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/antimicrobial-resistance-annual-epidemiological-report-EARS-Net-2023.pdf>
9. Country summaries - antimicrobial resistance in the EU/EEA 2023 [Internet]. 2024 [cited 2024 Dec 11]. Available from: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Country_profiles_2023_2024_1.pdf
10. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae Worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014 Sept;20(9):821–30.
11. Glasner C, Albiger B, Buist G, et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: A survey among national experts from 39 countries, February 2013. *Eurosurveillance*. 2013 Jul 11;18(28). Available from: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES2013.18.28.20525>
12. Magiorakos AP, Burns K, Rodríguez Baño J, et al. Infection prevention and control measures and tools for the prevention of entry of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae into healthcare settings: Guidance from the European Centre for Disease Prevention and Control. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 2017 Nov 15;6(1):113.
13. Facility Guidance for Control of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) November 2015 Update -CRE Toolkit [Internet]. [cited 2024 Dec 13]. Available from: https://stacks.cdc.gov/view/cdc/79104/cdc_79104_DS1.pdf

14. Tacconelli E, Cataldo MA, Dancer SJ, et al. ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients. *Clinical Microbiology and Infection* [Internet]. 2014 Jan;20(Supplement_1):1–55.
15. Ghuysen JM. Molecular structures of penicillin-binding proteins and β -lactamases. *Trends in Microbiology*. 1994 Oct;2(10):372–80.
16. Yocum RR, Waxman DJ, Rasmussen JR, et al. Mechanism of penicillin action: penicillin and substrate bind covalently to the same active site serine in two bacterial D-alanine carboxypeptidases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1979 Jun 1;76(6):2730–4.
17. Neu HC. β -Lactam Antibiotics: Structural Relationships Affecting in Vitro Activity and Pharmacologic Properties. *Clinical Infectious Diseases*. 1986 Jul 1;8(Supplement_3):S237–59.
18. Hawkey PM, Livermore DM. Carbapenem antibiotics for serious infections. *BMJ*. 2012 May 31;344.
19. Codjoe F, Donkor E. Carbapenem Resistance: A Review. *Medical Sciences*. 2017 Dec 21;6(1):1.
20. Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, Thomson K, Rubinstein E, Hoban DJ, et al. Comparative Review of the Carbapenems. *Drugs*. 2007;67(7):1027–52.
21. Bonfiglio G, Russo G, Nicoletti G. Recent developments in carbapenems. *Expert opinion on investigational drugs*. 2002;11(4):529–44.
22. Barry AL, Thornsberry C, Jones RN, et al. Aztreonam: Antibacterial Activity, β -Lactamase Stability, and Interpretive Standards and Quality Control Guidelines for Disk-Diffusion Susceptibility Tests. *Clinical Infectious Diseases*. 1985 Nov 1;7(Supplement_4):S594–604.
23. Medeiros AA. Evolution and Dissemination of β -Lactamases Accelerated by Generations of β -Lactam Antibiotics. *Clinical Infectious Diseases*. 1997 Jan 1;24(Supplement_1):S19–45.
24. Lupski JR. Molecular Mechanisms for Transposition of Drug-Resistance Genes and Other Movable Genetic Elements. *Clinical Infectious Diseases*. 1987 Mar 1;9(2):357–68.
25. Dantas G, Sommer MOA, Oluwasegun RD, et al. Bacteria Subsisting on Antibiotics. *Science*. 2008 Apr 4;320(5872):100–3.
26. Massey RC, Buckling A, Peacock SJ. Phenotypic switching of antibiotic resistance circumvents permanent costs in *Staphylococcus aureus*. *Current Biology*. 2001 Nov;11(22):1810–4.
27. Ruppé É, Woerther PL, Barbier F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Annals of Intensive Care*. 2015 Aug 12;5(1):61.
28. Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009 Dec 7;54(3):969–76.

29. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*. 2009 Jan 1;22(1):161–82.
30. Wilkowski P, Hryniewiecka E, Kornelia Jasińska, Leszek Pączek, Cizek M. Breaking Antimicrobial Resistance: High-Dose Amoxicillin with Clavulanic Acid for Urinary Tract Infections Due to Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Annals of Transplantation*. 2023 Apr 17;28: e939258.
31. Martinez-Guerra BA, Xancal-Salvador LF, Esteban-Kenel V, et al. Favourable effect of clavulanic acid on the minimum inhibitory concentrations of cefixime and ceftibuten in ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2024 Jun 28;38:212–5.
32. Veeraraghavan B, Bakthavatchalam YD, Sahni RD. Orally Administered Amoxicillin/Clavulanate: Current Role in Outpatient Therapy. *Infectious Diseases and Therapy*. 2020 Dec 11;10(1):15–25.
33. Cohen Stuart J, Leverstein - Van Hall M, Kortmann W, Verlind J, Mulder F, Scharringa J, et al. Ceftibuten plus amoxicillin-clavulanic acid for oral treatment of urinary tract infections with ESBL producing *E. coli* and *K. pneumoniae*: a retrospective observational case-series. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2018 Aug 16;37(10):2021–5.
34. Rossi B, Soubirou JF, Chau F, et al. Cefotaxime and Amoxicillin-Clavulanate Synergism against Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* in a Murine Model of Urinary Tract Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015 Nov 2;60(1):424–30.
35. Karaiskos I, Giamarellou H. Carbapenem-Sparing Strategies for ESBL Producers: When and How. *Antibiotics*. 2020 Feb 5;9(2):61.
36. Tamma PD, Rodriguez-Baño J. The Use of Noncarbapenem β -Lactams for the Treatment of Extended-Spectrum β -Lactamase Infections. *Clinical Infectious Diseases*. 2017 Apr 1;64(7):972–80.
37. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, et al. Metallo- β -Lactamases: The quiet before the storm? *Clinical Microbiology Reviews*. 2005 Apr 1;18(2):306–25.
38. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: The Versatile β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*. 2007 Jul 1;20(3):440–58.
39. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel Carbapenem-Hydrolyzing-Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001 Apr 1;45(4):1151–61.
40. Reference Gene Catalog - Pathogen Detection - NCBI [Internet]. Nih.gov. 2024 [cited 2024 Oct 23]. Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#gene_family:\(blaKPC\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#gene_family:(blaKPC))
41. Stoesser N, Sheppard AE, Peirano G, et al. Genomic epidemiology of global *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Escherichia coli*. *Scientific Reports*. 2017 Jul 19;7(1):5917.

