

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ Ζ. ΤΣΑΚΡΗΣ

**ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΑΠΟ
GRAM ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΥΝ
ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ**

ΙΩΑΝΝΗΣ ΔΑΝΙΗΛ

ΕΙΔΙΚΟΣ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ, 2019

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ Ζ. ΤΣΑΚΡΗΣ

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΑΠΟ
GRAM ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΥΝ
ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ

ΙΩΑΝΝΗΣ ΔΑΝΙΗΛ
ΕΙΔΙΚΟΣ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΑΙΤΗΣΗΣ: 01/04/2009

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 29/07/2009

ΜΕΛΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

- 1. ΤΣΑΚΡΗΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ, ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**
- 2. ΒΡΥΩΝΗ ΓΕΩΡΓΙΑ, ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ**
- 3. ΣΠΑΝΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

 ΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ, ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ, ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙ ΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ' ΗΓΗΣΑΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ, ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΑΥΤΕΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝ ΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΣΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝΤΟΣ, ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΛΟΓΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ, ΔΕ ΟΥΔΕΜΙ ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ὈΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ, ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕΥ ΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ' ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥ ΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΪΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΛ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΝΤΑΣ, ΕΚΧΛΗΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡΗΪΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΩ ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ὈΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΗΣ, ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ, Η ΙΔΩ, Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΗΤΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΔ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΔΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ' ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΛΩ.

*Σε δύο γυναίκες που με σμίλευσαν,
τη Μητέρα μου και τη Διευθύντριά μου*

Ευχαριστίες

Θερμές ευχαριστίες στο Καθηγητή Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Ε.Κ.Π.Α. κ. Αθανάσιο Ζ. Τσακρή για την τιμητική ανάθεση, την καθοδήγηση και την επίβλεψη στην εκπόνηση της παρούσης διδακτορικής διατριβής, καθώς και τα μέλη της τριμελούς επιτροπής Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Γεωργία Βρυώνη και Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Σπανάκη Νικόλαο. Πολλές ευχαριστίες οφείλω στη Διοίκηση του Νοσοκομείου, το Διευθυντή και το προσωπικό της Μ.Ε.Θ. του Γ. Ν. Νίκαιας-Πειραιά «Ο Άγιος Παντελεήμων» για την πολύτιμη βοήθειά τους στη συλλογή του υλικού και των δεδομένων. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Διευθύντριά μου κα. Δήμητρα Μυλωνά-Πετροπούλου, που μου προσέφερε όλα τα εφόδια κατά την εκπαίδευσή μου στην ειδικότητα της Ιατρικής Βιοπαθολογίας, ώστε να ανταποκριθώ στο επιστημονικό μου έργο, καθώς και στους γονείς μου που στάθηκαν στο πλευρό μου όλο αυτό το διάστημα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	4
Εισαγωγή	5
1. Β-λακταμικά αντιβιοτικά. Μηχανισμός δράσης	8
2. Καρβαπενέμες	11
3. Μηχανισμοί αντοχής των Gram αρνητικών βακτηρίων στα β-λακταμικά αντιβιοτικά	14
4. Μηχανισμός δράσης των β-λακταμασών	18
5. Ταξινόμηση β-λακταμασών	19
6. Καρβαπενεμάσες: ταξινόμηση	25
6.1 Καρβαπενεμάσες τάξης A κατά Ambler	28
6.2 Καρβαπενεμάσες τάξης B κατά Ambler	31
6.3 Καρβαπενεμάσες τάξης C κατά Ambler	35
6.4 Καρβαπενεμάσες τάξης D κατά Ambler	36
7. Εργαστηριακή ανίχνευση καρβαπεμενασών	38
7.1 Φαινοτυπικές τεχνικές	42
7.2 Μοριακές τεχνικές	55
7.3 Άλλες τεχνικές	57
7.3.1 Ανίχνευση της δραστηρότητας της καρβαπενεμάσης με φασματοφωτομετρία	57
7.3.2 Ανίχνευση της δραστηρότητας της καρβαπενεμάσης με φασματομετρία μάζας	57
7.3.3 Βιοχημικές δοκιμασίες	58
7.3.4 Εκλεκτικά χρωμογόνα καλλιεργητικά μέσα	59
7.3.5 Ανοσοχρωματικές μέθοδοι	59
8. Επιδημιολογία καρβαπεμενασών	59
9. Λοιμώξεις από <i>Enterobacteriaceae</i> που παράγουν καρβαπενεμάσες	67
9.1 Λοιμώξεις από <i>Klebsiella pneumoniae</i>	67
9.2 Λοιμώξεις από <i>Proteus mirabilis</i>	69
9.3 Λοιμώξεις από <i>Enterobacter cloacae</i>	70
9.4 Λοιμώξεις από <i>Serratia marcescens</i>	73
9.5 Λοιμώξεις από <i>Escherichia coli</i>	76
10. Θεραπεία λοιμώξεων από <i>Enterobacteriaceae</i> που παράγουν καρβαπενεμάσες	79
10.1 Πολυμυξίνες	80
10.2 Τιγκεκυκλίνη	81
10.3 Αμινογλυκοσίδες	82
10.4 Φωσφομυκίνη	82
10.5 Συνδυασμένη αγωγή έναντι των CPE	83
10.6 Νεότεροι αντιμικροβιακοί παράγοντες έναντι των CPE	84
11. Νοσοκομειακές λοιμώξεις στην Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ)...	89
12. Μέτρα ελέγχου λοιμώξεων για στελέχη εντεροβακτηριακών που παράγουν καρβαπενεμάσες	92
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	101
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	102
1. Ορισμοί	102

2. Σκοπός – στόχοι	104
3. Σχεδιασμός	105
4. Ηθικές προεκτάσεις	105
5. Πληθυσμός – δείγμα	106
6. Μέθοδοι	107
6.1 Έλεγχος αποικισμού ασθενών	107
6.2 Έλεγχος αποικισμού χεριών προσωπικού της ΜΕΘ	108
6.3 Έλεγχος αποικισμού περιβάλλοντος της ΜΕΘ	108
6.4 Καλλιέργεια δειγμάτων	109
6.5 Ανίχνευση και απομόνωση των ύποπτων για CPE αποικιών	111
6.6 Ταυτοποίηση και έλεγχος αντιμικροβιακής ευαισθησίας των ύποπτων για CPE αποικιών	112
6.7 Όρια (breakpoints) ευαισθησίας των καρβαπενεμών	114
6.8 Φαινοτυπικός έλεγχος για παραγωγή καρβαπεμενασών (screening tests)	115
6.9 Μοριακή τυποποίηση στελεχών	117
6.10 Προσδιορισμός ορίου ανίχνευσης των μεθόδων	121
6.11 Προσδιορισμός της ευαισθησίας και της ειδικότητας των μεθόδων ελέγχου	122
6.12 Καταγραφή ελέγχου αποικισμού ασθενών, προσωπικού και περιβάλλοντος της ΜΕΘ και λοιμώξεων από στελέχη CPE	122
6.13 Υπολογισμός βαρύτητας κλινικής νόσου εισόδου (APACHE II score)	130
6.14 Στατιστική ανάλυση των δεδομένων	131
6.15 Μέτρα ελέγχου αποικισμού και λοιμώξεων από CPE στελέχη στη ΜΕΘ	131
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	133
1. Αποτελέσματα ελέγχου αποικισμού των ασθενών της ΜΕΘ	133
2. Αποτελέσματα ελέγχου αποικισμού του περιβάλλοντος της ΜΕΘ	137
3. Αποτελέσματα ελέγχου αποικισμού των χεριών του προσωπικού της ΜΕΘ	137
4. Δεδομένα ασθενών	138
4.1 Δημογραφικά και κλινικά δεδομένα ασθενών αποικισμένων και μη αποικισμένων με <i>Enterobacteriaceae</i> που παράγουν καρβαπενεμάσες ...	138
4.2 Δημογραφικά και κλινικά δεδομένα ασθενών που παρέμειναν περισσότερο από 7 ημέρες στη ΜΕΘ και αποικίσθηκαν από <i>Enterobacteriaceae</i> που παράγουν καρβαπενεμάσες	142
4.3 Δημογραφικά και κλινικά δεδομένα ασθενών που εμφάνισαν λοίμωξη από <i>Enterobacteriaceae</i> που παράγουν καρβαπενεμάσες	146
5. Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας	151
5.1 Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας για τα στελέχη CPE που απομονώθηκαν από τους αποικισμένους ασθενείς της ΜΕΘ	151
5.2 Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας για τα στελέχη CPE που απομονώθηκαν από τα κλινικά δείγματα των αποικισμένων ασθενών της ΜΕΘ με λοίμωξη	154
6. Αποτελέσματα ελέγχου αποικισμού από CPE στελέχη πριν και μετά την εφαρμογή μέτρων ελέγχου και πρόληψης στη ΜΕΘ	158
7. Αποτελέσματα σύγκρισης των πέντε μεθόδων ελέγχου για CPE στελέχη	159
7.1 Αποτελέσματα προσδιορισμού του ελάχιστου ορίου ανίχνευσης (LOD) των πέντε μεθόδων ελέγχου	159

7.2 Αποτελέσματα από την καλλιέργεια των ορθικών επιχρισμάτων με τις συγκρινόμενες μεθόδους ελέγχου	161
7.3 Αποτελέσματα προσδιορισμού ευαισθησίας, ειδικότητας, θετικής προγνωστικής αξίας, αρνητικής προγνωστικής αξίας και ακρίβειας των μεθόδων ελέγχου	167
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	169
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	185
ABSTRACT	188
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	190
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	237

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή

Η αντοχή των μικροοργανισμών έναντι των αντιμικροβιακών παραγόντων αποτελεί ένα πρόβλημα με παγκόσμιες διαστάσεις που επιδεινώνεται διαρκώς και μια σημαντική πρόκληση για τους κλινικούς ιατρούς καθώς είναι δύσκολη η θεραπευτική αντιμετώπιση των λοιμώξεων από τους μικροοργανισμούς αυτούς (Arias CA and Murray BE, 2009). Η αντοχή στις καρβαπενέμες, οι οποίες χρησιμοποιούνται στη θεραπεία πολυανθεκτικών (MDR) gram αρνητικών βακτηρίων μεταξύ των οποίων και μικροβιακών στελεχών της οικογένειας *Enterobacteriaceae* που παράγουν εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (ESBL), αποτελεί ένα αναδυόμενο και ραγδαία αυξανόμενο φαινόμενο (Nordmann P *et al*, 2011).

Τα μικρόβια της οικογένειας των *Enterobacteriaceae* που είναι ανθεκτικά στις καρβαπενέμες (CRE) δύναται να είναι ανθεκτικά στις περισσότερες ακόμα και σε όλες τις τάξεις των β-λακταμικών αντιβιοτικών (πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, μονοβακτάμες και καρβαπενέμες), γεγονός που περιορίζει τις επιλογές αντιμικροβιακής αγωγής για τη θεραπεία ασθενών με λοίμωξη από τα στελέχη αυτά (Nordmann P *et al*, 2012). Η αντοχή στις καρβαπενέμες εμφανίζεται όταν ένα μικροβιακό στέλεχος: α. εκφράζει μια β-λακταμάση ικανή να υδρολύει τις καρβαπενέμες (καρβαπενεμάση), β. έχει υποστεί αλλαγές (συνήθως απώλεια) στις πορίνες της εξωτερικής μεμβράνης, γ. υπερεκφράζει αντλίες ενεργητικής εκροής των αντιβιοτικών, και δ. όταν παράγει εκτεταμένου φάσματος κεφαλοσπορινάση, όπως η AmpC-type beta-lactamase ή εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάση (ESBL) σε συνδυασμό με την απώλεια πορίνης (Fernandes R *et al*, 2013; Jacoby GA *et al*, 2004). Το φαινόμενο της αντοχής στις καρβαπενέμες όταν οφείλεται στην απώλεια πορινών και στην υπερέκφραση των αντλίων ενεργητικής εκροής περιπλέκεται εξαιτίας της επίδρασης αυτών των μηχανισμών και σε άλλα αντιβιοτικά, όπως τις κινολόνες, τις αμινογλυκοσίδες και την τιγκεκυκλίνη. (Arias CA and Murray BE, 2009)

Μεταξύ των καρβαπενεμασών συγκαταλέγονται οι μεταλλο-β-λακταμάσες (ένζυμα MBL, τάξης B κατά Ambler) και η *Klebsiella pneumoniae* καρβαπενεμάση (KPC, τάξης A κατά Ambler) που επικρατούν στα εντεροβακτηριακά σε χώρες ή μεγάλες γεωγραφικές περιοχές, όπως οι ΗΠΑ, το Ισραήλ, η Ιταλία, η Ελλάδα, η Άπω Ανατολή και η Νότια Αμερική (Chmelnitsky *et al*, 2008; Fukigai S *et al*, 2007; Gomez SA *et al*, 2011; Grundmann H *et al*, 2010; Kitchel B *et al*, 2009; Kochar S *et al*, 2009; Nordmann P *et al*, 2011; Pournaras S *et al*, 2009; Qi Y *et al*, 2011). Επιπλέον, η oxacillinase-48 (OXA-48, τάξης D κατά Ambler) από το 2008 έχει απομονωθεί σε

εντεροβακτηριακά από την Τουρκία (Carrër A *et al*, 2008) και έκτοτε έχει αναφερθεί η εμφάνισή της και σε άλλες χώρες της λεκάνης της Μεσογείου και της Δυτικής Ευρώπης (Glupczynski Y *et al*, 2012; Nordmann P *et al*, 2011)

Επίσης, πρέπει να σημειωθεί ότι τα γονίδια των καρβαπενεμασών που φιλοξενούνται στα στελέχη *Enterobacteriaceae* που παράγουν καρβαπενεμάσες (CPE) είναι κωδικοποιημένα ως επί το πλείστον σε τρανσποζόνια ή / και ιντεγκρόνια, που αποτελούν καθοριστικούς παράγοντες για την εύκολη μετάδοσή τους σε άλλα εντεροβακτηριακά στελέχη (Cuzon G *et al*, 2010; Samuelsen Ø *et al*, 2009; Tsakris A *et al*, 2010). Αποτέλεσμα της ιδιότητας αυτής είναι να έχουν μεγαλύτερη δυναμικότητα διασποράς και να ευθύνονται για επιδημίες στο νοσοκομειακό περιβάλλον (Giakkouri P *et al*, 2009; Nordmann P *et al*, 2009; Woodford N *et al*, 2011). Οι λοιμώξεις που προκαλούν, συνήθως βακτηριαίμεις και σηπτικές ουρολοιμώξεις, σχετίζονται με υψηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα με πολλαπλό κόστος, κοινωνικό και οικονομικό (Cosgrove SE, 2006; Nordmann P *et al*, 2011; Barriere SL, 2015; Giske CG *et al*, 2008; Slama TG, 2008; Wilke MH, 2010).

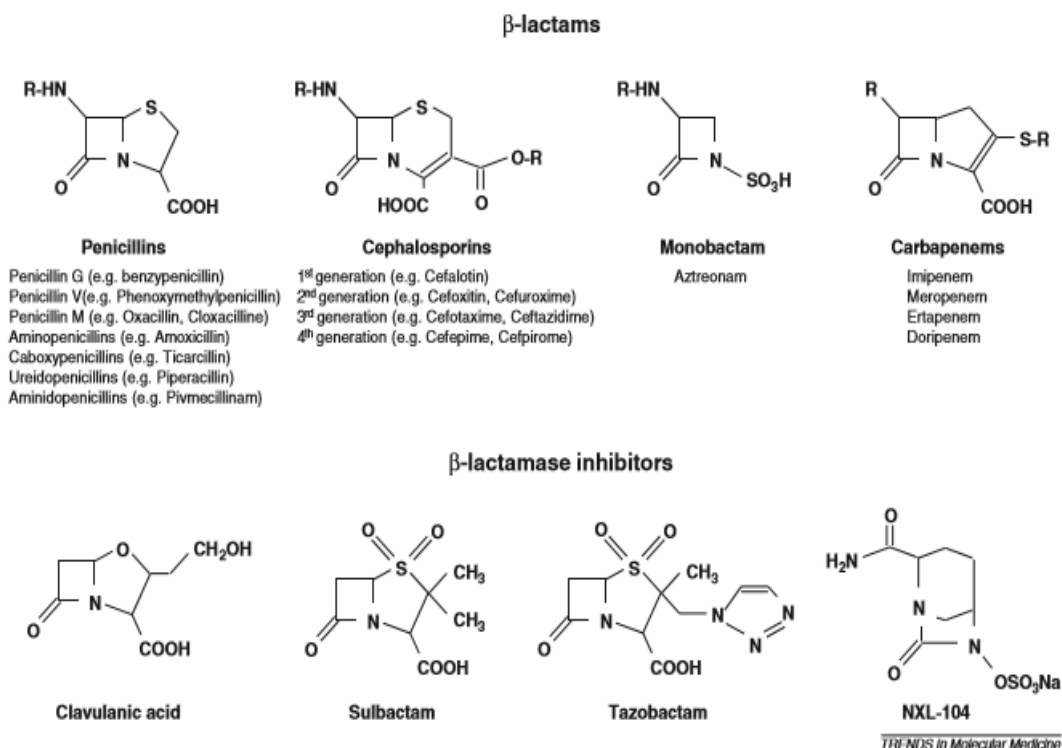
Η εμφάνιση αντοχής είναι γενικώς υψηλή μεταξύ των μικροοργανισμών που απομονώνονται σε ασθενείς που νοσηλεύονται στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ), η οποία αποτελεί τμήμα με την μεγαλύτερη χρήση «προωθημένων» αντιβιοτικών (Kollef MH, 2001; Siegel JD *et al*, 2006). Οι λοιμώξεις στη ΜΕΘ αποτελούν ένα σοβαρό και εξελισσόμενο πρόβλημα τόσο στην Ελλάδα όσο και σε παγκόσμιο επίπεδο (Giakkouri, 2010; Gikas A, 2002; Dima S, 2007; Vincent JL *et al*, 2009; Richards M, 2003). Οι ΜΕΘ νοσηλεύουν ειδικές ομάδες ασθενών, βαρέως πασχόντων, με μειωμένη ανοσολογική απάντηση στις περισσότερες των περιπτώσεων. Στην βαριά υποκείμενη νόσο των ασθενών έρχονται να προστεθούν διαγνωστικές και εντατικές θεραπευτικές παρεμβάσεις στις οποίες υποβάλλονται, καθώς και η χρήση μηχανικών μέσων υποστήριξης, χειρισμοί που επιβαρύνουν τους ήδη διαταραγμένους μηχανισμούς άμυνας των ασθενών. Ο κίνδυνος Νοσοκομειακής Λοίμωξης στους ασθενείς αυτούς είναι 5-10 φορές υψηλότερος απ' ό τι στους ασθενείς των παθολογικών και χειρουργικών τμημάτων (Weber *et al*, 1999). Δεδομένα από τις ΗΠΑ και την Ευρώπη δείχνουν ότι το 21-50% των Νοσοκομειακών Λοιμώξεων αφορούν ασθενείς της ΜΕΘ (Vincent JL *et al*, 1995; NNIS, 2003; Dhillon R and Clark J, 2009; Vincent JL *et al*, 2009). Η παθοφυσιολογία των λοιμώξεων στη ΜΕΘ περιλαμβάνει τον αποικισμό των ασθενών με δυνητικά λοιμογόνους μικροοργανισμούς, οι οποίοι μπορούν να προέρχονται από

τη φυσιολογική χλωρίδα του ασθενούς ή από το χώρο της ΜΕΘ και στους οποίους ανήκουν, σε αυξανόμενα ποσοστά, πολυανθεκτικοί μικροοργανισμοί (Donskey CJ, 2004; Bonten M and Weinstein R., 1995; Prasad N *et al*, 2016; Otter JA *et al*, 2013; Lerner A *et al*, 2013)

Πηγή μετάδοσης στελεχών CPE στο νοσοκομειακό περιβάλλον και κυρίως στη ΜΕΘ αποτελούν συνήθως ασθενείς που είναι αποικισμένοι με τα στελέχη αυτά. (Calfee D and Jenkins SG, 2008; CDC, 2009; Kochar S *et al*, 2009). Επιπλέον, αρκετά επιδημικά κρούσματα αυτών των στελεχών έχουν συσχετισθεί και με τον αποικισμό του περιβάλλοντος της ΜΕΘ (van 't Veen A *et al*, 2005; Levin AS, 2001), ενώ δεν πρέπει να παραγνωρίζεται και η δυνατότητα μετάδοσης ανθεκτικών μικροοργανισμών μέσω των χεριών του προσωπικού (Maureen H *et al*, 2008. Ο εντοπισμός και η ανίχνευσή τους τόσο με φαινοτυπικές όσο και με μοριακές μεθόδους συμβάλλουν στην μελέτη του τρόπου διασποράς τους, στον περιορισμό της μετάδοσής τους και στην χάραξη κατάλληλων προληπτικών μέτρων και θεραπευτικών παρεμβάσεων έναντι των λοιμώξεων που προκαλούν και αποτελούν το αντικείμενο της παρούσας μελέτης.

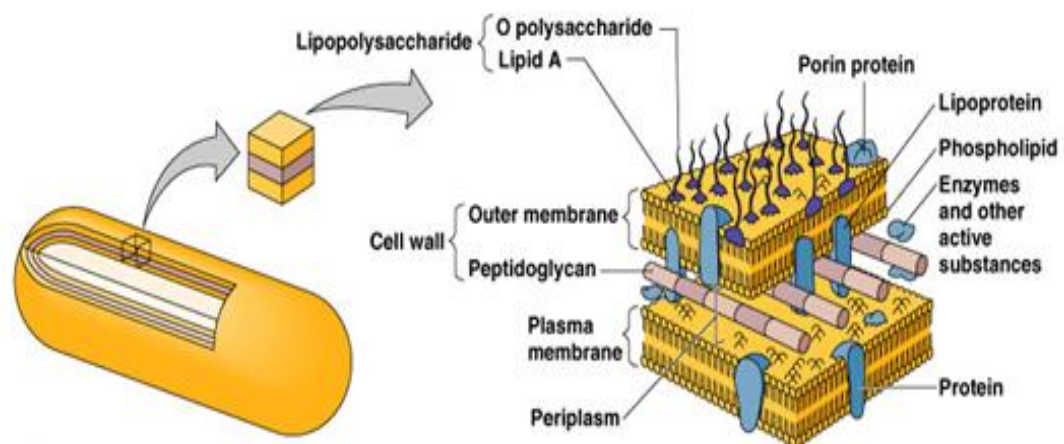
1. Β-λακταμικά αντιβιοτικά. Μηχανισμός δράσης

Ένα από τα πιο σημαντικά επιτεύγματα της σύγχρονης ιατρικής αποτέλεσε αναμφίβολα η ανακάλυψη και η εξέλιξη των αντιβιοτικών, καθώς παρείχε καταλυτικές δυνατότητες στην θεραπευτική αντιμετώπιση των λοιμώξεων που μακροχρόνια μάστιζαν την ανθρωπότητα. Η ανακάλυψη από τον Α. Φλέμινγκ της πενικιλίνης το 1928 και η κλινική επιτυχία της πενικιλίνης G, του πρώτου β-λακταμικού αντιβιοτικού, οδήγησε στην παραγωγή των β-λακταμικών αντιβιοτικών (τις πενικιλίνες, τις κεφαλοσπορίνες, τις μονοβακτάμες και τις καρβαπενέμες), τα οποία χρησιμοποιούνται σήμερα ευρέως στη θεραπεία των λοιμώξεων, λόγω του μεγάλου αντιμικροβιακού φάσματος, της ταχείας βακτηριοκτόνου δράσης και της χαμηλής τοξικότητάς τους (Gaynes R, 2017). Η αντιμικροβιακή δραστηριότητα των β-λακταμικών οφείλεται σε ένα κοινό χαρακτηριστικό στη χημική δομή τους, τον τετραμελή β-λακταμικό δακτύλιο. Η σύνθεση των πλευρικών αλυσίδων του δακτυλίου αυτού καθορίζουν το αντιμικροβιακό τους φάσμα, την αντοχή τους στη δράση των β-λακταμασών και τις φαρμακοκινητικές τους ιδιότητες. (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Η χημική δομή των β-λακταμικών αντιβιοτικών και των αναστολέων των β-λακταμασών (Nordmann P *et al*, 2012).

Η αντιμικροβιακή δράση των β-λακταμικών είναι βακτηριοκτόνος και συνίσταται στην αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος των μικροοργανισμών. Το κυτταρικό τοίχωμα είναι ιδιαίτερα σημαντικό δομικό στοιχείο των μικροβίων καθώς από την ακεραιότητά του εξαρτάται η σταθερότητα του σχήματος του μικροβιακού κυττάρου και η διατήρησή του σε υπέρτονο περιβάλλον (Massova I and Mobashery S, 1998). Το κυτταρικό τοίχωμα στα εντεροβακτηριακά αποτελείται από την εξωτερική μεμβράνη και το στρώμα πεπτιδογλυκάνης (σε ποσοστό 5-10%) και διαχωρίζεται από την κυτταροπλασματική μεμβράνη με τον περιπλασματικό χώρο (Εικόνα 2). Το ακέραιο μικροβιακό κυτταρικό τοίχωμα περιλαμβάνει εναλλασσόμενα αμινοσάκχαρα N-ακετυλο-μουραμικού οξέος (NAM) και N-ακετυλο-γλυκοζαμίνης (NAG) ενωμένα με β-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό. Αυτά συνδέονται με πενταπεπτίδια εναλλασσόμενων L- και D- αμινοξέων (L-αλανίνης, D-γλουταμινικού οξέος, διαμινοπιμελικού οξέος (DAP) και D-αλανίνης) ενωμένων με πεπτιδικό δεσμό, σχηματίζοντας τις πεπτιδογλυκανικές αλυσίδες, οι οποίες καταλήγουν στο διπεπτίδιο D-αλανυλ-D-αλανίνη (Εικόνα 3). Οι πεπτιδογλυκανικές αλυσίδες σχηματίζουν ένα δίκτυο η σύνθεση του οποίου καταλύεται από τρανσπεπτιδάσες, γνωστές ως πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες (Penicillin Binding Proteins, PBPs), οι οποίες εδράζονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και συμμετέχουν στη δημιουργία του πεπτιδικού δεσμού DAP – D-αλανίνη μεταξύ των πενταπεπτιδίων NAM (τρανσπεπτιδίωση) (Zarun A *et al*, 2008; Sauvage E *et al*, 2008). Ο δεσμός αυτός εξασφαλίζει την σταθερότητα του κυτταρικού τοιχώματος και συνεπώς την οσμωτική ομοιοστάση του μικροβιακού κυττάρου.

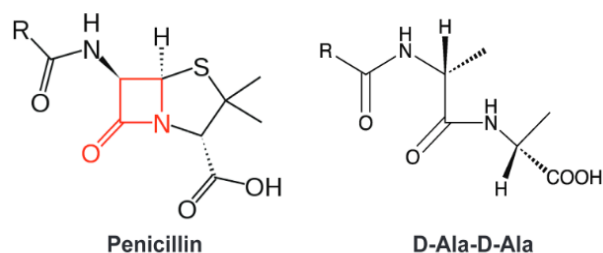


Εικόνα 2: Δομή κυτταρικού τοιχώματος των *Enterobacteriaceae* (Tortora *et al*, 2007)



Εικόνα 3: Σύνθεση των πεπτιδογλυκανικών αλυσίδων του κυτταρικού τοιχώματος των *Enterobacteriaceae* (Kong KF *et al*, 2010)

Για να δράσουν τα β-λακταμικά που αποτελούν υδρόφιλα μόρια, θα πρέπει να διαπεράσουν το κυτταρικό τοίχωμα για να βρεθούν στην κυτταροπλασματική μεμβράνη όπου βρίσκονται οι PBPs και οι οποίες αποτελούν το στόχο τους. Αυτό επιτυγχάνεται με τη βοήθεια καναλιών της εξωτερικής μεμβράνης, γνωστών ως πορίνες ή πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης (Outer membrane porins, Omps), οι οποίες επιτρέπουν την παθητική διάχυση υδρόφιλων μορίων, μικρότερων των 600Da (James CE *et al*, 2009; Galdiero S *et al*, 2012). Η δραστηριότητα του β-λακταμικού δακτυλίου συνίσταται στην δομική ομοιότητά του με το D-αλανυλ-D-αλανίνη των πενταπεπτιδίων NAM, με αποτέλεσμα να αναγνωρίζεται λανθασμένα από τις PBPs ως δομικό συστατικό κατά τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος (Εικόνα 4). Αυτό έχει ως συνέπεια τη σύνδεση των β-λακταμικών με την ενεργό θέση των PBPs, σχηματίζοντας το σύμπλεγμα Henry-Michaelis, ενώ ο β-λακταμικός δακτύλιος ανοίγει και συνδέεται με μη αντιστρεπτό δεσμό με την ενεργό σερίνη των PBPs (ακετυλίωση), οι οποίες με τον τρόπο αυτό αδρανοποιούνται και δεν καταλύουν ως τρανσπεπτιδάσες τη σύνθεση του δικτύου των πεπτιδογλυκανικών αλυσίδων. Η σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, τελικά, αναστέλλεται, οι πεπτιδογλυκάνες αυτολύονται με επακόλουθο την αύξηση της διαπερατότητας, την οσμωτική λύση και το θάνατο του μικροοργανισμού (Fisher *et al*, 2009).



Εικόνα 4: Η δομική ομοιότητα του β-λακταμικού δακτυλίου με την D-αλανυλ-D-αλανίνη (Zeng X and Lin J, 2013)

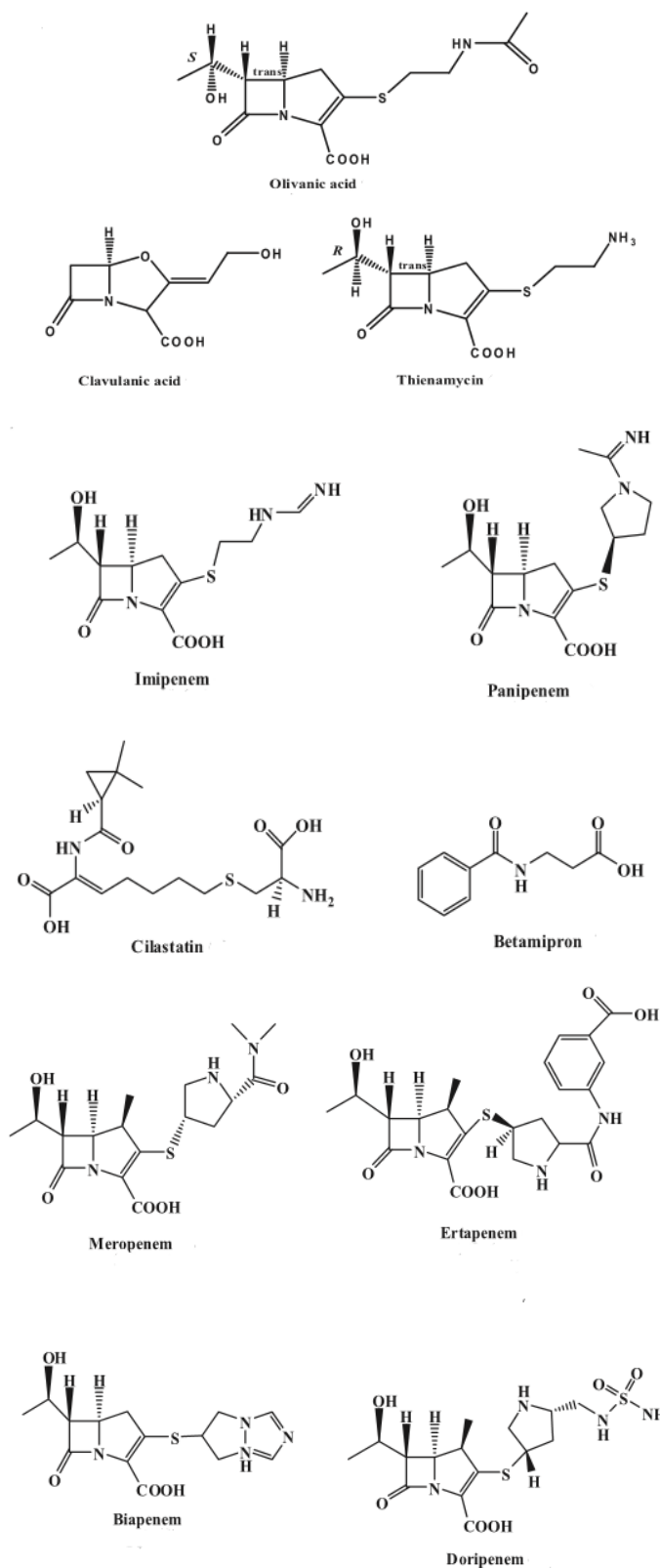
2. Καρβαπενέμες

Στις καρβαπενέμες ανήκουν οι χημικές ουσίες που έχουν τον πενταμερή δακτύλιο των πενικιλινών ενωμένο στις θέσεις 4:5 με τον τετραμερή β-λακταμικό δακτύλιο, αλλά φέρουν ένα διπλό δεσμό ανάμεσα στα C2 και C3 και στη θέση C1 έχει γίνει αντικατάσταση του θείου με άνθρακα (Papp-Wallace KM *et al*, 2011) (Εικόνα 5). Οι πρώτες καρβαπενέμες ήταν τα ολιβανικά οξέα που παρήχθησαν από το *Streptomyces olivaceus*, ενώ μετέπειτα το 1976 ανακαλύφθηκε η θειεναμυκίνη, που παρήχθει από το *Streptomyces cattleya*, με μεγάλο αντιμικροβιακό φάσμα και ανασταλτική δράση έναντι των β-λακταμασών. Παρ' ότι η θειεναμυκίνη ήταν δραστική έναντι των gram αρνητικών, συμπεριλαμβανομένου της *Pseudomonas*, των αναεροβίων, όπως το *Bacteriodes fragilis* και των gram θετικών μικροοργανισμών δεν είχε κλινική χρησιμότητα εξαιτίας της χημικής της αστάθειας (Kahan JS *et al*, 1979).

Το 1984 συντέθηκε ένα πιο σταθερό παράγωγο της θειεναμυκίνης, η ιμιπενέμη, που ήταν και η πρώτη καρβαπενέμη που χρησιμοποιήθηκε κλινικά για τη θεραπεία σοβαρών λοιμώξεων. Ενώ η ιμιπενέμη είχε μεγάλη συγγένεια προς τις PBPs και εμφάνισε σταθερότητα έναντι των β-λακταμασών, η υδρόλυσή της από την νεφρική δεϋδροπεπτιδάση-1 (DHP-1) και η προκαλούμενη παραγωγή νεφροτοξικών μεταβολιτών αποτελούσε πρόβλημα που υπερκεράστηκε αργότερα με τον συνδυασμό της με κάποιον αναστολέα, όπως η σιλαστατίνη ή βεταμιπρόνη (Kattan JN *et al*, 2008; Birnbaum J *et al*, 1985).

Αργότερα παρήχθησαν ακόμα πιο σταθερές καρβαπενέμες με την προσθήκη μιας μεθυλ-ομάδας στη θέση 1-β. Η μεροπενέμη ήταν η πρώτη καρβαπενέμη με 1-β-μεθυλ-ομάδα και 2-θειοπυρρολιδινυλ-ομάδα καθιστώντας την σταθερή έναντι της DHP-1 (Fukasawa M *et al*, 1992) Ακολούθησε η παραγωγή και άλλων

σταθερών καρβαπενεμών, όπως η πανιπενέμη, η ερταπενέμη, η βιαπενέμη και η δοριπενέμη (Papp-Wallace KM *et al*, 2011).



Εικόνα 5: Χημική δομή των πρώτων και των νεότερων καρβαπενεμών και των αναστολέων της DHP-1 (Papp-Wallace KM *et al*, 2011).

Όπως έχει αναφερθεί, ο μηχανισμός της δράσης των καρβαπενεμών συνίσταται στην αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος των μικροβίων μέσω της σύνδεσής τους με τις PBPs και την αναστολή της δράσης αυτών ως πεπτιδάσες κατά το σχηματισμό της πεπτιδογλυκάνης, με συνέπεια την οσμωτική λύση του μικροβιακού κυττάρου. Βασικό χαρακτηριστικό των καρβαπενεμών αποτελεί η ικανότητα ισχυρής σύνδεσής τους με πολλαπλές διαφορετικές PBPs στην οποία αποδίδεται το μεγάλο αντιμικροβιακό τους φάσμα και η ταχεία δράση τους (Hashizume *et al*, 1984).

Οι καρβαπενέμες ανάλογα με το αντιμικροβιακό τους φάσμα διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες: στις καρβαπενέμες, όπως η ερταπενέμη, που είναι ελάχιστα ή καθόλου δραστικές έναντι των αζυμωτικών gram αρνητικών μικροοργανισμών (Group 1) και είναι κατάλληλες για τη θεραπεία λοιμώξεων από *Enterobacteriaceae*, και στις καρβαπενέμες, όπως η ιμιπενέμη, η μεροπενέμη και η δοριπενέμη που έχουν ευρύτερο αντιμικροβιακό φάσμα και είναι δραστικές και έναντι αζυμωτικών gram αρνητικών μικροοργανισμών, όπως η *Pseudomonas aeruginosa*, η *Burkholderia cepacia* και το *Acinetobacter* spp. (Group 2) και επομένως είναι εξαιρετικά χρήσιμες στην αντιμετώπιση των νοσοκομειακών λοιμώξεων, ειδικά των ΜΕΘ. Οι καρβαπενέμες και των δύο αυτών κατηγοριών είναι δραστικές έναντι των στρεπτοκόκκων, των ευαίσθητων στην μεθικιλίνη σταφυλοκόκκων (MSSS), στην *Neisseria* και τον *Haemophilus*, καθώς και στα περισσότερα gram θετικά και gram αρνητικά αναερόβια μικρόβια. Οι μικροοργανισμοί που δεν είναι ευαίσθητοι στην καρβαπενέμες είναι ο ανθεκτικός στην αμπικιλίνη *Enterococcus faecium*, οι ανθεκτικοί στη μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus* (MRSA), η *Stenotrophomonas maltophilia* και ορισμένα στελέχη *Clostridium difficile*. Ωστόσο, έχει προταθεί και μια τρίτη κατηγορία καρβαπενεμών, όπως η PZ-601, που χαρακτηριστικά είναι δραστικές έναντι των ανθεκτικών στη μεθικιλίνη στελεχών *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Kattan JN *et al*, 2008; Unal S *et al*, 2005).

Οι καρβαπενέμες αποτελούν τα αντιμικροβιακά εκλογής έναντι των λοιμώξεων από στελέχη *Enterobacteriaceae* που παράγουν ESBL (Rodríguez-Baño J *et al*, 2012). Η ιμιπενέμη, αν και λιγότερο σταθερή από τις νεότερες καρβαπενέμες, χρησιμοποιείται ακόμα, αντενδείκνυται ωστόσο για λοιμώξεις του κεντρικού νευρικού συστήματος σε άτομα με νεφρική ανεπάρκεια ή δομική εγκεφαλική νόσο. Η μεροπενέμη, αν και έχει παρόμοιο μικροβιακό φάσμα με την

ιμipενέμη, χρησιμοποιείται περισσότερο κλινικά καθώς είναι ελάχιστα περισσότερο δραστική έναντι των αερόβιων gram αρνητικών βακτηρίων. Από την άλλη πλευρά, η ερταπενέμη, υδρολύεται λιγότερο από τη DHP-1 (η υδρόλυσή της αντιστοιχεί στο ¼ εκείνης της ιμipενέμης) διαθέτει μεγαλύτερο χρόνο ημίσειας ζωής και για το λόγο αυτό χορηγείται ημερησίως εφάπαξ. Η ερταπενέμη θεωρείται κατάλληλη για την εμπειρική θεραπευτική αντιμετώπιση ενδοκοιλιακών μεικτών λοιμώξεων από αερόβια και αναερόβια μικρόβια, λοιμώξεων δέρματος και μαλακών μορίων, πνευμονία κοινότητας και λοιμώξεων του ουροποιητικού (Wexler HM, 2004). Επιπλέον, η δοριπενέμη εμφανίζει τα πλεονεκτήματα τόσο της ιμipενέμης όσο και της μεροπενέμης έναντι των gram αρνητικών αλλά και των gram θετικών μικροοργανισμών (ιδιαίτερα έναντι του *Streptococcus pneumoniae*) και χορηγείται για την αντιμετώπιση της νοσοκομειακής πνευμονίας (συμπεριλαμβανομένης της σχετιζόμενης με αναπνευστήρα πνευμονίας), πολύπλοκων ενδοκοιλιακών λοιμώξεων και λοιμώξεων της ουροποιητικής οδού (Walsh F, 2007). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι κλινικά διαθέσιμες καρβαπενέμες κατά τη χορήγηση από το στόμα εμφανίζουν χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα και για αυτό θα πρέπει να χορηγούνται ενδοφλέβια. Η ιμipενέμη/σιλαστατίνη και η ερταπενέμη μπορούν επίσης να χορηγηθούν ενδομυϊκά (Buckley MM *et al*, 1995; Wexler HM, 2004). Κατά την εμπειρική θεραπεία των λοιμώξεων συνήθως χρησιμοποιούνται μαζί με έναν αντιμικροβιακό παράγοντα που είναι έναντι των gram θετικών μικροοργανισμών. Οι καρβαπενέμες απεκκρίνονται κυρίως με τη νεφρική λειτουργία και οι ανεπιθύμητες ενέργειες που έχουν αναφερθεί από τη χρήση τους, εκτός από τη νεφροτοξικότητα, περιλαμβάνουν την νευροτοξικότητα, τις ανοσολογικές διαταραχές (συνηθέστερα αλλεργικές αντιδράσεις) και τη διαταραχή της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου (Papp-Wallace KM *et al*, 2011).