42. Cai M, Song K, Wang R, Wang S, Chen H, Wang H. Tracking intra-species and inter-genus transmission of KPC through global plasmids mining. *Cell Reports*. 2024 Jun;43(6):114351.
43. Girmenia C, Canichella M, Serrao A. epidemiology of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* infections in Mediterranean countries. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*. 2016 Jun 1;8(1):e2016032.
44. Maltezou HC, Giakkoupi P, Maragos A, et al. Outbreak of infections due to KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Crete (Greece). *Journal of Infection*. 2009 Mar;58(3):213–9.
45. Pournaras S, Protonotariou E, Voulgari E, et al. Clonal spread of KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greece. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2009 Jun 13;64(2):348–52.
46. Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S, et al. Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1995 Apr;39(4):824–9.
47. Reference Gene Catalog - Pathogen Detection - NCBI [Internet]. Nih.gov. 2024 [cited 2024 Oct 23]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#IMP>:
48. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, et al. Cloning and Characterization of blaVIM, a New Integron-Borne Metallo- β -Lactamase Gene from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999 Jul 1;43(7):1584–90.
49. Poirel L, Naas T, Nicolas D, et al. Characterization of VIM-2, a Carbapenem-Hydrolyzing Metallo- β -Lactamase and Its Plasmid- and Integron-Borne Gene from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000 Apr 1;44(4):891–7.
50. Miriagou V, Douzinas EE, Papagiannitsis CC, et al. Emergence of *Serratia liquefaciens* and *Klebsiella oxytoca* with metallo- β -lactamase-encoding IncW plasmids: further spread of the blaVIM-1-carrying integron In-e541. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2008 Dec;32(6):540–1.
51. Psychogiou M, Tassios PT, Avlami A, et al. Ongoing epidemic of blaVIM-1-positive *Klebsiella pneumoniae* in Athens, Greece: A prospective survey. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007 Nov 22;61(1):59–63.
52. Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al. Characterization of a New Metallo- β -Lactamase Gene, blaNDM-1, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009 Dec 1;53(12):5046–54.
53. Reference Gene Catalog - Pathogen Detection - NCBI [Internet]. Nih.gov. 2024 [cited 2024 Oct 23]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#NDM>:

54. Poirel L, Özdamar M, Ocampo-Sosa AA, et al. NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* Now in Turkey. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012 Mar 5;56(5):2784–5.
55. Giakkoupi P, Tryfinopoulou K, Kontopidou F, et al. Emergence of NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2013 Dec;77(4):382–4.
56. Voulgari E, Gartzonika C, Vrioni G, Politi L, Priavali E, Levidiotou-Stefanou S, et al. The Balkan region: NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 clonal strain causing outbreaks in Greece. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014 Apr 15;69(8):2091–7.
57. Levy SB. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology*. 2002 May;92(Supplement):65S-71S.
58. Li XZ, Plésiat P, Nikaido H. The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*. 2015 Mar 18;28(2):337–418.
59. Fernandez-Cuenca F, Martinez-Martinez M, Conejo MC, et al. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003 Jan 28;51(3):565–74.
60. Neuwirth C, Siébor E, Duez JM, et al. Imipenem resistance in clinical isolates of *Proteus mirabilis* associated with alterations in penicillin-binding proteins. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1995;36(2):335–42.
61. Yamachika S, Sugihara C, Kamai Y, et al. Correlation between penicillin-binding protein 2 mutations and carbapenem resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology*. 2013 Mar 1;62(3):429–36.
62. Giske CG, Buarø L, Sundsfjord A, et al. Alterations of Porin, Pumps, and Penicillin-Binding Proteins in Carbapenem Resistant Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Drug Resistance*. 2008 Mar;14(1):23–30.
63. Farra A, Islam S, Strålfors A, et al. Role of outer membrane protein OprD and penicillin-binding proteins in resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem and meropenem. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2008 May;31(5):427–33.
64. Miriagou V, Tzelepi E, Gianneli D, et al. *Escherichia coli* with a Self-Transferable, Multiresistant Plasmid Coding for Metallo- β -Lactamase VIM-1. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003 Jan 1;47(1):395–7.
65. Galani I, Souli M, Koratzanis E, et al. Emerging bacterial pathogens: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* and *proteus mirabilis* clinical isolates harbouring the same transferable plasmid coding for metallo- β -lactamase vim-1 in Greece. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007 Jan 25;59(3):578–9.
66. Galani I. Molecular characterization of an *Escherichia coli* clinical isolate that produces both metallo-beta-lactamase VIM-2 and extended-spectrum beta-