3. Μηχανισμοί αντοχής των Gram αρνητικών βακτηρίων στα β-λακταμικά αντιβιοτικά.

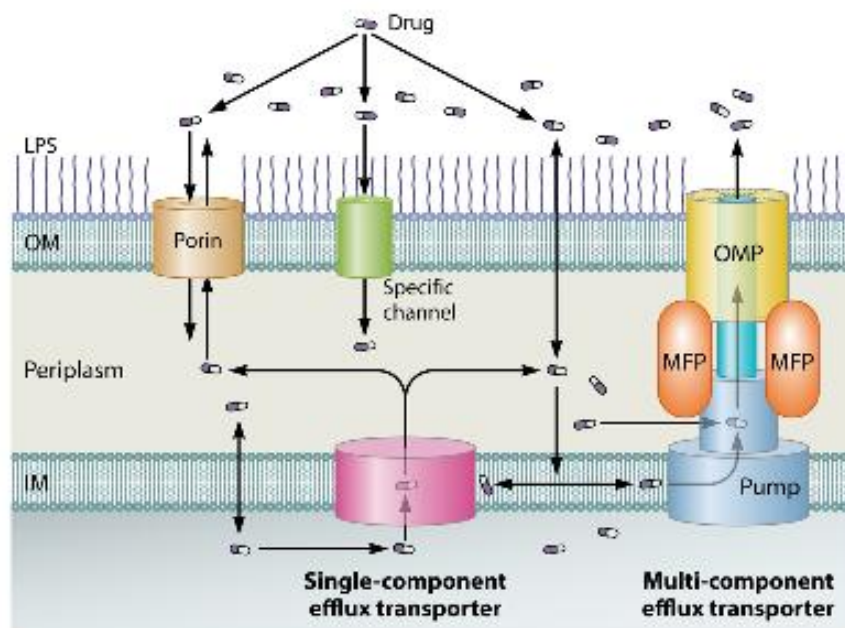
Τα Gram αρνητικά βακτήρια δύναται να εμφανίσουν αντοχή στα β-λακταμικά αντιβιοτικά που να οφείλεται στους εξής μηχανισμούς (Εικόνα 7):

α. *Αδιαπερατότητα (Impermeability) της εξωτερικής μεμβράνης.* Όπως αναφέρθηκε, τα υδρόφιλα β-λακταμικά εισέρχονται στον περιπλασμικό χώρο

διαμέσου των πορινών (Omps) της εξωτερικής μεμβράνης, οι οποίες ποικίλουν σε αριθμό στα διάφορα είδη βακτηρίων. Ποιοτική ή ποσοτική διαταραχή στην έκφραση των πορινών επιφέρει επίκτητη αντοχή λόγω μειωμένης κυτταρικής διαπερατότητας των β-λακταμικών (Poole K, 2002). Τέτοια αντοχή έχει παρατηρηθεί σε *E.coli*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* και *Serratia*, ενώ μπορεί να αφορά σε διαφορετικά αντιβιοτικά που διέρχονται από την ίδια πορίνη ή σε αντιβιοτικό που διέρχεται από συγκεκριμένη πορίνη (Denyer SP and Maillard JY, 2002). Υποκατάσταση ή μειωμένη έκφραση των πορινών έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη είσοδο των καρβαπενεμών στον περιπλασμικό χώρο, ανεβάζοντας την MIC τους και έχει αναφερθεί σε *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *A. baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus rettgeri*, *Shigella dysenteriae* και *Salmonella enterica* (Papp-Wallace KM et al, 2011). Το επίπεδο της αντοχής που προκαλεί ο μηχανισμός αυτός είναι χαμηλού επιπέδου και συχνά συνδυάζεται με την ύπαρξη και ενός άλλου μηχανισμού αντοχής στα β-λακταμικά (όπως οι αντλίες ενεργητικής εκροής ή/και η παραγωγή β-λακταμασών), όπως επίσης δύναται να ενισχύσει το επίπεδο αντοχής που προκαλείται από άλλους μηχανισμούς.

β. *Υπερέκφραση αντλιών ενεργητικής εκροής (efflux pumps)*. Κάθε αντλία αποτελείται από ένα σύστημα τριών πρωτεϊνικών δομών που εδράζονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, τον περιπλασμικό χώρο (membrane fusion protein, MFP) και την εξωτερική μεμβράνη του μικροβίου (outer membrane factor, OMF) (Εικόνα 6) και έχουν ως ρόλο την αποβολή μεταβολικών ή τοξικών προϊόντων, όπως είναι τα αντιβιοτικά, χρησιμοποιώντας δύναμη κινούμενη από πρωτόνια (proton-motive force, PMF) (Poole K, 2001; Poole K, 2004; Li XZ et al, 2015). Τα περισσότερα γονίδια που κωδικοποιούν αυτές τις αντλίες είναι φυσιολογικά συστατικά του βακτηριακού χρωμοσώματος. Μερικά από αυτά τα γονίδια έχουν υψηλή ιδιοσυστατική έκφραση και προσδίδουν εγγενή αντίσταση στα αντιβιοτικά σε ορισμένα βακτήρια, ενώ σε άλλα βακτήρια αυτά τα γονίδια εκφράζονται μετά την απόκτηση ρυθμιστικών μεταλλάξεων (Lomovskaya O et al, 2001). Η υπερέκφραση των αντλιών αυτών έχει ως αποτέλεσμα όχι μόνο χαμηλού επιπέδου αντοχή στα β-λακταμικά αλλά και διασταυρούμενη αντοχή σε άλλα αντιβιοτικά, όπως τετρακυκλίνες, χλωραμφενικόλη και κινολόνες, ενώ ο

συνδυασμός της με το μηχανισμό της μειωμένης διαπερατότητας, όπως αναφέρθηκε, μπορεί να οδηγήσει σε υψηλού βαθμού διασταυρούμενη αντοχή σε δομικά ανόμοιες ομάδες αντιβιοτικών (πολυαντοχή). Αντίσταση στις καρβαπενέμες που οφείλεται στην υπερέκφραση των αντλιών ενεργητικής εκροής έχει παρατηρηθεί κυρίως στα *P. aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes* και *A. baumannii* (Papp-Wallace KM *et al*, 2011). Η ανάπτυξη αντοχής στη μεροπενέμη, επίσης, έχει αποδοθεί στην αλληλεπίδραση των μηχανισμών απώλειας πορινών και της υπερέκφρασης αντλιών ενεργητικής εκροής (όπως, οι Mex AB-Opr M, Mex CD-opr J και Mex XY-Opr M). (Quale J *et al*, 2006).



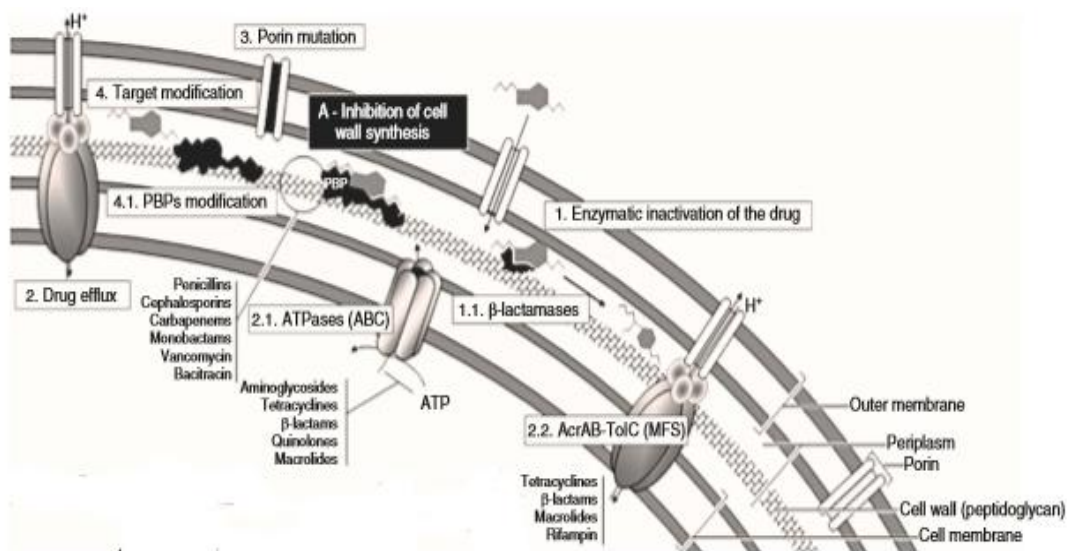
Εικόνα 6: Η θέση των ενεργητικών αντλιών εκροής (efflux pumps) στο κυτταρικό τοίχωμα και η διαδρομή των φαρμακευτικών ουσιών κατά την εισροή και εκροή τους από την εξωτερική και εσωτερική μεμβράνη του βακτηριακού κυττάρου (Li XZ *et al*, 2015).

γ. *Τροποποιημένες PBPs*. Οποιαδήποτε μεταβολή στο ενεργό κέντρο των PBPs που αποτελούν τον στόχο δράσης των β-λακταμικών έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της χημικής συγγένειας (affinity) των PBPs με τα β-λακταμικά και συνεπώς την αυξημένη αντοχή σε αυτά (Zarun A *et al*, 2008). Αυτό μπορεί να συμβεί είτε λόγω μεταλλάξεων γονιδίων που κωδικοποιούν τις PBPs είτε σε πρόσληψη ξένων γονιδίων ή γονιδιακών τμημάτων που κωδικοποιούν διαφορετικές PBPs (Munita JM and Arias CA, 2016). Ο μηχανισμός αυτός είναι

ασυνήθης στα εντεροβακτηριακά σε αντίθεση με τους Gram θετικούς κόκκους (Hartman BJ and Tomasz A, 1984; Fontana R *et al*, 1994). Στελέχη *Proteus* spp. ανθεκτικά στην ιμιπενέμη βρέθηκαν να διαθέτουν τροποποιημένες (με μειωμένη affinity) ή/ και ελαττωμένες PBPs (Neuwirth C *et al*, 1995).

δ. Παραγωγή β-λακταμασών. Αποτελεί τον κύριο μηχανισμό αντοχής των Gram αρνητικών βακτηρίων στα β-λακταμικά (Frère JM, 1995; Bradford PA, 2001). Οι β-λακταμάσες αποτελούν ένζυμα που με την παρουσία στον περιπλασματικό χώρο υδρολύουν το β-λακταμικό δακτύλιο, αδρανοποιώντας με τον τρόπο αυτό τα β-λακταμικά. Η συνύπαρξη τους με διάφορους μηχανισμούς αντοχής είναι συχνά απαραίτητη ώστε να αναπτυχθεί η αντοχή έναντι των β-λακταμικών, όπως, για παράδειγμα, συμβαίνει στην αντοχή στις καρβαπενέμες που η παρουσία των β-λακταμασών συνδυάζεται με απώλεια πορινών ή/και υπερέκφραση αντλιών ενεργητικής εκροής (Woodford *et al*, 2007). Για παράδειγμα, η αντοχή της *Pseudomonas* spp. στην μεροπενέμη εμφανίζεται όταν υπάρχει ο συνδυασμός β – λακταμάσης (συνηθέστερα AmpC), χαμηλής παρουσίας πορινών της εξωτερικής μεμβράνης, όπως η OprD, και υπερέκφρασης της Mex AB– OprM, που αποτελεί αντλία ενεργητικής εκροής για πολλαπλές φαρμακευτικές ουσίες (Quale J *et al*, 2006). Μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί πάνω από 890 τέτοια ένζυμα που έχουν μεταβάλλει την κλινική δραστηριότητα των β-λακταμικών και η ανίχνευσή τους αποτελεί μια σημαντική πρόκληση παγκοσμίως (Bush K and Jacoby GA, 2010).

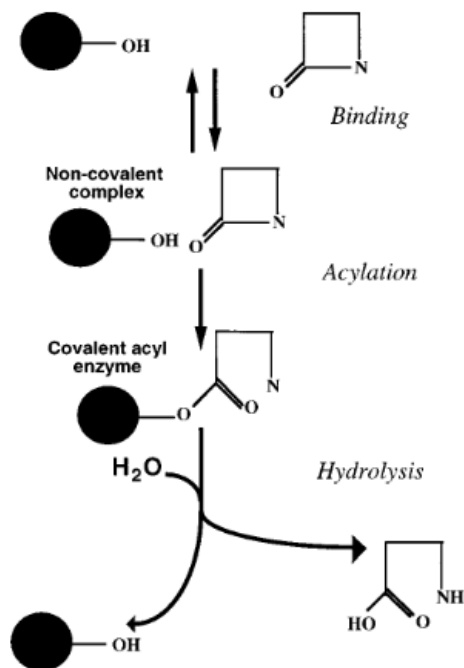
Η παραγωγή των β-λακταμασών φαίνεται να αποτελεί και τον πιο διαδεδομένο μηχανισμό αντοχής διαφόρων βακτηριακών ειδών στις καρβαπενέμες. Οι καρβαπενεμάσες είναι ειδικές β-λακταμάσες με την ικανότητα να υδρολύουν καρβαπενέμες, εμποδίζοντας έτσι το φάρμακο να φτάσει στο στόχο του (PBPs). Οι καρβαπενεμάσες διακρίνονται γενικά σε δύο κατηγορίες με βάση το ενεργό κέντρο τους: στις καρβαπενεμάσες σερίνης (SBLs) και τις μεταλλο-β-λακταμάσες (MBLs) και αποτελούν τις πιο ευέλικτες β-λακταμάσες με ασύγκριτα μεγάλο πλήθος υποστρωμάτων (Queenan AM and Bush K, 2007).



Εικόνα 7: Μηχανισμός δράσης των β-λακταμικών αντιβιοτικών και μηχανισμοί ανάπτυξης αντοχής των Gram αρνητικών βακτηρίων σε αυτά (Fernandes R *et al*, 2013)

4. Μηχανισμός δράσης των β-λακταμασών

Αρχικά η β-λακταμάση συνδέεται με το β-λακταμικό αντιβιοτικό σε ένα μη ομοιοπολικό σύμπλοκο Michaelis. Κατόπιν το ελεύθερο υδροξύλιο της πλευρικής αλυσίδας της σερίνης του ενεργού κέντρου της β-λακταμάσης διασπά το β-λακταμικό δακτύλιο και δημιουργείται με ομοιοπολικό δεσμό ένας ακυλ-εστέρας. Με την υδρόλυση του εστέρα αποδεσμεύονται τόσο η δραστική β-λακταμάση όσο και το υδρολυμένο, αδρανοποιημένο πλέον β-λακταμικό αντιβιοτικό (Εικόνα 8) (Livermore DM, 1995).



Εικόνα 8: Μηχανισμός δράσης των β-λακταμασών (Livermore DM, 1995)

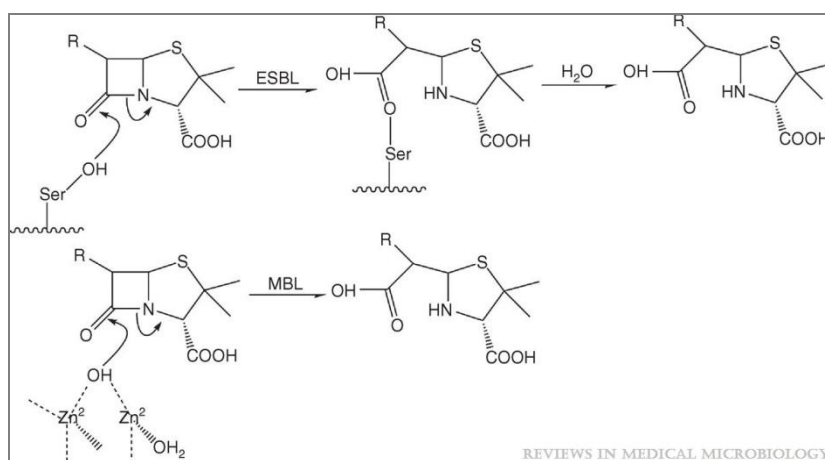
5. Ταξινόμηση β-λακταμασών

Υπάρχει μεγάλη ποικιλία β-λακταμασών που οφείλεται κατά κύριο λόγο στην προέλευση των ενζύμων αυτών από βακτήρια διαφόρων οικοσυστημάτων και την προσαρμογή τους κάτω από επιλεκτική πίεση ώστε να αδρανοποιούν τους πιθανούς αναστολείς (Medeiros AA, 1997). Ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους οι β-λακταμάσες διακρίνονται σε (Nordmann P *et al*, 2012):

- πενικιλινάσες, που αδρανοποιούν τις πενικιλίνες, αλλά όχι τις κεφαλοσπορίνες, την αζτρεονάμη και τις καρβαπενέμες
- κεφαλοσπορινάσες, που αναστέλλουν τις κεφαλοσπορίνες και τις αμινοπενικιλίνες (αλλά όχι τις καρβόξυπενικιλίνες ή τις ουρειδοπενικιλίνες, ούτε την αζτρεονάμη και τις καρβαπενέμες)
- εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (Extended-spectrum β-lactamases, ESBL), που αδρανοποιούν όλα τα β-λακταμικά εκτός από τις καρβαπενέμες. Η ενζυματική δράση τους αναστέλλεται από το κλαβουλανικό οξύ
- καρβαπενεμάσες, που αναστέλλουν τουλάχιστον τις καρβαπενέμες και, ανάλογα με τον τύπο τους, και άλλα β-λακταμικά αντιβιοτικά.

Το σχήμα που χρησιμοποιείται ευρέως σήμερα για την κατάταξη των β-λακταμασών στηρίζεται στην μοριακή τους διάκριση όπως αυτή καθορίζεται

μέσα από τον προσδιορισμό της αμινοξικής αλληλουχίας τους, όπως προτάθηκε από τον Ambler (Ambler RP, 1980; Ambler *et al*, 1991). Σύμφωνα με την μοριακή ταξινόμηση κατά Ambler διακρίνουμε 4 τάξεις β-λακταμασών: A, B, C, D (Hall BG and Barlow M, 2005). Ο κύριος μηχανισμός δράσης των β-λακταμασών τάξεων A, C και D περιλαμβάνει την ύπαρξη εστέρα σερίνης στο ενεργό κέντρο τους (Queenan AM and Bush K, 2007), ενώ η υδρολυτική δράση των β-λακταμασών τάξης B προϋποθέτει την παρουσία ενός ή ζεύγους ιόντων ψευδαργύρου (MBLs) σε συνέργεια με His/Cys/Asp στο ενεργό κέντρο τους (zinc β-lactamases) (Bebrone C, 2007), (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Μηχανισμός δράσης των ESBL (λακταμάσες σερίνης) και των MBL (λακταμάσες ιόντων ψευδαργύρου) (Fernandes R *et al*, 2013).

Πιο συγκεκριμένα, οι τάξεις των β-λακταμασών είναι:

- **Τάξη A:** ανήκουν οι β-λακταμάσες που αναστέλλονται από το κλαβουλανικό, την ταζομπακτάμη και λιγότερο από τη σουλμπακτάμη, με εξαίρεση τις καρβαπενεμάσες τύπου KPC (Drawz SM and Bonomo RA, 2010). Στην τάξη αυτή ανήκουν >500 ένζυμα και περιλαμβάνονται οι ευρέως διαδεδομένες πενικιλινάσες TEM-1, TEM-2, SHV-1 και PSE-1, οι περιορισμένοι (LSBL) και εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (ESBL) (Philippon A *et al*, 2016) και οι KPC-τύπου καρβαπενεμάσες, οι οποίες αδρανοποιούν τις καρβαπενέμες, τις κεφαλοσπορίνες και τις μονοβακτάμες (Queenan AM and Bush K, 2007).

- **Τάξη B:** ανήκουν οι μεταλλο-β-λακταμάσες (MBLs) που υδρολύουν τις πενικιλίνες, τις κεφαλοσπορίνες και τις καρβαπενέμες, όχι όμως την αζτρεονάμη. Η δράση τους αναστέλλεται από το EDTA, λόγω της ύπαρξης των ιόντων ψευδαργύρου στο ενεργό κέντρο τους, ενώ εμφανίζουν αντοχή έναντι της ανασταλτικής δράσης του κλαβουλανικού και των σουλφονών. Στην τάξη αυτή περιλαμβάνονται οι τύπου IMP, VIM και NDM-1 μεταλλο-β-λακταμάσες (Cornaglia G *et al*, 2011).
- **Τάξη C:** περιλαμβάνει τις κεφαλοσπορινάσες (AmpC β-λακταμάσες) που υδρολύουν τις πενικιλίνες, τα β-λακταμικά με αναστολείς, τις κεφαλοσπορίνες εκτός από την κεφεπίμη, δεν υδρολύουν την αζτρεονάμη και τις καρβαπενέμες και η δράση τους αναστέλλεται από την κλοξακιλλίνη (Bush K *et al*, 1995). Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις AmpC φέρονται στο χρωμόσωμα (ενδογενής αντοχή) ενός μεγάλου αριθμού βακτηρίων, όπως *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*, κ.α., ενώ μπορούν να μεταφερθούν πλασμιδιακά και σε είδη που δεν τα διαθέτουν στο χρωμόσωμά τους, όπως *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* spp., *Proteus mirabilis* (Philippon A *et al*, 2002).
- **Τάξη D:** περιλαμβάνει περισσότερα από 350 διαφορετικά ένζυμα, γνωστά ως OXA-τύπου ένζυμα ή οξακιλλινάσες (Antunes NT *et al*, 2014). Στην τάξη αυτή ανήκουν οι κλασσικές οξακιλλινάσες (OXA), οι ESBLs τάξης D και οι καρβαπενεμάσες τάξης D. Όλες έχουν την ικανότητα να υδρολύουν την οξακιλλίνη σε ποσοστό >50% σε σχέση με την βενζυλπενικιλίνη, ενώ οι OXA-τύπου ESBLs υδρολύουν επίσης και τις πενικιλίνες και τις κεφαλοσπορίνες ευρέως φάσματος και οι OXA-τύπου καρβαπενεμάσες και τις καρβαπενέμες (Evans BA and Amyes SGB, 2014). Δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ, την ταζομπακτάμη και τη σουλμπακτάμη (εκτός από τις OXA-12 και OXA-18), ενώ αναστέλλονται συνήθως από το NaCl (Poirel L *et al*, 2012). Η OXA-48 αποτελεί την πλέον γνωστή καρβαπενεμάση τάξης D των στελεχών

Klebsiella pneumoniae, η οποία σε μικρότερο βαθμό έχει μεταδοθεί και σε άλλα στελέχη *Enterobacteriaceae*.

Το 1989 ο Bush πρότεινε ένα άλλο σύστημα κατάταξης των β-λακταμασών (Bush K *et al*, 1995; Bush K and Jacoby GA, 2010) που βασίσθηκε στο λειτουργικό τους ρόλο ανάλογα με το υπόστρωμα της δράσης τους (πενικιλίνη, οξακιλλίνη, καρμπενικιλίνη, κεφαλοριδίνη, ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες και ιμιπενέμη) και στο είδος του αναστολέα τους (κλαβουλανικό, ταζομπακτάμη, σουλμπακτάμη). Το σύστημα αυτό που επεκτάθηκε το 1995 και ανανεώθηκε το 2010, συνδέει τις διάφορες ομάδες των β-λακταμασών με τον κλινικό τους ρόλο, και περιλαμβάνει:

- Την **ομάδα 1**, στην οποία ανήκουν οι χρωμοσωμιακές και πλαιδισμιακές τύπου AmpC κεφαλοσπορινάσες (τάξη C κατά Ambler). Στην υποομάδα 1e ανήκουν οι εκτεταμένου φάσματος AmpC (ESAC) που είναι πιο δραστικές έναντι της κεφταζιδίμης.
- Την **ομάδα 2**, στην οποία ανήκουν οι τάξης A και D κατά Ambler β-λακταμάσες και οι κυριότερες υποομάδες που περιλαμβάνει είναι:
 - Η υποομάδα 2a που αφορά στις πενικιλινάσες που ανιχνεύονται σε Gram θετικούς κόκκους.
 - Η υποομάδα 2b που περιλαμβάνει τις πλασμιδιακές TEM-1, TEM-2 και SHV-1 πενικιλινάσες.
 - Η υποομάδα 2be στην οποία ανήκουν οι ESBLs που αναστέλλονται από το κλαβουλανικό.
 - Η υποομάδα 2br στην οποία ανήκουν οι ευρέως φάσματος β-λακταμάσες που δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό (Inhibitor Resistant TEM-IRT).
 - Η υποομάδα 2d που αφορά στις OXA-τύπου β-λακταμάσες που υδρολύουν την οξακιλλίνη και την κλοξακιλλίνη και συνήθως αναστέλλονται από το NaCl.

Η υποομάδα 2de στην οποία ανήκουν οι εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες τύπου OXA που υδρολύουν εκτός από την οξακιλλίνη και τις οξυ-ίμινο κεφαλοσπορίνες.

Η υποομάδα 2df που περιλαμβάνει τις OXA τύπου β-λακταμάσες που υδρολύουν τις καρβαπενέμες (OXA-23, OXA-48) και δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό.

Η υποομάδα 2f στην οποία συμπεριλαμβάνονται οι καρβαπενεμάσες τύπου KPC, SME, IMI-1, NMC-1 και ορισμένες GES.

- Την **ομάδα 3** στην οποία ανήκουν οι τάξης B κατά Ambler β-λακταμάσες (MBLs) και περιλαμβάνει δυο υποομάδες: την υποομάδα 3a που περιλαμβάνει τις τύπου IMP και VIM MBLs και την χρωμοσωμιακή L1 MBL της *Stenotrophomonas maltophilia* που έχουν 2 ιόντα ψευδαργύρου στο ενεργό κέντρο τους, και την υποομάδα 3b όπου ανήκει η χρωμοσωμιακή MBL της *Aeromonas* spp. που απαιτεί μόνο ένα ιόν ψευδαργύρου για να εκδηλώσει την υδρολυτική της δράση έναντι κυρίως των καρβαπενεμών.

Συνήθως χρησιμοποιείται ο συνδυασμός των δύο αυτών συστημάτων κατάταξης (κατά Ambler και κατά Bush), συσχετίζοντας τη μοριακή δομή με το λειτουργικό ρόλο των β-λακταμασών (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Σχήμα κατάταξης των β-λακταμασών (Bush K and Jacoby GA, 2010).

Bush-Jacoby group (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros group (1995)	Molecular class (subclass)	Distinctive substrate(s)	Inhibited by		Defining characteristic(s)	Representative enzyme(s)
				CA or TZB ^a	EDTA		
1	1	C	Cephalosporins	No	No	Greater hydrolysis of cephalosporins than benzylpenicillin; hydrolyzes cephamycins	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1c	NI ^b	C	Cephalosporins	No	No	Increased hydrolysis of ceftazidime and often other oximino-β-lactams	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Penicillins	Yes	No	Greater hydrolysis of benzylpenicillin than cephalosporins	PC1
2b	2b	A	Penicillins, early cephalosporins	Yes	No	Similar hydrolysis of benzylpenicillin and cephalosporins	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	Yes	No	Increased hydrolysis of oximino-β-lactams (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, cefepime, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicillins	No	No	Resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	No	No	Increased hydrolysis of oximino-β-lactams combined with resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicillin	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbenicillin, cefepime	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin, cefepime, and cefpirome	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacillin	Variable	No	Increased hydrolysis of cloxacillin or oxacillin	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Extended-spectrum cephalosporins	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and oximino-β-lactams	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenems	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and carbapenems	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Extended-spectrum cephalosporins	Yes	No	Hydrolyzes cephalosporins. Inhibited by clavulanic acid but not aztreonam	CepA
2f	2f	A	Carbapenems	Variable	No	Increased hydrolysis of carbapenems, oximino-β-lactams, cephamycins	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1)	Carbapenems	No	Yes	Broad-spectrum hydrolysis including carbapenems but not monobactams	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
		B (B3)					L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Carbapenems	No	Yes	Preferential hydrolysis of carbapenems	CphA, Sfh-1
NI	4	Unknown					

^a CA, clavulanic acid; TZB, tazobactam.

^b NI, not included.

6. Καρβαπενεμάσες: ταξινόμηση

Οι πρώτες καρβαπενεμάσες που ανιχνεύθηκαν στα *Enterobacteriaceae* ήταν τύπου SME-1 το 1982 στο Λονδίνο σε 2 στελέχη *S. marcescens* και τύπου IMI-1 το 1984 στην Καλιφόρνια των Η.Π.Α σε 2 στελέχη *E. cloacae*. Βιβλιογραφικά, η πρώτη καρβαπενεμάση που χαρακτηρίστηκε ως «μη - μεταλλοένζυμο καρβαπενεμάση» (καρβαπενεμάση σερίνης) ήταν η χρωμοσωμιακή NmcA που εντοπίστηκε σε σπάνιο κλινικά απομονωθέν στέλεχος *Enterobacter cloacae* το 1990 στο Παρίσι (Queenan AM and Bush K, 2007). Την τελευταία δεκαετία έχει παρατηρηθεί επίταση του φαινομένου της απομόνωσης στελεχών *Enterobacteriaceae* που παράγουν καρβαπενεμάσες (CPE) παγκοσμίως, κυρίως ως συνέπεια της ευρείας μετάδοσης των γονιδίων των καρβαπενεμασών, αποτελώντας σημαντικό επιδημιολογικό πρόβλημα στις μονάδες υγείας ιδιαίτερα όσον αφορά ασθενείς που εμφανίζουν λοιμώξεις από πολυανθεκτικά στελέχη (Nordmann P et al, 2011). Τα στελέχη CPE παράγουν διαφορετικού τύπου καρβαπενεμάσες που ανήκουν στις 4 μοριακές τάξεις των β-λακταμασών κατά Ambler (Πίνακας 2).

- **Καρβαπενεμάσες τάξης A κατά Ambler:** στην τάξη αυτή ανήκουν 3 κύριοι τύποι ενζύμων, NmcA/IMI, SME και KPC, που κατατάσσονται στην λειτουργική ομάδα 2f. Και οι τρεις αυτοί τύποι υδρολύουν το β-λακταμικό δακτύλιο των πενικιλινών, των κεφαλοσπορινών, των καρβαπενεμών και της αζτρεονάμης λόγω της ύπαρξης σερίνης στη θέση 70 στο δραστικό τους κέντρο και της παρουσίας ενός δισουλφιδικού δεσμού μεταξύ Cys69 και Cys238 που διαμορφώνει το συνολικό σχήμα στο ενεργό κέντρο. Η στερεοχημική αυτή διαμόρφωση ελαττώνει την παρεμπόδιση από την C-6 υδροξυαιθύλ πλευρική αλυσίδα στις καρβαπενέμες, με αποτέλεσμα την υδρόλυση της ιμιπενέμης. Όλα τα ένζυμα περιέχουν στο ενεργό κέντρο τους το μοτίβο S-X-X-K, S-D-N, και K-T-G των β-λακταμασών της τάξης A. Η υδρολυτική τους δράση αναστέλλεται *in vitro* από το κλαβουλανικό οξύ και την ταζομπακτάμη, αλλά όχι και από το EDTA. Στην τάξη αυτή ανήκουν και κλασσικά ένζυμα τύπου ESBL, όπως τα GES, τα οποία σπάνια έχουν δράση καρβαπενεμάσης (Walther-Rasmussen J and Høiby N, 2007; Queenan AM and Bush K, 2007)

- **Καρβαπενεμάσες τάξης B κατά Ambler (MBLs):** όπως έχει ήδη αναφερθεί, υδρολύουν τις πενικιλλίνες, τις κεφαλοσπορίνες και τις καρβαπενέμες, όχι όμως την αζτρεονάμη. Η δράση τους αναστέλλεται από το EDTA, λόγω της ύπαρξης των ιόντων ψευδαργύρου στο ενεργό κέντρο τους, ενώ δεν αναστέλλεται από τους κλασσικούς αναστολείς των β-λακταμασών (κλαβουλανικό, ταζομπακτάμη, σουλμπακτάμη). Κατατάσσονται στις λειτουργικές υποομάδες 3a και 3b. Οι πρώτες MBLs ανιχνεύθηκαν σε περιβαλλοντικά και ευκαιριακά βακτήρια, όπως *Bacillus cereus*, *Aeromonas* spp. και *Stenotrophomonas maltophilia*, και κωδικοποιούνται από εγγενή χρωμοσωμικά γονίδια (Walsh TR *et al*, 2005). Κατά τη δεκαετία του 1990 παρατηρήθηκε αύξηση της απομόνωσης MBLs που εδράζονται σε επίκτητα, μεταφερόμενα γονίδια σε στελέχη *Pseudomonas* spp. και *Enterobacteriaceae* (Cornaglia G *et al*, 2007; Cornaglia G *et al*, 2011). Οι κύριοι τύποι MBLs ενζύμων στα *Enterobacteriaceae* είναι οι IMP και οι VIM, ενώ προσφάτως ανεδείχθη και ο τύπος NDM (Sekizuka T *et al*, 2011). Επίσης, στην τάξη αυτή ανήκει και ο σπάνιος τύπος KHM-1 (Sekiguchi J *et al*, 2008).
- **Καρβαπενεμάσες τάξης C κατά Ambler:** στην τάξη αυτή ανήκει μια εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάση της τάξης C (CMY-10) που εμφανίζει ιδιότητες καρβαπενεμάσης (Kim JY *et al*, 2006).
- **Καρβαπενεμάσες τάξης D κατά Ambler (τύπου OXA-48):** στην τάξη αυτή ανήκουν 232 ένζυμα που υδρολύουν τις καρβαπενεμάσες (CHDLs) σε ποικίλο βαθμό και όλα, με εξαίρεση την OXA-163, δεν υδρολύουν τις ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες. Η δράση τους δεν αναστέλλεται από το κλαβουλανικό ή το EDTA, ενώ αναστέλλεται από το NaCl. Κατατάσσονται στην λειτουργική υποομάδα 2df. Αν και οι περισσότερες CHDLs έχουν ανιχνευθεί σε *Acinetobacter* spp., οι OXA-48 εντοπίζονται μόνο σε *Enterobacteriaceae* (Nordmann *et al*, 2012; Poirel L *et al*, 2012).

Molecular Class	Bush-Jacoby-Medeiros (1995)	Bush-Jacoby (2010)	Representative Enzyme	Hydrolysis Profile					Inhibition Profile	
				Penicillin	Early cephalosporin	Extended Spectrum cephalosporin	Aztreonam	Carbapenems	EDTA	Clavulanic acid
A	2f	2f	NMC	+	+	+	+	+	-	+
			IMI	+	+	+	+	+	-	+
			SME	+	+	±	+	+	-	+
			KPC	+	+	+	+	+	-	+
			GES	+	+	+	-	±	-	+
B1	3	3a	IMP	+	+	+	-	+	+	-
			VIM	+	+	+	-	+	+	-
			GIM	+	+	+	-	+	+	-
			SPM	+	+	+	-	+	+	-
			NDM	+	+	+	±	+	+	-
D		2df	OXA	+	+	±	-	±	-	±

Πίνακας 2: Ταξινόμηση των καρβαπεμενασών

6.1 Καρβαπενεμάσες τάξης A κατά Ambler

Έχουν ανιχνευθεί σε στελέχη *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella spp.* και *E. coli* στο βακτηριακό χρωμόσωμα ή σε γενετικά στοιχεία μεταφοράς, σε μεμονωμένα στελέχη ή σε μικρές επιδημίες (Medeiros AA, 1997; Nordmann P *et al*, 1993; Yang Y *et al*, 1990; Petrella S *et al*, 2008). Οι καρβαπενεμάσες τάξης A εμφανίζονται σχετικά σπάνια και η διάδοσή τους εξαρτάται από τον κλωνικό πολλαπλασιασμό των βακτηρίων που τις παράγουν. Μεταξύ των καρβαπενεμασών τάξης A, τα ένζυμα KPC, SME και NmcA/IMI έχουν παρόμοια δομή, με τις μεγαλύτερες διαφορές να εντοπίζονται σε περιοχές απομακρυσμένες από το ενεργό κέντρο τους (Walther-Rasmussen J and Høiby N, 2007; Queenan AM and Bush K, 2007).

Τα SME και NmcA/IMI είναι τα πιο σημαντικά χρωμοσωμιακά κωδικοποιούμενα ένζυμα. Τα NmcA/IMI παρουσιάζουν μεταξύ τους 97% ομοιότητα στην αμινοξική αλληλουχία και 70% ομοιότητα σε σχέση με τα SME. Παρ' ότι μπορούν να υδρολύουν τις ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες, το ποσοστό της υδρόλυσης είναι σχετικά μικρό, ενώ η υδρόλυση της κεφοξιτίνης είναι αναποτελεσματική. Η παραγωγή αυτών των ενζύμων επάγεται από την ιμιπενέμη και την κεφοξιτίνη μέσω ενός AmpC τύπου LysR εξαρτώμενου ρυθμιστικού συστήματος που περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες SmeR, ImiR και NmcR (Naas T *et al*, 1997; Queenan AM *et al*, 2000; Queenan AM *et al*, 2006).

Τα ένζυμα τύπου SME (*Serratia marcescens* enzymes) έχουν ανιχνευθεί μόνο σε ένα μικρό αριθμό στελεχών *Serratia marcescens* (ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά σε στελέχη που απομονώθηκαν στο Λονδίνο το 1982) και διακρίνονται σε τρεις υποτύπους SME-1, -2 και -3, όλα κωδικοποιημένα από χρωμοσωμιακά γονίδια. Αυτά τα ένζυμα έχουν σποραδικά παρατηρηθεί σε στελέχη *Serratia marcescens* που απομονώθηκαν στις Η.Π.Α., τα οποία ωστόσο δεν εμφάνισαν κλωνική διασπορά (Queenan AM *et al*, 2006). Επίσης, SME-1 ανιχνεύθηκαν σε στελέχη *Serratia marcescens* από δύο κρούσματα, σε διαφορετικά νοσοκομεία, και τα οποία είχαν κλωνική συσχέτιση (Fairfax MR *et al*, 2011). SME-2 ανιχνεύθηκαν στον Καναδά και την Ελβετία (Poirel L *et al*, 2007; Carrère A *et al*, 2008).

Τα ένζυμα NmcA/IMI έχουν ανιχνευθεί σε στελέχη *Enterobacter spp.* Τα ένζυμα IMI (imipenem hydrolyzing β -lactamase) πρωτοεμφανίσθηκαν σε στέλεχος *Enterobacter cloacae* το 1984 στις Η.Π.Α. Από τότε ανιχνεύθηκαν

σπανίως σε κλινικά απομονωθέντα στελέχη *Enterobacter cloacae* στις Η.Π.Α., την Γαλλία και την Αργεντινή (Rasmussen BA *et al*, 1996). Στη συνέχεια ένζυμα IMI-2 απομονώθηκαν σε κλινικά στελέχη *Enterobacter cloacae* στην Κίνα και τη Γαλλία, τα οποία όμως κωδικοποιούνται πλασμιδιακώς (Yu Y-S *et al*, 2006; Bernusset S *et al*, 2012). Τα ένζυμα NmcA (not metalloenzyme carbapenemase) ανιχνεύθηκαν αρχικώς σε στέλεχος *Enterobacter cloacae* στην Γαλλία το 1990 και αργότερα αναφέρθηκε η εμφάνισή τους στις Η.Π.Α. και την Αργεντινή (Nordmann P *et al*, 1993; Radice M *et al*, 2004; Pottumarthy S *et al*, 2003).