- lactamase GES-7: Identification of the In8 integron carrying the blaVIM-2 gene. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006 May 30;58(2):432–3.
67. Scoulica E, Neonakis IK, Gikas A, et al. Spread of blaVIM-1-producing *e. coli* in a university hospital in Greece. Genetic analysis of the integron carrying the blaVIM-1 metallo- β -lactamase gene. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2004 Mar 1;48(3):167–72.
68. Giakkoupi P, Xanthaki A, Kanelopoulou M, et al. VIM-1 Metallo- β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Greek Hospitals. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003 Aug;41(8):3893–6.
69. Vourli S, Tsorlini H, Katsifa H, et al. Emergence of *Proteus mirabilis* carrying the blaVIM-1 metallo- β -lactamase gene. *Clinical Microbiology and Infection*. 2006 Jul;12(7):691–4.
70. Tsakris A, Ikonomidis A, Poulou A, et al. Transmission in the community of Clonal *Proteus Mirabilis* carrying vim-1 metallo- β -lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007 May 9;60(1):136–9.
71. Galani I, Souli M, Chrysouli Z, et al. Characterization of a new integron containing bla(VIM-1) and aac(6')-IIc in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate from Greece. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005 May 1;55(5):634–8.
72. Tsakris A, Ikonomidis A, Spanakis N, et al. Characterization of in3mor, a new integron carrying VIM-1 metallo- β -lactamase and SAT1 gene, from *Morganella Morganii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007 Mar 6;59(4):739–41.
73. Miriagou V, Tzouvelekis LS, Flevari K, et al. *Providencia Stuartii* with vim-1 metallo- β -lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007 May 22;60(1):183–4.
74. Vatopoulos A. High rates of metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece - a review of the current evidence. *Eurosurveillance*. 2008 Jan 24;13(4):7–8.
75. Poulou A, Spanakis N, Pournaras S, et al. Recurrent healthcare-associated community-onset infections due to *Klebsiella pneumoniae* producing vim-1 metallo- β -lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2010 Sept 28;65(12):2538–42.
76. Tsakris A, Kristo I, Poulou A, et al. First occurrence of kpc-2-possessing *Klebsiella pneumoniae* in a greek hospital and recommendation for detection with boronic acid disc tests. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008 Sept 10;62(6):1257–60.
77. Cuzon G, Naas T, Demachy MC, et al. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* Isolate from Greece. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2008 Dec 3;52(2):796–7.
78. Tokatlidou D, Tsivitanidou M, Pournaras S, et al. Outbreak caused by a multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clone carrying bla VIM-12 in a university hospital. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008 Jan 17;46(3):1005–8.
79. Ikonomidis A, Tokatlidou D, Kristo I, et al. Outbreaks in distinct regions due to a single *Klebsiella pneumoniae* clone carrying a bla VIM-1 metallo- β -lactamase gene. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005 Oct;43(10):5344–7

80. Daikos GL, Petrikos P, Psychogiou M, et al. Prospective Observational Study of the Impact of VIM-1 Metallo- β -Lactamase on the Outcome of Patients with *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009 Feb 17;53(5):1868–73.
81. Petrikos P, Kosmidis C, Psychogiou M, et al. Prospective study of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: risk factors and clinical significance of type VIM-1 metallo- β -lactamases. *Archives of Hellenic Medicine*. 2009;26(3), 374-83.
82. Neonakis IK, Samonis G, H Messaritakis, et al. Resistance status and evolution trends of *Klebsiella pneumoniae* isolates in a university hospital in Greece: ineffectiveness of carbapenems and increasing resistance to colistin. *Chemotherapy*. 2010 Jan 1;56(6):448–52.
83. Samonis G, Maraki S, Rafailidis PI, et al. Antimicrobial Susceptibility of Gram-Negative Nonurinary Bacteria to Fosfomycin and Other Antimicrobials. *Future Microbiology*. 2010 Jun 1;5(6):961–70.
84. Grundmann H, Livermore DM, Giske CG, et al. Carbapenem-non-susceptible Enterobacteriaceae in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Eurosurveillance*. 2010 Nov 18;15(46).
85. Souli M, Galani I, Giamarellou H. Emergence of extensively drug-resistant and Pandrug-resistant gram-negative bacilli in Europe. *Eurosurveillance*. 2008 Nov 20;13(47).
86. Meletis G, Tzampaz E, Protonotariou E, et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carrying blaVIM and blaKPC genes. *Hippokratia*. 2010;14(2):139-140.
87. Vergadi E, Bitsori M, Maraki S, et al. Community-onset carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* urinary tract infections in infancy following NICU hospitalisation. *Journal of Pediatric Urology*. 2017 Oct 1;13(5):495.e1–6.
88. Meletis G, Oustas E, Botziori C, et al. Containment of carbapenem resistance rates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in a Greek hospital with a concomitant increase in colistin, gentamicin and tigecycline resistance. *The New Microbiologica*. 2015 Jul 1;38(3):417–21.
89. Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012 May;18(5):413–31.
90. Voulgari E, Zarkotou O, Ranellou K, et al. Outbreak of oxa-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece involving an ST11 clone. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2012 Sept 3;68(1):84–8.
91. Karampatakis T, Geladari A, Politi L, et al. Cluster-distinguishing genotypic and phenotypic diversity of carbapenem-resistant Gram-negative bacteria in solid-organ transplantation patients: a comparative study. *Journal of Medical Microbiology*. 2017 Jul 31;66(8):1158–69.