Τα ένζυμα KPC και GES είναι πλασμιδιακώς κωδικοποιούμενα ένζυμα, η συχνότητα ανίχνευσης των οποίων εμφανίζει αύξηση. Το ένζυμο KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) πρωτοανιχνεύθηκε σε στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* στις Η.Π.Α. το 1996 (KPC-2) και αποτελεί το πιο σημαντικό κλινικά ένζυμο των καρβαπεμενασών της τάξης A. Τα γονίδια αντοχής KPC σχετίζονται με ένα μεγάλο πλασμίδιο και εδράζονται σε κινητά γενετικά στοιχεία, και ειδικότερα στο Tn3-type τρανσποζόνιο γνωστό ως Tn4401, το οποίο δύναται να μεταφερθεί μέσω των πλασμιδίων και σε άλλα γένη. Τα ένζυμα KPC συμμετέχουν στην υδρόλυση όχι μόνο των γνωστών β – λακταμικών, αλλά και μέσω κινητών γενετικών στοιχείων που φέρουν γονίδια αντοχής και σε άλλα αντιβιοτικά εκτός των β – λακταμικών (Queenan AM and Bush K, 2007). Αυτή τη στιγμή υπάρχουν 22 γνωστά ένζυμα KPC, που διαφέρουν σε 1-3 ομάδες αμινοξέων και εμφανίζουν διάφορα υδρολυτικά προφίλ (Mehta SC *et al*, 2015). Ενδιαφέρον στοιχείο αποτελεί ότι τα ένζυμα αυτά εμφανίζουν 61% ομολογία με ένα άλλο χρωμοσωμιακό ένζυμο της τάξης A το SFC-1 από τη *Serratia fonticola* (Walther-Rasmussen J and Høiby N, 2007). Αν και ανιχνεύονται κυρίως σε απομονωθέντα στελέχη *K. pneumoniae*, έχουν επίσης παρατηρηθεί σε στελέχη *Salmonella enterica* serotype Cubana, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter georgoviae*, *Serratia marcescens*, *E. coli*, και *P. aeruginosa* (Patel JB *et al*, 2009). Τα KPC ένζυμα προσδίδουν αντίσταση σε όλες τις πενικιλίνες, τις κεφαλοσπορίνες, την αζτρεονάμη και την ιμιπενέμη, αλλά είναι ευαίσθητα στην αναστολή από το κλαβουλανικό οξύ. Οι ρυθμοί υδρόλυσης για ιμιπενέμη, μεροπενέμη, κεφοταξίμη και αζτρεονάμη είναι 10 φορές μικρότεροι από ό, τι εκείνοι για τις πενικιλίνες και τις νεότερες κεφαλοσπορίνες. Αν κι αυτά τα ένζυμα μπορούν να υδρολύουν καρβαπενέμες, η αντίσταση δεν ανιχνεύεται φαινοτυπικά και σε πολλές

περιπτώσεις οι τιμές MIC είναι μικρότερες από τα οριζόμενα MIC breakpoints. Αυτό έχει οδηγήσει σε υπο-ανίχνευση αρκετών στελεχών που παράγουν KPC ένζυμα (Queenan AM and Bush K, 2007).

Η οικογένεια των ενζύμων GES/IBC (Guiana extended spectrum/ integron borne cephalosporinase) είναι σπάνια και παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά σε στέλεχος *K. pneumoniae* που απομονώθηκε στη Γαλλική Γουιάνα το 2000 (GES-1) και σε στέλεχος *E. cloacae* στην Ελλάδα (IBC-1). Τα ένζυμα της οικογένειας αυτής διαφέρουν το ένα από το άλλο σε 1-4 αντικαταστάσεις αμινοξέων και παρουσιάζουν χαμηλή ομοιότητα με τις υπόλοιπες καρβαπενεμάσες της τάξης A (Queenan AM and Bush K, 2007). Τα ένζυμα IBC έχουν πλέον μετονομαστεί σε GES. Τα γονίδια που κωδικοποιούν την οικογένεια ενζύμων GES βρίσκονται σε ιντεγκρόνια σε πλασμίδια. Σε ένα στέλεχος *E. coli* απομονώθηκε GES γονίδιο (blaGES - 7) που βρίσκεται σε χρωμόσωμα και είναι το μόνο blaGES γονίδιο που δεν έχει εντοπιστεί σε ιντεγκρόνιο (Galani I *et al*, 2006). Τα GES λόγω της ικανότητάς τους να υδρολύουν εκτεταμένου φάσματος κεφαλοσπορίνες είχαν αρχικά θεωρηθεί ως ESBLs, ενώ υδρολύουν και την ιμιπενέμη, αν και λιγότερο δραστικά. Αυτή τη στιγμή υπάρχουν 26 γνωστοί τύποι GES και έχουν παρατηρηθεί σε στελέχη *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* και *A. baumannii* που απομονώθηκαν σε διάφορες χώρες (Ελλάδα, Γαλλία, Πορτογαλία, Νότια Αφρική, Γαλλική Γουιάνα, Αργεντινή, Ιαπωνία και Κορέα) (Naas T *et al*, 2016).

Άλλα σπανιότερα ένζυμα της τάξης A των καρβαπενεμασών είναι το SHV-38, ένα χρωμοσωμιακό ένζυμο στο οποίο αποδίδεται μειωμένη ευαισθησία στην ιμιπενέμη στελεχών *K. pneumoniae* (Poirel L *et al*, 2003) και το χρωμοσωμιακό ένζυμο BIC-1 που απομονώθηκε σε περιβαλλοντικό στέλεχος *Pseudomonas fluorescens* σε ποτάμι στο Παρίσι (Girlich D *et al*, 2010). Επίσης, το ένζυμο FPH-1 που έχει πρόσφατα απομονωθεί από στέλεχος *Francisella philomiragia* και σε αντίθεση με άλλες β-λακταμάσες που υπάρχουν στους μικροοργανισμούς του γένους *Francisella* (FTU-1 και FPH-like proteins), εμφανίζει ευρύτερη υδρολυτική δράση, υδρολύοντας τις ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες, την αζτρεονάμη και τις καρβαπενέμες (προκαλεί άνοδο στις MICs της ιμιπενέμης, της μεροπενέμης, της ερταπενέμης και της δοριπενέμης κατά 8 με 64 φορές) (Toth M *et al*, 2012). Στην τάξη A ανήκει και η καρβαπενεμάση PenA, που ομοιάζει περισσότερο με την KPC-2, υδρολύει πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, μονοβακτάμες και καρβαπενέμες, εμφανίζει αντίσταση στους αναστολείς των β-

λακταμασών και έχει απομονωθεί από στελέχη *Burkholderia multivorans*, ένα ευκαιριακό νοσοκομειακό παθογόνο που προσβάλλει κυρίως ασθενείς με κυστική ίνωση (Papp-Wallace KM *et al*, 2013). Τέλος, ένα ακόμα πλασμιδιακώς κωδικοποιημένο ένζυμο της τάξης A των καρβαπεμενασών είναι και το FRI-1, που απομονώθηκε από ορθικό επίχρισμα ασθενούς στη Γαλλία και εμφανίζει αντοχή στις 1^η και 2^{ης} γενεάς κεφαλοσπορίνες, την αζτρεονάμη και τις καρβαπενέμες, όχι όμως στις 3^{ης} γενεάς κεφαλοσπορίνες (Dortet L *et al*, 2015).

6.2 Καρβαπενεμάσες τάξης B κατά Ambler ή metallo-β-lactamases (MBLs)

Οι MBLs διαιρούνται σε τρεις υποκατηγορίες, B1, B2 και B3, ανάλογα με την πρωτοταγή αλληλουχία των αμινοξέων και τα δομικά χαρακτηριστικά του ενεργού κέντρου (Πίνακας 2). Οι MBLs στις υποκατηγορίες B1 και B3 χρησιμοποιούν δύο ιόντα Zn^{2+} στην ενεργό θέση και έχουν ένα ευρύ φάσμα υδρόλυσης, ενώ στην υποκατηγορία B2 χρησιμοποιούν ένα μόνο ιόν Zn^{2+} στην ενεργό θέση (η σύνδεση και δεύτερου ιόντος προκαλεί αναστολή) και εμφανίζουν υδρολυτική δραστηριότητα μόνο στις καρβαπενέμες (Palzkill T, 2013). Οι περισσότερες MBLs έχουν μεγάλη αύλακα στο ενεργό κέντρο τους, η οποία μπορεί να φιλοξενήσει τα περισσότερα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Οι MBLs δεν υδrolύουν όλες εύκολα την νιτροσεφίνη, ενώ ο μηχανισμός υδρόλυσης των καρβαπενεμών είναι περίπλοκος και διαφέρει από την μία στην άλλη MBL.

Οι επίκτητες MBLs μεταφέρονται εύκολα μεταξύ διαφορετικών ειδών μικροοργανισμών, καθώς μπορούν να εισαχθούν σε κινητά γενετικά στοιχεία. Αυτές οι MBLs, που κατατάσσονται κυρίως ως ένζυμα B1 υποκατηγορίας, εμφανίζουν αυξημένη προδιάθεση για την εισαγωγή τους σε γονιδιακές κασέτες, ιντεγκρόνια, τρανσποζόνια ή πλασμίδια. Τα περισσότερα γονίδια των MBL (συμπεριλαμβανομένων των VIM, IMP) βρίσκονται ως γονιδιακές κασέτες σε ιντεγκρόνια τάξης 1. Επίσης, μερικά γονίδια IMP βρίσκονται σε ιντεγκρόνια τάξης 3. Ωστόσο, τα SPM-1 γονίδια δεν βρίσκονται σε ιντεγκρόνια ή τρανσποζόνια (Walsh TR *et al*, 2005). Σε όλες τις υποκατηγορίες οι MBLs εμφανίζουν μεταξύ τους μόνο 23% ή και λιγότερο ομολογία αμινοξέων (Meini MR *et al*, 2015)

Όπως αναφέρθηκε, οι πρώτες MBLs ανιχνεύθηκαν σε περιβαλλοντικά και ευκαιριακά βακτήρια, όπως *Bacillus cereus* (BCI, BCII), *Aeromonas* spp. (CphA) και *Stenotrophomonas maltophilia* (L1), και κωδικοποιούνται από εγγενή

χρωμοσωμιακά γονίδια. Αυτά τα βακτήρια παράγουν επίσης πρόσθετες β-λακταμάσες σερίνης και αμφότερα τα ένζυμα επάγονται με έκθεση σε β-λακταμικά. Χρωμοσωμιακή MBL βρέθηκε επίσης σε μερικά στελέχη *Bacteroides fragilis* (CcrA) (Walsh TR *et al*, 2005).

Όσον αφορά στις πλασμιδιακές MBLs, η επιδημιολογική σημασία τους είναι μεγάλη καθώς εμφανίζουν παγκόσμια εξάπλωση (Rossolini GM, 2005). Η πλειοψηφία των κινητών MBL γονιδίων ανευρίσκεται σε γονιδιακές κασέτες διευκολύνοντας τη μετάδοσή τους μεταξύ των μικροοργανισμών. Αυτά περιλαμβάνουν τα *blaIMP*, *blaVIM*, *blaGIM*, *blaSIM* και *blaKMH* γονίδια (Cornaglia G *et al*, 2011). Μεταφερόμενη αντίσταση στις καρβαπενέμες (IMP) εντοπίστηκε για πρώτη φορά σε *P. aeruginosa* που απομονώθηκε στην Ιαπωνία το 1990 (Watanabe M *et al*, 1991). Κατόπιν αναφέρθηκε η παρουσία IMP σε τέσσερα στελέχη *S. marcescens* στην Ιαπωνία (Osano E *et al*, 1994), ενώ αργότερα περιγράφηκε μια παρόμοια αντίσταση στις καρβαπενέμες σε ένα απομονωθέν στέλεχος *B. fragilis* (Concha NO *et al*, 1996). Στην Ευρώπη για πρώτη φορά απομονώθηκε γονίδιο IMP-2 πάνω σε δομή ιντεγκρονίου τάξης 1 σε *A. baumannii* στην Ιταλία (Riccio ML *et al*, 2000). Επί του παρόντος, υπάρχουν 48 γνωστά είδη IMP (www.lahey.org/studies). Παρ' ό,τι ανιχνεύονται πιο συχνά σε στελέχη *P. aeruginosa* και *A. baumannii*, έχουν ανιχνευθεί και στα περισσότερα μέλη της οικογένειας *Enterobacteriaceae* (Maltezou HC, 2009). Αυτά τα ένζυμα έχουν μεγάλη ειδικότητα στην υδρόλυση των κεφαλοσπορινών και καρβαπενεμών και χαρακτηριστικά επιδεικνύουν χαμηλή δραστικότητα στην τεμοκιλλίνη. Επιπλέον, είναι υπεύθυνα και για την εμφάνιση χαμηλής ευαισθησίας και σε άλλα αντιβιοτικά, όπως χλωροφαινικόλη, αμινογλυκοσίδες και σουλφοναμίδες. Παρουσιάζονται διαφορές στην ενζυμική κινητική μεταξύ των διαφορετικών υποτύπων, αλλά με χαμηλή κλινική σημασία (Cornaglia G *et al*, 2011).

Όσον αφορά τα ένζυμα VIM (Verona IMipenemase) χαρακτηρίζονται ως «ευρωπαϊκές MBLs», παρ' ό,τι εμφανίζουν παγκόσμια εξάπλωση. Το ιντεγκρόνιο τάξεως 1 (VIM-1) που σχετίζεται με MBL παρατηρήθηκε για πρώτη φορά σε ένα στέλεχος *P. aeruginosa* που απομονώθηκε στην Ιταλία το 1997 (Lauretti L *et al*, 1999). VIM-2 αναφέρθηκε σε ένα κλινικά απομονωθέν στέλεχος *P. aeruginosa* στη Γαλλία (Poirel *et al*, 2000). Αυτή τη στιγμή υπάρχουν 41 υποείδη VIM (www.lahey.org/studies), από τα οποία τα VIM-1 και VIM-2 εμφανίζουν

παγκόσμια κατανομή και διασπείρονται εύκολα. Απομονώνονται κυρίως από στελέχη *P. aeruginosa* και *Enterobacteriaceae*, όπως *K. pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens* (Walsh TR *et al*, 2005). Το ένζυμο VIM-2 είναι η επικρατέστερη MBL σε όλη την Ευρώπη και έχει ανιχνευθεί σε περισσότερα από 23 είδη μικροοργανισμών σε 40 χώρες. Έχει τις ίδιες αλληλουχίες αμινοξέων με το VIM-1 στην περιοχή σύνδεσης με τα ιόντα Zn^{2+} ή το μόριο του νερού ή στο ενεργό κέντρο, εμφανίζοντας 93% ομοιότητα μεταξύ τους. Οι μικρές, ωστόσο, διαφορές των αμινοξέων τους φαίνεται ότι είναι λειτουργικά σημαντικές. Παρά το γεγονός ότι το υδρολυτικό φάσμα του VIM-2 είναι ίδιο με του VIM-1, αυτό εμφανίζεται δραστικότερο έναντι της βενζυλπενικιλίνης, αμπικιλίνης, ιμιπενέμης και μεροπενέμης και λιγότερο δραστικό έναντι της κεφεπίμης, ενώ υδρολύει ταχύτερα την ιμιπενέμη σε σχέση με την μεροπενέμη. Επίσης, το VIM-2 αναστέλλεται ευκολότερα από χηλικούς παράγοντες (EDTA, διπικολινικό οξύ), (Poirel *et al*, 2000; Docquier JD *et al*, 2003). Συνήθως τα ένζυμα VIM παρουσιάζουν μεγάλη ειδικότητα στην υδρόλυση των καρβαπενεμών, και σε αντίθεση με τις IMP, τα ένζυμα αυτά υδρολύουν και την τεμοκιλλίνη. Το προφίλ της υδρόλυσης ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων υποτύπων VIM χωρίς αυτό, ωστόσο, να έχει κλινική σημασία (Cornaglia G *et al*, 2007).

Το ένζυμο SPM-1 (Sao Paulo Metallo-β-lactamases) εντοπίστηκε σε *P. aeruginosa* στο Σάο Πάολο της Βραζιλίας το 1999 και η αλληλουχία του εμφανίζει μέτρια ομοιότητα (35,5%) με την IMP-1 και διαφέρει από τις VIM (Toleman MA *et al*, 2002). Η γενετική ανάλυση αποκάλυψε ότι το γονίδιο *blaSPM-1* δεν είναι μέρος κάποιου ιντεγκρονίου αλλά ενός παθογόνου κινητού γονιδιακού τόπου που εδράζεται σε ένα πλασμίδιο. Αυτά τα ένζυμα έχουν ένα ευρύ προφίλ υδρόλυσης, που συμπεριλαμβάνει τις πενικιλίνες, τις κεφαλοσπορίνες και τις καρβαπενέμες. Ωστόσο, λόγω των συνδεδεμένων κινητών γενετικών στοιχείων, αυτά τα ένζυμα παρουσιάζουν μικρή μεταδοτικότητα (Murphy TA *et al*, 2003).

Η MBL GIM-1 (German IMipenemase) έχει αναφερθεί μόνο στην Γερμανία και αρχικώς εντοπίστηκε σε στελέχη *P. aeruginosa* το 2002, ενώ πρόσφατα έχει ανιχνευθεί και σε *Enterobacteriaceae* (Nordmann P *et al*, 2014). Η GIM-1 δεν έχει σαφή προτίμηση προς κάποιο υπόστρωμα και δεν υδρολύει την αζλοκιλλίνη, την αζτρεονάμη και τους αναστολείς της σερίνης-β-λακταμάσης. Η αλληλουχία

των αμινοξέων της μοιάζει περισσότερο με τα υπόλοιπα ένζυμα. Το γονίδιο *blaGIM-1* βρέθηκε στην κατηγορία 1 ιντεγκρονίου σε ένα 22-kb μη μεταβιβάσιμο πλασμίδιο (Castanheira M *et al*, 2004).

Επιπλέον, οι NDMs (New Delhi metallo-β-lactamases) έχουν προσφάτως προστεθεί στις MBLs και εμφανίζουν υψηλή τάση διασποράς, τείνοντας να γίνουν από τα πιο σημαντικά ένζυμα αυτής της τάξης καρβαπεμενασών (Dortet L *et al*, 2014). Η NDM-1 έχει ανιχνευθεί σε στελέχη *Enterobacteriaceae*, αλλά και σε άλλα Gram (-), μη ζυμούντα τη γλυκόζη, βακτήρια, όπως *A. baumannii* (Cornaglia G *et al*, 2011; Kumarasamy KK *et al*, 2010; Karthikeyan K *et al*, 2010). Ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά το 2008 από στέλεχος *K. pneumoniae* και *E. coli* που απομονώθηκε από έναν ινδικής καταγωγής ασθενή στη Σουηδία ο οποίος είχε προηγουμένως νοσηλευθεί στο Νέο Δελχί, στην Ινδία (Yong D *et al*, 2009). Η NDM-1 που βρισκόταν σε ένα πλασμίδιο 180-kb στην *K. pneumoniae* και 140-kb στην *E. coli*, εξέφραζε υψηλό επίπεδο αντίστασης σε όλες τις πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες, σιπροφλοξασίνη και αζτρεονάμη και ήταν ευαίσθητη μόνο στην κολιστίνη. Η ανάλυση PCR απέτυχε να ανιχνεύσει ήδη γνωστά γονίδια MBL, ωστόσο ανίχνευσε ιντεγκρόνιο τάξεως 1. Αυτό το προϊόν απομόνωσης είχε ενσωματωμένο επίσης ένα γονίδιο AmpC (CMY-4), ένα νέο γονίδιο εστεράσης της ερυθρομικίνης (EREC), καθώς και γονίδια που κωδικοποιούν αντίσταση σε χλωραμφαινικόλη και αμινογλυκοσίδες. Η NDM-1 ταυτίζεται ελάχιστα με άλλες MBLs, με τις πιο ομοιάζοντες MBLs να είναι η VIM-1 / VIM-2, με τις οποίες έχει μόνο 32,4% ομοιότητα. Σε σύγκριση με τη VIM-2, η NDM-1 εμφανίζει ισχυρότερη σύνδεση προς τις περισσότερες κεφαλοσπορίνες, ιδίως, κεφουροξίμη, κεφοταξίμη, και κεφαλοθίνη, και επίσης στις πενικιλίνες. Ωστόσο, η NDM-1 δεν συνδέεται στις καρβαπενέμες τόσο ισχυρά όσο οι IMP-1 ή VIM-2. Η NDM-1 αποτελεί όχι μόνο μια νέα υποκατηγορία της ομάδας B1 των MBLs, αλλά διαθέτει, επίσης, νέα αμινοξέα πλησίον της δραστηκής θέσης, γεγονός που υποδηλώνει ότι έχει μια νέα δομή (Dortet L *et al*, 2014; Yong D *et al*, 2009).

Επί του παρόντος, υπάρχουν 12 γνωστά είδη ενζύμων NDM (<http://www.lahey.org>). Μερικά από αυτά, όπως το NDM-4, -5 και -7, παρουσιάζουν υψηλότερη υδρολυτική ικανότητα στις καρβαπενέμες (Nordmann P and Poirel L, 2014). NDM-1 παράγουν στελέχη *E. coli* και *K. pneumoniae* και άλλα *Enterobacteriaceae*, όπως *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*,

Citrobacter freundii, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* spp., *M. morganii* και *Providencia* spp. που έχουν απομονωθεί σε διάφορα μέρη του κόσμου και ήταν είτε νοσοκομειακά στελέχη είτε κοινότητας (Dortet L *et al*, 2014; Rolain JM *et al*, 2010; Walsh TR *et al*, 2011). Στελέχη που παράγουν NDM-1 που βρέθηκαν στην Ινδία εμφάνισαν ανθεκτικότητα στην κολιστίνη και στην τιγκεκυκλίνη (Mulla S *et al*, 2016). Στελέχη *Citrobacter freundii* που παράγουν NDM-1 βρέθηκαν να φέρουν εννέα διαφορετικά γονίδια β-λακταμάσης (Poirel L *et al*, 2011). Τα περισσότερα στελέχη που εκφράζουν τα υπόλοιπα NDM ένζυμα εμφανίζουν ευαισθησία στην κολιστίνη και τιγκεκυκλίνη, εκτός από εκείνα που έχουν ενδογενή αντοχή, όπως *M. morganii*, *Proteus* spp. και *Providencia* spp. και κυμαινόμενη ευαισθησία στην αζτρεονάμη. Η ταυτόχρονη παραγωγή και άλλων AmpC και ESBLs ενζύμων σε στελέχη που φέρουν NDM ένζυμα μπορεί να παρεμποδίσει τη χρήση της αζτρεονάμης. Αυτή η συχνή σύνδεση των NDMs με την παρουσία και άλλων μηχανισμών αντιμικροβιακής αντοχής τα καθιστά παγκοσμίως ένα σημαντικό πρόβλημα στην αντιμετώπιση των λοιμώξεων από μικροοργανισμούς που τα παράγουν (Dortet L *et al*, 2014).

Τέλος, άλλες επίκτητες MBLs που παρουσιάζουν περιορισμένο εύρος διασποράς και έχουν μικρότερη κλινική σημασία είναι η SIM-1 (Seoul Imipenemase) η οποία ανιχνεύθηκε το 2005 σε στελέχη *A. baumannii* στη Ν. Κορέα, βρίσκεται πάνω σε ιντεγκρόνιο και εμφανίζει ομοιότητα 64-69% με την IMP-τύπου MBL (Lee K *et al*, 2005), η AIM-1 (Adelaide IMipenemase) που βρέθηκε στην Αυστραλία σε στέλεχος *P. aeruginosa* (Yong D *et al*, 2012), η DIM-1 (Dutch IMipenemase) που εντοπίστηκε σε στέλεχος *P. stutzeri* στην Ολλανδία (Poirel L *et al*, 2010), η TMB-1 (Tripoli metallo-β-lactamase) που απομονώθηκε σε στέλεχος *Achromobacter xylosoxidans* στη Λιβύη (El Salabi A *et al*, 2012) και την KHM-1, η οποία απομονώθηκε από ένα κλινικό στέλεχος *Citrobacter freundii* στην Ιαπωνία το 1997 (Sekiguchi J *et al*, 2008).

6.3 Καρβαπενεμάσες τάξης C κατά Ambler

Το CMY-10 είναι το πρώτο ένζυμο που ανιχνεύθηκε να υδρολύει τις καρβαπενέμες σε αυτή την τάξη των β-λακταμασών και ανήκει στην λειτουργική υποομάδα 1e. Αυτό το ένζυμο είναι μια πλασμιδιακή κεφαλοσπορινάση ευρέως φάσματος που είναι δραστική έναντι και της ιμιπενέμης και έχει ανιχνευθεί σε στελέχη *Enterobacter cloacae* στη Νότια Κορέα (Kim JY *et al*, 2006). Έκτοτε

νέα ένζυμα της τάξης C εμφανίσθηκαν με δραστικότητα καρβαπενεμάσης (ACT-1, DHA-1, CMY-2, και ADC-68) (Jeon JH *et al*, 2015).

6.4 Καρβαπενεμάσες τάξης D κατά Ambler

Τα ένζυμα τάξης D κατά Ambler είναι OXA (oxacillin hydrolyzing) ένζυμα, γνωστά και ως οξακιλλινάσες, τα οποία είναι πενικιλινάσες που υδρολύουν την οξακιλλίνη, την κλοξακιλλίνη και την δικλοξακιλλίνη, ταχύτερα απ' ό,τι την βενζυλπενικιλίνη (Jeon JH *et al*, 2015). Αυτή τη στιγμή υπάρχουν περισσότερα από 400 ένζυμα OXA, κάποια εκ των οποίων εμφανίζουν δραστηριότητα καρβαπενεμάσης και ταξινομούνται ως υποομάδα 2dF στη λειτουργική ταξινόμηση. Αναστέλλονται ασθενώς από το κλαβουλανικό οξύ και το EDTA και είναι γνωστό ότι έχουν μεγάλη μεταβλητότητα στις αλληλουχίες αμινοξέων. Με βάση την αμινοξική τους αλληλουχία κατατάσσονται σε 12 υποομάδες ενζύμων: OXA-23, OXA-24/40, OXA-48, OXA-51, OXA-58, OXA-134a, OXA-143, OXA-211, OXA-213, OXA-214, OXA-229, και OXA-235. Αυτές οι β-λακταμάσες σερίνης είναι πλασμιδιακές και οι περισσότερες βρίσκονται συνήθως σε στελέχη *A. baumannii*, ενώ η OXA-48 ανευρίσκεται κατά κύριο λόγο σε *Enterobacteriaceae* (Evans BA and Amyes SGB, 2014).

Το πρώτο OXA ένζυμο με δραστηριότητα καρβαπενεμάσης παρατηρήθηκε σε *A. baumannii* που απομονώθηκε στη Σκωτία το 1985. Αρχικά ονομάστηκε ARI-1 (*Acinetobacter resistant to imipenem*) και κωδικοποιείται σε ένα μεγάλο πλασμίδιο. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του ενζύμου αποκάλυψε ότι ανήκε στην OXA οικογένεια των β-λακταμασών και αργότερα μετονομάστηκε σε OXA-23 (Donald HM *et al*, 2000).

Οι OXA καρβαπενεμάσες υδρολύουν ασθενώς τις καρβαπενέμες καθώς αυτές εμφανίζουν μέγιστες ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (MIC) κάτω από το cut-off της τιμής ανθεκτικότητας, δημιουργώντας προβλήματα στη φαινοτυπική εντόπισή τους. Παρ' όλα αυτά, πολλά από τα βακτήρια που παράγουν OXA καρβαπενεμάσες είναι συνήθως ανθεκτικά στις καρβαπενέμες, αντανakλώντας την ταυτόχρονη ύπαρξη και άλλων μηχανισμών αντίστασης, όπως η ελαττωμένη διαπερατότητα ή η παραγωγή και άλλων β-λακταμασών. Οι OXA καρβαπενεμάσες αναστέλλονται σε ποικίλο βαθμό από το κλαβουλανικό οξύ, τη σουλμπακτάμη και την ταζομπακτάμη. Ο καταλυτικός μηχανισμός αυτών των ενζύμων είναι παρόμοιος με εκείνο των καρβαπενεμασών σερίνης. Τα OXA

ένζυμα εμφανίζουν αξιοσημείωτη δραστικότητα ενάντια στις πενικιλίνες, στις πρώτης γενιάς κεφαλοσπορίνες και την ιμιπενέμη, ενώ οι εκτεταμένου φάσματος κεφαλοσπορίνες (οξυίμινο- κεφαλοσπορίνες) υδρολύονται ασθενώς. Επιπλέον, οι αντλίες ενεργητικής εκροής πιστεύεται, επίσης, ότι συμβάλλουν στην αντίσταση στις καρβαπενέμες. Σε χώρες που ενδημούν στελέχη *Enterobacteriaceae* που παράγουν ESBLs, στελέχη που παράγουν και OXA ένζυμα εμφανίζουν αντοχή τόσο στις καρβαπενέμες όσο και στις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς (Evans BA and Amyes SGB, 2014; Poirel L *et al*, 2012) .

Όπως αναφέρθηκε, η συντριπτική πλειοψηφία των OXA καρβαπενεμασών έχουν ανιχνευθεί σε απομονωθέντα στελέχη *Acinetobacter* spp., κυρίως *A. baumannii*, παρουσιάζοντας μεγάλη αντοχή στις καρβαπενέμες (Evans BA *et al*, 2013; Zhao WH and Hu ZQ). Ωστόσο, η υποομάδα OXA-48 είναι η πιο σημαντική ανάμεσα στις καρβαπενεμάσες τάξης D. Ένζυμο OXA-48 απομονώθηκε από ένα κλινικό στέλεχος *K. pneumoniae* στην Τουρκία και είχε <50% ομολογία αμινοξέων με άλλα OXA ένζυμα (Carrër A *et al*, 2008). Αν και έχουν χαμηλή δραστικότητα έναντι των καρβαπενεμών, ωστόσο εμφανίζουν υψηλότερο ποσοστό υδρόλυσης της ιμιπενέμης σε σχέση με την μεροπενέμη και από εκείνο των άλλων OXA ενζύμων. Έχουν ανιχνευθεί σε στελέχη *K. pneumoniae*, από τα οποία έχουν εξαπλωθεί σε άλλα *Enterobacteriaceae*, ενώ τα τελευταία χρόνια έχουν απομονωθεί και από στελέχη *A. baumannii* (Goncalves D *et al*, 2013).

Επιπλέον, υπάρχουν OXA-48 like ένζυμα που διαφέρουν σε ένα ή περισσότερα αμινοξέα, όπως είναι τα OXA-163, OXA-181, OXA-204 και OXA-232 (Poirel L *et al*, 2012). Από αυτά, το OXA-181 που διαφέρει σε τέσσερα αμινοξέα είναι το μόνο που εμφανίζει σημαντική δραστηριότητα καρβαπενεμάσης και έχει βρεθεί να συσχετίζεται με καρβαπενεμάσες που κωδικοποιούνται από άλλα γονίδια, όπως τα *bla_{NDM-1}* και *bla_{VIM}*. Όπως και το OXA-48, το OXA-181 έχει ανιχνευθεί σε διάφορα είδη *Enterobacteriaceae*, και ιδιαίτερα σε στελέχη *K. pneumoniae*. Το OXA-163, επίσης ένα ένζυμο OXA-48 like με μία μόνο υποκατάσταση αμινοξέος και μία διαγραφή τεσσάρων αμινοξέων, επιδεικνύει χαμηλότερη συγγένεια για καρβαπενέμες, αλλά είναι δραστικό έναντι των εκτεταμένου φάσματος κεφαλοσπορινών και της αζτρεονάμης, και αναστέλλεται μερικώς από το κλαβουλανικό οξύ, μιμούμενο έτσι το φαινοτυπικό προφίλ των ESBLs.

Τα OXA-23, -24 και -51 έχουν απομονωθεί σε κλινικά στελέχη *Acinetobacter* spp. Επίσης, το ένζυμο OXA-50 έχει παρατηρηθεί ως χρωμοσωμιακό ένζυμο σε διάφορα στελέχη *P. aeruginosa*, το οποίο δεν εκφράζεται συνεχώς και δεν μπορεί να προκαλέσει φαινοτυπική αντίσταση στις καρβαπενέμες. Παρομοίως το OXA-51 έχει βρεθεί ως χρωμοσωμιακό ένζυμο σε διάφορα στελέχη *A. baumannii*. Μεταξύ των διαφόρων ομάδων καρβαπεμενασών OXA υπάρχει 40-70% ομολογία αμινοξέων, ενώ εντός της κάθε ομάδας η ομολογία φτάνει το 92.5% ή υψηλότερα (Evans BA and Amyes SGB, 2014).

7. Εργαστηριακή ανίχνευση καρβαπεμενασών

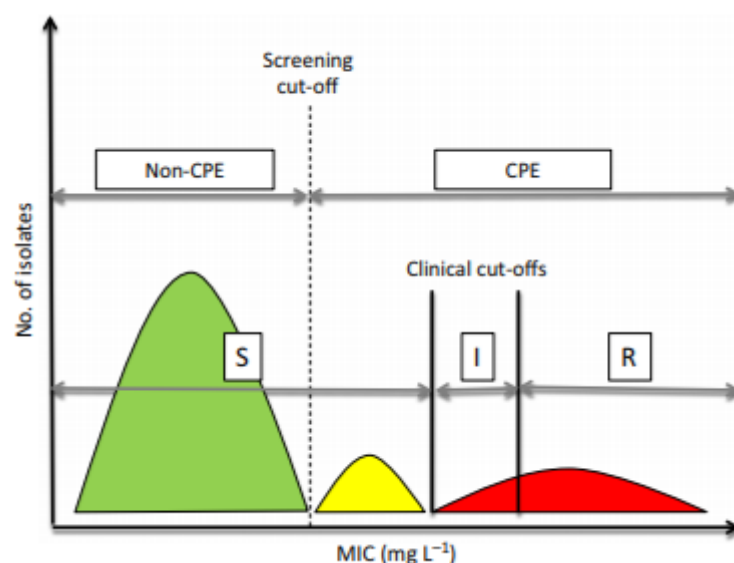
Η ανίχνευση των στελεχών *Enterobacteriaceae* που παράγουν καρβαπενεμάσες είναι ζωτικής σημασίας για τον έλεγχο των λοιμώξεων από τα στελέχη αυτά και την κατάλληλη επιλογή της αντιμικροβιακής θεραπείας. Η παραγωγή καρβαπενεμάσης, όπως αναφέρθηκε, δύναται να προσδώσει έναν συγκεκριμένο φαινότυπο αντίστασης στα β-λακταμικά, ανάλογα με τα βακτηριακά είδη, το επίπεδο έκφρασης, τον τύπο ή την παραλλαγή του ενζύμου, καθώς και την παρουσία πρόσθετων μηχανισμών αντίστασης όπως η μείωση της διαπερατότητας ή/και η αντλία ενεργητικής εκροής ή/και η δραστικότητα άλλων β-λακταμασών. Όπως αναφέρθηκε, οι περισσότερες καρβαπενεμάσες σερίνης εμφανίζουν ενδιάμεση ευαισθησία ή πλήρη αντοχή σε εκτεταμένου φάσματος κεφαλοσπορίνες, αζτρεονάμη και καρβαπενέμες, αλλά αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ και την ταζομπακτάμη. Οι μεταλλο-β-λακταμάσες χαρακτηρίζονται από ελαττωμένη ευαισθησία στις εκτεταμένου φάσματος κεφαλοσπορίνες και καρβαπενέμες, αλλά εμφανίζουν ευαισθησία στην αζτρεονάμη και το EDTA. Αυτή η ευαισθησία αναστρέφεται με την προσθήκη Mg^{2+} . Μέχρι πριν την εισαγωγή από το Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) και το European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) το 2010 των νέων χαμηλότερων breakpoints αντοχής για τις MICs των καρβαπενεμών (CLSI, 2010; www.eucast.org), στελέχη *Enterobacteriaceae* που ήταν θετικά στην παραγωγή των καρβαπεμενασών, όπως αποδεικνυόταν μετέπειτα από φαινοτυπικές και μοριακές μεθόδους ανίχνευσής τους, δεν εμφάνιζαν αξιοσημείωτη φαινοτυπική αντοχή στις καρβαπενέμες. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να μην αναφέρεται με σαφήνεια η πιθανότητα αποτυχίας μιας θεραπευτικής αγωγής με καρβαπενέμες στους κλινικούς ιατρούς. Επιπλέον, ορισμένα εντεροβακτηριακά στελέχη δύναται να εμφανίσουν αυξημένες MICs στις

καρβαπενέμες, χωρίς να παράγουν καρβαπενεμάσες, αλλά να εκφράζουν διαφορετικά ένζυμα σε συνδυασμό και με άλλους μηχανισμούς αντοχής. Μετά την εισαγωγή των νέων ορίων στις MICs για τις καρβαπενέμες, η εικόνα σχετικά με την ευαισθησία αυτής της ομάδας των αντιμικροβιακών είναι πιο ξεκάθαρη και τα εργαστήρια αναφέρουν τις MICs των καρβαπενεμών ανεξάρτητα από την παραγωγή καρβαπενεμάσης. Παρ' όλα αυτά, η εφαρμογή απλών και αξιόπιστων δοκιμασιών ανίχνευσης καρβαπενεμασών είναι εξαιρετικά χρήσιμη για να εντοπισθούν στελέχη CRE προκειμένου να καταγραφεί το επιδημιολογική προφίλ μιας κλινικής μονάδας, να σχεδιασθούν μέτρα ελέγχου διασποράς αυτών των στελεχών στο νοσοκομειακό περιβάλλον και να εφαρμοσθούν πολιτικές ορθολογικής χρήσης αντιβιοτικών (Tzouveleakis LS, 2012).

Μια σημαντικά αυξημένη MIC ή μειωμένη ζώνη αναστολής στη μέθοδο διάχυσης δίσκων σε κάποια καρβαπενέμη, συμπεριλαμβανομένης της ερταπενέμης, είναι ικανά να δημιουργήσουν την υποψία παραγωγής καρβαπενεμάσης στο απομονωθέν στέλεχος. Σύμφωνα με το CLSI τα κριτήρια επιλογής για περαιτέρω έλεγχο ανίχνευσης καρβαπενεμάσης σε στελέχη *Enterobacteriaceae* είναι η ενδιάμεση αντοχή ή η αντοχή σε μία ή περισσότερες καρβαπενέμες και η αντοχή τουλάχιστον σε μια κεφαλοσπορίνης τρίτης γενιάς (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, cefoperazone, ή ceftizoxime). Η διάμετρος ζώνης αναστολής 16-21 mm για την ερταπενέμη και 14-21 mm για την μεροπενέμη, σύμφωνα με το CLSI, μπορεί να θεωρηθούν ενδεικτικές της παραγωγής καρβαπενεμάσης παρά το γεγονός ότι βρίσκονται εντός των ορίων ευαισθησίας. Αντίστοιχα, τιμή MIC από 2-4 µg/ml για την ερταπενέμη και 2-8 µg/ml για την ιμιπενέμη και την μεροπενέμη υποδεικνύουν πιθανή παραγωγή καρβαπενεμάσης. Μόνο η μεροπενέμη και η ιμιπενέμη συνιστώνται για δοκιμές διαλογής στελεχών *P. aeruginosa* και *Acinetobacter* spp. (CLSI 2010, 2011). Οι MICs της ιμιπενέμης για τα στελέχη *Proteus* spp, *Providencia* spp. και *M. morganii* τείνουν να είναι υψηλότερες από τις MICs της μεροπενέμης ή της δοριπενέμης. Η ερταπενέμη θεωρείται ο πιο ευαίσθητος δείκτης (Bratu S et al, 2005), παρ' ό,τι ο μηχανισμός αντοχής της μειωμένης διαπερατότητας σε συνδυασμό με την παραγωγή CTX-M ή την υπερπαραγωγή AmpC λακταμασών μπορούν να επηρεάσουν την MIC της και να μειώσουν την ειδικότητά της ως δείκτη (Cohen Stuart J and Leverstein-Van Hall MA, 2010), ενώ η μεροπενέμη εμφανίζει την καλύτερη αναλογία ευαισθησίας και ειδικότητας. Για αυτό το λόγο το CLSI προτείνει

τη χρήση ερταπενέμης ή/και μεροπενέμης για τον έλεγχο ευαισθησίας στις καρβαπενέμες.