92. Geladari A, Karampatakis T, Antachopoulos C, et al. Epidemiological surveillance of multidrug-resistant gram-negative bacteria in a solid organ transplantation department. *Transplant Infectious Disease*. 2017 Jun 1;19(3):e12686–6.
93. Katsiari M, Panagiota G, Likousi S, et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections in a Greek intensive care unit: Molecular characterisation and treatment challenges. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2015 Jun;3(2):123–7.
94. Kontopidou F, Giamarellou H, Katerelos P, et al. Infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* among patients in intensive care units in Greece: a multi-centre study on clinical outcome and therapeutic options. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014 Feb;20(2):O117–23.
95. Rolain JM, Abat C, Jimeno MT, et al. Do we need new antibiotics? *Clinical Microbiology and Infection*. 2016 May;22(5):408–15.
96. Galani I, Nafplioti K, Adamou P, Karaikos I, Giamarellou H, Souli M. Nationwide epidemiology of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Greek hospitals, with regards to plazomicin and aminoglycoside resistance. *BMC Infectious Diseases*. 2019 Feb 15;19(1):167.
97. Gartzonika K, Rossen JWA, Sakkas H, Rosema S, Priavali E, Friedrich AW, et al. Identification of a KPC-9-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 cluster among KPC-2-producing isolates of an ongoing outbreak in Northwestern Greece: a retrospective study. *Clinical Microbiology and Infection*. 2018 May;24(5):558–60.
98. Chatzidimitriou M, Chatzivasileiou P, Sakellariou G, et al. Ceftazidime/avibactam and eravacycline susceptibility of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in two Greek tertiary teaching hospitals. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 2021 Jun 21;68(2):65–72.
99. Sakkas H, Bozidis P, Ilia A, et al. Antimicrobial Resistance in Bacterial Pathogens and Detection of Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Hospital Wastewater. *Antibiotics*. 2019 Jun 27;8(3):85.
100. Papadimitriou-Olivgeris M, Spiliopoulou I, Christofidou M, et al. Co-colonization by multidrug-resistant bacteria in two Greek intensive care units. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2015 Jul 15;34(10):1947–55.
101. Politi L, Gartzonika K, Spanakis N, et al. Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece: Evidence of a widespread clonal outbreak. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2019 May 7;74(8):2197–202.
102. Karampatakis T, Antachopoulos C, Iosifidis E, et al. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Greece. *Future Microbiology*. 2016 Jun;11(6):809–23.
103. Galani I, Karaikos I, Karantani I, et al. Epidemiology and resistance phenotypes of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece, 2014 to 2016. *Eurosurveillance*. 2018 Aug 2;23(31).

104. Karampatakis T, Tsergouli K, Politi L, et al. Molecular Epidemiology of Endemic Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacteria in an Intensive Care Unit. *Microbial Drug Resistance*. 2019 Jun;25(5):712–6.
105. Afolayan AO, Rigatou A, Grundmann H, et al. Three *Klebsiella pneumoniae* lineages causing bloodstream infections variably dominated within a Greek hospital over a 15 year period. *Microbial Genomics*. 2023 Aug 29;9(8).
106. Karampatakis T, Zarras C, Pappa S, et al. Emergence of ST39 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing VIM-1 and KPC-2. *Microbial Pathogenesis*. 2022 Jan;162:105373.
107. Protonotariou E, Meletis G, Chatzopoulou F, et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST11 co-producing NDM-1 and OXA-48 carbapenemases in Greece. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2019 Dec;19:81–2.
108. Tsilipounidaki K, Athanasakopoulou Z, Müller E, et al. Plethora of Resistance Genes in Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacteria in Greece: No End to a Continuous Genetic Evolution. *Microorganisms*. 2022 Jan 13 [cited 2023 Apr 21];10(1):159–9.
109. Papadimitriou-Olivgeris M, Bartzavali C, Nikolopoulou A, et al. Impact of Tigecycline's MIC in the Outcome of Critically Ill Patients with Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Bacteraemia Treated with Tigecycline Monotherapy—Validation of 2019's EUCAST Proposed Breakpoint Changes. *Antibiotics*. 2020 Nov 19;9(11):828.
110. Kofteridis DP, Andrianaki AM, Maraki S, et al. Treatment pattern, prognostic factors, and outcome in patients with infection due to pan-drug-resistant gram-negative bacteria. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2020 Jan 13;39(5):965–70.
111. Galani I, Karaikos I, Angelidis E, et al. Emergence of ceftazidime-avibactam resistance through distinct genomic adaptations in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* of sequence type 39 during treatment. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2021 Jul 30;40(1):219–24.
112. Voulgari E, Kotsakis SD, Giannopoulou P, et al. Detection in two hospitals of transferable ceftazidime-avibactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* due to a novel VEB β -lactamase variant with a Lys234Arg substitution, Greece, 2019. *Eurosurveillance*. 2020 Jan 16;25(2).
113. Di Bella S, Giacobbe DR, Maraolo AE, et al. Resistance to ceftazidime/avibactam in infections and colonisations by KPC-producing Enterobacterales: a systematic review of observational clinical studies. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2021 Jun;25:268–81.
114. Zarras C, Karampatakis T, Pappa S, et al. Genetic Characterization of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates in a Tertiary Hospital in Greece, 2018-2022. *Antibiotics*. 2023 May;12(6):976.

115. Manolitsis I, Feretzakis G, Katsimperis S, et al. A 2-Year Audit on Antibiotic Resistance Patterns from a Urology Department in Greece. *Journal of Clinical Medicine*. 2023 Apr 28;12(9):3180–0.
116. Tryfinopoulou K, Linkevicius M, Pappa O, et al. Emergence and persistent spread of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* high-risk clones in Greek hospitals, 2013 to 2022. *Euro Surveillance*. 2023 Nov 1;28(47):2300571.
117. Guidance for control of infections with carbapenem-resistant or carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in acute care facilities [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention; [cited 2024 Dec 15]. Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5810a4.htm>
118. Lolans K, Calvert K, Won S, et al. Direct Ertapenem Disk Screening Method for Identification of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Surveillance Swab Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* [Internet]. 2010 Mar 1;48(3):836–41.
119. Vroni G, Daniil I, Voulgari E, et al. Comparative evaluation of a prototype chromogenic medium (ChromID CARBA) for detecting carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in surveillance rectal swabs. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012 Jun 1;50(6):1841–6.
120. Aguirre-Quiñonero A, Martínez-Martínez L. Non-molecular detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae clinical isolates. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2017 Jan;23(1):1–11.
121. Simner PJ, Gilmour MW, DeGagne P, Nichol K, Karlowsky JA. Evaluation of Five Chromogenic Agar Media and the Rosco Rapid Carb Screen Kit for Detection and Confirmation of Carbapenemase Production in Gram-Negative Bacilli. *Journal of Clinical Microbiology*. 2015 Jan;53(1):105–12.
122. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, Version 2.0, 2017 [Internet]. [cited 2024 Dec 15]. Available from: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf
123. Woodford N, Eastaway AT, Ford M, et al. Comparison of BD Phoenix, Vitek 2, and MicroScan Automated Systems for Detection and Inference of Mechanisms Responsible for Carbapenem Resistance in Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010 Jun 9;48(8):2999–3002.
124. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012 May;18(5):432–8.
125. Potron A, Nordmann P, Lafeuille E, et al. Characterization of OXA-181, a Carbapenem-Hydrolyzing Class D β -Lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011 Jul 18;55(10):4896–9.

126. Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, et al. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clinical Microbiology and Infection*. 2010 Feb;16(2):112–22.
127. Krajewska J, Chyży P, Durka K, et al. Aromatic diboronic acids as effective KPC/AMPC inhibitors. *Molecules*. 2023 Oct 31;28(21):7362.
128. Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, et al. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009 Jun;47(6):1631–9.
129. Giske CG, Gezelius L, Samuelsen Ø, et al. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- β -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clinical Microbiology and Infection*. 2011 Apr 1;17(4):552–6.
130. Miriagou V, Tzelepi E, Kotsakis SD et al. Combined disc methods for the detection of KPC- and/or VIM-positive *Klebsiella pneumoniae*: improving reliability for the double carbapenemase producers. *Clinical Microbiology and Infection*. 2013 Sep;19(9):E412–5.
131. Hodge W, Ciak J, Tramont EC. Simple Method for Detection of Penicillinase-Producing *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1978 Jan;7(1):102–3.
132. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 27th ed. P. A. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017. CLSI supplement M 100.
133. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012 Feb;50(2):477–9.
134. Takayama Y, Adachi Y, Nihonyanagi S, et al. Modified Hodge test using Mueller–Hinton agar supplemented with cloxacillin improves screening for carbapenemase-producing clinical isolates of Enterobacteriaceae. *Journal of Medical Microbiology*. 2015 Jul 1;64(7):774–7.
135. Pasteran F, Gonzalez LJ, Albornoz E, et al. Triton Hodge Test: Improved Protocol for Modified Hodge Test for Enhanced Detection of NDM and Other Carbapenemase Producers. *Journal of Clinical Microbiology*. 2015 Dec 30;54(3):640–9.
136. Hrabák J, Chudáčková E, Papagiannitsis CC. Detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014 Sep;20(9):839–53.
137. Bernabeu S, Poirel L, Nordmann P. Spectrophotometry-based detection of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2012 Sep;74(1):88–90.
138. Dortet L, Bréchart L, Cuzon G, et al. Strategy for Rapid Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014 Jan 27;58(4):2441–5.

139. Papagiannitsis CC, Študentová V, Izdebski R, et al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Meropenem Hydrolysis Assay with NH_4HCO_3 , a Reliable Tool for Direct Detection of Carbapenemase Activity. *Journal of Clinical Microbiology*. 2015 May;53(5):1731–5.
140. Bogaerts P, Yunus S, Massart M, et al. Evaluation of the BYG Carba Test, a New Electrochemical Assay for Rapid Laboratory Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*. 2016 Feb;54(2):349–58.
141. Notake S, Matsuda M, Tamai K, et al. Detection of IMP metallo-beta-lactamase in carbapenem-nonsusceptible Enterobacteriaceae and non-glucose-fermenting Gram-negative rods by immunochromatography assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013 Mar 27;51(6):1762–8.
142. Glupczynski Y, Evrard S, Ote I, et al. Evaluation of two new commercial immunochromatographic assays for the rapid detection of OXA-48 and KPC carbapenemases from cultured bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016 Jan 28;71(5):1217–22.
143. Kolenda C, Benoit R, Carricajo A, et al. Evaluation of the New Multiplex Immunochromatographic O.K.N.V. K-SeT Assay for Rapid Detection of OXA-48-like, KPC, NDM, and VIM Carbapenemases. *Journal of Clinical Microbiology*. 2018 Sep 5;56(11): e01247-18.
144. Baeza LL, Pfennigwerth N, Greissl C, et al. Comparison of five methods for detection of carbapenemases in Enterobacterales with proposal of a new algorithm. *Clinical Microbiology and Infection*. 2019 Oct;25(10):1286.e9–15.
145. Garibyan L, Avashia N. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *Journal of Investigative Dermatology*. 2013 Mar;133(3):1–4.
146. Kadri K. Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications [Internet]. *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science*. IntechOpen; 2020. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.86491>
147. Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, et al. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *Journal of Biological Chemistry*. 1989 Apr;264(11):6427–37.
148. Al-Zahrani I. Routine detection of carbapenem-resistant gram-negative bacilli in clinical laboratories. A review of current challenges. *Saudi Medical Journal*. 2018 Sep 1;39(9):861–72.
149. Cui X, Zhang H, Du H. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Detection and Antimicrobial Therapy. *Frontiers in Microbiology*. 2019 Aug 20;10:1823.
150. Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Vol. 2: The Proteobacteria. Part C: the Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria. New York: Springer; 2005.
151. Adeolu M, Alnajjar S, Naushad S, et al. Genome-based phylogeny and taxonomy of the “Enterobacterales”: 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*. 2016 Dec 1;66(12):5575–99.