Ο έλεγχος ευαισθησίας στις καρβαπενέμες γίνεται με τις συνήθεις μεθόδους, όπως τη μέθοδο διάχυσης δίσκου σε άγαρ και τον προσδιορισμό της MIC με μεθόδους αραίωσης σε άγαρ/ζωμό, με E-test και με αυτόματα συστήματα (όπως Microscan Walkway, Vitek, Vitek2 Compact, BD Pheonix Sensititre, κ.α). Η μέθοδος μικροαραιώσεων σε ζωμό και η μέθοδος αραιώσεων σε άγαρ θεωρούνται πιο αξιόπιστες για την ανίχνευση όλων των τύπων αντοχής που προκαλείται από τις καρβαπενεμάσες (Anderson K.F. *et al*, 2007). Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στην παρασκευή του μικροβιακού εναιωρήματος ακόμα και για αυτόματα συστήματα. Για τον αποκλεισμό των τεχνικών λαθών και για τον περιορισμό των στελεχών που υποβάλλονται σε περαιτέρω έλεγχο για την ανίχνευση καρβαπεμενασών, τα στελέχη που εμφάνισαν στα αυτόματα συστήματα MICs πάνω από τα breakpoints για τις καρβαπενέμες δύναται να επιβεβαιώνονται με E-test για την ιμιπενέμη ή τη μεροπενέμη σε Muller-Hinton άγαρ (CLSI, 2011; Cohen Stuart J and Leverstein-Van Hall MA, 2010; Castenheira *et al*, 2004, Lee *et al*, 2005, Queenan *et al*, 2007). Τα breakpoints για τα ευαίσθητα στις καρβαπενέμες στελέχη *Enterobacteriaceae* σύμφωνα με το EUCAST και το CLSI παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. (http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Consultation/EUCAST_guidelines_detection_of_resistance_mechanisms_121222.pdf; CLSI, 2010, 2011). Σύμφωνα με το EUCAST, τα επιδημιολογικά όρια (ECCOFs) που χρησιμοποιούνται για την διαλογή των ύποπτων CPE στελεχών και τον περαιτέρω έλεγχό τους βασίζονται στην κατανομή των MICs των καρβαπενεμών μεταξύ των CPE στελεχών σε σύγκριση με εκείνη στα στελέχη «άγριου τύπου». Έχει παρατηρηθεί στελέχη CPE να είναι ευαίσθητα με βάση τα κλινικά όρια ευαισθησίας. Γι' αυτό το λόγο και το EUCAST προτείνει για τη διαλογή και την περαιτέρω διερεύνηση των ύποπτων CPE στελεχών τη χρήση των screening cut-offs (Tängdén T and Giske CG, 2015).



Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση των κλινικών ορίων (clinical cut-offs) και των ορίων διαλογής (screening cut-offs) των CPE στελεχών (Tängdén T and Giske CG, 2015)

	Clinical breakpoints (susceptible category)				Screening cut-off	
	MIC (mg/L)		Disk diffusion inhibition zone diameter (mm)		MIC (mg/L)	Disk diffusion inhibition zone diameter (mm)
	EUCAST	CLSI	EUCAST	CLSI		
Ertapenem	≤0.5	≤0.25	≥25	≥23	>0.125	<25
Imipenem	≤2	≤1	≥22	≥23	>1	<23
Meropenem	≤2	≤1	≥22	≥23	>0.125	<25

Πίνακας 3: Τα κλινικά όρια ευαισθησίας (clinical breakpoints) για τις καρβαπενέμες σύμφωνα με το EUCAST και το CLSI και τα όρια (screening cut-off) που προτείνει το EUCAST για τη διαλογή των CPE στελεχών.

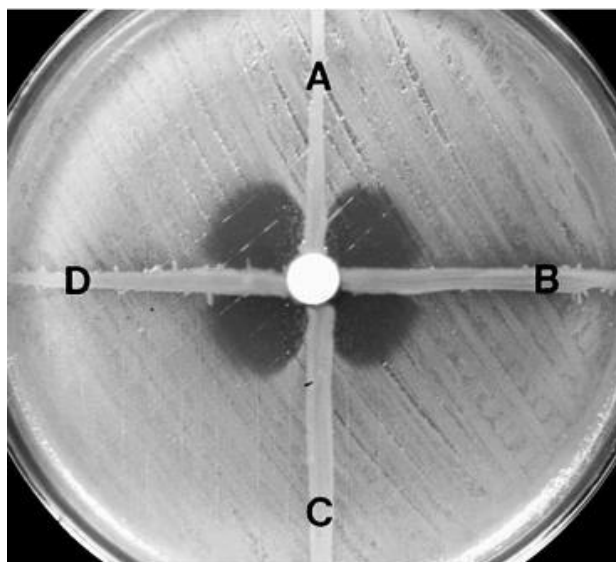
Υπάρχουν πολλές μελέτες που προτείνουν διάφορες τεχνικές για την ανίχνευση των καρβαπεμενασών σε ύποπτα CPE στελέχη. Αυτές περιλαμβάνουν τις κλασσικές, φαινοτυπικές τεχνικές αλλά και νεώτερες, όπως οι μοριακές και άλλες τεχνικές και παρουσιάζονται συνοπτικά παρακάτω.

7.1 Φαινοτυπικές τεχνικές

Οι περισσότερες φαινοτυπικές δοκιμασίες που έχουν περιγραφεί και αξιολογηθεί για τη διερεύνηση του μηχανισμού αντοχής των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες μικροοργανισμών, κυρίως *K. pneumoniae* και *E. coli*, στηρίζονται στην απλή μεθοδολογία της διάχυσης δίσκων σε άγαρ. Η φαινοτυπική επιβεβαίωση, αρχικώς, μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας το συνδυασμό δύο μεθόδων: της τροποποιημένης δοκιμασίας Hodge (Modified Hodge Test, MHT) και μιας δοκιμασίας αναστολής της καρβαπενεμάσης. Το MHT χρησιμοποιείται για τη διαπίστωση παρουσίας ενζύμων με δραστικότητα καρβαπενεμάσης στα ύποπτα στελέχη, ενώ οι δοκιμασίες αναστολής χρησιμοποιούνται για τη διάκριση μεταξύ των δύο κύριων κατηγοριών καρβαπεμενασών, των KPC και των MBLs.

Η τροποποιημένη δοκιμασία Hodge είναι μια απλή δοκιμασία η οποία βασίζεται στην αδρανοποίηση μιας καρβαπενέμης με τη χρήση στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάση (Lee K, *et al*, 2001). Εν συντομία, η 1:10 αραιώση ενός εναιωρήματος πρότυπου στελέχους *E. coli* ATCC 25922, με θολερότητα 0.5 της πρότυπης κλίμακας McFarland, χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό της επιφάνειας ενός τρυβλίου με Mueller-Hinton άγαρ. Μετά από επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, τοποθετείται δίσκος που περιέχει 10μg ερταπενέμης ή μεροπενέμης στο κέντρο πάνω στο άγαρ. Στη συνέχεια, 3-5 αποικίες του υπο εξέταση ύποπτου μικροοργανισμού επιστρώνονται σε ευθεία γραμμή (20-25mm μήκος) από την άκρη του δίσκου στην περιφέρεια του τρυβλίου. Σε μια δοκιμασία μπορούν να εξετασθούν μέχρι και τέσσερις μικροοργανισμοί. Το τρυβλίο επωάζεται αεροβίως στους 37°C για 18-24h. Η ανάπτυξη του εξεταζόμενου στελέχους προς τον δίσκο της καρβαπενέμης δημιουργεί εσοχή στη ζώνη αναστολής δίνοντας την εικόνα φύλλου τριφυλλίου και ερμηνεύεται ως θετικό αποτέλεσμα για την υδρόλυση από καρβαπενεμάση. (Εικόνα 11). Το CLSI συνιστά αυτή τη δοκιμασία για διαλογή στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάση, εκτός από *P. aeruginosa*. Έχει περιγραφεί μια βελτιστοποίηση της μεθόδου MHT (PAE-MHT) με τη χρήση πρότυπου στελέχους *K. pneumoniae* ATCC 700603 η οποία εμφανίζει ευαισθησία 100% και ειδικότητα 98% για την ανίχνευση της δραστικότητας καρβαπενεμάσης και σε στελέχη *P. aeruginosa* που παράγουν KPC και MBLs (Pasteran F *et al*, 2011). Παρά το γεγονός ότι το MHT λειτουργεί καλά για την ανίχνευση καρβαπεμενασών τύπου KPC και OXA-48, ωστόσο είναι χρονοβόρο και δεν μπορεί να διακρίνει τον τύπο της καρβαπενεμάσης (σερίνης ή μεταλλο-β-λακταμάσες). Επιπλέον, ψευδώς θετικά

αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί σε στελέχη που παράγουν ESBL τύπου CTX-M ή αυξημένα ποσά AmpC β-λακταμασών με μειωμένη διαπερατότητα (Pasteran F *et al*, 2009). Από την άλλη πλευρά, ενδέχεται να προκύψουν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα σε στελέχη που παράγουν χαμηλής δραστηριότητας MBLs και κυρίως μεταξύ των παραγωγών NDM καρβαπεμενασών. Η προσθήκη ψευδαργύρου στο Mueller-Hinton άγαρ βελτιώνει σημαντικά την ευαισθησία στην ανίχνευση των στελεχών που παράγουν NDM αυξάνοντας τη σταθερότητα του ενζύμου ή τροποποιώντας την έκφραση πορίνης (Girlich D *et al*, 2012). Η αντικατάσταση του Mueller-Hinton άγαρ με MacConkey άγαρ αυξάνει επίσης την ευαισθησία της μεθόδου για την ανίχνευση στελεχών που παράγουν MBLs ή τύπου OXA καρβαπενεμάσες, καθώς τα χολικά άλατα που περιέχονται στο MacConkey άγαρ βοηθούν στην απελευθέρωση των περιπλασμικών ενζύμων. Μια άλλη τροποποίηση του MHT (double-modified Hodge test) χρησιμοποιώντας δίσκους που περιέχουν καρβαπενέμη εμποτισμένων με βορονικό οξύ, το οποίο αναστέλλει τόσο τις καρβαπενεμάσες κατηγορίας A όσο και τις AmpC β-λακταμάσες, μπορεί να εφαρμοσθεί για τη μείωση του αριθμού των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων και εμφανίζει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα για την ανίχνευση καρβαπεμενασών της τάξης A (Pasteran F *et al*, 2010).



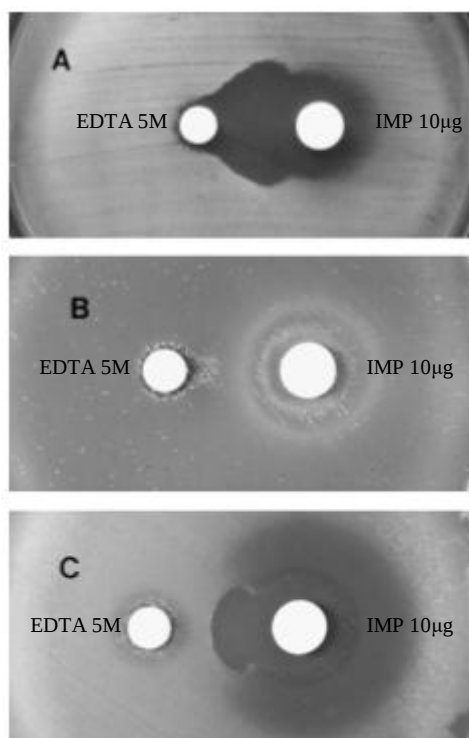
Εικόνα 11: Modified Hodge Test. Τα στελέχη A και C παράγουν καρβαπενεμάση και εμφανίζουν θετική τη δοκιμασία δημιουργώντας εσοχή στη ζώνη αναστολής γύρω από το δίσκο της καρβαπενέμης, ενώ η δοκιμασία είναι αρνητική για τα στελέχη B και D (Lee K *et al*, 2001).

Οι δοκιμασίες αναστολής της δραστηριότητας της καρβαπενεμάσης (synergy tests) βασίζονται στην ιδιότητα που έχουν ορισμένοι χημικοί παράγοντες να αναστέλλουν *in vitro* την υδρολυτική δράση συγκεκριμένων κατηγοριών καρβαπεμενασών. Η προσθήκη αυτών των αναστολέων στις φαινοτυπικές δοκιμασίες βοηθά στην ανίχνευση των στελεχών CPE με βάση τον τύπο της καρβαπενεμάσης που παράγουν. Για την ανίχνευση των μεταλλο-β-λακταμασών έχουν προταθεί τεχνικές που χρησιμοποιούν διάφορους χηλικούς παράγοντες μόνους ή σε συνδυασμό, όπως το EDTA, το διπικολινικό οξύ, την 1,10-φαινανθρολίνη, ενώσεις θειόλης όπως το 2-μερκαπτοπροπιονικό οξύ και το μερκαπτοοξικό οξύ (Osano E *et al*, 1994; Arakawa Y *et al*, 2000; Migliavacca *et al*, 2002; Yong D *et al*, 2002; Lee K *et al*, 2003; Kim S-Y *et al*, 2007; Miriagou V, *et al*, 2010). Οι χηλικοί αυτοί παράγοντες επιδρούν στη σταθερότητα των δεσμών του ψευδαργύρου που είναι σημαντικοί για την υδρολυτική δράση των μεταλλο-β-λακταμασών έναντι των β-λακταμικών, με αποτέλεσμα την επανεμφάνιση της δραστηριότητας των β-λακταμικών. Συνηθέστερα χρησιμοποιείται το EDTA ως αναστολέας των MBLs το οποίο εμποτίζει σε συγκεκριμένη ποσότητα (10μL 0.1M ή 0.5M EDTA) ένα κενό δίσκο που τοποθετείται σε ορισμένη απόσταση (10-15mm) δίπλα σε ένα δίσκο β-λακταμικού (συνήθως καρβαπενέμης ή κεφταζιδίμης) πάνω σε Mueller-Hinton άγαρ επιστρωμένο με το ύποπτο για παραγωγή MBLs μικροβιακό στέλεχος (double disk synergy test-DDST). Η διεύρυνση της ζώνης αναστολής γύρω από το δίσκο του β-λακταμικού είναι θετική για την παραγωγή μεταλλο-β-λακταμάσης (Εικόνα 12). Διάφορες ποσότητες EDTA καθώς και συνδυασμοί χηλικών παραγόντων, διαφορετικά β-λακταμικά και διαφορετικές αποστάσεις μεταξύ των δίσκων έχουν προταθεί διαχρονικά για να αυξήσουν την ευαισθησία της μεθόδου ανάλογα με το εξεταζόμενο μικροβιακό στέλεχος. Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ταυτόχρονα δίσκος β-λακταμικού εμποτισμένου με EDTA και δίσκος β-λακταμικού μόνος του (combined disk test-CDT). Η αύξηση της διαμέτρου στη ζώνη αναστολής γύρω από το δίσκο του β-λακταμικού με το EDTA σε σύγκριση με τη ζώνη αναστολής γύρω από τον απλό δίσκο β-λακταμικού πάνω από ένα καθορισμένο όριο δηλώνει την παραγωγή μεταλλο-β-λακταμάσης (Εικόνα 13).

Βασισμένη στην ίδια αρχή χρησιμοποιείται, επίσης, και η μέθοδος διαβαθμιζόμενης διάχυσης με ταινίες που περιέχουν ιμιπενέμη και ιμιπενέμη με EDTA (π.χ. IP/IPI E-test MBL, bioMerieux, France ή Solna, Sweden). Η μείωση της

MIC της ιμιπενέμης με το EDTA σε σύγκριση με την MIC της ιμιπενέμης ίση ή πάνω από 8 φορές ($IP/IPI \geq 8$) είναι δηλωτική της παραγωγής μέταλλο-β-λακταμασών (Εικόνα 14), (Walsh TR *et al*, 2002; Khosravi Y *et al*, 2012; Doyle D *et al*, 2012). Αν και αυτή η μέθοδος εμφανίζει καλή ευαισθησία και ειδικότητα, ωστόσο ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα έχουν αναφερθεί σε στελέχη με MIC ιμιπενέμης <4 $\mu\text{g/ml}$ και ψευδώς θετικά αποτελέσματα έχουν αναφερθεί σε στελέχη με διαφορετικό μηχανισμό αντοχής (για παράδειγμα μειωμένη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης) λόγω της επίδρασης του EDTA ή σε *A. baumannii* που παράγουν OXA-23. Επιπλέον, η παρουσία μεμονωμένων αποικιών μέσα στη ζώνη αναστολής μπορούν να δυσκολέψουν τον σαφή καθορισμό της MIC.

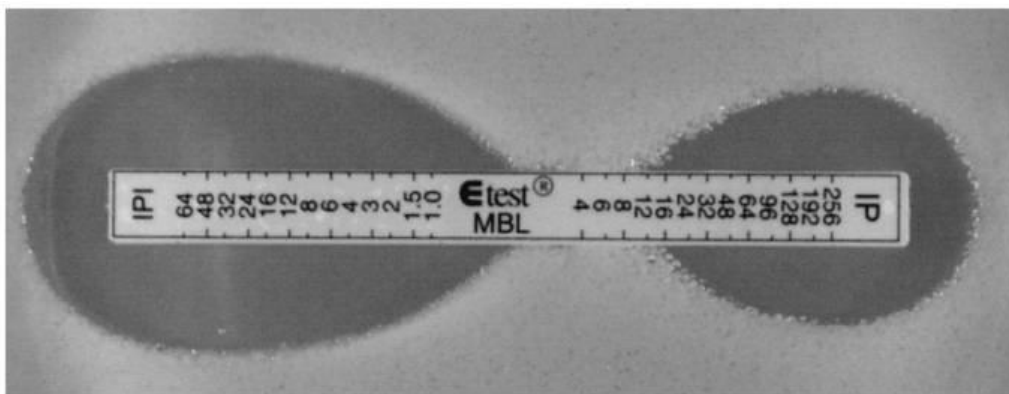
Μια άλλη προτεινόμενη μέθοδος για την φαινοτυπική ανίχνευση των μέταλλο-β-λακταμασών είναι η χρήση ενός εμποτισμένου με χηλικό παράγοντα άγαρ (Birgy A *et al*, 2012). Ένα εμποτισμένο με EDTA άγαρ παρασκευάζεται με την επίστρωση 2 mL διαλύματος 5 mmol/L EDTA στην επιφάνεια ενός MH άγαρ. Οι διαφορές ≥ 10 mm στη διάμετρο της ζώνης αναστολής των δίσκων καρβαπενέμης που έχουν τοποθετηθεί σε εμποτισμένο με EDTA MH άγαρ και σε απλό MH άγαρ δεικνύει την ύπαρξη MBLs. Αυτή η τεχνική διευκολύνει την ανίχνευση της ταυτόχρονης παρουσίας συσχετιζόμενων μηχανισμών αντοχής β-λακτάμης και παραγωγής καρβαπενεμάσης σε κλινικά απομονωθέντα στελέχη. Γενικά, οι μέθοδοι με τη χρήση χηλικών παραγόντων θα πρέπει να επιβεβαιώνονται με άλλες μεθόδους, κυρίως γονοτυπικές, και να λαμβάνεται υπόψιν η τυχόν επίδραση των παραγόντων αυτών στην βακτηριακή ανάπτυξη.



Εικόνα 12: θετικό για την παρουσία MBL double disk synergy test-DDST (A και C) με διεύρυνση της ζώνης αναστολής στην καρβαπενέμη υπό την επίδραση του EDTA και αρνητικό για MBL DDST (B) χωρίς διεύρυνση της ζώνης αναστολής στις καρβαπενέμη και με ισχυρή ζώνη γύρω από το EDTA (Lee K *et al*, 2001)



Εικόνα 13: θετικό για την παρουσία MBL combined disk test-CDT με αύξηση της ζώνης αναστολής >7mm γύρω από τον εμποτισμένο με EDTA δίσκο της ιμιπενέμης σε σύγκριση με τη ζώνη αναστολής γύρω από τον δίσκο ιμιπενέμης χωρίς EDTA (Khosravi Y *et al*, 2012).



Εικόνα 14: IP/IPI Etest MBL σε στέλεχος *S. marcescens* που παρήγαγε IMP-1 μεταλλο-β-λακταμάση. Η MIC της ιμιπενέμης μειώθηκε από 16 σε <1 mg/L κάτω από την έκθεση σε σταθερή συγκέντρωση EDTA (Walsh TR *et al*, 2002).

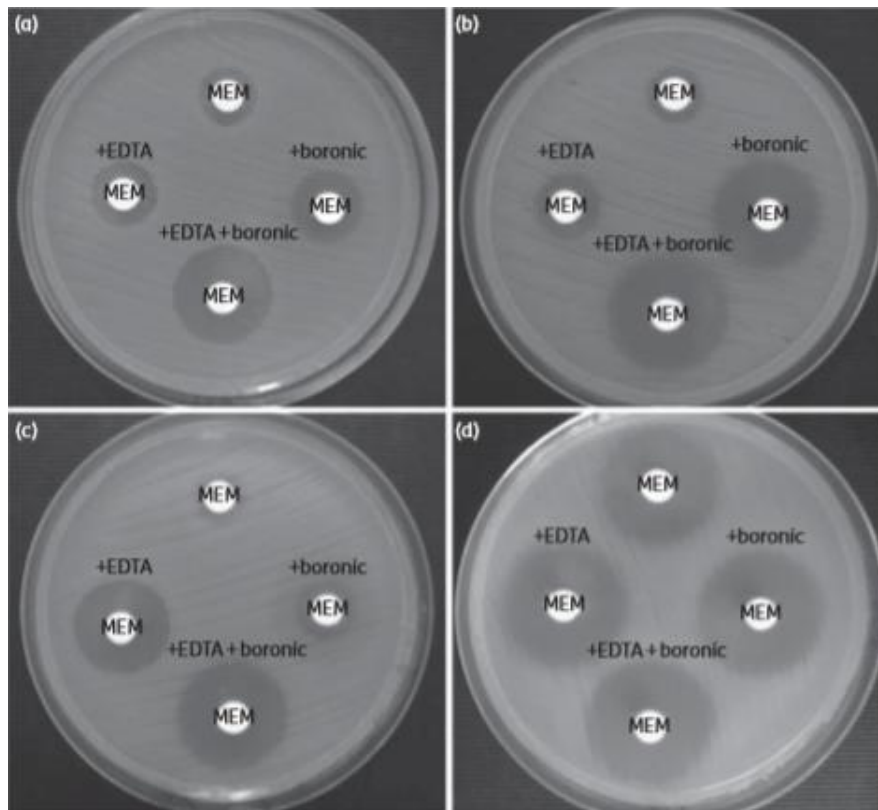
Για τον φαινοτυπικό προσδιορισμό των καρβαπεμενσών της τάξης A χρησιμοποιούνται μέθοδοι που στηρίζονται στην ανασταλτική επίδραση του βορονικού οξέος και παραγώγων του, όπως είναι το φαινυλοβορονικό οξύ (PBA), το 3-αμινοφαινυλοβορονικό οξύ (APBA) (Pasteran F *et al*, 2008). Στις δοκιμασίες αυτές προτιμώνται να χρησιμοποιούνται συνήθως δίσκοι μεροπενέμης 10μg ή/και ιμιπενέμης 10μg. Συνοπτικά, σε MH άγαρ επιστρωμένο με το ύποπτο CPE στέλεχος τοποθετούνται κανονικοί δίσκοι καρβαπενέμης και δίσκοι καρβαπενέμης που είναι εμποτισμένοι με βορονικό οξύ και ακολουθεί 24ωρη επώαση στους 37°C. Η διαφορά στη διάμετρο της ζώνης αναστολής γύρω από του δίσκους καρβαπενέμης με και χωρίς βορονικό οξύ (έχουν προταθεί διαφορές από ≥ 4 έως ≥ 7 mm) είναι ενδεικτική της παραγωγής καρβαπενεμάσης της τάξης A (Pasteran F *et al*, 2009; Doi Y *et al*, 2008). Η μέθοδος με τη χρήση δίσκων μεροπενέμης 10μg με ή χωρίς 400 μg βορονικού οξέος και με αύξηση στη ζώνη αναστολής ≥ 5 mm εμφανίζει 100% ειδικότητα και 100% ευαισθησία στην ανίχνευση KPC τύπου καρβαπενεμάσες που παράγονται από στελέχη *K. pneumoniae* (Tsakris *et al*, 2009).

Επιπλέον, έχουν χρησιμοποιηθεί και δίσκοι κλοξακιλλίνης με και χωρίς βορονικό οξύ μαζί με δίσκους καρβαπενέμης με και χωρίς βορονικό οξύ που επιτρέπουν την διαφοροποίηση στελεχών που εμφανίζουν μειωμένη ευαισθησία στις καρβαπενέμες, αλλά παράγουν τύπου AmpC β-λακταμάσες, οι οποίες αναστέλλονται από το βορονικό οξύ. Η χρήση δίσκων ερταπενέμης με βορονικό οξύ αποφεύγονται καθότι μπορούν να δώσουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα σε στελέχη που παράγουν τύπου AmpC β-λακταμάσες (Beesley T *et al*, 1983; Giske CG *et al*, 2011). Επίσης,

έχει προταθεί και συνδυαστική μέθοδος για την ταυτόχρονη ανίχνευση και τη διαφοροποίηση στελεχών *Enterobacteriaceae* που παράγουν MBLs και KPC τύπου καρβαπενεμάσες με υψηλή ευαισθησία (από 96.8% έως 100%) και υψηλή ειδικότητα (από 98.8% έως 100%) (Tsakris *et al*, 2010). Στη μέθοδο αυτή τοποθετούνται σε επιστρωμένο με το ύποπτο CPE στέλεχος ΜΗ άγαρ δίσκοι μεροπενέμης χωρίς και με 400μg PBA ή με 292μg EDTA ή και με τα δύο (400 μg PBA και 292 μg EDTA). Μετά από 24ωρη επώαση στους 37°C, συγκρίνονται οι διάμετροι των ζωνών αναστολής και στους τρεις δίσκους με αναστολέα και αξιολογείται ως θετική για την παραγωγή καρβαπενεμάσης διαφορά $\geq 5\text{mm}$ σε σύγκριση με τη ζώνη αναστολής γύρω από το δίσκο μεροπενέμης χωρίς κανένα αναστολέα. Η διαφοροποίηση του είδους της παραγόμενης καρβαπενεμάσης γίνεται με τη συνδυαστική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων γύρω από όλους τους δίσκους, όπως φαίνεται στον πίνακα 4 και την εικόνα 15. Κατόπιν, στηριζόμενοι σε αυτή τη μέθοδο οι Miriagou *et al*. ανέδειξαν την αύξηση της ευαισθησίας και της ειδικότητας στο KPC/MBL kit (ROSCO Diagnostica, Taastrup, Denmark) με δυο τροποποιήσεις της μεθόδου του kit που αφορούσαν στην αντικατάσταση του APBA με το PBA και την προσθήκη δίσκου μεροπενέμης που περιείχε PBA και EDTA μαζί (Miriagou V *et al*, 2013). Σε μια άλλη μέθοδο που έχει περιγραφεί αξιολογείται η διαφορά των MICs των καρβαπενεμών σε ΜΗ άγαρ με το ύποπτο στέλεχος χωρίς και με ενσωματωμένο APBA (0.3 mg/mL). Μια μείωση των MICs στο ΜΗ άγαρ με APBA ≥ 3 φορές σε σχέση με τις MICs στο ΜΗ άγαρ χωρίς APBA είναι ενδεικτική της παραγωγής καρβαπενεμάσης τάξης A (Pasteran F *et al*, 2009). Γενικά, οι φαινοτυπικές μέθοδοι με τη χρήση του βορονικού οξέος ως αναστολέα εμφανίζουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα για την ανίχνευση στελεχών *Enterobacteriaceae* που παράγουν KPC τύπου καρβαπενεμάσες.

Meropenem	Meropenem + PBA	Meropenem + EDTA	Meropenem + PBA + EDTA	Interpretation
-	+	-	+	Class A carbapenemase
-	-	+	+	Class B carbapenemase
-	-	-	+	Both class A and B carbapenemase

Πίνακας 4: Αξιολόγηση της συνδυαστικής μεθόδου δίσκων μεροπενέμης με και χωρίς αναστολέα (PBA ή/και EDTA).



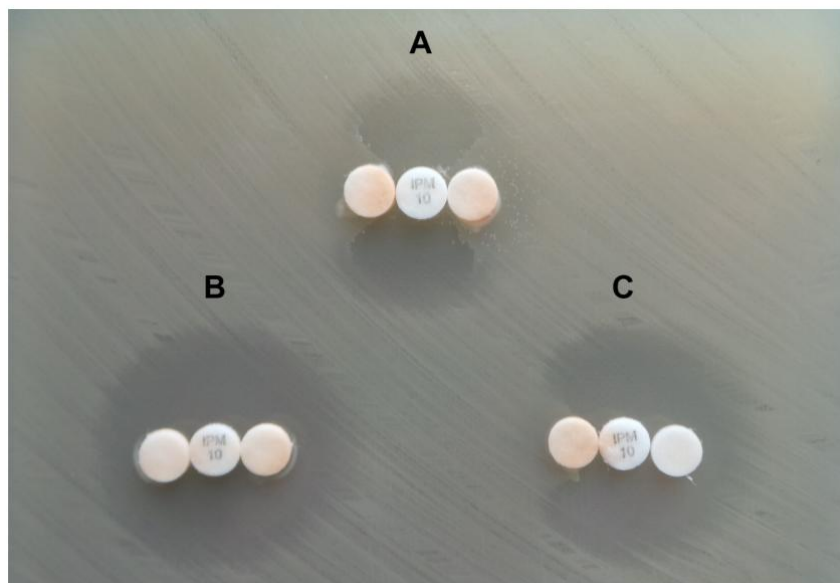
Εικόνα 15: Ενδεικτικά αποτελέσματα της μεθόδου με τους τρεις συνδυαστικούς δίσκους της μεροπενέμης (MEM) με αναστολέα (φαινυλοβορονικό οξύ ή/και EDTA) και το δίσκο μεροπενέμης χωρίς αναστολέα. KPC/VIM/ESBL-θετικό στέλεχος (a), KPC/ESBL-θετικό στέλεχος (b), VIM-θετικό στέλεχος (c) και AmpC/ESBL-θετικό στέλεχος (d) (Tsakris *et al*, 2010) .

Ενώ η ανάπτυξη φαινοτυπικών μεθόδων για την ανίχνευση των καρβαπεμενασών τάξεως A και B είναι ευρεία και πολλά υποσχόμενη, η ανίχνευση των τύπου OXA-48 καρβαπενεμασών παραμένει δυσχερής εξαιτίας ακριβώς της μη δυνατότητας αναστολής τους από παράγοντες όπως η ταζομπακτάμη, το κλαβουλανικό οξύ ή χηλικούς παράγοντες. Η ταυτόχρονη εμφάνιση υψηλών τιμών MICs και στην temocillin (>64 mg/L) και στην πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη σε στελέχη *Enterobacteriaceae* υποκρύπτει χαμηλή ευαισθησία ή αντοχή σε μια τουλάχιστον καρβαπενέμη και καθιστά το στέλεχος ύποπτο για παραγωγή τύπου OXA-48 καρβαπενεμάσες. Σύμφωνα με τα κριτήρια του CLSI και του EUCAST μια ζώνη αναστολής στη μεροπενέμη διαμέτρου <27mm θα μπορούσε να τεθεί ως cut-off διαλογής σε χώρες που ενδημούν τα στελέχη που παράγουν OXA-48 (CLSI, 2014; EUCAST, 2014). Μια μέθοδος διάχυσης δίσκων που χρησιμοποιεί δίσκο temocillin 30μg θα μπορούσε να αποτελέσει μια αρκετά αξιόπιστη φαινοτυπική δοκιμασία για

την ανίχνευση των OXA-48 στα *Enterobacteriaceae* (van Dijk K *et al*, 2014). Επίσης, ο συνδυασμός δύο δίσκων, temocillin και piperacillin/tazobactam με όρια διαμέτρων <12mm και <16mm, αντίστοιχα, χρησιμοποιείται για την ανίχνευση OXA-48 στα *Enterobacteriaceae* εμφανίζοντας υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα (Huang TD *et al*, 2014).

Για την ανίχνευση των OXA-48 καρβαπεμενασών έχει προταθεί το OXA-48 disk test (Tsakris A *et al*, 2015). Η δοκιμασία βασίζεται στη χρήση του EDTA για την αύξηση της διαπερατότητας του βακτηριακού κυττάρου και την απελευθέρωση των β-λακταμασών στο εξωτερικό περιβάλλον. Το EDTA χρησιμοποιήθηκε, επίσης, για την αναστολή της παραγωγής των MBL καρβαπεμενασών, ενώ παράλληλα PBA χρησιμοποιήθηκε για την αναστολή της παραγωγής των KPCs. 10μl EDTA 0,1 M (που περιέχει 292 μg EDTA) διανέμεται σε δύο δίσκους λευκού χαρτιού. Επίσης, με 10μl PBA (που περιείχε 600 μg PBA) εμποτίζεται ο δεξιός των δύο δίσκων που περιέχουν EDTA. Οι δίσκοι, αφού αφήνονται να στεγνώσουν, χρησιμοποιούνται εντός 60 λεπτών. Η επιφάνεια ενός τρυβλίου Mueller-Hinton άγαρ ενοφθαλμίζεται με εναιώρημα με ευαίσθητο στις καρβαπενέμες *E. coli* ATCC 25922 σε θολερότητα 0,5 McFarland. Ένας δίσκος μιπενέμης 10 μg τοποθετείται στην εμβολιασμένη επιφάνεια του Mueller-Hinton άγαρ. Από τις κορυφές 2 έως 3 καλά απομονωμένων αποικιών του εξεταζόμενου μικροοργανισμού εφαρμόζονται για την επικάλυψη των δίσκων που περιέχουν EDTA και EDTA / PBA. Οι ενοφθαλμισμένοι δίσκοι τοποθετούνται με την πλευρά με την βακτηριακή επικάλυψη προς τα κάτω στο άγαρ δίπλα στον δίσκο της μιπενέμης. Το τρυβλίο συνέχεια επωάζεται 18h στους 35 ° C σε αέρα περιβάλλοντος και στη συνέχεια εξετάζεται είτε για εσοχή είτε για εξαφάνιση της ζώνης αναστολής από τους δίσκους δίπλα στην μιπενέμη, υποδεικνύοντας ενζυματική απενεργοποίηση της μιπενέμης (θετικό αποτέλεσμα), είτε για απουσία αλλοίωσης της ζώνης αναστολής, που δεν δείχνει σημαντική αδρανοποίηση της μιπενέμης (αρνητικό αποτέλεσμα) (Εικόνα 16). Βακτηριακή ανάπτυξη προς τους δίσκους EDTA και EDTA / PBA υποδεικνύει παραγωγή καρβαπενεμάσης OXA-48. Η στένωση της βακτηριακής ανάπτυξης προς το δίσκο EDTA και η απουσία ανάπτυξης προς τους δίσκους EDTA / PBA είναι ενδεικτικές παραγωγής KPC ή KPC + MBL. Απουσία βακτηριακής ανάπτυξης και προς τους δύο δίσκους EDTA και EDTA / PBA δείχνουν παραγωγή MBL καρβαπενεμάσης ή μη ευαισθησίας σε καρβαπενέμες λόγω παραγωγής των ESBL / AmpC β-λακταμασών

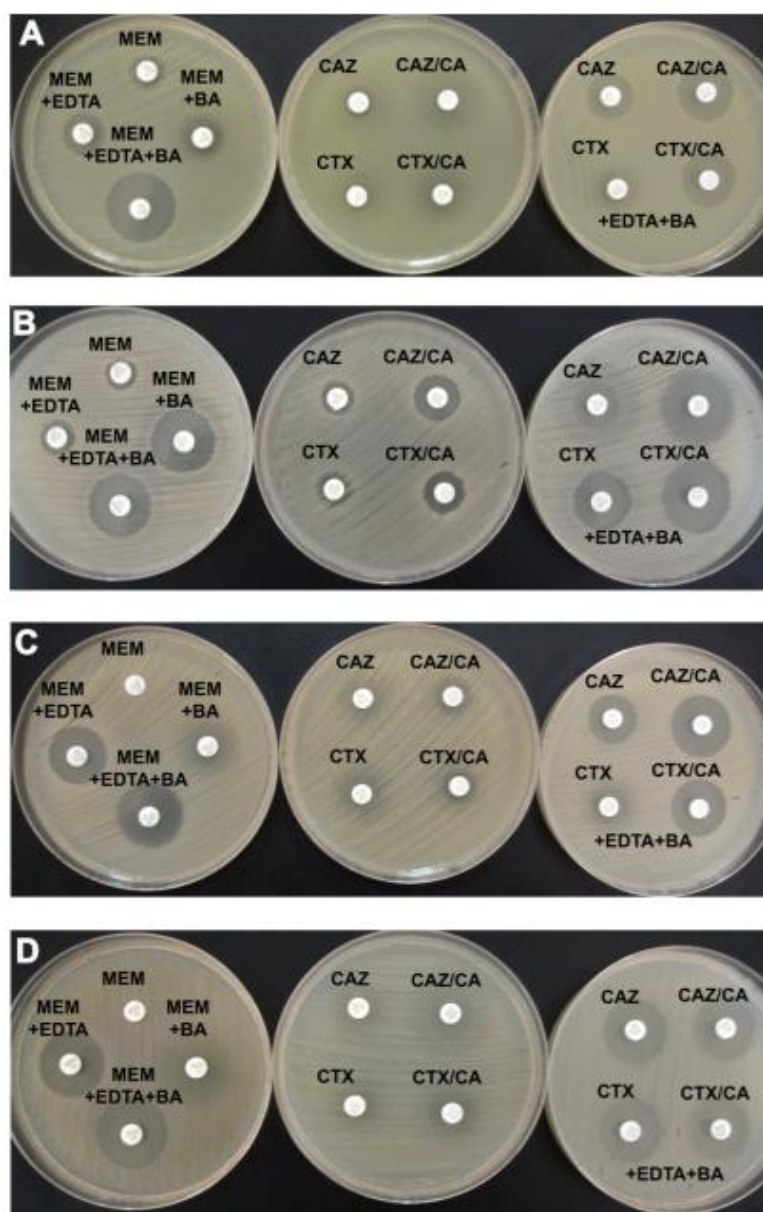
και απώλειας πορινών. Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία (96.3%) και ειδικότητα (97.7%) για την ανίχνευση των OXA-48 καρβαπεμενασών.



Εικόνα 16: Ενδεικτικά αποτελέσματα του OXA-48 disk test, με τη χρήση δύο κενών δίσκων τοποθετημένων δίπλα σε ένα δίσκο ιμιπενέμης, και οι οποίοι περιέχουν EDTA (αριστερός δίσκος) και EDTA+PBA (δεξιός δίσκος). Α. Παραγωγή OXA-48/ESBL β-λακταμασών (εσοχή και στους δύο δίσκους EDTA και EDTA+PBA), Β. Παραγωγή NDM-1/ESBL β-λακταμασών (καμμία εσοχή σε κανέναν από τους δύο δίσκους) και C. Παραγωγή KPC-2 β-λακταμασών (εσοχή μόνο στο δίσκο με EDTA) (Tsakris A *et al*, 2015).