152. Janda JM, Abbott SL. The Changing Face of the Family Enterobacteriaceae (Order: “Enterobacterales”): New Members, Taxonomic Issues, Geographic Expansion, and New Diseases and Disease Syndromes. *Clinical Microbiology Reviews*. 2021 Mar 17;34(2): e00174-20.

153. Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, et al. *The prokaryotes*. Berlin: Springer; 2013.

154. Sheu CC, Chang YT, Lin SY, et al. Infections Caused by Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: An Update on Therapeutic Options. *Frontiers in Microbiology*. 2019 Jan 30;10:80.

155. Tilahun M, Kassa Y, Gedefie A, et al. Emerging Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infection, Its Epidemiology and Novel Treatment Options: A Review. *Infection and Drug Resistance*. 2021 Oct;14:4363–74.

156. WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance [Internet]. World Health Organization; [cited 2024 Dec 15]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>

157. Antibiotic resistance threats in the United States [Internet]. [cited 2024 Dec 15]. Available from: <https://www.cdc.gov/antimicrobial-resistance/media/pdfs/2019-ar-threats-report-508.pdf>

158. Paño Pardo JR, Villar SS, Ramos Ramos JC, et al. Infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Risk factors, clinical features and prognosis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2014 Dec;32(Supplement 4):41–8.

159. Swaminathan M, Sharma S, Poliansky Blash S, et al. Prevalence and Risk Factors for Acquisition of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae in the Setting of Endemicity. 8. 2013 Jul 9;34(8):809–17.

160. Wiener-Well Y, Rudensky B, Yinnon AM, et al. Carriage rate of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospitalised patients during a national outbreak. *Journal of Hospital Infection*. 2010 Apr;74(4):344–9.

161. Tran DM, Larsson M, Olson L, et al. High prevalence of colonisation with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae among patients admitted to Vietnamese hospitals: Risk factors and burden of disease. *The Journal of Infection*. 2019 Aug 1;79(2):115–22.

162. Caudell MA, Castillo C, Santos LF, et al. Risk factors for colonization with extended-spectrum cephalosporin-resistant and carbapenem-resistant Enterobacterales among hospitalized patients in Guatemala: An Antibiotic Resistance in Communities and Hospitals (ARCH) study. *IJID Regions*. 2024 Mar 30;11:100361–1.

163. Pérez-Galera S, Bravo-Ferrer JM, Paniagua, et al. Risk factors for infections caused by carbapenem-resistant Enterobacterales: an international matched case-control-control study (EURECA). *eClinicalMedicine*. 2023 Mar 1;57:101871.
164. Debby BD, Ganor O, Yasmin M, et al. Epidemiology of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization in an Intensive Care Unit. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2012 Jan 14;31(8):1811–7.
165. Tischendorf J, de Avila RA, Safdar N. Risk of infection following colonization with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: A systematic review. *American Journal of Infection Control*. 2016 May;44(5):539–43.
166. Dickstein Y, Edelman R, Dror T, et al. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae colonization and infection in critically ill patients: a retrospective matched cohort comparison with non-carriers. *Journal of Hospital Infection*. 2016 Sep;94(1):54–9.
167. McConville TH, Sullivan SB, Gomez-Simmonds A, et al. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae colonization (CRE) and subsequent risk of infection and 90-day mortality in critically ill patients, an observational study. *PLoS ONE*. 2017 Oct 12;12(10):e0186195.
168. van Duin D. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: What we know and what we need to know. *Virulence*. 2017 Apr 12;8(4):379–82.
169. Xu L, Sun X, Ma X. Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2017 Mar 29;16(1):18.
170. Martin A, Fahrbach K, Zhao Q, et al. Association Between Carbapenem Resistance and Mortality Among Adult, Hospitalized Patients With Serious Infections Due to Enterobacteriaceae: Results of a Systematic Literature Review and Meta-analysis. *Open Forum Infectious Diseases*. 2018 Jun 28;5(7):ofy150.
171. Zhou R, Fang X, Zhang J, et al. Impact of carbapenem resistance on mortality in patients infected with *Enterobacteriaceae*: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*. 2021 Dec;11(12):e054971.
172. Χώροι Παροχής υγείας - νοσοκομεία [Internet]. 2024 [cited 2024 Dec 16]. Available from: <https://eody.gov.gr/mikroviaki-antochi-kai-loimoxeis-poy-syndeontai-me-choroy-parochis-ygeias/choroi-parochis-ygeias-nosokomeia/>
173. WHO guidelines on hand hygiene in Health Care [Internet]. World Health Organization; [cited 2024 Dec 16]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241597906>
174. GLOBAL ACTION PLAN ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE. [Internet]. [cited 2024 Dec 15]. Available from: https://iris.who.int/bitstream/10665/193736/1/9789241509763_eng.pdf?ua=1
175. MONITORING AND EVALUATION OF THE GLOBAL ACTION PLAN ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE, Framework and recommended indicators. 1. [Internet]. [cited 2024 Dec 15]. Available from: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/325006/9789241515665-eng.pdf?ua=1>

176. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 25th ed. P. A. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015. CLSI supplement M 100.
177. Garcia LS, Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington, DC: ASM Press; 2010.
178. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters, 2015.
179. Antibacterial Susceptibility Test Interpretive Criteria. FDA [Internet]. 2021 Oct 14; Available from: <https://www.fda.gov/drugs/development-resources/antibacterial-susceptibility-test-interpretive-criteria>
180. Tsakris A, Poulou A, Pournaras S, et al. A simple phenotypic method for the differentiation of metallo- β -lactamases and class A KPC carbapenemases in Enterobacteriaceae clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2010 Jun 11;65(8):1664–71.
181. Lomaestro BM, Tobin EH, Shang W, et al. The spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase–producing *K. pneumoniae* to upstate New York. *Clinical Infectious Diseases*. 2006 Aug;43(3):e26–8.
182. Tzelepi E, Magana C, Platsouka E, et al. Extended-spectrum β -lactamase types in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in two Greek hospitals. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2003 Mar 1;21(3):285–8.
183. Gartzonika K, Bozidis P, Priavali E, Sakkas H. Rapid Detection of blaKPC-9 Allele from Clinical Isolates. *Pathogens*. 2021 Apr 17;10(4):487-95.
184. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Research*. 1989;17(7):2503–16.
185. Dang RKB, Anthony JI, Craig RC, et al. Limitations of the use of single base changes in the p53 gene to detect minimal residual disease of breast cancer. *Molecular Pathology*. 2002 Jun 1;55(3):177–81.
186. Primers used for MLST of *Klebsiella pneumoniae* [Internet]. [cited 2024 Dec 16]. Available from: <https://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/primers-used/>
187. Beasley TM, Schumacker RE. Multiple Regression Approach to Analyzing Contingency Tables: Post Hoc and Planned Comparison Procedures. *The Journal of Experimental Education*. 1995 Oct;64(1):79–93.
188. Maraki S, Mavromanolaki VE, Stafylaki D, et al. Antimicrobial resistance trends among *Klebsiella pneumoniae* associated with urinary tract infections in Crete,

Greece, 2017–2022. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 2024 May 22;71(2):121–6.

189. Karakosta P, Vourli S, Kousouli E, et al. Multidrug-resistant organism bloodstream infection and hospital acquisition among inpatients in three tertiary Greek hospitals during the COVID-19 era. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. 2024 Mar 26;43,1241-1246.

190. Apostolidi EA, Basoulis D, Zerva S, et al. Blood stream infections due to carbapenem-resistant gram-negative bacilli, producing *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase or New Delhi metallo- β -lactamase: A single-center, retrospective, comparative study in a high-prevalence area. *Preprints*. 2024 Jun 11; doi:10.20944/preprints202406.0719.v1

191. Papadimitriou-Olivgeris M, Bartzavali C, Karachalias E, et al. A Seven-Year Microbiological and Molecular Study of Bacteremias Due to Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: An Interrupted Time-Series Analysis of Changes in the Carbapenemase Gene's Distribution after Introduction of Ceftazidime/Avibactam. *Antibiotics*. 2022 Oct 14;11(10):1414.

192. Galani I, Antoniadou A, Karaikos I, Kontopoulou K, Giamarellou H, Souli M. Genomic characterization of a KPC-23-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clinical isolate resistant to ceftazidime-avibactam. *Clinical Microbiology and Infection*. 2019 Jun;25(6):763.e5–8.

193. Chatzidimitriou M, Tsolakidou P, Kyriazidi MA, et al. Detection of KPC-3 producing *Escherichia coli* ST410 in Volos, Greece. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 2024 Sept 17; doi:10.1556/030.2024.02376

194. Chatzidimitriou M, Tsolakidou P, Voulgaridis A, et al. NDM-1 and KPC-3 co-producing *Klebsiella pneumoniae* ST512 in bronchial secretion from a patient in an intensive care unit of a Greek Tertiary Care Hospital. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 2024 Nov 27; doi:10.1556/030.2024.02464

195. Hidalgo-Grass C, Warburg G, Temper V, Benenson S, Moses AE, Block C, et al. KPC-9, a Novel Carbapenemase from Clinical Specimens in Israel. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012 Sep 11;56(11):6057–9.

196. Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Frontiers in Microbiology*. 2012;3:110.

197. Gales AC, Stone G, Sahm DF, et al. Incidence of ESBLs and carbapenemases among Enterobacterales and carbapenemases in *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected globally: Results from Atlas 2017–2019. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2023 May 10;78(7):1606–15.

198. Kazmierczak KM, de Jonge BLM, Stone GG, et al. Longitudinal analysis of ESBL and carbapenemase carriage among Enterobacterales and *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in Europe as part of the International Network for Optimal Resistance Monitoring (INFORM) global surveillance programme, 2013–17. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2020 Feb 10;75(5):1165–73.
199. Meletis G, Chatzopoulou F, Fragkouli A, et al. Whole-genome sequencing study of kpc-encoding *Klebsiella pneumoniae* isolated in Greek private laboratories from non-hospitalised patients. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2020 Mar;20:78–81.
200. Pawar SK, Mohite ST, Datkhile KD, et al. Closing the Gap Between Phenotypic and Genotypic Detection of Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae by New Modified Carbapenem Inactivation Method. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2018; 12(11):DC01-DC04.
201. Zhong H, Wu M-L, Feng W-J, et al. Accuracy and applicability of different phenotypic methods for carbapenemase detection in Enterobacteriaceae: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2020 Jun;21:138–47.
202. Ghasemnejad A, Doudi M, Amirmozafari N. Evaluation of Modified Hodge Test as a Non-molecular Assay for Accurate Detection of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Polish Journal of Microbiology*. 2018 Jan 1;67(3):291–5.
203. Ratkai C, Quinteira S, Grosso F, et al. Controlling for false positives: Interpreting MBL Etest and MBL combined disc test for the detection of metallo-β-lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2009 Jun 30;64(3):657–8.
204. Chu YW, Terence K.M. Cheung, et al. EDTA susceptibility leading to false detection of metallo-β-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* by Etest and an imipenem–EDTA disk method. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2005 Oct 1;26(4):340–1.
205. Bathoorn E, Tsioutis C, da Silva Voorham JM, et al. Emergence of pan-resistance in KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Crete, Greece: A close call. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016 Jan 26;71(5):1207–12.
206. [Internet]. [cited 2024 Dec 16]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Country%20summaries-AER-EARS-Net%20202019.pdf>
207. Zhang X, Li Q, Lin H, et al. High-Level Aminoglycoside Resistance in Human Clinical *Klebsiella pneumoniae* Complex Isolates and Characteristics of armA-Carrying IncHI5 Plasmids. *Frontiers in Microbiology*. 2021 Apr 7;12:636396.
208. Papa-Ezdra R, Cordeiro NF, Ferreira F, et al. First Detection of High-Level Aminoglycoside-Resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* Isolates