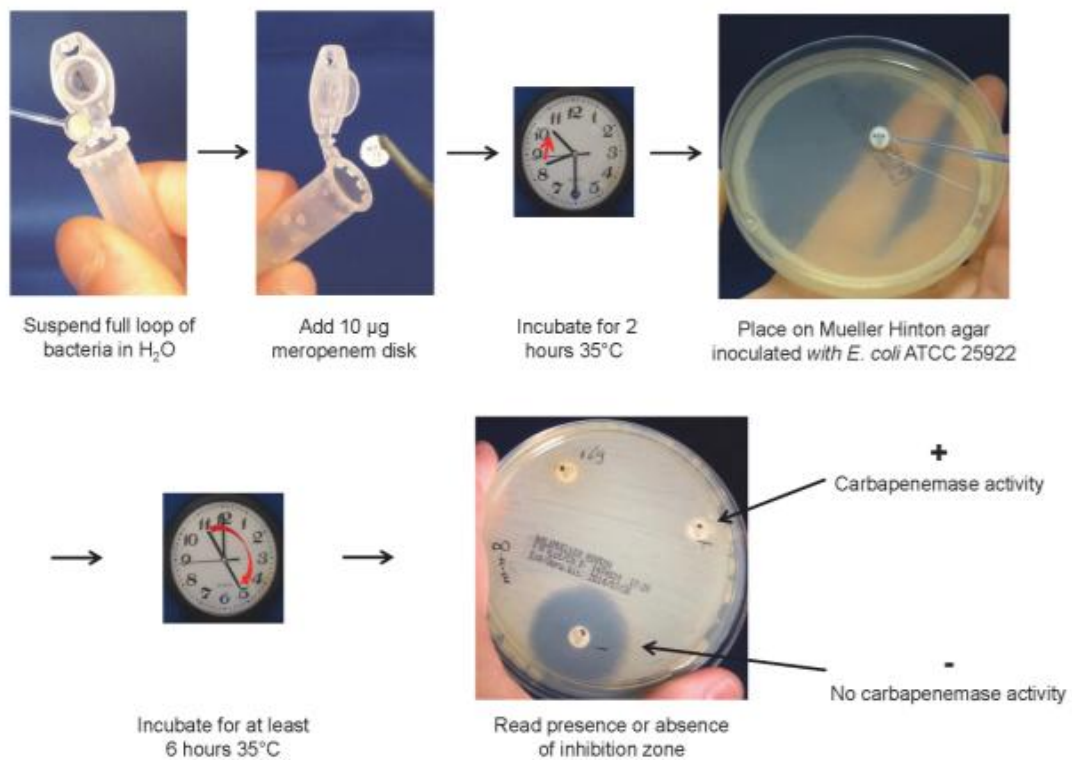
Επίσης, θα πρέπει να αναφέρουμε και μια άλλη φαινοτυπική τεχνική που έχει προταθεί για την ανίχνευση παραγωγής ESBL β-λακταμασών σε στελέχη που παράγουν και άλλου είδους β-λακταμάσες, συμπεριλαμβανομένων και των καρβαπεμενασών (Poulou A *et al*, 2014). Πρόκειται για μια τροποποιημένη μέθοδο της κατά CLSI επιβεβαιωτικής δοκιμής για την ανίχνευση ESBLs. Η τροποποίηση αυτή πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας δίσκους κεφοταξίμης (CTX) και κεφταζιδίμης (CAZ) με ή χωρίς κλαβουλανικό οξύ (CA), στους οποίους προστέθηκαν και BA και EDTA. Συγκεκριμένα, 10 μl διαλύματος BA (που περιέχουν 400 μg BA) διανεμήθηκαν σε δίσκους αντιβιοτικών που περιέχουν CTX (30 μg) ή CAZ (30 μg) με ή χωρίς CA (10 μg). Επιπροσθέτως, 10 μl 0,1 M EDTA (που περιέχουν 292 μg EDTA) διανεμήθηκαν στους ίδιους δίσκους αντιβιοτικών. Η δοκιμή διεξήχθη με εμβολιασμό σε Mueller-Hinton άγαρ του εξεταζόμενου στελέχους. Τα τρυβλία

επώασθηκαν στους 37 ° C επί 18 ώρες. Παρόμοια με την πρότυπη κατά CLSI δοκιμή ανίχνευσης ESBL, αύξηση 5 mm στην ζώνη αναστολής της βακτηριακής ανάπτυξης στο δίσκο CTX-CA ή CAZ-CA σε συνδυασμό με BA και EDTA (CTX-CA-BA-EDTA και CAZ-CA-BA-EDTA, αντιστοίχως) σε σύγκριση με τη διάμετρο της ζώνης αναστολής στους δίσκους CTX ή CAZ που περιέχουν μόνο BA και EDTA (CTX-BA-EDTA και CAZ-BA-EDTA, αντιστοίχως) θεωρήθηκε θετικό αποτέλεσμα για την παραγωγή ESBL (Εικόνα 17). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η συγκέντρωση των BA και EDTA που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή δεν έχουν καμία ανιχνεύσιμη επίδραση στη βακτηριακή ανάπτυξη. Η ευαισθησία και η ειδικότητα της τροποποιημένης μεθόδου κατά CLSI για την ανίχνευση ESBL θετικών στελεχών ήταν εξαιρετικά υψηλή (φτάνει μέχρι και το 100%) σε στελέχη που παρήγαγαν ταυτόχρονα και καρβαπενεμάσες σε σύγκριση με την πρότυπη κατά CLSI μέθοδο ανίχνευσης των ESBLs, η οποία είχε καλύτερη ή παρόμοια ειδικότητα και ευαισθησία στα στελέχη που παρήγαγαν μόνο ESBLs ή/και OXA-48 καρβαπενεμάση.

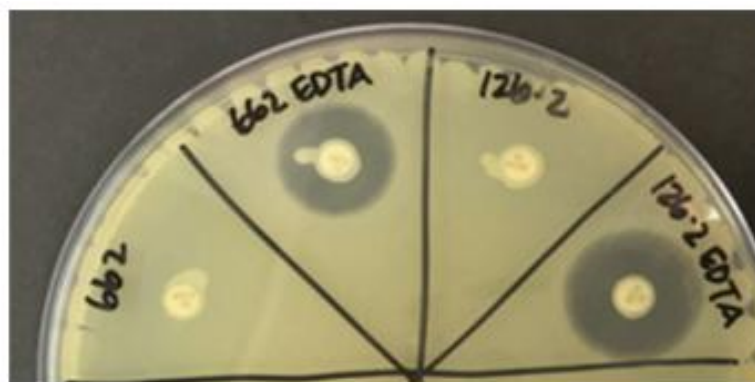


Εικόνα 17: Ενδεικτικά αποτελέσματα της πρότυπης κατά CLSI μεθόδου επιβεβαίωσης παραγωγής ESBL (δεύτερη στήλη) και της προτεινόμενης τροποποιημένης μεθόδου (τρίτη στήλη) με τη χρήση αντιβιοτικών δισκίων που περιέχουν EDTA και BA. Α. Στέλεχος που παράγει KPC, VIM, και ESBL β-λακταμάσες, Β. Στέλεχος που παράγει KPC και ESBL β-λακταμάσες, C. Στέλεχος που παράγει VIM και ESBL β-λακταμάσες, και D. Στέλεχος που παράγει VIM β-λακταμάσες. Στην πρώτη στήλη απεικονίζονται τα αποτελέσματα από την φαινοτυπική δοκιμασία ανίχνευσης και διαφοροδιάγνωσης των καρβαπεμενασών στα *Enterobacteriaceae* με τη χρήση αντιβιοτικών δισκίων μεροπενέμης (MEM) χωρίς και με EDTA ή BA, ή EDTA μαζί με BA (Poulou A *et al*, 2014).

Τέλος, μια άλλη φαινοτυπική μέθοδος ανίχνευσης καρβαπεμενασών σε Gram-αρνητικούς μικροοργανισμούς είναι η μέθοδος αδρανοποίησης της καρβαπενέμης (Carbapenem Inactivation Method-CIM). Η μέθοδος πραγματοποιείται με τη δημιουργία εναιωρήματος σε 400μl νερού σε Eppendorf 1.5ml μιας αποικίας που ελήφθει με κρίκο 10μl από Mueller-Hinton άγαρ ή αιματούχο άγαρ. Στη συνέχεια πραγματοποιείται έλεγχος ευαισθησίας με την προσθήκη δίσκου μεροπενέμης 10μg (που πλεονεκτεί έναντι των δίσκων ερταπενέμης και ιμιπενέμης) στο εναιώρημα και επώασή τους για τουλάχιστον δύο ώρες στους 35°C. Μετά την επώαση, αφαιρείται ο δίσκος της μεροπενέμης με τη βοήθεια βρόχου και τοποθετείται πάνω στην επιφάνεια τρυβλίου με Mueller-Hinton άγαρ που έχει ενοφθαλμιστεί με εναιώρημα (0.5 McFarland) πρότυπου ευαίσθητου στις καρβαπενέμες στελέχους *E. coli* (ATCC 29522) και κατόπιν επωάζεται στους 35°C. Εάν το εξεταζόμενο στέλεχος παράγει καρβαπενεμάση, ο δίσκος της μεροπενέμης θα έχει αδρανοποιηθεί κατά την προηγούμενη επώαση με αυτό επιτρέποντας την ανεμπόδιστη ανάπτυξη του ευαίσθητου πρότυπου στελέχους. Οι δίσκοι που επώασθηκαν σε εναιωρήματα με στελέχη που δεν παράγουν καρβαπενεμάσες έδωσαν μια σαφή ζώνη αναστολής (Εικόνα 18). Το αποτέλεσμα της δοκιμασίας μπορεί να ερμηνευθεί ακόμα και μετά από 6-8 μόλις ώρες, εάν υπάρχει ανάγκη, ωστόσο συνιστάται να αναγινώσκεται μετά από ολονύκτια επώαση. Η μέθοδος CIM αποτελεί μια εύκολη και χαμηλού κόστους μέθοδο ανίχνευσης καρβαπεμενασών, χωρίς όμως να ξεχωρίζει τον τύπο του ενζύμου, εμφανίζοντας μεγάλο ποσοστό συμφωνίας με τα αποτελέσματα της PCR μεθόδου (100% για στελέχη *Enterobacteriaceae* και 98,8% για αζυμωτικά στελέχη) (van der Zwaluw K et al, 2015; Gauthier L et al, 2017). Οι Zwaluw et al, προχώρησαν σε τροποποίηση της αρχικής μεθόδου CIM, χρησιμοποιώντας 400μl Trypticase Soy Broth (TSB) αντί για νερό, και σε επώαση μετά την προσθήκη του δίσκου μεροπενέμης για τουλάχιστον 3-4 ώρες, προκειμένου να αυξήσουν την αναλυτική ευαισθησία της μεθόδου και να ανιχνεύσουν στελέχη που παράγουν ασθενώς καρβαπενεμάσες. Επίσης, οι McMullen et al χρησιμοποίησαν την προσθήκη EDTA μέσα στο εναιώρημα με το δίσκο της μεροπενέμης για την ανίχνευση στελεχών που παράγουν MBLs (CIM-EDTA μέθοδος). Η διαφορά στη διάμετρο του δίσκου μεροπενέμης που επώασθηκε με και χωρίς EDTA πάνω από 5mm δεικνύει την παραγωγή MBLs (Εικόνα 19) (McMullen AL et al, 2017).



Εικόνα 18: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας και του αποτελέσματος της CIM μεθόδου (van der Zwaluw K et al, 2015)



Εικόνα 19: Μέθοδος CIM-EDTA για τη ανίχνευση MBLs. Στέλεχος *P. rettgeri* που παράγει άγνωστη καρβαπεναμάση (662) και στέλεχος με *bla*NDM (126 -2) που επωάσθηκαν με και χωρίς EDTA (McMullen AL et al, 2017).

7.2 Μοριακές τεχνικές

Για την επίλυση των προβλημάτων που προκύπτουν από τις φαινοτυπικές τεχνικές, την έγκαιρη εξαγωγή αποτελεσμάτων αλλά και την περαιτέρω επιδημιολογική διερεύνηση των απομονούμενων CPE στελεχών πολλά κλινικά

εργαστήρια χρησιμοποιούν μοριακές τεχνικές, όπως η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) είτε ως απλή μέθοδο είτε ως πολυπλεκτική, η πραγματικού χρόνου PCR (Real-Time PCR), αλλά και άλλες τεχνικές όπως η μέθοδος υβριδισμού DNA και η μέθοδος αλληλούχησης DNA. Αυτές εμφανίζουν σημαντικά πλεονεκτήματα όσον αφορά στην ανίχνευση καρβαπεμενασών που δεν μπορούν να ανιχνευθούν με τις κλασσικές φαινοτυπικές μεθόδους, όπως οι τύπου OXA καρβαπενεμάσες, στην ταυτόχρονη ανίχνευση περισσότερων τύπων καρβαπενεμασών και άλλων γονιδίων αντοχής γενικότερα, στο σύντομο χρόνο εκτέλεσης της εξέτασης, στη δυνατότητα ορισμένων άμεσης εφαρμογής τους σε κλινικά δείγματα και την υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα που παρουσιάζουν. Τα κύρια μειονεκτήματά τους είναι το υψηλό κόστος, η απαιτούμενη εξειδίκευση του προσωπικού και η αδυναμία ανίχνευσης νέων γονιδίων καρβαπενεμασών (Queenan AM and Bush K, 2007).

Οι απλές μέθοδοι PCR που στοχεύουν στην ανίχνευση ενός μόνο τύπου καρβαπενεμάσης χρησιμοποιούνται ευρέως σε κλινικά εργαστήρια και σε πολλές μελέτες ως μέθοδος αναφοράς, αν και υπάρχει διάσταση απόψεων σχετικά με τους εκκινητές που πρέπει να χρησιμοποιούνται. Με την πολυπλεκτική (multiplex) και την Real-Time PCR επιδιώκεται η μείωση του χρόνου ανίχνευσης των καρβαπενεμασών, που είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τον έλεγχο των λοιμώξεων από τα στελέχη που τις παράγουν, η εντόπιση στελεχών που φέρουν πολλαπλά γονίδια αντοχής και η πιθανή εντόπιση παραλλαγών του τύπου της καρβαπενεμάσης (Dallenne C *et al*, 2010; Voets GM *et al*, 2011; Mendes RE *et al*, 2007; Bisiklis A *et al*, 2007; Hindiyeh M *et al*, 2008; Poiriel L *et al*, 2011; Monteiro J *et al*, 2012; van der Zee A *et al*, 2014). Αρκετές in-house Real-Time PCR μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί και εφαρμοσθεί σε κλινικά εργαστήρια και σε κέντρα αναφοράς, αλλά υπάρχουν και εμπορικά διαθέσιμες μέθοδοι (Avlami A *et al*, 2010; Spanu T *et al*, 2012; Kaase M *et al*, 2012; Tenover FC *et al*, 2013; O'Connor C *et al*, 2016). Τελευταία στις μοριακές τεχνικές έχει προστεθεί και η μέθοδος των μικροσυστοιχιών (microarrays method) που έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την ανίχνευση μέσω αντιδράσεων σε «πηγαδάκια» μιας ευρείας ποικιλίας γονιδίων καρβαπενεμασών, ωστόσο και αυτή στηρίζεται στην ανίχνευση προκαθορισμένων γονιδίων, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει η δυνατότητα ανίχνευσης νέων γονιδίων αντοχής (Naas T *et al*, 2011; Cohen SJ *et al*, 2012).

7.3 Άλλες τεχνικές

7.3.1 Ανίχνευση τη δραστικότητας της καρβαπενεμάσης με φασματοφωτομετρία (spectrophotometry)

Η φασματοφωτομετρία στηρίζεται στην μείωση της απορρόφησης μιας καρβαπενέμης, συνηθέστερα ιμιπενέμης, σε μήκος κύματος 297nm λόγω της υδρολυτικής δράσης εκχυλίσματος βακτηριακού ενζύμου, ακατέργαστου ή μερικώς κεκαθαρμένου, παρουσία του κατάλληλου αναστολέα της καρβαπενεμάσης (π.χ. EDTA για τις MBLs, κλαβουλανικό οξύ ή ταζομπακτάμη για τις τύπου KPC, NaCl για τις περισσότερες OXA). Αυτό το εκχύλισμα λαμβάνεται από 24ωρο καλλιέργημα του απομονωθέντος βακτηρίου μέσω μηχανικής λύσης χρησιμοποιώντας υπερήχους. Η φασματοφωτομετρία διαφοροποιεί με ακρίβεια τα βακτήρια που παράγουν καρβαπενεμάση και τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες βακτήρια με μηχανισμούς αντοχής διαφορετικούς από την παραγωγή καρβαπενεμάσης. Επιπλέον, αυτή η μέθοδος είναι φθηνότερη σε σύγκριση με τις μοριακές τεχνικές και έχει εξαιρετική ευαισθησία και ειδικότητα (100% και 98,5% αντίστοιχα). Ωστόσο, η φασματοφωτομετρία δεν κάνει διάκριση μεταξύ διαφορετικών τύπων καρβαπενεμασών, είναι χρονοβόρα και απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό. Για αυτό το λόγο δεν χρησιμοποιείται ευρέως σε κλινικά εργαστήρια αλλά ως επιβεβαιωτική μέθοδος σε εργαστηριακά κέντρα αναφοράς (Bernabeu S *et al*, 2012).

7.3.2 Ανίχνευση τη δραστικότητας της καρβαπενεμάσης με φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry Matrix)

Μια άλλη κατηγορία τεχνικών για την ανίχνευση της δραστικότητας της καρβαπενεμάσης είναι η φασματομετρία μάζας. Η πιο πρόσφατη μέθοδος αυτής της κατηγορίας είναι η MALDI-TOF MS, η φασματομετρία , δηλαδή, μάζας χρόνου πτήσης (TOF MS) που χρησιμοποιεί την τεχνική του ήπιου ιονισμού (MALDI), με τη βοήθεια ακτίνας laser σε μια μήτρα. Η βασική αρχή της μεθόδου είναι ο ιονισμός σε υψηλό κενό του εξεταζόμενου υλικού και στην επακόλουθη επιτάχυνση του σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Τα μεγέθη των θραυσμάτων του υλικού μπορούν να προσδιορισθούν από το χρόνο πλεύσης εντός του ηλεκτρικού πεδίου. Η ανίχνευση της δραστηριότητας των ενζύμων, όπως οι καρβαπενεμάσες, γίνεται μέσω της άμεσης ανίχνευσης των υδρολυτικών προϊόντων των καρβαπενεμών που έχουν μοριακή μάζα διαφορετική από αυτή των φυσικών μορίων. Για την ανίχνευση αυτών των υδρολυτικών μορίων έχουν περιγραφεί διαφορετικές μήτρες και τροποποιημένες προσεγγίσεις για την προετοιμασία του δείγματος (Sparbier K *et al*, 2012; Hrabák J *et*

al, 2012; Pan C *et al*, 2007; Burckhardt I and Zimmermann S, 2011). Η μεθοδολογία MALDI-TOF περιλαμβάνει την εναιώρηση μιας φρέσκιας βακτηριακής καλλιέργειας σε ρυθμιστικό διάλυμα, ακολουθούμενη από φυγοκέντρηση. Το σφαιρίδιο στη συνέχεια επαναιωρείται σε ένα άλλο ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει καρβαπενέμη. Μετά από επώαση στους 35°C για 1-3 ώρες, το μίγμα της αντίδρασης φυγοκεντρείται και το υπερκείμενο που περιέχει την καρβαπενέμη και τα προϊόντα της υδρόλυσής της εξετάζεται μέσω MALDI-TOF. Η δραστηριότητα της καρβαπενεμάσης προσδιορίζεται με βάση την εξαφάνιση της κορυφής που αντιστοιχεί στην φυσική καρβαπενέμη και την εμφάνιση κορυφών που αντιστοιχούν σε μεταβολίτες ως αποτέλεσμα της υδρόλυσης της καρβαπενέμης (Hrabák J *et al*, 2011). Όλες οι σχετικές μελέτες έχουν παρουσιάσει παρόμοια αποτελέσματα, δείχνοντας εξαιρετική ευαισθησία και ειδικότητα για όλες τις καρβαπενεμάσες, συμπεριλαμβανομένων και του τύπου OXA καρβαπεμενασών σε στελέχη *Enterobacteriaceae* και *A. baumannii* (Carvalhaes CG *et al*, 2013; Hooff GP *et al*, 2012). Ωστόσο, οι χειρισμοί της μεθόδου απαιτούν εκπαιδευμένο προσωπικό, ενώ είναι επιθυμητή η διάθεση λογισμικού για την αυτόματη απόκτηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων στα διαγνωστικά εργαστήρια. Η άμεση ανίχνευση της δραστηριότητας της καρβαπενεμάσης σε θετική καλλιέργεια αίματος αξιολογείται επί του παρόντος, έχοντας επιτύχει καλή ευαισθησία (Carvalhaes CG *et al*, 2014).

7.3.3 Βιοχημικές δοκιμασίες

Επίσης, αρκετές εμπορικά διαθέσιμες βιοχημικές δοκιμασίες έχουν χρησιμοποιηθεί για την έγκαιρη ανίχνευση των καρβαπενεμασών σε *Enterobacteriaceae* και *P. aeruginosa*. Οι δοκιμασίες αυτές βασίζονται στις βιοχημικές ιδιότητες των παραγόμενων προϊόντων της υδρόλυσης των καρβαπενεμών (π.χ. οξίνιση, χρωματικοί δείκτες) και σε συνδυασμό μερικές φορές με αναστολείς των καρβαπεμενασών (ταζομπακτάμης, EDTA). Τέτοιες είναι το Carba NP test, το Rapid Carb Screen Kit (Rosco Diagnostica A/S, Denmark) και το Blue-Carba test, με το πρώτο να εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα και ικανότητα να διακρίνει τους τύπους της καρβαπενεμάσης, αλλά το τελευταίο να μπορεί να ανιχνεύει τις OXA τύπου καρβαπενεμάσες σε *Acinetobacter* spp.. Γενικότερα, αυτές οι μέθοδοι είναι απλές και εύχρηστες, με ταχεία ανάγνωση του αποτελέσματος και φυσικά πολύ πιο οικονομικές από τις μοριακές μεθόδους (Pasteran F *et al*, 2010; Dortet L *et al*, 2012; Nordmann P *et al*, 2012; Tijet N *et al*, 2013; Dortet L *et al*, 2012; Dortet L *et al*, 2014; Huang TD *et al*, 2014; Pires J *et al*, 2013).

7.3.4 Εκλεκτικά χρωμογόνα καλλιεργητικά μέσα

Αρκετά εκλεκτικά χρωμογόνα καλλιεργητικά μέσα που επιτρέπουν την αναγνώριση διαφορετικών μικροοργανισμών που παράγουν καρβαπενεμάσες είναι εμπορικά διαθέσιμα, όπως το CHROMagar-KPC (CHROMagar, BBL) και Brilliance CRE άγαρ (Thermo Fisher Scientific). Τα μικροβιακά είδη διακρίνονται ανάλογα με το χρώμα των αποικιών που αναπτύσσονται στο χρωμογόνο μέσο. Παρ' ότι η αξιοπιστία των μέσων αυτών δεν έχει ακόμη αξιολογηθεί επαρκώς, εντούτοις έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για καλλιέργειες επιτήρησης (Nordmann P *et al*, 2012; Cohen Stuart J *et al*, 2013).

7.3.5 Ανοσοχρωματογραφικές μέθοδοι

Ένα είδος ανοσοχρωματογραφικής μεθόδου είναι η Lateral flow Immunoassay (LFI)-Antibody based method (NG-test Carba 5, GN Biotech), με την οποία ανιχνεύεται η παραγωγή των 5 σημαντικότερων καρβαπεμενασών (NDM, KPC, OXA-48, VIM και IMP) με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων σε μια κασσέτα (Boutal H *et al*, 2018). Ανιχνεύει μόνο τα στοχευμένα ένζυμα και τις παραλλαγές τους, δεν δίνει διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλες καρβαπενεμάσες και επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση δύο ή περισσότερων καρβαπενεμασών. Προηγείται εκχύλιση της αποικίας του ύποπτου CPE στελέχους και το αποτέλεσμα εξάγεται σε 15 μόλις λεπτά. Η συγκεκριμένη ανοσοχρωματογραφική μέθοδος εμφανίζει ποσοστό ευαισθησίας 100% και ειδικότητας 95.3%. Άλλη παρόμοιας αρχής ανοσοχρωματογραφική μέθοδος που διατίθεται στο εμπόριο είναι το RESIST-3 O.K.N. ICT (Coris BioConcept) για την ανίχνευση KPC, OXA-48 και NDM καρβαπενεμάσες με 100% ειδικότητα και ευαισθησία. Το πλεονέκτημα πολλών ανοσοχρωματογραφικών μεθόδων LFI είναι ότι μπορούν να εφαρμοσθούν απευθείας και από θετικές αιμοκαλλιέργειες ή ουροκαλλιέργειες (Wareham DW and Abdul Momin MHF, 2017).

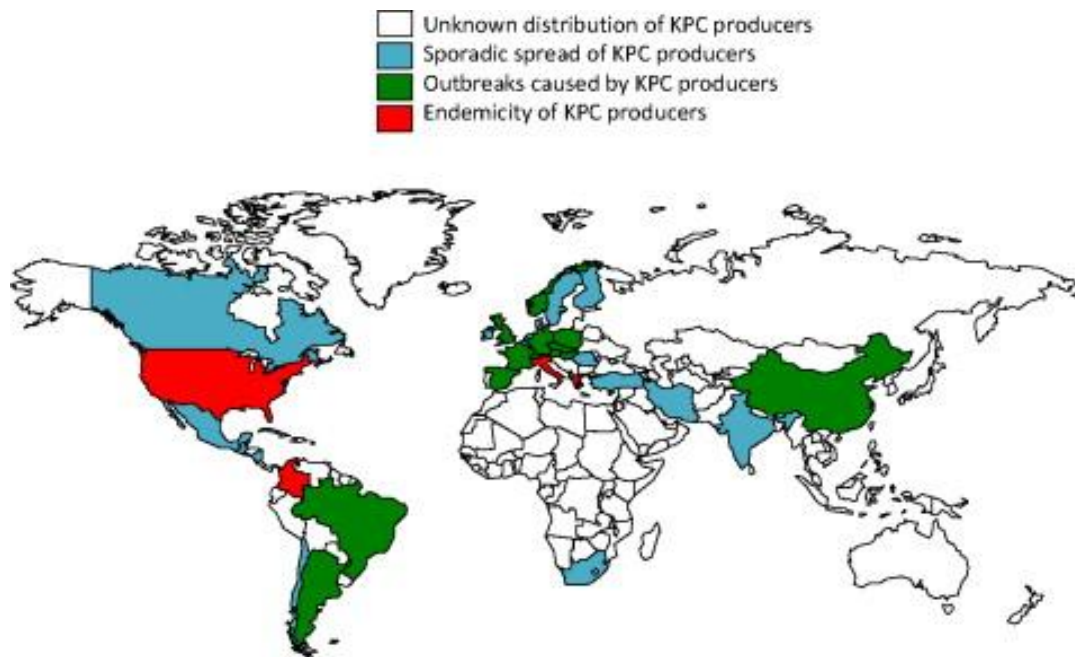
8. Επιδημιολογία καρβαπεμενασών

Το γονίδιο *bla*SME έχει ανευρεθεί σε ορισμένους υποπληθυσμούς *S. marcescens* που απομονώθηκαν, κυρίως, στο Ηνωμένο Βασίλειο και σποραδικά στις Η.Π.Α, στη Βόρεια Αμερική και την Ελβετία. Αυτό το γονίδιο έχει συσχετιστεί με μεμονωμένα περιστατικά ή μικρές επιδημίες, αλλά η εξάπλωση είναι πιο πιθανό να εμποδίζεται μέσω πολύπλοκων διαδικασιών που σχετίζονται με την έκφραση της πρωτεΐνης SME (Queenan AM *et al*, 2006; Queenan AM and Bush K, 2007; Walther-Rasmussen J and

Høiby N, 2007; Marciano DC *et al*, 2007; Mataseje LF *et al*, 2014; Poirel L *et al*, 2007; Carrër A *et al*, 2008). Επίσης, blaIMI/NMC-A έχει ανιχνευθεί σε στελέχη *Enterobacter* spp. και αφορούσαν σε σποραδικά κρούσματα στις Η.Π.Α., την Γαλλία, τη Φιλανδία, την Κροατία, την Αργεντινή και την Κίνα (Rasmussen BA *et al*, 1996; Yu Y-S *et al*, 2006; Bernusset S *et al*, 2012; Queenan AM and Bush K, 2007; Nordmann P and Poirel L, 2014; Österblad M *et al*, 2012; Nordmann P *et al*, 1993; Radice M *et al*, 2004; Pottumarthy S *et al*, 2003).

KPC τύπου καρβαπενεμάσες έχουν αναφερθεί στις Η.Π.Α., το Πουέρτο Ρίκο, την Ελλάδα, το Ισραήλ, την Ιταλία, την Κολομβία, την Τουρκία, την ανατολική ακτή της Κίνας, την Ινδία και το Ηνωμένο Βασίλειο. Έχουν ανιχνευθεί σε στελέχη *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *S. enterica*, *S. marcescens*, *Raultella* spp. και *P. aeruginosa* (Bratu *et al*, 2005; Walther-Rasmussen J and Høiby, 2007; Patel JB *et al*, 2009; Robledo IE *et al*, 2010; Nordmann P *et al*, 2011; Cantón RN *et al*, 2012; Munoz-Price LS *et al*, 2010). Τα ένζυμα KPC, που αρχικά είχαν εντοπισθεί στην βορειοανατολική ακτή των Η.Π.Α. (πρωτοανιχνεύθηκε σε ασθενή στη Βόρεια Καρολίνα), παρατηρήθηκαν σε πολλές γειτονικές πολιτείες μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα (Yigit H *et al*, 2001; Deshpande LM *et al*, 2006). Αρκετές περιπτώσεις κρουσμάτων από νοσοκομεία των Η.Π.Α. κατά τη διάρκεια της τριετίας 2001-2003 προκλήθηκαν από στελέχη *K. pneumoniae* που παρήγαγαν τις KPC-2 και KPC-3 (σημειακή μετάλλαξη της KPC-2) τα οποία έφεραν αποικισμένοι ασθενείς (Alba J *et al*, 2005; Endimiani A *et al*, 2009a; Endimiani A *et al*, 2009b). Σύμφωνα με πολυκεντρική μελέτη σε νοσοκομεία της Νέας Υόρκης, η συχνότητα απομόνωσης *K. pneumoniae* με KPC τύπου καρβαπενεμάσες, από 36% που έφτασε το 2006, μειώθηκε σε 25% το 2009 και σε 13% τη διετία 2013-2014 (Van Duin D and Doi Y, 2017). Ασθενείς από το Ισραήλ και τη Λατινική Αμερική, από τους οποίους απομονώθηκαν *K. pneumoniae* που παρήγαγαν KPC-2, δεν ανέφεραν κανένα ιστορικό ταξιδιού στις Η.Π.Α (Leavitt A *et al*, 2007; Villegas MV *et al*, 2006; Monteiro J *et al*, 2009; Pasteran FG *et al*, 2008). Στη συνέχεια ακολούθησε η εντόπισή τους και σε άλλες χώρες, όπως η Κίνα και η Ελλάδα, από την οποία υπάρχει η υπόθεση ότι εξαπλώθηκε και στην υπόλοιπη Ευρώπη (Wei Z-Q *et al*, 2007; Giakkouri P *et al*, 2009; Galani I *et al*, 2013; Wernli D *et al*, 2011). Το 2008 καταγράφηκε το πρώτο κρούσμα *K. pneumoniae* που παρήγαγε KPC-2 καρβαπενεμάση στην Ελλάδα, αν και η εισαγωγή τέτοιου στελέχους έγινε ένα χρόνο νωρίτερα στην Κρήτη. Στην Ελλάδα τα KPC τύπου στελέχη *K. pneumoniae* ενδημούν

στα τριτοβάθμια νοσοκομεία κι ευθύνονται για επιδημικά κρούσματα (Giakkouri P *et al*, 2010; Souli M *et al*, 2010). Κρούσματα από τα στελέχη αυτά σε αρκετά νοσοκομεία αναφέρθηκαν επίσης και στη Γαλλία, ενώ υψηλά είναι τα ποσοστά ανίχνευσής τους στην Ιταλία και την Πολωνία (Naas T *et al*, 2005; Carbonne A *et al*, 2010; Giani T *et al*, 2009; Baraniak A *et al*, 2009). Την διετία 2014-2015 η Ελλάδα και η Ιταλία βρίσκονταν σε «κατάσταση επιδημίας» όσον αφορά στην απομόνωση στελεχών CPE που παρήγαγαν KPC τύπου καρβαπενεμάσες. Τα αποτελέσματα μιας 10ετούς μελέτης στην Ελλάδα έδειξαν μια δραματική αύξηση στην απομόνωση στελεχών *K. pneumoniae* με γονίδιο *blaKPC*, ενώ αύξηση παρατηρήθηκε και στη συχνότητα των βακτηριαμιών από τα στελέχη αυτά (Van Duin D and Doi Y, 2017). Στην Ισπανία, επίσης, αναφέρθηκαν στελέχη *K. pneumoniae* που παρήγαγαν KPC-3 καρβαπενεμάσες για πρώτη φορά το 2010 (Robustillo Rodela A *et al*, 2012). Αντίθετα, στη Βόρεια και την Δυτική Ευρώπη (π.χ. Νορβηγία, Σουηδία, Ην. Βασίλειο, Ολλανδία, Ελβετία, κ.α.) τα ποσοστά τους είναι χαμηλά κι ευθύνονται μόνο για σποραδικά κρούσματα (Samuelsen Ø *et al*, 2009; Woodford N *et al*, 2008). Η υψηλή προσαρμοστικότητα και η εύκολη εντός των γενεών εξάπλωση των KPC είναι εμφανής και από την εντόπισή τους για πρώτη φορά στον Καναδά, όπου KPC-3 απομονώθηκαν από πέντε διαφορετικά είδη *Enterobacteriaceae* σε 8 ασθενείς (Leung V *et al*, 2012). Τα στελέχη *K. pneumoniae* ST258 που παράγουν KPC τύπου καρβαπενεμάσες αποτελούν την πλειοψηφία των πολυανθεκτικών στελεχών *K. pneumoniae* που έχουν απομονωθεί παγκοσμίως (όπως και στη Ελλάδα) καθώς εμφανίζουν υψηλή μεταδοτικότητα (Kitchel B *et al*, 2009). KPC τύπου καρβαπενεμάσες που παράγουν άλλα στελέχη *Enterobacteriaceae*, όπως *E. coli* και *Enterobacter cloacae*, έχουν ανιχνευθεί, όπως θα ήταν αναμενόμενο, σε χώρες όπου έχουν καταγραφεί υψηλά ποσοστά απομόνωσης στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν KPC τύπου καρβαπενεμάσες, όπως είναι οι Η.Π.Α., το Ισραήλ και η Ελλάδα (Bratu *et al*, 2005; Bratu *et al*, 2007; Goren MG *et al*, 2010; Urban C *et al*, 2008; Miriagou V *et al*, 2010). Θα πρέπει να επισημανθεί ότι στο Ισραήλ η εφαρμογή παρεμβάσεων ελέγχου των νοσοκομειακών λοιμώξεων από CPE έφερε θετικά αποτελέσματα καθώς σημειώθηκε μείωση της συχνότητας απομόνωσης τους, ωστόσο η αυξημένη απομόνωση CPE στελεχών από τραύματα Σύριων ασθενών που νοσηλεύονται σε Νοσοκομεία του Ισραήλ αποτελεί κίνδυνο απώλειας του ελέγχου των λοιμώξεων αυτών (Van Duin D and Doi Y, 2017).



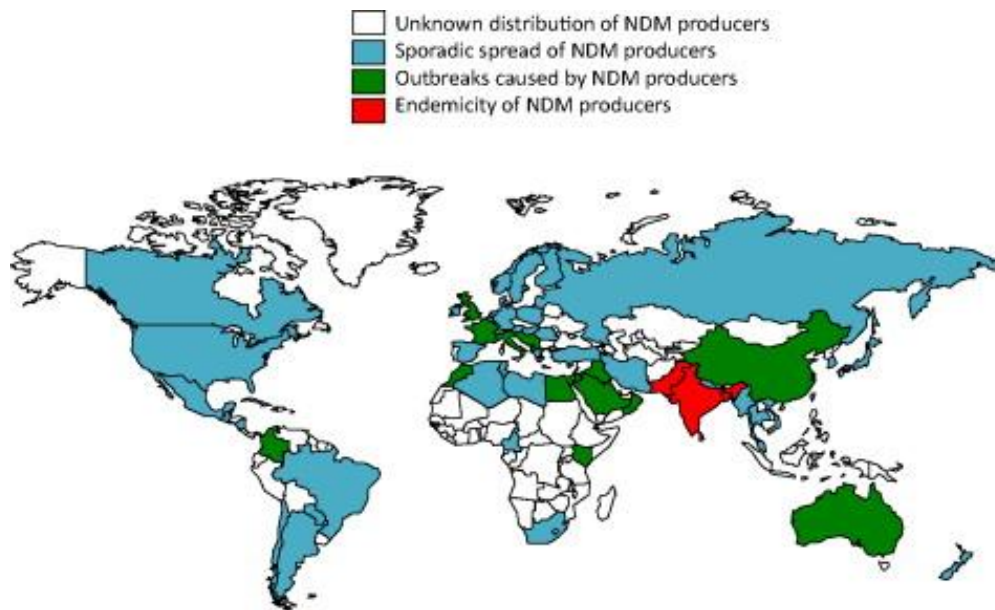
Εικόνα 20: Γεωγραφική κατανομή των μικροβιακών στελεχών που παράγουν KPC τύπου καρβαπενεμάσες (Nordmann P and Poirel L, 2014)

Αν και σπάνια, τα ένζυμα της οικογένειας GES/IBC έχουν εντοπιστεί σε όλο τον κόσμο και κυρίως στην Νότια Αφρική, την Πορτογαλία, τη Βραζιλία, την Αργεντινή, την Κίνα, την Κορέα, την Ιαπωνία, την Ελλάδα, τη Γαλλία και την Τουρκία. Οι περισσότερες από αυτές τις απομονώσεις αφορούσαν σε μεμονωμένα περιστατικά. Ωστόσο, ένας κλώνος της *P. aeruginosa* συνδέθηκε με μια μικρή επιδημία σε νοσοκομείο στη Νότια Αφρική το 2000. Τα *bla*GES γονίδια μπορούν δυνητικά να ανιχνευθούν σε διάφορα είδη *Enterobacteriaceae* και μη ζυμούντων τη γλυκόζη Gram (-) μικροοργανισμούς, ωστόσο δημιουργούν σημαντικά μικρότερο επιδημιολογικό πρόβλημα σε σχέση με τα *bla*KPC (Poirel L *et al*, 2000; Kartali G *et al*, 2002; Correia M *et al*, 2003; Duarte A *et al*, 2003; Castanheira M *et al*, 2004; Vourli S *et al*, 2004; Wachino J *et al*, 2004a; Wachino J *et al*, 2004b; Jeong SH *et al*, 2005; Pasteran F *et al*, 2005; Poirel L *et al*, 2005; Nordmann P and Poirel L, 2014).