Due to 16S rRNA Methyltransferases with and Without *bla*_{NDM} in Uruguay. *Antibiotics*. 2024 Oct 31;13(11):1029–9.

209. Zeng L, Zhang J, Li C, et al. The determination of *gyrA* and *parC* mutations and the prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes in carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* ST11 and ST76 strains isolated from patients in Heilongjiang Province, China. *Infection, Genetics and Evolution*. 2020 Aug;82:104319.

210. Zhan Q, Xu Y, Wang B, et al. Distribution of fluoroquinolone resistance determinants in Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates associated with bloodstream infections in China. *BMC Microbiology*. 2021 Jun 2;21(1):164.

211. Hamprecht A, Göttig S. Treatment of Infections Caused by Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Current Treatment Options in Infectious Diseases*. 2014 Aug 30;6(4):425–38.

212. Falagas ME, Lourida P, Poulikakos P, et al. Antibiotic Treatment of Infections Due to Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: Systematic Evaluation of the Available Evidence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014 Sep 30;58(2):654–63.

213. Spyropoulou A, Papadimitriou-Olivgeris M, Bartzavali C, et al. A ten-year surveillance study of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary care Greek university hospital: predominance of KPC- over VIM- or NDM-producing isolates. *Journal of Medical Microbiology*. 2016 Mar 1;65(3):240–6.

214. Protonotariou E, Meletis G, Pilalas D, Mantzana P, Tychala A, Kotzamanidis C, et al. Polyclonal endemicity of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in icus of a Greek Tertiary Care Hospital. *Antibiotics*. 2022 Jan 25;11(2):149.

215. Mehta SC, Rice K, Palzkill T. Natural variants of the KPC-2 carbapenemase have evolved increased catalytic efficiency for ceftazidime hydrolysis at the cost of enzyme stability. *PLOS Pathogens*. 2015 Jun 1;11(6): e1004949.

216. Almaghrabi R, Clancy CJ, Doi Y, et al. Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains Exhibit Diversity in Aminoglycoside-Modifying Enzymes, Which Exert Differing Effects on Plazomicin and Other Agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014 May 27;58(8):4443–51.

217. DeLeo FR, Chen L, Porcella SF, et al. Molecular dissection of the evolution of carbapenem-resistant multilocus sequence type 258 *Klebsiella pneumoniae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014 Mar 17;111(13):4988–93.

218. Diago-Navarro E, Chen L, Passet V, et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* exhibit variability in capsular polysaccharide and capsule associated virulence traits. *The Journal of Infectious Diseases*. 2014 Mar 14;210(5):803–13.

219. Clancy CJ, Chen L, Shields RK, et al. Epidemiology and Molecular Characterization of Bacteremia Due to Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation*. 2013 Sep 6;13(10):2619–33.
220. Zhang F, Li Q, Bai J, et al. Heteroresistance to amikacin in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. *Frontiers in Microbiology*. 2021 Dec 2;12:682239.
221. Andersson DI, Nicoloff H, Hjort K. Mechanisms and clinical relevance of bacterial heteroresistance. *Nature Reviews Microbiology*. 2019 Aug 1;17(8):479–96.
222. Nicoloff H, Hjort K, Levin BR, et al. The high prevalence of antibiotic heteroresistance in pathogenic bacteria is mainly caused by gene amplification. *Nature Microbiology*. 2019 Feb 11;4(3):504–14.
223. Braspenning AJMM, Rajakani SG, Sey A, et al. Assessment of Colistin Heteroresistance among Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Intensive Care Patients in Europe. *Antibiotics*. 2024 Mar 20;13(3):281–1.
224. Tumbarello M, Trecarichi EM, De Rosa FG, et al. Infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: differences in therapy and mortality in a multicentre study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2015 Apr 21;70(7):2133–43.
225. Ramos-Castaneda JA, Ruano-Ravina A, Barbosa-Lorenzo R, et al. Mortality due to KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: Systematic review and meta-analysis: Mortality due to KPC *Klebsiella pneumoniae* infections. *Journal of Infection*. 2018 May 1;76(5):438–48.
226. Soares de Moraes L, Gomes Magalhaes GL, Material Soncini JG, et al. High mortality from carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection. *Microbial Pathogenesis*. 2022 Jun 1;167:105519.
227. Zarkotou O, Pournaras S, Tselioti P, et al. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. *Clinical Microbiology and Infection*. 2011 Dec;17(12):1798–803.
228. Zhao H, Liu M, Wu J, et al. Mortality and genetic diversity of antibiotic-resistant bacteria associated with bloodstream infections: a systemic review and genomic analysis. *BMC Infectious Diseases*. 2024 Dec 4;24(1):1385.