Τα ένζυμα τύπου VIM ανιχνεύθηκαν για πρώτη φορά στη δεκαετία του 1990 στην Ιταλία και τη Γαλλία (VIM-1) και είναι πλέον ενδημικά στην Ελλάδα, την Ιταλία, την Ισπανία, τη Νότια Κορέα και την Ταϊβάν. Οι καρβαπενεμάσες τύπου IMP αναφέρθηκαν για πρώτη φορά στην Ιαπωνία στα τέλη της δεκαετίας του 1980 στην *P. aeruginosa*, και στη συνέχεια εντοπίστηκαν σε στελέχη *K. pneumoniae* και *S. marcescens* στην Ιαπωνία, στην Ταϊβάν και τη Σιγκαπούρη και σήμερα ανιχνεύονται κυρίως σε *Enterobacteriaceae* και *Pseudomonas* σε όλη την Ανατολική Ασία και τη

Βραζιλία. Ομοίως, τα ένζυμα τύπου VIM έχουν κατά κύριο λόγο ανιχνευθεί σε *Enterobacteriaceae* και *Pseudomonas* (Nordmann P and Poirel L, 2014; Queenan AM and Bush K, 2007; Grundmann H *et al*, 2010; Vatoropoulos A, 2008; Fukigai S *et al*, 2007; Lauretti L *et al*, 1999; Bae IK *et al*, 2014; Loli A *et al*, 2006; Lincopan N *et al*, 2005; Osano E *et al*, 1994; Watanabe M *et al*, 1991; Tada T *et al*, 2013; Chen S *et al*, 2014). Στελέχη *K. pneumoniae* που παρήγαγαν IMP ένζυμα απομονώθηκαν για πρώτη φορά το διάστημα 2001-2003 στην Ανατολική Ευρώπη και αργότερα στην Βόρεια Ευρώπη (Γερμανία, Γαλλία και Σκανδιναβικές χώρες) και τις Η.Π.Α. κυρίως μέσω αποικισμένων ασθενών από περιοχές που ενδημούσαν τα στελέχη αυτά, ενώ σε αυτές τις χώρες η απομόνωση στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν VIM ένζυμα είναι περιορισμένη (Cornaglia G *et al*, 2011; Grundmann H *et al*, 2010). Επίσης, στελέχη *K. pneumoniae* που παρήγαγαν IMP-4 ένζυμα προκάλεσαν νοσοκομειακά κρούσματα σε Κίνα και Αυστραλία (Mendes RE *et al*, 2008; Peleg AY *et al*, 2005). Γενικά η ανίχνευση στελεχών *Enterobacteriaceae* που παράγουν IMP ένζυμα είναι περιορισμένη στον υπόλοιπο κόσμο, και εντοπίζεται κυρίως σε Τουρκία, Λίβανο και Η.Π.Α. (Aktas Z *et al*, 2006; Daoud Z *et al*, 2008; Dixon N *et al*, 2016), ενώ σποραδικά κρούσματα από στελέχη που παράγουν VIM εντοπίστηκαν σε Τυνησία, Νότια Κορέα και Βενεζουέλα (Ktari S *et al*, 2006; Yong D *et al*, 2006; Marciano D *et al*, 2008). Στην Ελλάδα το Νοέμβριο του 2001 απομονώθηκε στέλεχος *E. coli* που παρήγαγε VIM-1, ενώ από το 2002 στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν VIM-1 απομονώθηκαν συνεχώς ειδικά σε ΜΕΘ Τριτοβάθμιων Νοσοκομείων (Cantón R *et al*, 2012). Στην Ιταλία, την Ισπανία και την Ουγγαρία τα VIM ένζυμα αποτελούν τις επικρατέστερες μεταλλο-β-λακταμάσες προκαλώντας τοπικά επιδημικά κρούσματα. Ενώ τα VIM και IMP ένζυμα εξακολουθούν να ανιχνεύονται σε όλο τον κόσμο, GIM, SIM και SPM ένζυμα δεν έχουν εξαπλωθεί πέρα από τις χώρες αρχικής εντόπισής τους (Nordmann P and Poirel L, 2014). Η VIM-2 είναι η πιο συχνά απομονούμενη MBL από πολλά μέρη του κόσμου, αλλά από το 2009, οι απομονώσεις NDM MBL αυξάνονται συνεχώς. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την NDM-1 φέρεται σε ένα πολύ κινητό γενετικό στοιχείο, με αποτέλεσμα την ταχεία εξάπλωση σε διάφορα είδη και πολλές χώρες (Kim MN *et al*, 2012; Nordmann P *et al*, 2012; Poirel L *et al*, 2012). Τα ένζυμα αυτά ανιχνεύθηκαν στην *K. pneumoniae* και *E. coli* σε έναν Σουηδό ασθενή με ουρολοίμωξη μετά την επιστροφή του από την Ινδία, καταδεικνύοντας την τάση για εξάπλωσή τους μεταξύ των μικροβιακών ειδών (Yong D *et al*, 2009; Walsh TR *et al*, 2011; Johnson AP and Woodford N, 2013). Η ινδική χερσόνησος έχει

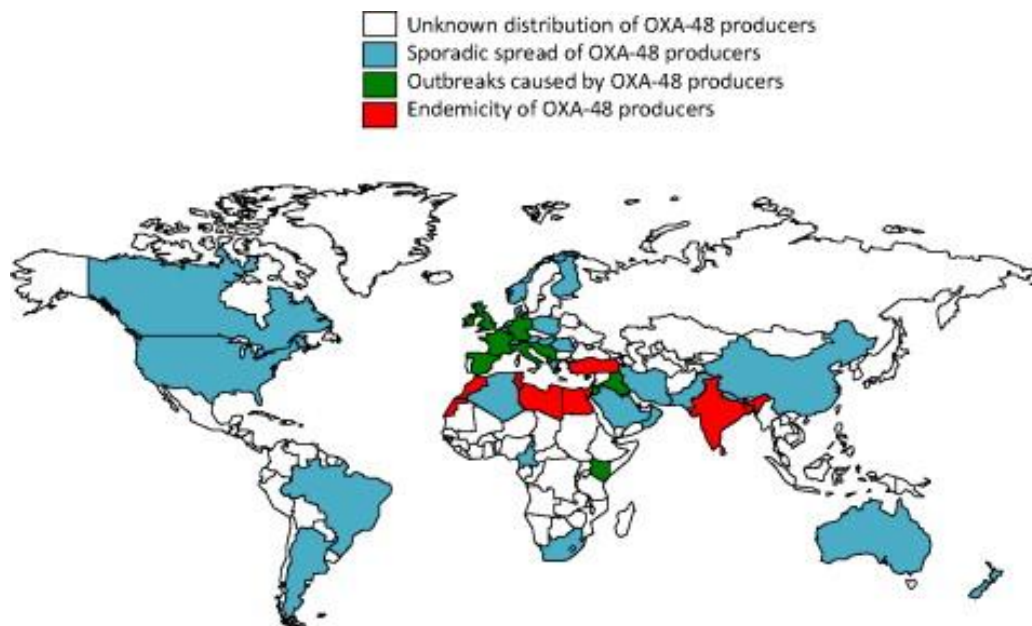
χαρακτηριστεί ως τόπος προέλευσης και δεξαμενής, όπου η επικράτηση αυτών των ενζύμων είναι περίπου 5% -18%, αλλά και στα Βαλκάνια έχει επίσης πρόσφατα εντοπιστεί μια δεξαμενή για καρβαπενεμάσες τύπου NDM (Perry JD *et al*, 2011; Day KM *et al*, 2013; Berrazeg M *et al*, 2014; Nordmann P *et al*, 2012; Poirel L *et al*, 2012; Halaby T *et al*, 2012; Voulgari E *et al*, 2014). Το NDM-1 έχει εξαπλωθεί από την Ινδία, το Πακιστάν και το Μπαγκλαντές στο Ηνωμένο Βασίλειο, τις ΗΠΑ, τη Γαλλία, την Δανία, την Κένυα, την Ιαπωνία, τον Καναδά, το Βέλγιο, την Ολλανδία, την Ταϊβάν, τη Σιγκαπούρη, την Κίνα, το Σουλτανάτο του Ομάν, την Αυστραλία, τη Βενεζουέλα, τη Βραζιλία, την Κένυα, τη Νιγηρία και τη Νότιο Αφρική (Nordmann P and Poirel L, 2014; Kim MN *et al*, 2012; Nordmann P *et al*, 2011; Kumarasamy KK *et al*, 2010; Van Duin D and Doi Y, 2017). Ένας κύριος παράγοντας κινδύνου που εντοπίζεται μεταξύ των ασθενών που έχουν λοίμωξη με βακτήρια που παράγουν NDM-1 ήταν η εισαγωγή τους σε νοσοκομεία στην Ινδία. Στην Ινδία, μάλιστα, στελέχη CPE που φέρουν *bla*NDM-1 απομονώθηκαν όχι μόνο σε ασθενείς, αλλά και σε περιβαλλοντικά υδάτινα δείγματα (όπως δημόσιες βρύσες και νερά ροών) (Van Duin D and Doi Y, 2017). Επίσης, στην Τουρκία, ειδικά σε Νοσοκομεία σε πόλεις κοντά στα σύνορα με τη Συρία, έχουν εντοπισθεί αυτόχθονα και εισαγόμενα κρούσματα *K. pneumoniae* NDM-1 αλλά και στην Ελλάδα (Girmenia C *et al*, 2016). Γενικά, ένας σημαντικός αριθμός ασθενών μολυσμένων ή αποικισμένων με στελέχη που παρήγαγαν NDM MBLs ανήκαν στο λεγόμενο «ιατρικό τουρισμό» ή σχετιζόνταν με διεπαιρωτικά ταξίδια (Nordmann P and Poirel L, 2014). Τα ένζυμα αυτά παράγονται από μικροβιακά στελέχη που προκαλούν τόσο νοσοκομειακές λοιμώξεις όσο και λοιμώξεις της κοινότητας (Nordmann P *et al*, 2011). Αν και στις Η.Π.Α. και τον Καναδά τα στελέχη CPE που παράγουν MBL ένζυμα γενικότερα αποτελούσαν ασυνήθη, το 2012 κατεγράφη στο Denver απομόνωση *K. pneumoniae* που παρήγαγε NDM-1, άγνωστης προέλευσης, ενώ τον Απρίλιο του 2017, από 25 Πολιτείες κατεγράφησαν 157 στελέχη CPE που παρήγαγαν NDM (στο Ιλινόις η εμφάνιση αυτών των στελεχών συσχετίστηκε με τη χρήση ενδοσκοπίων) (Van Duin D and Doi Y, 2017).



Εικόνα 21: Γεωγραφική κατανομή των μικροβιακών στελεχών που παράγουν NDM μεταλλο-β-λακταμάσες (Nordmann P and Poirel L, 2014).

Τα ένζυμα τύπου OXA-48 βρίσκονται κυρίως στην *K. pneumoniae* και αποτελούν μια πηγή συχνών νοσοκομειακών επιδημιών. Για πρώτη φορά ανιχνεύθηκαν στην Τουρκία το 2001, όπου και ενδημούν, και έκτοτε έχει αναφερθεί η εξάπλωσή τους στην Βόρεια Αφρική, τη Μέση Ανατολή, την Κίνα, την Ινδία και το Ηνωμένο Βασίλειο (Carrër A *et al*, 2008; Carrër A *et al*, 2010; Cuzon G *et al*, 2010; Poirel L *et al*, 2010; Potron A *et al*, 2011; Castanheira M *et al*, 2011; Moquet O *et al*, 2011; Grundmann H *et al*, 2010; Nordmann P and Poirel L, 2014; Van Duin D and Doi Y, 2017). Στις Η.Π.Α. η απομόνωση στελεχών CPE OXA-48 είναι σπάνια, αντίθετα με την Ευρώπη και ιδιαίτερα με τις Μεσογειακές χώρες όπου αποτελεί συνήθη (Girmentria C *et al*, 2016). Στη Γαλλία, την Ισπανία, το Βέλγιο και τη Ρουμανία στελέχη CPE OXA-48 ευθύνονταν για επιδημικά κρούσματα τη διετία 2014-2015 (Van Duin D and Doi Y, 2017). Στη Γαλλία, την Ολλανδία και το Μαρόκο οι καρβαπενεμάσες τύπου OXA-48 έχουν συσχετιστεί με το στέλεχος *K. pneumoniae* ST395, φανερώνοντας την πιθανή γεωγραφική διασπορά τους μέσω της μετανάστευσης (Potron A *et al*, 2011). Στην Ελλάδα το 2012 για πρώτη φορά σε Τριτοβάθμιο Νοσοκομείο αναφέρθηκε η εντόπιση ενός επιδημικού κλώνου *K. pneumoniae* (ST111) που έφερε OXA-48, CTX-M-15 και OXA-1 ένζυμα (Voulgari E *et al*, 2012). OXA-24 και OXA-40 αναφέρθηκαν σε νοσοκομειακές επιδημίες από *A.*

baumanii στην Ισπανία και την Πορτογαλία. OXA-23 έχει αναφερθεί σε νοσοκομειακά κρούσματα από *Acinetobacter* spp στη Βραζιλία, το Ηνωμένο Βασίλειο και την Κορέα. OXA-23 και OXA-58 έχουν επίσης εντοπισθεί σε λοιμώξεις κατοίκων και στρατιωτικού προσωπικού που υπηρετούν στο Ιράκ και το Αφγανιστάν. OXA-58 έχει ανευρεθεί κατά κόρον σε απομονώσεις *Acinetobacter* spp. στη Γαλλία, την Ελλάδα, τη Ρουμανία, την Ιταλία, την Τουρκία, το Κουβέιτ και την Αργεντινή (Poirel L *et al*, 2010; Nordmann P and Poirel L, 2014). Η εμφάνιση OXA-181 αποτελεί ένα αναδυόμενο πρόβλημα με αυξημένη συχνότητα στην ινδική υποήπειρο, ενώ σποραδικά κρούσματα έχουν αναφερθεί σε όλο τον κόσμο, αν και οι περισσότερες υποθέσεις σχετίζονται με τη συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή (Nordmann P and Poirel L, 2014). Τέλος, OXA-163 έχουν επίσης εντοπιστεί στην Αργεντινή και την Αίγυπτο (Poirel L *et al*, 2011; Nordmann P and Poirel L, 2014). Θα πρέπει, ωστόσο, να σημειωθεί ότι τα περισσότερα κλινικά μικροβιολογικά εργαστήρια δεν εξετάζουν την παρουσία OXA-48 ενζύμων σε CPE στελέχη και ο φαινότυπος αυτών των στελεχών (χαμηλού επιπέδου αντοχή στις καρβαπενέμες) δύσκολα αναγνωρίζεται, με συνέπεια η συχνότητα απομόνωσής τους πιθανώς να υποεκτιμάται (Van Duin D and Doi Y, 2017).



Εικόνα 22: Γεωγραφική κατανομή των μικροβιακών στελεχών που παράγουν τύπου OXA-48 καρβαπενεμάσες (Nordmann P and Poirel L, 2014).

9. Λοιμώξεις από *Enterobacteriaceae* που παράγουν καρβαπενεμάσες

Οι καρβαπενέμες, όπως η ερταπενέμη, η ιμιπενέμη, η μεροπενέμη, και η δοριπενέμη αποτελούν τους συχνότερα χρησιμοποιούμενους αντιμικροβιακούς παράγοντες στην θεραπευτική καταπολέμηση λοιμώξεων οι οποίες οφείλονται σε μικροοργανισμούς της οικογένειας *Enterobacteriaceae* που παράγουν ευρέως φάσματος βήτα-λακταμάση (ESBL) ή πλασμιδιακώς μεταφερόμενη AmpC (PAmpC) (Thomson KS, 2010). Αυτά τα παθογόνα, επίσης, είναι συχνά ανθεκτικά και σε άλλες τάξεις αντιμικροβιακών, συμπεριλαμβανομένων των κινολονών, των αμινογλυκοσιδών, της τριμεθοπρίμης – σουλφαμεθοξαζόλης, κ.α. Οι καρβαπενέμες είναι ζωτικής σημασίας για την αντιμετώπιση των απειλητικών για τη ζωή λοιμώξεων που σχετίζονται με την νοσοκομειακή φροντίδα. Δυστυχώς, η συχνότητα εμφάνισης *Enterobacteriaceae* που παράγουν καρβαπενεμάσες (CPE) έχει αυξηθεί κατά τη διάρκεια των τελευταίων 10 ετών, θέτοντας σε σοβαρό κίνδυνο τη δυνατότητα εφαρμογής αποτελεσματικών θεραπευτικών παρεμβάσεων σε ασθενείς με λοιμώξεις που οφείλονται σε CPE (Nordmann P *et al*, 2011).

Από τα στελέχη *Enterobacteriaceae* που παράγουν καρβαπενεμάσες τα πιο σημαντικά είναι η *Klebsiella pneumoniae*, ο *Proteus mirabilis*, το *Enterobacter cloacae*, η *Serratia marcescens* και η *E. coli*.

9.1 Λοιμώξεις από *Klebsiella pneumoniae*

Η *Klebsiella pneumoniae* είναι ένα gram αρνητικό βακτηρίδιο που τα στελέχη της αποικίζουν τον γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου και των θηλαστικών αλλά μπορούν να απομονωθούν και από το δέρμα, τον φάρυγγα και την ανώτερη αναπνευστική οδό των νοσηλευόμενων ασθενών. Ευθύνεται για την εμφάνιση ευκαιριακών λοιμώξεων σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς, όπως είναι οι διαβητικοί, οι ογκολογικοί ασθενείς ή οι ασθενείς που νοσηλεύονται σε μονάδες εντατικής νοσηλείας ή χρησιμοποιούν εξωσωματικές συσκευές.

Οι συχνότερες λοιμώξεις που προκαλούν τα στελέχη *Klebsiella pneumoniae* είναι οι λοιμώξεις του ουροποιητικού και του αναπνευστικού συστήματος. Στο παρελθόν, η *Klebsiella pneumoniae* αποτελούσε αιτιολογικό παράγοντα λοιμώξεων του αναπνευστικού στην κοινότητα, συμπεριλαμβανομένης μιας σοβαρής μορφής πνευμονίας. Ωστόσο, η επιδημιολογία των λοιμώξεων που προκαλεί άλλαξε τις τελευταίες δεκαετίες με την εγκατάσταση και την εξάπλωση του βακτηριδίου στα νοσοκομεία, με αποτέλεσμα η *Klebsiella pneumoniae* να ευθύνεται πλέον για το 6-

17% των ουρολοιμώξεων σε νοσοκομειακούς ασθενείς, ενώ αποτελεί το δεύτερο αίτιο βακτηριακών από gram αρνητικούς μικροοργανισμούς μετά την *E. coli*. Η θνητότητα από λοιμώξεις που προκαλούν τα στελέχη *Klebsiella pneumoniae* εμφανίζει υψηλά ποσοστά ακόμα και μετά την χορήγηση κατάλληλων αντιμικροβιακών παραγόντων (Podschun R and Ullmann U, 1998).

Βασικό χαρακτηριστικό των στελεχών *Klebsiella pneumoniae* είναι η υψηλή μεταδοτικότητα τους στους νοσοκομειακούς χώρους. Τα βακτηρίδια αυτά μπορούν να διασπαρούν εύκολα από τον γαστρεντερικό σωλήνα των ασθενών διαμέσου κυρίως των χεριών του προσωπικού σε άλλους ασθενείς και στον περιβάλλοντα χώρο (άψυχες επιφάνειες, συσκευές, κ.ά.). Ο αποικισμός του γαστρεντερικού, που μπορεί να φτάσει ακόμα και το 77%, του δέρματος και του ρινοφάρυγγα των νοσηλευόμενων ασθενών, αλλά και των χεριών του προσωπικού και του χώρου νοσηλείας ευθύνονται για την εμφάνιση επιδημικών κρουσμάτων στα νοσοκομεία και την αύξηση της θνησιμότητας, ιδίως όταν τα υπεύθυνα στελέχη είναι πολυανθεκτικά στα αντιμικροβιακά. Ο αποικισμός του γαστρεντερικού των ασθενών με πολυανθεκτικά στελέχη μπορεί να είναι μακροχρόνιος και να διαρκέσει ακόμα και μήνες, αποτελώντας με αυτό τον τρόπο σοβαρή πηγή διασποράς τους και αποικισμού και άλλων ασθενών, ιδίως όταν τα μέτρα ελέγχου των λοιμώξεων είναι περιορισμένα ή ανεπιτυχή (Podschun R and Ullmann U, 1998; Devrari JC and Pai V, 2017; Asensio A et al, 2000).

Τα στελέχη *Klebsiella pneumoniae* μπορούν να αναπτύξουν αντοχή έναντι πολλών αντιμικροβιακών, η οποία συνήθως μεταφέρεται πλασμιδιακώς. Η *Klebsiella pneumoniae* παράγει χρωμοσωμιακή SHV βήτα-λακταμάση στην οποία οφείλεται η ενδογενής αντοχή που εμφανίζει στις αμινοπενικιλίνες (Babini GS and Livermore DM, 2000). Επιπλέον, τα βακτηρίδια αυτά μπορούν εύκολα να γίνουν αποδέκτες γονιδίων αντοχής μέσω πλασμιδιακής μεταφοράς τους και να διευκολύνουν την διασπορά των γονιδίων αυτών και σε υπόλοιπα στελέχη εντεροβακτηριακών. Αυτή η ιδιότητά τους τα καθιστά πολύ σημαντικούς από επιδημιολογικής άποψης μικροοργανισμούς (Podschun R and Ullmann U, 1998; Devrari JC and Pai V, 2017).

Τα στελέχη *Klebsiella pneumoniae* μπορούν να εμφανίσουν πλασμιδιακώς προκαλούμενη αντοχή στις αμινογλυκοσίδες, στις κεφαλοσπορίνες 3^{ης} γενιάς και τις μονοβακτάμες που οφείλεται στην παραγωγή ESBL (Jacoby GA et al, 2004), ενώ πλασμιδιακές AmpC τύπου β-λακταμάσες προσδίδουν επίσης στα στελέχη αυτά αντοχή έναντι των βήτα-λακταμικών, εκτός από τις καρβαπενέμες (Philippon A et al,

2002). Για την θεραπευτική αντιμετώπιση των λοιμώξεων που προκαλούν αυτά τα ανθεκτικά στα βήτα-λακταμικά, τις αμινογλυκοσίδες και τις κεφαλοσπορίνες στελέχη χρησιμοποιήθηκαν ευρέως οι καρβαπενέμες, γεγονός που είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση των καρβαπεμενασών, αρχικώς των MBL και μετέπειτα των KPC και τύπου OXA (Nordmann P *et al*, 2009; Cuzon G *et al*, 2010).

Σε χώρες που ενδημούν τα στελέχη *Klebsiella pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάσες, η συχνότητα απομόνωσης στα νοσηλευτικά ιδρύματα κυμαίνεται από 20-40% των ασθενών. Αρχικά υπήρξε η εντύπωση ότι τα στελέχη αυτά προκαλούν λοιμώξεις κυρίως σε ασθενείς που νοσηλεύονται στις ΜΕΘ. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται εξάπλωσή τους και σε άλλα τμήματα των νοσοκομείων όπως π.χ. μονάδες μακροχρόνιας φροντίδας. Η κακή αρχική κατάσταση της υγείας του ασθενούς και η πρότερη μακροχρόνια χρήση αντιμικροβιακής θεραπείας, ιδιαίτερα των βήτα-λακταμικών και των καρβαπενεμών, έχει παρατηρηθεί ότι αποτελούν τους κύριους παράγοντες εμφάνισης των λοιμώξεων από τα στελέχη αυτά (Tzouvelekis LS *et al*, 2012). Οι κύριες λοιμώξεις των ασθενών από τους οποίους απομονώθηκαν στελέχη *Klebsiella pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάσες, σε διάφορες μελέτες, είναι οι βακτηριαιμίες, οι λοιμώξεις του αναπνευστικού, οι ουρολοιμώξεις και οι λοιμώξεις χειρουργικών τραυμάτων. Η θεραπευτική αντιμετώπιση αυτών των λοιμώξεων είναι εξαιρετικά δύσκολη, κυρίως λόγω του περιορισμού των διαθέσιμων αντιμικροβιακών παραγόντων αλλά και της ήδη επιβαρυνμένης κατάστασης των ασθενών που τις εμφανίζουν, με αποτέλεσμα η έκβασή τους να είναι επισφαλής και τα ποσοστά θνητότητας υψηλά (Pitout JDD *et al*, 2015).

9.2 Λοιμώξεις από *Proteus mirabilis*

Ο *Proteus mirabilis* είναι ένα gram αρνητικό βακτηρίδιο που ανευρίσκεται ευρέως στο περιβάλλον, στο έδαφος, στο νερό και το ζωικό βασίλειο. Επιπλέον, αποτελεί αρκετά συχνά μέλος της φυσιολογικής χλωρίδας του γαστρεντερικού συστήματος του ανθρώπου, από το οποίο υπό ορισμένες συνθήκες μπορεί να διασπαρεί σε άλλα συστήματα προκαλώντας λοιμώξεις ή στο περιβάλλον.

Ο *P. mirabilis* αποτελεί το τρίτο κατά σειρά αίτιο μη επιπλεγμένων ουρολοιμώξεων, πυελονεφρίτιδας και προστατίτιδας σε ενδονοσοκομειακούς ασθενείς, κυρίως σε αυτούς που φέρουν ουροκαθετήρες ή έχουν δομικές ανωμαλίες του ουροποιητικού συστήματος. Τα ηλικιωμένα άτομα και οι ανοσοκατεσταλμένοι

παρουσιάζουν μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης αυτών των λοιμώξεων από στελέχη *P. mirabilis*. Κύριοι παθογενετικοί παράγοντες των λοιμώξεων αυτών είναι η δυνατότητα του *P. mirabilis* να παράγει ουρεάση και τοξίνες, ο σχηματισμός biofilm και ο μορφολογικός μετασχηματισμός του, που διευκολύνουν τον αποικισμό του ουροποιητικού συστήματος από τον μικροοργανισμό αυτό. Ειδικότερα, η παραγωγή ουρεάσης σχετίζεται με τη δημιουργία λίθων στους νεφρούς, τους ουρητήρες και την ουροδόχο κύστη που βοηθούν τον περαιτέρω μικροβιακό αποικισμό των οργάνων αυτών και την πρόκληση λοιμώξεων (Foris LA and Snowden J, 2018; Armbruster CE *et al*, 2018).

Στις Η.Π.Α. έχει εκτιμηθεί ότι περίπου το 3% των νοσοκομειακών λοιμώξεων οφείλονται στον *P. mirabilis* και η απομόνωσή του στα κλινικά μικροβιολογικά εργαστήρια είναι συνήθης. Εκτός από τις λοιμώξεις του ουροποιητικού, ο *P. mirabilis* εμπλέκεται, επίσης, και στη βακτηριαιμία, στη νεογνική μηνιγγοεγκεφαλίτιδα, το εμπύημα και την οστεομυελίτιδα. Οι ενδονοσοκομειακές επιδημίες από στελέχη *P. mirabilis* είναι σπάνιες και συνήθως έχει προηγηθεί αποικισμός του γαστρεντερικού σωλήνα των ασθενών από ανθεκτικά στα αντιμικροβιακά στελέχη (O'Hara CM *et al*, 2000).

Ο *Proteus mirabilis* παράγει μια χρωμοσωμική κεφαλοσπορινάση, ενώ εμφανίζει ενδογενή αντοχή στην τετρακυκλίνη, στην νιτροφουραντοΐνη και στις πολυμυξίνες. Η αντοχή στα βήτα-λακταμικά συνήθως είναι επίκτητη και οφείλεται είτε στην παραγωγή ESBL είτε στην παρουσία πλασμιδιακής AmpC (Olaitan AO *et al*, 2014; Endimiani A *et al*, 2005; Thomson KS, 2010). Επιπλέον, μπορεί να εμφανίσει επίκτητη αντοχή στις καρβαπενέμες που οφείλεται κυρίως στην παραγωγή MBL (συνήθως VIM και NDM) και σπανιότερα στην παραγωγή KPC-τύπου καρβαπεμενασών (συχνότερα KPC-2). Επίσης, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις απομόνωσης στελεχών *P. mirabilis* που παράγουν καρβαπενεμάσες τύπου OXA (OXA-48, OXA-23, OXA-58) (Thomson KS, 2010; Chen L *et al*, 2015; Girlich D *et al*, 2017).

9.3 Λοιμώξεις από *Enterobacter cloacae*

Το *Enterobacter cloacae* είναι ένα gram αρνητικό ραβδόμορφο βακτήριο, προαιρετικά αναερόβιο που φέρει περίτριχο μαστίγιο. Ανευρίσκεται ευρέως στη φύση και αποτελεί συχνά συμβιωτικό μέλος της φυσιολογικής χλωρίδας του γαστρεντερικού συστήματος του ανθρώπου και των ζώων χωρίς να είναι πρωτεύον

παθογόνο για τον άνθρωπο, όπως είναι για τα φυτά ή τα έντομα.. Δυστυχώς, ωστόσο, μπορεί να προκαλέσει λοιμώξεις που σχετίζονται με το ουροποιητικό ή το αναπνευστικό σύστημα και να απομονωθεί από κλινικά ανθρώπινα δείγματα (Mezzatesta ML *et al*, 2012).

Τα νοσοκομειακά στελέχη *Enterobacter cloacae* αποτελούν σημαντικούς παθογόνους παράγοντες λοιμώξεων σε ασθενείς, ιδιαίτερα των νοσηλεύομενων σε μονάδες εντατικής, προκαλώντας κατά κύριο λόγο βακτηριαιμίες, λοιμώξεις του κατωτέρου αναπνευστικού συστήματος, λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, ενδοκοιλιακές λοιμώξεις, καθώς και ενδοκαρδίτιδα, σηπτική αρθρίτιδα, οστεομυελίτιδα και λοιμώξεις του δέρματος και των μαλακών ιστών. Τα στελέχη αυτά μπορούν να απομονωθούν συχνά από το δέρμα και το γαστρεντερικό σύστημα των ασθενών, τα οποία αποικίζουν (Sanders WE and Sanders CC, 1997). Τα στελέχη *E. cloacae* τείνουν να μολύνουν διάφορες ιατρικές, ενδοφλέβιες και άλλες συσκευές που χρησιμοποιούνται στο νοσοκομείο. Νοσοκομειακά κρούσματα έχουν επίσης συσχετιστεί με αποικισμό του χειρουργικού εξοπλισμού και μηχανικών μέσων καθαρισμού. Μια άλλη πιθανή πηγή για νοσοκομειακή βακτηριαιμία από *E. cloacae* είναι η μόλυνση της ηπαρίνης που χρησιμοποιείται για την συνεχή χρήση ενδοαγγειακών συσκευών (Davin-Regli A and Pagès J-M, 2015). Η ικανότητά του μικροοργανισμού αυτού να σχηματίζει biofilms και να εκκρίνει διάφορες κυτταροτοξίνες (εντεροτοξινών, αιμολυσινών, τοξίνες σχηματισμού πόρων) είναι σημαντικός παράγοντας για την παθογένεια των λοιμώξεων από αυτό (Krzymińska S *et al*, 2009).

Τα τελευταία χρόνια, τα στελέχη *E. cloacae* έχουν ενοχοποιηθεί ως ένα από τα πιο συχνά απομονούμενα νοσοκομειακά παθογόνα σε μονάδες νεογνών, με πολλές αναφερόμενες επιδημίες λοιμώξεων από αυτά, προκαλώντας ακόμα και θανάτους. Αυτά τα στελέχη μπορεί να μεταδοθούν στα νεογνά μέσω μολυσμένων ενδοφλέβιων υγρών, ολοκληρωμένων παρεντερικών διατροφών και ιατρικού εξοπλισμού. Επίσης, σημαντικός θεωρείται και ο ρόλος της μετάδοσης κλώνων *E. cloacae* μέσω διασταυρούμενης μόλυνσης από το προσωπικό των μονάδων. Επίσης, έχουν αναφερθεί αρκετές περιπτώσεις εμφάνισης λοιμώξεων από στελέχη *E. cloacae* που είναι πολυανθεκτικά στους αντιμικροβιακούς παράγοντες (Oteo J *et al*, 2013; Stoesser N *et al*, 2015).

Το *Enterobacter cloacae* έχει εγγενή αντοχή στην αμπικιλίνη, την αμοξυκιλλίνη, τις κεφαλοσπορίνες πρώτης γενιάς, και την κεφοξιτίνη λόγω

συστηματικής παραγωγής AmpC βήτα-λακταμάσης. Επιπλέον, παρουσιάζει υψηλή συχνότητα εμφάνισης ενζυματικής αντοχής στις κεφαλοσπορίνες ευρέως φάσματος, καθώς αποτελεί το τρίτο κατά σειρά συχνότητας είδος των *Enterobacteriaceae* μετά τα *E. coli* και *K. pneumoniae* που εμφανίζει αντοχή στις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς. Η αντοχή των στελεχών *E. cloacae* στις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς συνήθως προκαλείται από υπερπαραγωγή της AmpC βήτα-λακταμάσης, και ως εκ τούτου η θεραπεία με κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς μπορεί να οδηγήσει μέσω της διαδικασίας της επιλογής στην επικράτηση μεταλλαγμένων στελεχών που υπερπαράγουν AmpC. Η υπερπαραγωγή AmpC οφείλεται στην ενεργοποίηση ενός χρωμοσωμικού γονιδίου ή στην απόκτηση ενός μεταφερόμενου γονιδίου *ampC* από πλασμίδια ή άλλα κινητά στοιχεία. Τα στελέχη αυτά αποτελούν ένα νοσοκομειακό πρόβλημα που οφείλεται στην αύξηση του επιπολασμού τους μεταξύ των κλινικών απομονώσεων. Το ένζυμο αυτό προσδίδει αντοχή στις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς και τις ουρεϊδο- και καρβοξυ-πενικιλίνες και δεν αναστέλλεται με κοινούς αναστολείς των βήτα-λακταμάσεων, ενώ οι κεφαλοσπορίνες τέταρτης γενιάς διατηρούν την δράση τους έναντι των στελεχών αυτών, αλλά αν αυτά είναι ταυτόχρονα και παραγωγοί ESBL, γίνονται ανθεκτικά και σε αυτές τις κεφαλοσπορίνες. Η συχνότητα απομόνωσης στελεχών που είναι παραγωγοί των ESBLs και CTX-M είναι 5% των διαφόρων απομονώσεων σε πρόσφατες μελέτες, αφορά κυρίως ασθενείς που λάμβαναν κεφαλοσπορίνες και η απόκτηση ESBLs είναι πιο συχνά πλασμιδιακή. Η θεραπεία με καρβαπενέμενες είναι η πιο δραστική σε λοιμώξεις που προκαλούνται από αυτά τα ανθεκτικά στελέχη (Mezzatesta ML *et al*, 2012; Davin-Regli A and Pagès J-M, 2015).

Τα τελευταία χρόνια, έχουν αναφερθεί κλινικές απομονώσεις ανθεκτικών στελεχών *E. cloacae* που παράγουν καρβαπενεμάσες. Το 2010, το CDC ανέφερε την μεταφορά NDM-1 στο *E. cloacae* από τους ασθενείς που έλαβαν ιατρική περίθαλψη στην Ινδία. Ειδικά στην Ασία, έχουν αναφερθεί στελέχη που παράγουν MBLs τύπου IMP, NDM, GIM, VIM, και την καρβαπενεμάση σερίνης τύπου KPC. Η καρβαπενεμάση σερίνης τύπου OXA-48 είναι η πιο διαδεδομένη, διότι το γονίδιο της βρίσκεται σε ένα πλασμίδιο, που σχετίζεται με το *bla*-CTXM-15 γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί ESBL. Επίσης, έχει παρατηρηθεί μια αύξηση στη συχνότητα εμφάνισης αντίστασης στην ιμιπενέμη από στελέχη *E. cloacae*, κατά 0,4 έως 8%, ενώ συχνή είναι η απομόνωση στελεχών που παράγουν MBLs σε βακτηριαίμιες. Έτσι, η εμφάνιση μειωμένης ευαισθησίας στις καρβαπενέμες σε νοσοκομειακά στελέχη *E.*

cloacae μπορεί να οφείλεται στη σταδιακή συσσώρευση καθοριστικών παραγόντων πολυανθεκτικότητας σε κλώνους των μικροοργανισμών αυτών. Σήμερα, τα στελέχη *E. cloacae* αποτελούν τα δεύτερα σε συχνότητα *Enterobacteriaceae* που φέρουν καρβαπενεμάσες, ενώ έχουν αναφερθεί και στελέχη που συνεκφράζουν δύο διαφορετικού τύπου καρβαπενεμάσες (Davín-Regli A and Pagès J-M, 2015).

9.4 Λοιμώξεις από *Serratia marcescens*

Η *Serratia marcescens* είναι ένα κινητό gram αρνητικό βακτήριο που παράγει μια κόκκινη χρωστική. Ενώ εθεωρείτο αρχικώς ως ένα ακίνδυνο κοινό σαπροφυτικό μικρόβιο που ευρίσκεται σε αφθονία στο περιβάλλον ειδικά σε υγρές συνθήκες, τις τελευταίες δεκαετίες έχει αναγνωριστεί ως ένα σημαντικό ευκαιριακό παθογόνο που μπορεί να προκαλέσει νοσοκομειακές λοιμώξεις, τόσο σε ενήλικες όσο και σε παιδιατρικούς ασθενείς, και πολύ σπάνια λοιμώξεις της κοινότητας (Hejazi A and Falkiner FR, 1997; Khanna A *et al*, 2013; Polilli E *et al*, 2011)

Η *S. marcescens* εμπλέκεται σε ένα ευρύ φάσμα σοβαρών λοιμώξεων συμπεριλαμβανομένης της πνευμονίας και λοιπών λοιμώξεων του κατώτερου αναπνευστικού, των λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος, της βακτηριαιμίας, των λοιμώξεων τραύματος και της μηνιγγίτιδας (Jones RN, 2010; Su L-H *et al*, 2003; Ostrowsky BE *et al*, 2002; Passaro DJ *et al*, 1997; Wu YM *et al*, 2013). Ο μικροοργανισμός αυτός έχει, επίσης, αναφερθεί ως σημαντική αιτία οφθαλμικής λοίμωξης, κυρίως κερατίτιδας, που σχετίζεται με τη χρήση φακών επαφής (Das S *et al*, 2007). Επιπλέον, η *S. marcescens* αποτελεί ένα σπάνιο αίτιο ενδοκαρδίτιδας, κυρίως σε δύο από τις μεγαλύτερες ομάδες υψηλού κινδύνου όπως οι χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών και οι ασθενείς που υποβάλλονται σε χειρουργική επέμβαση προσθετικής βαλβίδας (Phadke VK *et al*, 2016). Οι λοιμώξεις του δέρματος και των μαλακών ιστών είναι επίσης ασυνήθιστες, αν και έχουν αναφερθεί σπάνιες περιπτώσεις διηθητικής κυτταρίτιδας και νεκρωτικής απονευρωσίτιδας (Hagiya H *et al*, 2016). Τέλος, σηπτική αρθρίτιδα από *S. marcescens* έχει επίσης αναφερθεί μετά από διαγνωστικές και θεραπευτικές ενδοαρθρικές ενέσεις (Nakashima AK *et al*, 1987).

Οι λοιμώξεις από *S. marcescens* μπορούν να προέρχονται από πολλές διαφορετικές πηγές μόλυνσης, όπως ο ιατρικός εξοπλισμός, συμπεριλαμβανομένων των νεφελοποιητών των βρογχοσκοπίων, των εξαρτημάτων των ηλεκτροκαρδιογράφων, των λαρυγγοσκοπίων, καθώς και τα μολυσμένα με τον

μικροοργανισμό υγρά, όπως τα εισπνεόμενα φάρμακα, οι προγεμισμένες σύριγγες ηπαρίνης, τα αλατούχα διαλύματα, η παρεντερική διατροφή και τα αντισηπτικά. Επίσης, έχουν ενοχοποιηθεί πολλές διαφορετικές περιβαλλοντικές πηγές, όπως οι μονάδες κλιματισμού, οι λεκάνες συλλογής ούρων, το υγρό σαπούνι, ακόμη και το νερό της βρύσης. Εκτός από τις περιβαλλοντικές πηγές, οι νοσοκομειακοί ασθενείς μπορούν να αποτελέσουν δεξαμενή για μετάδοση και λοίμωξη με *S. marcescens*. Ο γαστρεντερικός σωλήνας είναι η κυρίαρχη θέση αποικισμού με *S. marcescens*, όπως συμβαίνει άλλωστε και για τα περισσότερα μέλη της οικογένειας των *Enterobacteriaceae* (Lewis AM *et al*, 1998; Wilhelmi I *et al*, 1987; Tanaka T *et al*, 2004; Peltroche-Llacsahuanga H *et al*, 1999; Su L-H *et al*, 2003; Khanna A *et al*, 2013; Horcajada JP *et al*, 2006).

Ανεξάρτητα από την πηγή ή δεξαμενή, ο συνηθέστερος τρόπος ενδοноσοκομειακής μετάδοσης της *S. marcescens* θεωρείται ότι είναι η μετάδοση χέρι-με-χέρι με το προσωπικό του νοσοκομείου. Ειδικότερα όταν υπάρχουν παράγοντες όπως η σοβαρή κλινική κατάσταση του νοσηλευόμενου ασθενούς, η μακρά παραμονή στο θάλαμο ή τη μονάδα και η συχνή έκθεση σε ιατρικές παρεμβάσεις, που αυξάνουν την συχνότητα και την ένταση της άμεσης επαφής με τα χέρια του προσωπικού, η μετάδοση του μικροοργανισμού είναι ευκολότερη. Επίσης, ως δεξαμενή μετάδοσης της *S. marcescens* έχουν ενοχοποιηθεί ακόμα και τα τεχνητά νύχια στα χέρια ασθενών, συγγενών και προσωπικού (Hejazi A *et al*, 2000; Kim B-N *et al*, 2006; Khanna A *et al*, 2013; Montagnani C *et al*, 2015; van Ogtrop ML *et al*, 1997).

Οι ασθενείς που διατρέχουν τον μεγαλύτερο κίνδυνο για λοίμωξη από *S. marcescens* περιλαμβάνουν εκείνους με σοβαρή σωματική αναπηρία ή διαταραχή του ανοσοποιητικού συστήματος, αυτούς που έλαβαν αγωγή με αντιβιοτικά ευρέως φάσματος και τους ασθενείς που νοσηλεύονται στη ΜΕΘ ή τα νεογνά σε μονάδες προώρων, που υποβάλλονται σε επεμβατικούς χειρισμούς. Η ύπαρξη μόνιμου ουροκαθετήρα είναι ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για λοίμωξη από *S. marcescens* και σχετίζεται με την εγγύτητα των ασθενών που φέρουν ουροκαθετήρα με άλλους καθετηριασμένους ασθενείς που είναι αποικισμένοι ή έχουν μολυνθεί με τον μικροοργανισμό. Η αναπνευστική οδός θεωρείται, επίσης, ως μια σημαντική πύλη εισόδου για τα στελέχη *S. marcescens*. Οι νοσοκομειακές λοιμώξεις που προκαλούν τα στελέχη *S. marcescens* που είναι ανθεκτικά σε αντιμικροβιακούς παράγοντες περιλαμβάνουν λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος σε ασθενείς με

μόνιμους καθετήρες, λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος σε διασωληνωμένους ασθενείς και βακτηριαμίες σε μετεγχειρητικούς ασθενείς, ιδιαίτερα σε εκείνους με ενδοφλέβιους καθετήρες (Jones RN, 2010; Su L-H *et al*, 2003; Ostrowsky BE *et al*, 2002; Kim B-N *et al*, 2006; Maragakis LL *et al*, 2008; Khanna A *et al*, 2013; Chaskar P *et al*, 2014) .

Τα στελέχη *S. marcescens* είναι εγγενώς ανθεκτικά στα βήτα-λακταμικά, όπως αμοξυκιλλίνη, αμοξυκιλλίνη-κλαβουλανικό, αμπικιλλίνη- σουλβακτάμη και αρκετές κεφαλοσπορίνες παλαιότερης γενιάς. Η αντίσταση αυτή αποδίδεται στην παρουσία ενός ενζύμου βήτα-λακταμάσης, της χρωμοσωμικής AmpC. Επίσης, εμφανίζουν ενδογενή αντοχή στις πολυμυξίνες. Ωστόσο, τα στελέχη αυτά μπορούν να εκφράσουν την επαγωγή AmpC, η οποία, κάτω από την παρουσία βήτα-λακταμικών, ιδίως κεφαλοσπορινών τρίτης γενιάς, προκαλεί συστηματική παραγωγή υψηλών επιπέδων βήτα-λακταμάσης, με αποτέλεσμα να επιδεικνύουν κλινικά σημαντική διασταυρούμενη αντοχή στα περισσότερα βήτα-λακταμικά, συμπεριλαμβανομένων των κεφαλοσπορινών ευρέως φάσματος, των μονοβακταμών και των βήτα-λακταμικών σε συνδυασμό με αναστολέα β-λακταμάσης. Επιπλέον, η *S. marcescens* μπορεί να εκφράσει την πλασμιδιακώς μεταφερόμενη ESBL, συνηθέστερα CTX-M ESBL, με αποτέλεσμα να εμφανίσει αντοχή και σε κεφαλοσπορίνες ευρέως φάσματος, ενώ συχνά επιδεικνύουν διασταυρούμενη αντοχή με άλλες τάξεις αντιβιοτικών συμπεριλαμβανομένων των αμινογλυκοσιδών και των φθοριοκινολονών, περιορίζοντας τις θεραπευτικές επιλογές. Αυτά τα πολυανθεκτικά στελέχη *S. marcescens* έχουν ενοχοποιηθεί για λοιμώξεις σε μονάδες νεογνών, σε ΜΕΘ και μονάδες μεταμόσχευσης (Jacoby GA , 2009; Livermore DM, 1995; Ruppé É *et al*, 2015; Raimondi A *et al*, 2001; Cheng KC *et al*, 2006).

Οι ευρέως φάσματος καρβαπενέμες, όπως η ιμιπενέμη και η μεροπενέμη, αντιστέκονται στην αδρανοποίηση από την χρωμοσωμική AmpC και την πλασμιδιακή ESBL. Παρ' όλα αυτά, υπάρχει ανησυχητική εξάπλωση της αντίστασης στις καρβαπενέμες και μεταξύ των στελεχών *S. marcescens*, που οφείλεται κυρίως στις καρβαπενεμάσες τύπου SME-1, SME-2 και SME-3, μετά από αναφερόμενη αυξημένη κλινική χρήση των καρβαπενεμών. Επίσης, έχει αναφερθεί και περίπτωση λοίμωξης από *S. marcescens* που έφερε MBL στην Ιαπωνία , αλλά και επιδημία από στελέχη που έφεραν GES-1 σε ολλανδικό νοσοκομείο. Πιο ανησυχητικά είναι τα κρούσματα με λοίμωξη από στελέχη *S. marcescens* που παρήγαγαν τύπου KPC καρβαπενεμάσες, παρ' ότι ήταν μεμονωμένα, εξαιτίας της πολυαντοχής που

προκαλούν. Δεν είναι ασύνηθες, επίσης, να εμφανισθεί σε στελέχη *S. marcescens* συνδυασμός αντοχής στα βήτα-λακταμικά μέσω της μείωσης της διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης από μετάλλαξη των πορινών και την ταυτόχρονη έκφραση AmpC και καρβαπεμενασών (Naas T *et al*, 1995; Deshpande LM *et al*, 2006; Walther-Rasmussen J and Høiby N, 2007; Queenan AM *et al*, 2000; Tsakris A *et al*, 2010)

9.5 Λοιμώξεις από *E. coli*

Η *Escherichia coli* είναι ένα gram αρνητικό βακτήριο, το επικρατέστερο της οικογένειας των *Enterobacteriaceae*, που είναι ευρέως διαδεδομένο στο φυσικό περιβάλλον και αποτελεί μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του γαστρεντερικού συστήματος του ανθρώπου και των ζώων. Στους ανθρώπους το γαστρεντερικό σύστημα αποικίζεται από την *E. coli* μέσα στις πρώτες ώρες της ζωής των νεογέννητων και υπό κανονικές συνθήκες ο μικροοργανισμός αυτός δεν έχει παθογόνο δράση, αλλά ευθύνεται και για πολλές σημαντικές φυσιολογικές λειτουργίες ως μέρος της χλωρίδας του εντέρου. Ωστόσο, η *E. coli* μπορεί να έχει και λοιμογόνο δράση όταν αναπτυχθεί σε ικανό αριθμό ή όταν κατά κάποιο τρόπο διαφύγει από τους προστατευτικούς δομικούς φραγμούς ή την ανοσιακή άμυνα του ξενιστή (Nataro JP and Kaper JB, 1998; Sousa CP, 2006).

Τα στελέχη *E. coli* μπορούν να προκαλέσουν, κατά κύριο λόγο, λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, ενδοκοιλιακές λοιμώξεις (χολοκυστίτιδα, χολαγγειίτιδα, περιτονίτιδα), βακτηραιμία, πνευμονία, διαρροϊκά σύνδρομα, νεογνική μηνιγγίτιδα και σήψη (Vila J *et al*, 2016; Goldstein EJ and Snyderman DR, 2004; Marrie TJ *et al*, 1998). Το ουροποιητικό σύστημα είναι η πιο συνηθισμένη εστία λοίμωξης από *E. coli*, με αποτέλεσμα το 75% των μη επιπλεγμένων και το 65% των επιπλεγμένων ουρολοιμώξεων να προκαλούνται από τον μικροοργανισμό αυτό. Επίσης, αποτελεί το υπεύθυνο ουροπαθογόνο για το 80-90% των λοιμώξεων του ουροποιητικού στην κοινότητα και για το 30-50% των νοσοκομειακών ουρολοιμώξεων. Το ποσοστό υποτροπής σε γυναίκες 6 μήνες μετά την πρώτη λοίμωξη από *E. coli* είναι 25%. Οι λοιμώξεις που προκαλούνται από ουροπαθογόνα στελέχη *E. coli* περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένων της απλής ουρηθρίτιδας / κυστίτιδας, της συμπτωματικής κυστίτιδας, της πυελονεφρίτιδας, της οξείας προστατίτιδας και του προστατικού αποστήματος. Η απλή κυστίτιδα εμφανίζεται κυρίως σε γυναίκες που

είναι σεξουαλικά ενεργές και αποικίστηκαν στην περιουρηθρική περιοχή από ένα ουροπαθογόνο στέλεχος *E. coli*. Κύριος παθογόνος παράγοντας για τα ουροπαθογόνα στελέχη *E. coli* είναι τα ινίδια προσκόλλησής τους στα ουροεπιθηλιακά κύτταρα που ονομάζονται κροσσοί P ή pili. Επιπλεγμένες ουρολοιμώξεις και πυελονεφρίτιδα παρατηρούνται σε ηλικιωμένους ασθενείς με δομικές ανωμαλίες ή απόφραξη του ουροποιητικού συστήματος, όπως υπερτροφία του προστάτη ή νευρογενή κύστη ή σε ασθενείς με ουροκαθετήρα (Flores-Mireles AL *et al*, 2015; Ejrnæs K, 2011).

Οι ενδοκοιλιακές λοιμώξεις από *E. coli* προκύπτουν συνήθως από διάτρηση σπλάγχνου (π.χ. εντερικού εκκολώματος, μετεγχειρητική αναστόμωση) ή μπορεί να σχετίζονται με την ύπαρξη ενδοκοιλιακού αποστήματος (συνηθέστερα ήπατος), χολοκυστίτιδας ή χολαγγειίτιδας, με αποτέλεσμα τη διασπορά των μικροοργανισμών στην περιτοναϊκή κοιλότητα και την πρόκληση περιτονίτιδας. Τα ενδοκοιλιακά αποστήματα είναι συνήθως πολυμικροβιακά, με αποτέλεσμα η *E. coli* να απομονώνεται συχνά μαζί με άλλους κυρίως αναερόβιους μικροοργανισμούς (Vila J *et al*, 2016; Lopez N *et al*, 2011; Indar AA and Beckingham IJ, 2002; Wang MC *et al*, 2002; Wang M *et al*, 2009)

Η *E. coli* αποτελεί την κύρια αιτία νοσοκομειακής βακτηριαμίας από λοίμωξη του ουροποιητικού συστήματος, ιδίως σε περίπτωση απόφραξής του, ή από ενδοκοιλιακή λοίμωξη. Η συστηματική αντίδραση του ανθρώπινου οργανισμού στην ενδοτοξίνη (κυτοκίνες) ή τους λιποπολυσακχαρίτες του μικροοργανισμού μπορεί να οδηγήσει σε διάχυτη ενδαγγειακή πήξη και το θάνατο (Vila J *et al*, 2016).

Επιπλέον, 6 διαφορετικά στελέχη *E. coli* έχουν αναφερθεί ως αιτιολογικά παθογόνα λοιμώξεων του γαστρεντερικού. Η εντεροτοξινογόνος *E. coli* (ETEC) είναι η αιτία της διάρροιας των ταξιδιωτών, ενώ η εντεροπαθογόνος *E. coli* (EPEC) είναι μια αιτία της παιδικής διάρροιας. Η εντεροδιεισδυτική *E. coli* (EIEC) προκαλεί μια δυσεντερική λοίμωξη, όπως η *Shigella*, και η εντεροαιμορραγική *E. coli* (EHEC) προκαλεί αιμορραγική κολίτιδα ή αιμολυτικό-ουραιμικό σύνδρομο (HUS). Η εντεροαθροιστική (enteroaggregative) *E. coli* (EAggEC) συνδέεται, κυρίως, με την επίμονη διάρροια σε παιδιά στις αναπτυσσόμενες χώρες, ενώ η εντερουποστηρικτική (enteroadherent) *E. coli* (EKAEC) είναι μια αιτία της παιδικής διάρροιας και της διάρροιας των ταξιδιωτών στο Μεξικό και τη Βόρεια Αφρική. Οι ETEC, EPEC, EAggEC και EKAEC αποικίζουν το λεπτό έντερο, ενώ οι EIEC και EHEC αποικίζουν κατά προτίμηση το παχύ έντερο πριν προκαλέσουν διάρροια. Η *E. coli* που παράγει την Shiga τοξίνη (STEC) είναι από τις πιο κοινές αιτίες των τροφιμογενών

νοσημάτων. Στελέχη STEC του οροτύπου O157 -H7 έχουν προκαλέσει πολλές επιδημίες αλλά και σποραδικές περιπτώσεις αιματηρής διάρροιας και HUS (Vila J *et al*, 2016; Jafari A *et al*, 2012; Sousa CP, 2006).

Οι λοιμώξεις του αναπνευστικού από *E. coli* είναι σπάνιες και σχεδόν πάντα συνδέονται με ουρολοίμωξη από αυτή. Η πνευμονία από *E. coli* μπορεί, επίσης, να προκύψει από εισρόφιση εκκρίσεων που έχουν προηγουμένως αποικιστεί με αυτόν τον οργανισμό προς τους πνεύμονες σε σοβαρά πάσχοντες ασθενείς, προκαλώντας ως εκ τούτου νοσοκομειακή πνευμονία. Ωστόσο, η πνευμονία από *E. coli* μπορεί να είναι και εξωνοσοκομειακή σε ασθενείς οι οποίοι έχουν σοβαρή υποκείμενη νόσο, όπως είναι ο σακχαρώδης διαβήτης, ο αλκοολισμός, η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια και η ουρολοίμωξη από *E. coli*. Η πνευμονία από *E. coli* συνήθως εκδηλώνεται ως βρογχοπνευμονία των κάτω λοβών και μπορεί να επιπλακεί με εμπύημα (Marrie TJ *et al*, 1998; Peleg AY and Hooper DC, 2010).

Τα στελέχη *E. coli* είναι ένα από τα πρώτα στελέχη εντεροβακτηριακών που έχουν αναπτύξει αντοχή στις φθοριοκινολόνες και τις κεφαλοσπορίνες λόγω παραγωγής ESBLs, ιδιαίτερα μετά την παγκόσμια εξάπλωση του κλώνου *E. coli* ST131. Οι ESBLs που παράγουν πιο συχνά τα στελέχη *E. coli* είναι τα ένζυμα CTX-M. Αντίθετα, στην *E. coli*, η AmpC β-λακταμάση εκφράζεται ενδογενώς σε χαμηλό επίπεδο. Η ρύθμιση της χρωμοσωμικής έκφρασης της AmpC στις *E. coli* διαφέρει σημαντικά από ότι σε άλλα είδη *Enterobacteriaceae*. Η *E. coli* στερείται ampR, και ως εκ τούτου η έκφραση της AmpC δεν είναι επαγωγίμη. Διάφορες μεταλλάξεις στην περιοχή του υποκινητή/αναστολέα έκφρασης της AmpC στις *E. coli* έχουν ενοχοποιηθεί για την υπερέκφραση του ενζύμου. Εκτός από τις χρωμοσωμικές AmpC, στις *E. coli* μπορεί να υπάρχουν πλασμίδια που φέρουν AmpC (pAmpC), οι οποίες μεταφέρονται μέσω οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων που προέρχονται από χρωμοσωμικές AmpC άλλων *Enterobacteriaceae* (Vila J *et al*, 2016).

Επιπρόσθετα, η εμφάνιση αντοχής στελεχών *E. coli* στις καρβαπενέμες, οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρέως στη θεραπεία των λοιμώξεων από στελέχη που παράγουν ESBLs, παρ' ότι είναι σπάνια σε σχέση με την *Klebsiella pneumoniae*, ωστόσο αποτελεί υπαρκτό και σημαντικό πρόβλημα. Σε *E. coli* που εμφάνισαν αντοχή σε καρβαπενέμες ανιχνεύθηκαν ένζυμα τύπου KPC και GES. Σε ένα στέλεχος *E. coli* απομονώθηκε GES γονίδιο (blaGES - 7) που βρίσκεται σε χρωμόσωμα και είναι το μόνο blaGES γονίδιο που δεν έχει εντοπιστεί σε ιντεγκρόνιο. Επίσης, ένζυμα NDM-1 ανιχνεύθηκαν, εκτός από *K. pneumoniae*, και σε *E. coli* σε έναν Σουηδό

ασθενή μετά την επιστροφή του από την Ινδία. Τέλος, η υπερπαραγωγή AmpC μαζί με μεταλλάξεις των πορινών της εξωτερικής μεμβράνης μπορεί να μειώσει την ευαισθησία στις καρβαπενέμες, ενώ η συνύπαρξη NDM μπορεί να μειώσει την ευαισθησία και στην αζτρεονάμη (Nordmann P *et al*, 2011; Galani I *et al*, 2006; Yong D *et al*, 2009; Vila J *et al*, 2016).

Τα πολυανθεκτικά στελέχη δύνανται να προκαλέσουν λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος που είναι πιο δύσκολο να θεραπευθούν και μπορεί μερικές φορές να εξελιχθούν σε πιο σοβαρές λοιμώξεις, όπως βακτηραιμίες, οι οποίες είναι απειλητικές για τη ζωή. Αυτά τα στελέχη απομονώνονται συχνότερα σε ασθενείς που νοσηλεύονται σε ΜΕΘ, με σοβαρή υποκείμενη νόσο και εκτεταμένη χρήση αντιμικροβιακών (Zilberberg M and Shorr A, 2013; Vila J *et al*, 2016).

10. Θεραπεία λοιμώξεων από *Enterobacteriaceae* που παράγουν καρβαπενεμάσες

Η θεραπευτική αντιμετώπιση των λοιμώξεων από στελέχη *Enterobacteriaceae* που παράγουν καρβαπενεμάσες αποτελεί μια σύγχρονη πρόκληση, καθώς αυτά τα στελέχη εμφανίζουν αντοχή στα περισσότερα διαθέσιμα αντιμικροβιακά, συμπεριλαμβανομένων και των πιο νεότερων γενεών αντιβιοτικών. Η εμπειρία για την θεραπεία αυτών των λοιμώξεων προέρχεται κυρίως από τα κλινικά αποτελέσματα διαφόρων μελετών, συνήθως μικρού αριθμού ασθενών, με μικρή ή μέτρια αποδεικτική ισχύ, τα συμπεράσματα των οποίων θα πρέπει να προσαρμόζονται στα επιδημιολογικά πρότυπα κάθε νοσοκομείου και την εξέλιξη της αντίστασης των παθογόνων στελεχών. Οι κυριότεροι αντιμικροβιακοί παράγοντες που είναι περισσότερο δραστικοί έναντι των CPE στελεχών είτε ως μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμό είναι οι πολυμυξίνες, η τιγκεκυκλίνη, οι αμινογλυκοσίδες και η φωσφομυκίνη. Για την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη τόσο ο *in vitro* έλεγχος ευαισθησίας σε συγκεκριμένα αντιμικροβιακά όσο και η θέση ανάπτυξης της λοίμωξης. Ωστόσο, υπάρχουν αρκετές μελέτες που δείχνουν ότι η δραστηριότητα των αντιμικροβιακών αυτών παραγόντων βαίνει συνεχώς μειούμενη με αποτέλεσμα να υπάρχει στροφή στη θεραπεία των λοιμώξεων από CRE σε νεώτερους αντιμικροβιακούς παράγοντες, που ολοένα και αναπτύσσονται (Tzouveleakis LS *et al*, 2012; Tzouveleakis LS *et al*, 2014).

10.1 Πολυμυξίνες

Οι πολυμυξίνες αποτελούν μια κατηγορία πολυπεπτιδικών αντιβιοτικών που απαρτίζεται από 5 μέλη. Η *in vitro* ευαισθησία στις πολυμυξίνες, κυρίως στην κολιστίνη και την πολυμυξίνη Β, μεταξύ των κλινικά απομονωθέντων στελεχών CPE κυμαίνεται σε παγκόσμιο επίπεδο από 80-100%. Ωστόσο, σε ορισμένες περιοχές, με κλωνική επικράτηση ανθεκτικών στελεχών, το ποσοστό αυτό είναι χαμηλότερο (Bogdanovich T *et al*, 2011; Mezzatesta ML *et al*, 2011; Kontopoulou K *et al*, 2010). Η κολιστίνη χρησιμοποιείται ευρύτερα σε σχέση με την πολυμυξίνη Β και η βακτηριοκτόνος δράση της εξαρτάται από τα επίπεδα της συγκέντρωσής της (Dudhani RV *et al*, 2010). Παλαιότερα χρησιμοποιούνταν σπανίως λόγω της νεφροτοξικότητάς τους, ωστόσο μετά την εμφάνιση των πολυανθεκτικών gram αρνητικών μικροοργανισμών, όπως *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Klebsiella* spp. και *Enterobacter* spp. έναντι των οποίων είναι δραστικές, το ενδιαφέρον για τη χρήση τους αυξήθηκε. Η κολιστίνη είναι συχνά ο μόνος αντιμικροβιακός παράγοντας που είναι δραστική ενάντια στα CPE στελέχη και που επιτυγχάνει επαρκή συγκέντρωση στον ορό του αίματος των ασθενών κατά τη θεραπεία των βακτηριαμιών. Ωστόσο, δεν υπάρχουν επαρκείς μελέτες που να καθορίζουν με σαφήνεια την βέλτιστη κλινικά δόση χορήγησής της (Arnold RS *et al*, 2011; Plachouras D *et al*, 2009).

Η νεφροτοξικότητα που σχετίζεται με την κολιστίνη έχει αποδειχθεί ότι είναι μικρότερη από ό,τι εθεωρείτο στο παρελθόν, καθώς παρατηρείται σε περίπου 10-15% των περιπτώσεων, στις περισσότερες είναι παροδική και πιθανώς σχετίζεται με την δοσολογία και τη διάρκεια της θεραπείας (Falagas ME and Rafailidis PI, 2009; Pogue JM *et al*, 2011; Dalfino L *et al*, 2012). Ωστόσο, κλινικές μελέτες έχουν δείξει, ότι χαμηλά δοσολογικά σχήματα της κολιστίνης ή παρατεταμένη χορήγησή της δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά και σχετίζονται με πιθανή ανάπτυξη αντοχής και αυξημένη θνητότητα. Ο συνεχής καθορισμός της δόσης με βάση τη νεφρική λειτουργία σε μια παρατεταμένη θεραπεία μπορεί να μειώσει την νεφροτοξικότητα της κολιστίνης και να προκαλέσει μικρού έως μέτριου βαθμού νεφρική βλάβη (Falagas ME *et al*, 2010; Daikos GL and Markogiannakis A, 2011).

Τα είδη *Proteus* spp. και *Serratia* spp. είναι ενδογενώς ανθεκτικά στην κολιστίνη. Αντίσταση στην κολιστίνη μπορούν να αναπτύξουν πιο συχνά τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *K. pneumoniae* από ό,τι τα MDR στελέχη *A. baumannii* ή *P. aeruginosa*. Η αυξημένη χρήση αυτού του αντιμικροβιακού

παράγοντα συνδέεται με την εμφάνιση στελεχών με ετεροαντοχή (heteroresistance), λόγω αλλαγής της δομής ενός πολυσακχαρίτη της μεμβράνης τους. Η ανάπτυξη της αντίστασης κατά τη διάρκεια της θεραπείας μπορεί να σχετίζεται με την ταυτόχρονη παρουσία ετεροανθεκτικών υποπληθυσμών (Matthaiou DK *et al*, 2008; Samonis G, *et al*, 2010; Meletis G *et al*, 2011).

10.2 Τιγκεκυκλίνη

Η τιγκεκυκλίνη είναι ένας βακτηριοστατικός παράγοντας που ανήκει στις γλυκυλκυκλίνες (ανάλογο της μινοκυκλίνης) και έχει *in vitro* καλό προφίλ ευαισθησίας. Η τιγκεκυκλίνη εμφανίζει εξαιρετική δραστικότητα έναντι πολυανθεκτικών gram αρνητικών νοσοκομειακών παθογόνων, όπως *A. baumannii*, *K. pneumoniae* και άλλων εντεροβακτηριακών, ενώ δεν είναι δραστική έναντι *P. aeruginosa*, *Proteus* spp. και *Providencia* spp. Αρκετές μελέτες ανέφεραν καθυστερημένη εξάλειψη ακόμα και επανεμφάνιση των παθογόνων, καθώς και την ανάγκη για παρατεταμένη χορήγηση για να επιτευχθεί το επιθυμητό κλινικό αποτέλεσμα. Η δραστικότητα της τιγκεκυκλίνης είναι εξαρτώμενη από τον χρόνο και, ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να παραταθεί ο μέγιστος χρόνος έκθεσης για να διατηρήσει τα επίπεδα της στο αίμα πάνω από το MIC ευαισθησίας της. Γι' αυτό το λόγο και η τιγκεκυκλίνη δεν είναι συνιστάται μόνη της για την θεραπεία της βακτηριαμίας, των αναπνευστικών ή άλλων σοβαρών λοιμώξεων (Mazzei T and Novelli A, 2009; Bhavnani SM *et al*, 2012; Falagas ME *et al*, 2011; Burkhardt O *et al*, 2009).

Στελέχη *Enterobacteriaceae* με επίκτητη αντοχή σε αυτό το φάρμακο (λόγω απορρύθμισης του μηχανισμού αντλιών εκροής, που προκαλείται από γονιδιακές μεταλλάξεις) έχουν αναφερθεί μεταξύ των διαφόρων κλινικών απομονώσεων. Η τιγκεκυκλίνη είναι αποτελεσματική σε ενδοκοιλιακές λοιμώξεις, λοιμώξεις του δέρματος και των μαλακών μορίων καθώς και στην πνευμονία από αναπνευστήρα, ωστόσο σε περιπτώσεις σοβαρών λοιμώξεων ορισμένες συγκριτικές μελέτες ανέφεραν αυξημένη συνολική θνησιμότητα σε μονοθεραπεία με τιγκεκυκλίνη. Σε αυτές τις περιπτώσεις προτείνεται συνδυασμός της τιγκεκυκλίνης με άλλους αντιμικροβιακούς παράγοντες αποτελεσματικούς έναντι των MDR μικροβιακών στελεχών. Επίσης, δεν συνιστάται για τη θεραπεία ουρολοιμώξεων λόγω των χαμηλών επιπέδων του φαρμάκου στα ούρα καθώς απεκκρίνεται από τη χολή (Anthony KB *et al*, 2008; Kelesidis T *et al*, 2008; Bodmann KF *et al*, 2012).

10.3 Αμινογλυκοσίδες

Η αντίσταση στις αμινογλυκοσίδες είναι αυξημένη μεταξύ των στελεχών CPE. Σε ευαίσθητα στην γενταμικίνη μικροβιακά στελέχη, *in vitro* δεδομένα έχουν δείξει ταχεία βακτηριοκτόνο δράση της γενταμικίνης, η οποία αποτελεί μια σημαντική θεραπευτική επιλογή. Άλλα μικροβιακά στελέχη μπορεί να φέρουν ένζυμα τροποποίησης για την γενταμικίνη, αλλά και τις λοιπές αμινογλυκοσίδες - δηλαδή, αμικασίνη και τομπραμικίνη – οι οποίες έχουν αποδειχθεί ότι είναι λιγότερο αποτελεσματικές έναντι των λοιμώξεων που οφείλονται σε MDR στελέχη *K. pneumoniae*. Οι μελέτες σχετικά με τη χρήση των αμινογλυκοσιδών ως μονοθεραπεία σε λοιμώξεις από στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενέμασες είναι περιορισμένες, και επομένως δεν συνίσταται (Bratu S *et al*, 2005).

10.4 Φωσφομυκίνη

Η φωσφομυκίνη είναι ένα φυσικό παράγωγο του φωσφονικού οξέος που αναστέλλει τη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος σε ένα προγενέστερο στάδιο από ό,τι τα βήτα-λακταμικά αντιβιοτικά. Εμφανίζει *in vitro* δράση έναντι των *Enterobacteriaceae* που παράγουν ESBL αλλά και των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *K. pneumoniae*, ακόμα και αυτών που δεν είναι ευαίσθητα στην τιγκεκυκλίνη ή/και την κολιστίνη (Porovic M *et al*, 2010; Endimiani A *et al*, 2010; Michalopoulos A *et al*, 2010). Η φωσφομυκίνη μπορεί να αποτελέσει θεραπεία εκλογής για ουρολοιμώξεις, καθώς φαίνεται ότι είναι αποτελεσματική όταν χορηγείται *per os* σε μη επιπλεγμένες ουρολοιμώξεις. Η αποτελεσματικότητά της ως μονοθεραπεία έναντι των υπόλοιπων λοιμώξεων είναι αμφιλεγόμενη και μη επαρκώς αποδεδειγμένη. Η φωσφομυκίνη όταν χορηγείται σε συνδυασμό με κολιστίνη ή γενταμικίνη ή πιπερακυλλίνη/ταζοβακτάμη δύναται να εμφανίσει μέχρι και 100% κλινική επιτυχία κατά την θεραπεία των σοβαρών λοιμώξεων που προκαλούνται από ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *K. pneumoniae*. Το κύριο πρόβλημα σχετικά με τη χρήση της φωσφομυκίνης ως θεραπεία λοιμώξεων από CPE στελέχη έγκειται στη πιθανότητα εμφάνισης αντίστασης κατά τη διάρκεια της θεραπείας, όπως ισχύει με όλους τους αντιμικροβιακούς παράγοντες, γι' αυτό και απαιτούνται περισσότερα δεδομένα σχετικά με το όφελός της ως πρόσθετου παράγοντα κατά την θεραπεία λοιμώξεων από αυτά τα στελέχη (Karageorgopoulos DE *et al*, 2012).

10.5 Συνδυασμένη αγωγή έναντι των CPE

Από πλευράς κλινικών αποτελεσμάτων, η εμπειρία υποστηρίζει τη χρήση της συνδυασμένης αντιμικροβιακής θεραπείας σε ασθενείς με λοιμώξεις από CPE. Η συνδυασμένη θεραπεία μπορεί να είναι χρήσιμη κατά κύριο λόγο στην πρόληψη της βακτηριακής αντοχής (Arnold RS *et al*, 2011). *In vitro* μελέτες έδειξαν ότι σε συνδυασμένη χορήγηση τιγκεκυκλίνης με άλλα αντιμικροβιακά, όπως αμικασίνη, σιπροφλοξασίνη, λεβοφλοξασίνη, κολιστίνη, ιμιπενέμη, ριφαμπικίνη, αμπικιλλίνη/ σουλμπακτάμη, πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη εμφανίστηκε είτε απουσία αλληλεπίδρασης είτε συνέργεια, ενθαρρύνοντας τη συγχορήγησή τους (Akonu M *et al*, 2012; Pournaras S *et al*, 2011; Elemam A *et al*, 2010). Οι πολυμυξίνες χρησιμοποιούνται συνήθως σε συνδυασμό με άλλα αντιμικροβιακά. Σε μια μελέτη αναφέρεται ότι η ενδοφλέβια χορήγηση της κολιστίνης σε συνδυασμό με άλλα αντιβιοτικά (μεροπενέμη, κινολόνη, αμινογλυκοσίδη, αμπικιλλίνη/σουλμπακτάμη) ήταν αποτελεσματική στο 66,7% των πολυανθεκτικών μικροοργανισμών, όπως *P. aeruginosa*, *A. baumannii* και *K. pneumoniae*, ενώ εμφάνισε μικρότερο ποσοστό νεφροτοξικότητας (8%) (Kasiakou SK *et al*, 2005). Σε μια αναδρομική μελέτη 41 ασθενών με βακτηριαμία λόγω *K. pneumoniae* που παράγει KPC, διαπιστώθηκε ότι η συνδυασμένη θεραπεία αποτελούσε ανεξάρτητο παράγοντα που συσχετιζόταν με την επιβίωση. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι συνδυασμοί ήταν κολιστίνη, πολυμυξίνη B, ή τιγκεκυκλίνη σε συνδυασμό με μια καρβαπενέμη. Η θνησιμότητα εντός 28 ημερών ήταν 13,3% στην ομάδα της συνδυασμένης θεραπείας σε σύγκριση με το 57,8% στην ομάδα μονοθεραπείας. Αξίζει να σημειωθεί ότι, παρά την *in vitro* ευαισθησία, οι ασθενείς που έλαβαν μονοθεραπεία με κολιστίνη, πολυμυξίνη B ή τιγκεκυκλίνη είχαν υψηλότερη θνησιμότητα (66,7%) (Qureshi ZA *et al*, 2012). Σε μια άλλη προοπτική μελέτη παρατήρησης για την αξιολόγηση της σημασίας της συνδυασμένης θεραπείας στην έκβαση των ασθενών με λοίμωξη από στελέχη *K. pneumoniae* που παρήγαγαν VIM, η χαμηλότερη θνησιμότητα (8.3%) παρατηρήθηκε στην ομάδα των ασθενών που έλαβαν συνδυασμένη θεραπεία με δύο δραστικά φάρμακα, ένα από τα οποία ήταν μια καρβαπενέμη και το άλλο είτε κολιστίνη ή μια δραστική αμινογλυκοσίδη (Daikos GL *et al*, 2009). Επίσης, σε μια άλλη μελέτη όπου εξετάστηκε η έκβαση σε 53 ασθενείς που είχαν λοίμωξη από στελέχη *K. pneumoniae* που παρήγαγαν KPC και οι οποίοι έλαβαν ένα τουλάχιστον δραστικό φάρμακο, οι 20 ασθενείς που έλαβαν συνδυασμό είχαν ευνοϊκά αποτελέσματα στην έκβαση, ενώ

επτά από τους 15 ασθενείς που δόθηκε ένα μόνο δραστικό φάρμακο έχασαν τη ζωή τους (Zarkotou O *et al*, 2011).

Συμπερασματικά, αν και η κλινική εμπειρία για τη θεραπεία των λοιμώξεων CPE είναι αρκετά περιορισμένη, υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι τα συνδυαστικά θεραπευτικά σχήματα που περιέχουν τουλάχιστον δύο παράγοντες με *in vitro* δραστικότητα έναντι CPE παρέχουν υψηλότερη θεραπευτική δραστικότητα έναντι λοιμώξεων που προκαλούνται από αυτά τα MDR παθογόνα. Γενικά, η μονοθεραπεία με κολιστίνη, τιγκεκυκλίνη και αμινογλυκοσίδη δεν συνιστάται για τη θεραπεία βακτηριαμιών, αναπνευστικών και γενικά σοβαρών λοιμώξεων, εκτός αν δεν υπάρχουν άλλες θεραπευτικές επιλογές. Η φωσφομυκίνη θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε λοιμώξεις του ουροποιητικού. Ο συνδυασμός μιας καρβαπενέμης με έναν άλλο δραστικό παράγοντα, κατά προτίμηση αμινογλυκοσίδης ή κολιστίνης θα μπορούσε να μειώσει τη θνητότητα, με την προϋπόθεση ότι η MIC της καρβαπενέμης είναι μέχρι και 8 mg/l. Τέλος, είναι αναγκαία η ανεύρεση αναστολέων των καρβαπενεμασών, όπως αντίστοιχα ισχύει με τους ήδη διαθέσιμους αναστολείς των β-λακταμασών (κλαβουλανικό οξύ, ταζομπακτάμη, σουλμπακτάμη). Τα τελευταία χρόνια γίνονται έρευνες με παράγοντες που αναστέλλουν τις MBLs και τις KPCs, ωστόσο η παραγωγή νέων αντιβιοτικών με κοινό αναστολέα είναι δύσκολη, δεδομένου της ποικιλίας του ενεργού κέντρου που έχουν οι καρβαπενεμάσες.

10.6 Νεώτεροι αντιμικροβιακοί παράγοντες έναντι των CPE

Η ολοένα αυξανόμενη αντοχή σε αντιμικροβιακούς παράγοντες που είναι δραστικοί έναντι των CPE στελεχών έχει οδηγήσει τη διεθνή φαρμακοβιομηχανία στην αναζήτηση, την ανάπτυξη και την κλινική δοκιμασία νέων αντιμικροβιακών παραγόντων που είτε δρουν έναντι των μικροβιακών αυτών στελεχών είτε δρουν ως αναστολείς των καρβαπενεμασών, επιμηκύνοντας τον χρόνο ζωής των υφιστάμενων δραστικών αντιμικροβιακών. Μερικά ενδεικτικά αντιβιοτικά μόρια που βρίσκονται υπό προχωρημένες κλινικές δοκιμές, αν και δεν επικεντρώνονται ειδικά στα CPE στελέχη, αλλά γενικότερα στους MDR μικροοργανισμούς, εμφανίζοντας ωστόσο δράση έναντι και των CPE, είναι τα εξής:

α) Σουλφακτάμες. Οι σουλφακτάμες αποτελούν μια ομάδα των μονοκυκλικών β-λακταμικών με ισχυρή δραστικότητα έναντι των *Enterobacteriaceae*. Παρουσιάζουν δομική ομοιότητα με τις μονοβακτάμες, όπως είναι η αζτρεονάμη, που δεν επηρεάζεται από την υδρολυτική δράση των MBL ενζύμων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον

παρουσιάζει μια νέα ομάδα σουλφακταμών συνεζευγμένων με σιδηροφόρα μόρια, με κύριο εκπρόσωπο το BAL30072. Αυτή η κατηγορία σουλφακταμών χρησιμοποιεί το σύστημα μεταφοράς σιδήρου της εξωτερικής μεμβράνης για την είσοδο στο μικροβιακό κύτταρο, ακόμη και σε στελέχη με ελαττωματική διαπερατότητα. Αναστέλλει περισσότερες από μια PBPs, δεν υδρολύεται από τα MBL, KPC και OXA-48 ένζυμα, αλλά υδρολύεται από ESBL τύπου SHV. Τα πειράματα σε ζώα έχουν καταδείξει τη δραστικότητα του BAL30072 έναντι των εντεροβακτηριακών που παράγουν MBLs. Στις πειραματικές λοιμώξεις από MDR στελέχη έχει συνδυασθεί κυρίως με κολιστίνη ή μεροπενέμη (Page MG *et al*, 2009; Page MG *et al*, 2010; Landman D *et al*, 2014; Miriagou V *et al*, 2010; Higgins PG *et al*, 2012);

β) Πλαζομικίνη. Η πλαζομικίνη (plazomicin), γνωστό ως ACHN-490, είναι μια αμινογλυκοσίδη νέας γενιάς, παράγωγο της σισσομικίνης με υποκαταστάσεις στις θέσεις 1 και 6 (α- υδροξυαμινοβουτυρικό και υδροξυαιθύλ ομάδα, αντίστοιχα). Αυτό το αντιβιοτικό αντιστέκεται στα περισσότερα ένζυμα που τροποποιούν τις κλασσικές αμινογλυκοσίδες (αλλά όχι στις 16S rRNA μεθυλάσες) και παρουσιάζει ισχυρή βακτηριοκτόνο δράση έναντι πολλών MDR μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των CPE (όχι όμως έναντι των στελεχών που παράγουν NDM ένζυμα). *In vitro* δείχνει περισσότερο δραστική έναντι των *Enterobacteriaceae* και *S. aureus* και λιγότερο έναντι της *P. aeruginosa* και του *Acinetobacter*. Αυτή τη στιγμή είναι σε κλινικές μελέτες φάσης 3 για χρήση ενάντια σε επιπλεγμένες ουρολοιμώξεις, βακτηριαιμίες και πνευμονίες συνδεδεμένες με αναπνευστήρα, είτε ως μονοθεραπεία είτε ως συνδυασμός με μεροπενέμη ή τιγκεκυκλίνη. (Galani I *et al*, 2012; Livermore DM *et al*, 2011; Zhang Y *et al*, 2017; Almaghrabi R *et al*, 2014; Landman D *et al*, 2011; García-Salguero C *et al*, 2015).

γ) Αναστολείς της αμινοακυλο-tRNA συνθετάσης. Μέχρι πρόσφατα, οι αναστολείς της αμινοακυλο-tRNA συνθετάσης (αναστολείς της πρωτεϊνοσύνθεσης) περιελάμβαναν μόνο την μουπιροσίνη, έναν αναστολέα ισολευκύλ-tRNA συνθετάσης, περιορισμένης κλινικής χρήσης. Ένας νέος αναστολέας αμινοακυλο-tRNA συνθετάσης που περιέχει βόριο σε κατάλληλες συστηματικές δόσεις είναι, επίσης, δραστικό κατά των Gram-αρνητικών μικροοργανισμών. Μια πολλά υποσχόμενη ένωση, η GSK2251052 (AN3365), η οποία αναστέλλει τη λευκυλ - tRNA συνθετάση και είναι αποτελεσματική έναντι CPE και άλλων MDRs, είναι επί του παρόντος υπό κλινική αξιολόγηση (Hernandez V *et al*, 2013; O'Dwyer K *et al*, 2015).

δ) Εραβακυκλίνη. Η εραβακυκλίνη, γνωστή ως TP-434, αποτελεί μια νέα φλουροκυκλίνη, με ευρεία δράση έναντι των αερόβιων και αναερόβιων Gram-αρνητικών και Gram-θετικών μικροοργανισμών (εκτός από στελέχη *Pseudomonas aeruginosa* και *Burkholderia cepacia*), συμπεριλαμβανομένων και των πολυανθεκτικών. Η εραβακυκλίνη περιέχει το τετρακυκλικό πυρήνα που είναι κοινός στις τετρακυκλίνες, με δύο τροποποιήσεις: ένα άτομο φθορίου στη θέση C-7 και μια ομάδα πυρρολιδινοακεταμιδίου στη C-9 στον τετρακυκλικό δακτύλιο D. Είναι ένας ισχυρός αναστολέας της μετάφρασης, δεσμεύεται στο ριβόσωμα και έχει καλή αντιβακτηριακή δράση έναντι στελεχών που εκφράζουν και τις τρεις κατηγορίες επίκτητης αντίστασης για την τετρακυκλίνη. Αυτές οι ιδιότητες προσδίδουν στην εραβακυκλίνη την δυνατότητα αντιμετώπισης μιας ευρείας ποικιλίας σοβαρών λοιμώξεων, όπως οι επιπλεγμένες ουρολοιμώξεις και ενδοκοιλιακές λοιμώξεις, που προκαλούνται από ανθεκτικά παθογόνα. Ένα ακόμη πλεονέκτημά της είναι ότι η βιοδιαθεσιμότητά της μετά από per os χορήγηση είναι υψηλή (Sutcliffe JA *et al*, 2013; Zhanel GG *et al*, 2016).

ζ) Αναστολείς του LpxC. Οι αναστολείς αυτοί, στους οποίους περιλαμβάνεται το ACHN-975, δρουν στο LpxC που είναι ένα σημαντικό μόριο κατά τη διαδικασία της βιοσύνθεσης του λιπιδίου A των Gram-αρνητικών βακτηρίων. Ενώ παρουσιάζει ισχυρή δράση έναντι των *Enterobacteriaceae* και της *P. aeruginosa*, δεν είναι το ίδιο δραστικό έναντι στελεχών *A. baumannii* (Kalinin DV and Holl R, 2016; Kalinin DV and Holl R, 2017).

η) Sionogi-649266. Πρόκειται για σιδηροφόρο κεφαλοσπορίνη, που αδρανοποιεί όλες τις β-λακταμάσες και των τεσσάρων τάξεων. Είναι 10 με 1000 φορές περισσότερο σταθερή έναντι των καρβαπεμενασών σε σχέση με τη μεροπενέμη ή την κεφεπίμη. Παρουσιάζει *in vitro* δραστικότητα έναντι των CRE στελεχών και στελεχών *P. aeruginosa* και *Acinetobacter* (Ito-Horiyama T *et al*, 2016).

Εκτός από τους αντιμικροβιακούς παράγοντες που δρουν στα βακτηριακά κύτταρα, τις τελευταίες δεκαετίες έχουν γίνει προσπάθειες για την ανάπτυξη αναστολέων των β - λακταμασών. Μέχρι σήμερα διατίθενται μόνο τρεις: το κλαβουλανικό οξύ, η ταζομπακτάμη και η σουλβακτάμη, που ως συνδυασμός με β - λακταμικά αποτελούν σημαντικούς θεραπευτικούς παράγοντες (Drawz SM and Bonomo RA, 2010). Αρκετοί δυνητικοί αναστολείς των β - λακταμασών είναι υπό αξιολόγηση, η πλειοψηφία των οποίων είναι λακταμικά παράγωγα. Ενώσεις που

εμφανίζουν κλινικά σε σημαντικό επίπεδο δράση αναστολέα καρβαπεμενασών (κυρίως KPC και MBLs) είναι:

α) Αβιμπακτάμη. Η αβιμπακτάμη, παλαιότερα γνωστή ως NXL104, είναι μια μη λακταμική ένωση που αναστέλλει τις β - λακταμάσες, χωρίς ενδογενή αντιμικροβιακή δράση. Πρόκειται για μια γεφυρωμένη διαζαδικυκλο-οκτανόνη με εξαιρετική δραστηριότητα έναντι των β -λακταμασών τάξης A και C (ESBLs, AmpC και KPC), έναντι κάποιων της τάξης D (OXA-48) και της απώλειας OprD, αλλά χωρίς δραστηριότητα έναντι των καρβαπεμενασών τάξης B (MBLs). Η ικανότητά της να αναστέλλει τις KPC-τύπου καρβαπενεμάσες σε χαμηλές συγκεντρώσεις είναι σημαντική. Η *in vitro* αποτελεσματικότητα του συνδυασμού της αβιμπακτάμης με νεότερα β -λακταμικά, όπως η κεφταζιδίμη, φαίνεται στην επίδραση που έχει ο συνδυασμός αβιμπακτάμης/κεφταζιδίμης (Avycaz) στις MICs της κεφταζιδίμης σε στελέχη *Enterobacteriaceae*, όπως επίσης ο συνδυασμός της αβιμπακτάμης με την αζτρεονάμη είναι δραστήσιος και έναντι στελεχών *Enterobacteriaceae* που παράγουν MBLs. Σε κλινικές μελέτες ερευνάται η αποτελεσματικότητά του συνδυασμού αυτού στη θεραπευτική αντιμετώπιση επιπλεγμένων ουρολοιμώξεων και ενδοκοιλιακών λοιμώξεων (Bonnefoy A *et al*, 2004; Stachyra T *et al*, 2009; Temkin E *et al*, 2017; Docquier JD and Mangani S, 2017) .

β) Ρελεμπακτάμη. Η ρελεμπακτάμη, γνωστή ως MK-7655, είναι ένας αναστολέας των β -λακταμασών που προκύπτει από την προσθήκη πιπεριδίνης στο δακτύλιο της αβιμπακτάμης. Η ανασταλτική της δράση είναι παρόμοια με της αβιμπακτάμης, και η αποτελεσματικότητά της έχει αξιολογηθεί όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την ιμιπενέμη και τη σιλαστατίνη. Ο συνδυασμός ιμιπενέμης/σιλαστατίνης/ρελεμπακτάμης αναστέλλει τις καρβαπενεμάσες των τάξεων A και C, είναι δραστήσιος έναντι των ESBL, AmpC, απώλειας OprD και υπερέκφρασης ενεργητικών αντλιών ροής, και έχει δράση και έναντι των αναεροβίων. Οι φαρμακοκινητικές και κλινικές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην αποτελεσματικότητά του συνδυασμού αυτού έναντι των επιπλεγμένων ουρολοιμώξεων και ενδοκοιλιακών λοιμώξεων (Lapuebla A *et al*, 2015; Docquier JD and Mangani S, 2017; Zhanel GG *et al*, 2018; Rodríguez-Baño J *et al*, 2018).

γ) Βαρμπομπακτάμη. Η βαρμπομπακτάμη, γνωστή ως RPX7009, είναι αναστολέας των β -λακταμασών που περιέχει βορονικό οξύ. Αδρανοποιεί, επομένως, της β -λακταμάσες τάξης A και C (ESBLs, AmpC και KPC) , ενώ δεν είναι δραστήσια έναντι των MBLs και των OXA τύπου καρβαπεμενασών. Κλινικές μελέτες σταδίου 3 είναι

σε εξέλιξη και αφορούν στην δραστικότητα του συνδυασμού μεροπενέμης/βαρμπομπακτάμης (Carbavance) σε λοιμώξεις του ουροποιητικού και γενικότερα σε λοιμώξεις από στελέχη CRE (Lomovskaya O *et al*, 2017; Zhanel GG *et al*, 2018) .

δ) Παράγωγα πενέμης. Τα παράγωγα πενέμης περιλαμβάνουν το πρωτότυπο, BRL42715, με ανασταλτική δραστικότητα έναντι των β-λακταμασών σερίνης (τάξης A) και το BLI-489, που φαίνεται να μειώνει MICs της πιπερακιλλίνης έναντι εντεροβακτηριακών που παράγουν KPC ένζυμα (Petersen PJ *et al*, 2009).

ε) 1-Μεθυλοκαρβαπενέμες. Οι 1-μεθυλοκαρβαπενέμες έχουν συντεθεί με διάφορες υποκαταστάσεις στον πυρήνα της καρβαπενεμών, το οποίο περιέχει μία ομάδα μεθυλίου στην θέση C-1. Μέλη αυτή της ομάδας των αναστολέων των β-λακταμασών είναι τα J-110411 και J-111225, που αναστέλλουν τις λακταμάσες τάξης A και C καθώς και IMP-τύπου MBLs, σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Nagano R *et al*, 1999; Nagano R *et al*, 2000).

στ) Σουλφόνια. Είναι κυρίως αναστολείς των καρβαπεμενισών τάξης A. Εν τούτοις, οι ενώσεις με έναν υποκαταστάτη μερκαπτομεθυλίου στο C-6 εμφανίζουν ισχυρή ανασταλτική δραστικότητα έναντι των MBLs (Buynak JD *et al*, 2004; Docquier JD and Mangani S, 2017).

ζ) Ηλεκτρικά οξέα. Διάφορα παράγωγα ηλεκτρικού οξέος εμφανίζουν ισχυρή ανασταλτική δραστικότητα έναντι των IMP-τύπου MBLs, αποκαθιστώντας την ευαισθησία σε στελέχη *Enterobacteriaceae* που παράγουν αυτά τα ένζυμα (Moloughney JG *et al*, 2005; Docquier JD and Mangani S, 2017).

η) Θειόλες. Οι ενώσεις θειόλης, όπως τα θειομανδελικά οξέα, θεωρούνται αποτελεσματικοί αναστολείς των MBLs, ιδιαίτερα τύπου IMP και VIM. Η δράση τους έγκειται στη γεφύρωση των ιόντων ψευδαργύρου στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, αντικαθιστώντας το καταλυτικό μόριο νερού (Brem J *et al*, 2015; Tehrani KHME *et al*, 2017).

Θα πρέπει να τονισθεί ότι τα νεώτερα αντιμικροβιακά έχουν στοχευμένη δράση έναντι συγκεκριμένων β-λακταμασών, όπως αναφέρθηκε αναλυτικά σε κάθε ένα από αυτά. Το γεγονός αυτό καθιστά απαραίτητη την διαφοροποίηση των παραγόμενων ενζύμων από τα στελέχη CPE για την επιλογή της στοχευμένης αγωγής.

11. Νοσοκομειακές λοιμώξεις στην Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ)

Οι νοσοκομειακές λοιμώξεις έχει εκτιμηθεί ότι αφορούν περίπου το 9% του συνόλου των εισαγωγών στα Νοσοκομεία. Οι λοιμώξεις που σχετίζονται με νοσηλεία σε ΜΕΘ εμφανίζουν ποσοστά 5-10 φορές υψηλότερα από εκείνα των γενικών νοσοκομειακών τμημάτων, με αποτέλεσμα έως και το 45% των νοσοκομειακών λοιμώξεων να αφορούν σε ασθενείς της ΜΕΘ, αν και αυτοί οι ασθενείς καταλαμβάνουν συνήθως μόνο το 8% των κλινών ενός νοσοκομείου (Emmerson AM *et al*, 1996; Weinstein RA, 1998; Donowitz LG *et al*, 1982). Σύμφωνα με την ετήσια καταγραφή του ECDC, το 2014 το 8% των ασθενών που νοσηλεύθηκαν σε ΜΕΘ πάνω από 2 ημέρες εμφάνισαν νοσοκομειακή λοίμωξη (ECDC, 2016). Οι λοιμώξεις είναι ένα κοινό πρόβλημα για τους ασθενείς στις ΜΕΘ και συνδέονται με σημαντική νοσηρότητα, θνησιμότητα και κόστος. Οι λοιμώξεις και η σχετιζόμενη με αυτές σήψη είναι η κύρια αιτία θανάτου στις ΜΕΘ, με ποσοστά θνησιμότητας που φθάνουν το 60% και αντιπροσωπεύουν περίπου το 40% των συνολικών δαπανών της ΜΕΘ Vincent JL *et al*, 2002; Angus DC *et al*, 2001). Οι πιο συχνές και σοβαρότερες λοιμώξεις που εμφανίζονται σε ασθενείς της ΜΕΘ είναι:

α) Λοιμώξεις του κατωτέρου αναπνευστικού συστήματος, με την πνευμονία που σχετίζεται με αναπνευστήρα να αποτελεί το συχνότερο, αλλά και πιο προβληματικό είδος αυτών των λοιμώξεων. Οι λοιμώξεις αυτές εμφανίζονται τουλάχιστον 48 ώρες μετά την εισαγωγή του ασθενούς στη ΜΕΘ, του οποίου η αναπνευστική λειτουργία υποστηρίζεται μηχανικά καθ' όλη αυτή τη διάρκεια. Σύμφωνα με το ECDC, 6% των ασθενών που νοσηλεύονται στη ΜΕΘ πάνω από δύο ημέρες εμφανίζουν πνευμονία, εκ των οποίων το 98% σχετίζεται με αναπνευστήρα. Η πνευμονία που σχετίζεται με αναπνευστήρα γενικά συνδέεται με παρατεταμένη διάρκεια νοσηλείας και εμφανίζει ποικίλα ποσοστά θνησιμότητας, με τα υψηλότερα να σχετίζονται με πολυανθεκτικά μικροβιακά αίτια (*Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Klebsiella* spp., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, κ.ά.). Η διάγνωσή της είναι προβληματική και στηρίζεται όχι μόνο σε ορισμένα κλινικά συμπτώματα (αυξημένες τραχειακές εκκρίσεις, ανάγκη παροχής οξυγόνου, κ.α), αλλά κυρίως σε εργαστηριακά ευρήματα και μικροβιολογικές εξετάσεις (καλλιέργεια πτυέλων) (Vincent JL *et al*, 2009; NNIS, 2003; Dhillon R and Clark J, 2009; ECDC, 2016).

β) Βακτηριαιμίες που σχετίζονται με καθετήρες. Αυτές ορίζονται ως οι βακτηριαιμίες που εμφανίζονται σε ασθενείς με αγγειακούς καθετήρες (κεντρικούς αγγειακούς ή

περιφερικούς) αφού προηγουμένως έχουν αποκλεισθεί άλλες πηγές λοίμωξης. Σύμφωνα με το ECDC, 4% των ασθενών που παραμένουν στη ΜΕΘ πάνω από δύο ημέρες εμφανίζουν νοσοκομειακή βακτηριαιμία, το 48% των οποίων σχετίζονται με καθετήρα. Πρόκειται για λοιμώξεις που μπορούν να προληφθούν αφού συνδέονται ευθέως με τη νοσηλευτική φροντίδα. Εκτός από την σημαντική νοσηρότητα που προκαλούν και το μεγάλο κόστος νοσηλείας, οι βακτηριαιμίες που συνδέονται κατά κύριο λόγο με κεντρικούς αγγειακούς καθετήρες εμφανίζουν και σημαντικά ποσοστά θνησιμότητας που κυμαίνονται από 12% έως και 25%. Διάφοροι παράγοντες σχετίζονται με την εμφάνιση βακτηριαιμίας από καθετήρες, όπως μη τήρηση των κανόνων υγιεινής από το ιατρικό και νοσηλευτικό προσωπικό, το υλικό του καθετήρα και η χρήση λιγότερων από τα προβλεπόμενα αποστειρωμένα μέσα τοποθέτησης, η προτίμηση μηριαίας ή σφαγιτιδικής προσπέλασης και όχι η υποκλείδιος, η τοποθέτηση σε παλαιά θέση, η διάρκεια παραμονής του καθετήρα πάνω από 7 ημέρες, συνυπάρχουσες λοιμώξεις, η βαρύτητα της κατάστασης του ασθενούς (APACHE II score), η ηλικία, η χρήση στεροειδών, το μικροβιακό αίτιο (αποικισμός από υδρόφοβα βακτήρια, βακτήρια που παράγουν εξωπολυσακχαρίτες και δημιουργούν biofilms και ανθεκτικά βακτήρια), κ.α. Οι κύριοι παθογόνοι μικροοργανισμοί των βακτηριαιμιών από καθετήρες είναι οι coagulase negative *Staphylococci*, *Enterococcus* spp., ο *S. aureus*, τα gram αρνητικά βακτήρια, όπως *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *S. maltophilia*, *Klebsiella* spp., *E. coli* και άλλα *Enterobacteriaceae*, και οι *Candida* spp. Επίσης, οι βακτηριαιμίες από *Klebsiella pneumoniae* που παράγουν KPC καρβαπενεμάσες βρέθηκαν να συσχετίζονται με την ύπαρξη καθετήρα και εμφανίζουν υψηλή θνησιμότητα. (Vincent JL *et al*, 1995; Vincent JL *et al*, 2009; NNIS, 2003; Dhillon R and Clark J, 2009; ECDC, 2016; Zarkotou O *et al*, 2011).

γ) Λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος. Οι λοιμώξεις αυτές εμφανίζονται σε ασθενείς της ΜΕΘ που είναι σε ιδιαίτερα σοβαρή κατάσταση (συχνά σε σηπτικούς ασθενείς) και σχετίζονται με αυξημένη νοσηρότητα αλλά όχι με θνητότητα. Δύο είναι οι κύριοι παράγοντες κινδύνου των ουρολοιμώξεων: το γυναικείο φύλο και η διάρκεια παραμονής στη ΜΕΘ. Ενώ οι λοιμώξεις αυτές οφείλονται γενικά σε ορισμένα παθογόνα, όπως *E. coli*, *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp., *Candida* spp., *Enterococcus* spp., ειδικότερα στους ασθενείς της ΜΕΘ ως αίτια πρόκλησής τους είναι συνήθως πολυανθεκτικοί gram αρνητικοί μικροοργανισμοί, όπως *Klebsiella* spp. και *E. coli* που παράγουν ESBLs, MBLs ή KPCs, *Pseudomonas*

spp. και *Acinetobacter* spp. Σύμφωνα με το ECDC, το 3% των ασθενών που παραμένουν στη ΜΕΘ πάνω από ένα 48ωρο εμφανίζουν νοσοκομειακές λοιμώξεις του ουροποιητικού, το 98% των οποίων σχετίζονται με την ύπαρξη ουροκαθετήρα. Πολλές φορές χρειάζεται να γίνει διάκριση εάν αυτοί οι μικροοργανισμοί απλά αποικίζουν τον ουροκαθετήρα ή προκαλούν πραγματικά λοίμωξη (Zilberberg M and Shorr A, 2013; Vincent JL *et al*, 2009; NNIS, 2003; Dhillon R and Clark J, 2009; ECDC, 2016).

δ) Λοιμώξεις χειρουργικού τραύματος. Αυτές αφορούν κυρίως επιλεγμένα ενδοκοιλιακά τραύματα και θεωρούνται ιδιαίτερα σοβαρές καθώς συνδέονται με πολυμικροβιακά αίτια και υψηλή νοσηρότητα και θνητότητα. Παρ' ό,τι οι εντερόκοκκοι παραμένουν τα πιο συχνά απομονωμένα μικροβιακά στελέχη από κοιλιακά τραύματα, τα Gram αρνητικά βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae* και οι αναερόβιοι εντερικοί μικροοργανισμοί (κυρίως το *Bacteroides fragilis*) είναι από τους επικρατείς μικροβιακούς παράγοντες των λοιμώξεων αυτών. Επίσης, γίνεται όλο και πιο συχνή η απομόνωση από ασθενείς της ΜΕΘ με λοιμώξεις χειρουργικού τραύματος μικροβιακών στελεχών που έχουν πολλαπλούς παράγοντες αντοχής, όπως ESBLs ή καρβαπενεμάσες (Dhillon R and Clark J, 2009; Katsiari M *et al*, 2015).

Δεδομένα από το ECDC δείχνουν μια αύξηση στην αντοχή στις καρβαπενέμες μεταξύ των στελεχών *K. pneumoniae* που απομονώνονται σε κλινικά δείγματα αίματος και ENY από <1% το 2001 σε 61.9% το 2015 στα Ελληνικά Νοσοκομεία (ECDC, 2017). Σύμφωνα με το Ελληνικό Σύστημα Επιτήρησης Μικροβιακής Αντοχής (WHONET, 2016) η συχνότητα απομόνωσης των στελεχών αυτών σε αιμοκαλλιέργειες το 2016 ήταν 3.10/10,000 ασθενο-ημέρες στο σύνολο των νοσοκομειακών τμημάτων με την συχνότητα να ανέρχεται στο 38.2/10,000 ασθενο-ημέρες στις ΜΕΘ. Στις Η.Π.Α. τα περιστατικά νοσοκομειακών λοιμώξεων από CRE στελέχη υπολογίζονται σε 140,000 ετησίως και εμφανίζουν υψηλά ποσοστά θνησιμότητας που κυμαίνεται 26-44% (CDC, 2013; Falagas ME *et al*, 2014). Οι νοσηλευόμενοι στις ΜΕΘ έχει παρατηρηθεί ότι προσβάλλονται από ένα ευρύ φάσμα λοιμώξεων από CRE με αυξημένη θνησιμότητα (Tischendorf J *et al*, 2016). Στα υπόλοιπα εντεροβακτηριακά τα ποσοστά στελεχών με αντοχή στις καρβαπενέμες παραμένουν χαμηλά. Επιπρόσθετα, στην Ευρώπη η συνολική επίπτωση των βακτηριαμίων από στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάση τύπου KPC αυξήθηκε από 0.5 περιπτώσεις/10,000 ασθενο-ημέρες το 2005 σε 4.2 περιπτώσεις/10,000 ασθενο-ημέρες το 2014 (Spygroulou A *et al*, 2016). Η

ενδημικότητα των στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάση (CP-Kp) έχει συσχετισθεί με υψηλά ποσοστά θνητότητας (Zarkotou O *et al*, 2011; Patel G *et al*, 2008). Οι συχνότερες λοιμώξεις από CPE στελέχη που έχουν παρατηρηθεί σε ΜΕΘ στην Ελλάδα είναι η πνευμονία συνδεδεμένη με αναπνευστήρα, οι βακτηριαίμιες, οι λοιμώξεις χειρουργικών τραυμάτων, οι ενδοκοιλιακές λοιμώξεις και οι λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων (Katsiari M *et al*, 2015).

Οι ασθενείς της ΜΕΘ βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο ασυμπτωματικού αποικισμού με εντεροβακτηριακά στελέχη που είναι πολυανθεκτικά (όπως είναι αυτά που παράγουν καρβαπενεμάσες) και εμφάνισης, αργότερα, λοιμώξεων από τα στελέχη αυτά (Tischendorf J *et al*, 2016). Οι κύριοι παράγοντες κινδύνου ασυμπτωματικού αποικισμού ή εμφάνισης λοιμώξεων από εντεροβακτηριακά στελέχη που παράγουν καρβαπενεμάσες σε ασθενείς της ΜΕΘ είναι: ο παρατεταμένος χρόνος νοσηλείας, η μακροχρόνια χορήγηση β-λακταμικών (όπως κεφαλοσπορίνες 3^{ης} και 4^{ης} γενεάς), πιπερακιλλίνης/ ταζομπακτάμης, αζτρεονάμης και καρβαπενεμών καθώς και η συνδυαστική χορήγηση πέρα των τριών από αυτά αντιβιοτικών, η ακατάλληλη ως προς το είδος και την δοσολογία εμπειρική αγωγή τις πρώτες 2-3 ημέρες της νοσηλείας, η συγχορήγηση αντινεοπλασματικών φαρμάκων ή κορτικοστεροειδών, η μεγάλη ηλικία και η σοβαρότητα του υποκείμενου νοσήματος, η ύπαρξη μηχανικής αναπνευστικής υποστήριξης, αγγειακού καθετήρα και ουροκαθετήρα, η χαμηλή συμμόρφωση του προσωπικού που βρίσκεται σε συχνή επαφή με τους ασθενείς της ΜΕΘ στα μέτρα αντισηψίας των χεριών και γενικά η πλημμελής ή μη τήρηση των μέτρων ελέγχου μικροβιακού αποικισμού του περιβάλλοντος της ΜΕΘ. Τέλος, δεν πρέπει να παραγνωρίζεται και η δυνατότητα αποικισμού ή λοίμωξης ασθενών που προέρχονται από μονάδες ή από χώρες με ενδημική παρουσία CPE στελεχών (Gasink LB *et al*, 2009; Papadimitriou-Olivgeris M *et al*, 2012; Rogers BA *et al*, 2011)

12. Μέτρα ελέγχου λοιμώξεων για στελέχη εντεροβακτηριακών που παράγουν καρβαπενεμάσες

Η αντιμικροβιακή αντοχή αποτελεί μια αυξανόμενη απειλή για τη δημόσια υγεία. Οι λοιμώξεις που προκαλούνται από πολυανθεκτικούς μικροοργανισμούς (MDROs) σχετίζονται με σημαντική επιδείνωση της κλινικής κατάστασης, καθώς προκαλούν αυξημένο κίνδυνο θνησιμότητας και νοσηρότητας, και συνδέονται, εν τέλει, με την αύξηση του κόστους (Smith R and Coast J, 2013). Ενώ τα

αντιμικροβιακά φάρμακα έχουν αναμφίβολα μειώσει τη θνησιμότητα λόγω λοιμώξεων, η ανθεκτικότητα σε αυτά τα καθιστά αναποτελεσματικά. Πρόσφατα, έχει επιτευχθεί συμφωνία ότι η παγκόσμια κοινότητα θα πρέπει να δράσει για να περιορίσει όσο το δυνατόν περισσότερο αυτά τα αναδυόμενα προβλήματα (WHO, 2012; Laxminarayan R *et al*, 2013).

Καθώς, λοιπόν, οι αντιμικροβιακές θεραπευτικές επιλογές ενάντια στα πολυανθεκτικά μικρόβια, και ιδιαίτερα έναντι των CPE στελεχών, είναι περιορισμένες, η πρόληψη και ο έλεγχος των λοιμώξεων που προκαλούνται από τα στελέχη αυτά αποτελούν τα σημαντικότερα μέσα αντιμετώπισής τους (Savard P and Perl TM, 2014. Υπάρχουν ορισμένες κατευθυντήριες οδηγίες από εθνικούς (ΚΕΕΛΠΙΝΟ) και διεθνείς οργανισμούς (CDC, ECDC) σχετικά με την αντιμετώπιση των πολυανθεκτικών μικροοργανισμών (Carmeli *et al*, 2010; CDC, 2015) , ενώ υπάρχει και σχετική νομοθεσία (<http://www.moh.gov.gr/>) και εθνικά σχέδια δράσης για τον έλεγχο και την πρόληψη των λοιμώξεων και της μικροβιακής αντοχής. Τα μέτρα που προτείνονται έχουν διττή εφαρμογή καθώς αφορούν τόσο την χορήγηση των αντιβιοτικών, μέσα από προγράμματα επιτήρησης και διαχείρισης των αντιβιοτικών (ASPs), όσο και την υλοποίηση όλων εκείνων των απαιτούμενων παρεμβάσεων σχετικά με τους κανόνες υγιεινής του προσωπικού και του νοσοκομειακού περιβάλλοντος.

Τα κύρια μέτρα ελέγχου λοιμώξεων από εντεροβακτηριακά που παράγουν καρβαπενεμάσες είναι: η ορθή χρήση των αντιβιοτικών, η ενεργητική επιτήρηση αποικισμού και λοιμώξεων, η επαγρύπνηση των μικροβιολογικών εργαστηρίων, μέτρα προφύλαξης κατά την επαφή, κατάλληλη οργάνωση της μονάδος (θάλαμοι απομόνωσης, διαχωρισμός ασθενών με CPE), υγιεινή των χεριών προσωπικού, καθαρισμός του περιβάλλοντος ή/και κλείσιμο κλινικής/μονάδος, και εκπαίδευση του προσωπικού (CDC, 2015). Όλα τα μέτρα αυτά είναι εξίσου σημαντικά στην καταπολέμηση των λοιμώξεων από τα πολυανθεκτικά μικροβιακά στελέχη, τα οποία έχουν την ιδιότητα να πολλαπλασιάζονται γρήγορα και να μεταφέρονται εύκολα στο νοσοκομειακό περιβάλλον και στους ασθενείς, ιδιαίτερα αυτών που νοσηλεύονται στη ΜΕΘ. Ο συνδυασμός όλων των παραπάνω μέτρων επιτυγχάνει καλύτερα αποτελέσματα απ' ό,τι η μεμονωμένη εφαρμογή τους (Siegel JD *et al*, 2007).

Η συνταγογράφηση των αντιμικροβιακών σκευασμάτων είναι πολύ σημαντικός παράγοντας στην ανάπτυξη πολυανθεκτικών στελεχών και στον έλεγχό τους, καθώς η πίεση επιλογής από την έκθεση στα αντιβιοτικά μπορεί να μεταβάλει

τη μικροβιακή χλωρίδα των ασθενών και να οδηγήσει στην αύξηση του φορτίου των πολυανθεκτικών μικροβίων και τον αποικισμό τους (Galán JC *et al*, 2013; Gómez-Zorrilla S *et al*, 2014). Ένας σημαντικός αριθμός επιδημιολογικών μελετών έχουν καταδείξει τη συσχέτιση μεταξύ αυξημένης χρήσης αντιμικροβιακών και της εμφάνισης αντοχής (McGowan JE Jr, 1983; Gould IM, 1999; Mulvey MR and Simor AE, 2009). Ωστόσο, υπάρχει μια λεπτή ισορροπία ανάμεσα στην αναγκαιότητα της άμεσης χορήγησης αντιβιοτικών που συνήθως οδηγεί στη μείωση της θνητότητας και στην μη κατάλληλη αντιμικροβιακή θεραπεία που μπορεί να οδηγήσει στην αύξηση της αντοχής. Επιπλέον, όσο επιδεινώνεται το προφίλ της ευαισθησίας των μικροβίων που ενδημούν στη ΜΕΘ τόσο μεγαλώνει η ανάγκη χορήγησης εμπειρικής θεραπείας με αντιβιοτικά ευρέως φάσματος, δημιουργώντας ένα φαύλο κύκλο.

Για την αντιμετώπιση του προβλήματος της αντιμικροβιακής αντοχής οι μονάδες υγειονομικής περίθαλψης καλούνται να εφαρμόσουν προγράμματα αντιβιοτικής επιτήρησης (ASP) για τη διαχείριση της χρήσης αντιμικροβιακών ουσιών με στόχο της βελτίωσης της έκβασης των ασθενών, την ελαχιστοποίηση των παράπλευρων βλαβών και τη μείωση της συχνότητας εμφάνισης λοιμώξεων από πολυανθεκτικά στελέχη (van Limburg M *et al*, 2014; Davey P *et al*, 2017). Σκοπός τους είναι η θεραπεία των ασθενών με βάσει τους συγκεκριμένους παθογόνους παράγοντες σύμφωνα με μια διαγνωστική στρατηγική που εξυπηρετεί τελικά τον έλεγχο της αύξησης των δαπανών στην υγειονομική περίθαλψη. Η συμμετοχή στα ASPs θεωρείται κυρίως καθήκον των κλινικών μικροβιολόγων ή / και των λοιμωξιολόγων, μαζί με τους φαρμακοποιούς της μονάδας. Ωστόσο, η ευρεία συμμετοχή του προσωπικού και άλλων ειδικοτήτων είναι χρήσιμη όπως: παραϊατρικό προσωπικό, νοσηλευτές, οι διευθυντές των διαγνωστικών εργαστηρίων και, φυσικά, η διοίκηση της υγειονομικής μονάδας. Καθώς η ελεύθερη μετακίνηση των ασθενών πέρα από ένα τμήμα ή μια νοσοκομειακή μονάδα και σε άλλα τμήματα, νοσοκομεία ή υπηρεσίες περίθαλψης ή και ακόμα και σε άλλες χώρες, τα αποτελέσματα αυτών των προγραμμάτων θα έχουν ευρύτερη επίδραση στην αντιμετώπιση της αντιμικροβιακής αντοχής και τον έλεγχο των λοιμώξεων από πολυανθεκτικά στελέχη. Για αυτό το λόγο και έχουν εκδοθεί οδηγίες εφαρμογής αυτών των προγραμμάτων τόσο σε διεθνές επίπεδο όσο και σε εθνικό (Donker T *et al*, 2010; Ciccolini M *et al*, 2013).

Η επιλογή της αρχικής εμπειρικής αντιμικροβιακής αγωγής (κατά τις πρώτες 48-72 ώρες) θα πρέπει να βασίζεται σε ακριβή δεδομένα σχετικά με το προφίλ ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά σε εθνικό επίπεδο ή/και στο συγκεκριμένο

νοσοκομείο ή ακόμα και στη ΜΕΘ (Pulcini C *et al*, 2008). Εντός της ΜΕΘ φαίνεται συνήθως να υπάρχει διαφορά στις ευαισθησίες σε ασθενείς που νοσηλεύονται με εξωνοσοκομειακές λοιμώξεις από τους ασθενείς με νοσοκομειακές λοιμώξεις (ECDC, 2016). Η ενσωμάτωση των τοπικών δεδομένων σχετικά με την μικροβιακή αντοχή στις κατευθυντήριες οδηγίες για την θεραπεία των λοιμώξεων, αναγνωρίζοντας τους κινδύνους σε κάθε ασθενή για την ανάπτυξη ανθεκτικών παθογόνων, δύναται να οδηγήσει στην κατάλληλη αρχική εμπειρική αγωγή, στην βελτίωση της έκβασης της λοίμωξης, στην πρόληψη της αντιμικροβιακής αντοχής και στη μείωση του κόστους (Pulcini C *et al*, 2008; Dik JW *et al*, 2015a). Η συνεχής παρακολούθηση των δεδομένων σχετικά με την αντιμικροβιακή αγωγή από ειδική ομάδα, όπως αναφέραμε, απαρτιζόμενη από κλινικό μικροβιολόγο, λοιμωξιολόγο και τον νοσοκομειακό φαρμακοποιό, με διαρκή επικοινωνία μεταξύ τους και με άμεση ηλεκτρονική πρόσβαση στα κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα, είναι απαραίτητη, προκειμένου να εξατομικευθεί και να βελτιστοποιηθεί η αντιμικροβιακή αγωγή, ακόμα και από το δεύτερο 24ωρο, με βάση τα μέχρι εκείνη τη στιγμή διαθέσιμα δεδομένα για την πορεία της λοίμωξης και την ανταπόκριση στην εμπειρική θεραπεία, την κατάσταση του ασθενούς και τα μικροβιολογικά αποτελέσματα (Dik JW *et al*, 2015b). Οι καρβαπενέμες, οι κεφαλοσπορίνες τρίτης και τέταρτης γενιάς, και οι φλουοροκινολόνες - μεταξύ άλλων – έχουν συσχετισθεί σημαντικά με την εμφάνιση των CPE στελεχών. Επομένως, αυτά τα αντιμικροβιακά απαιτούν ιδιαίτερη προσοχή και θα πρέπει πάντα να χρησιμοποιούνται καταλλήλως ιδιαίτερα στην εμπειρική αγωγή (Tacconelli E *et al*, 2014; ECDC, 2011). Εκτός από την επιλογή της αντιμικροβιακής αγωγής, βρίσκεται υπό συζήτηση σε πολυάριθμες μελέτες ο ρόλος της δοσολογίας και της διάρκειας της αγωγής στην εμφάνιση της αντοχής. Υπάρχει η θεώρηση ότι τα κατάλληλα δοσολογικά σχήματα (αποφυγή υπο- ή υπερδοσολογίας) και η συντομότερη διάρκεια της αντιμικροβιακής θεραπείας οδηγούν σε μειωμένη εμφάνιση αντοχής (Wong D and Spellberg B, 2017).

Η ενεργητική επιτήρηση είναι η μέθοδος εκλογής για τον προσδιορισμό των πολυανθεκτικών μικροοργανισμών που ενδημούν σε μια νοσοκομειακή μονάδα και τον εντοπισμό των ασθενών-φορέων αυτών, βοηθώντας στην καλύτερη οργάνωση της φροντίδας των ασθενών της μονάδας, την αξιολόγηση των επιδημιών και τη μείωση της διασποράς τους (Savard P and Perl TM, 2014; Saidel-Odes L and Borer A, 2014). Η κύρια δεξαμενή των πολυανθεκτικών εντεροβακτηριακών είναι η γαστρεντερική οδός την οποία και αποικίζουν σε μεγάλο βαθμό, ακολουθούμενη από

το ρινοφάρυγγα, το δέρμα, τις περιοχές χειρουργικών τραυμάτων, τους καθετήρες, και τις ενδοτραχειακές εκκρίσεις. Κατά την ενεργητική επιτήρηση θα πρέπει να συλλέγεται επίχρισμα από το ορθό κάθε ασθενούς κατά τη στιγμή της εισαγωγής του στο νοσοκομείο καθώς και κατά την εισαγωγή του σε κάθε μονάδα υψηλού κινδύνου, όπως είναι η ΜΕΘ (Calfee D. and Jenkins SG, 2008; Buehlmann M *et al*, 2010). Το ορθικό επίχρισμα στη συνέχεια καλλιεργείται καταλλήλως για την απομόνωση και την ταυτοποίηση των CPE στελεχών. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίνεται στα αποτελέσματα των αντιμικροβιακών ευαισθησιών που προκύπτουν από τα αυτοματοποιημένα συστήματα, καθώς μπορεί να μην ανιχνεύσουν μηχανισμούς αντοχής και να υποδιαγνώσουν στελέχη CPE (da Silva RM *et al*, 2012). Αυτά θα πρέπει να επαληθεύονται με συγκεκριμένες μεθόδους ελέγχου της αντοχής στις καρβαπενέμες στο εργαστήριο σύμφωνα με το CLSI (Anderson KF *et al*, 2007; CLSI, 2017).

Σύμφωνα με οδηγίες του CDC η ενεργητική επιτήρηση θα πρέπει να πραγματοποιείται σε εβδομαδιαία βάση μέχρι την εξάλειψη του αποικισμού των ασθενών ή μέχρι την μη καταγραφή νέων κρουσμάτων λοιμώξεων από πολυανθεκτικά στελέχη, καθώς και κατά τη διάρκεια εμφάνισης επιδημικών κρουσμάτων. Αν δεν είναι δυνατή η εβδομαδιαία ενεργητική επιτήρηση (λόγω κόστους ή μειωμένου προσωπικού), αυτή μπορεί να πραγματοποιείται κάθε δεκαπενθήμερο, με αποδεκτά αποτελέσματα (CDC, 2015). Ασθενείς που εμφανίζουν αυξημένο επιπολασμό αποικισμού με CPE είναι όσοι νοσηλεύονταν σε νοσοκομειακή μονάδα με εκδήλωση κρουσμάτων λοιμώξεων από τα στελέχη αυτά ή έχουν υποβληθεί σε φροντίδα από το ίδιο προσωπικό που χειρίστηκε τα κρούσματα αυτά ή τους έχει γίνει χορήγηση ευρέως φάσματος αντιβιοτικών, αλλά και όσοι νοσηλεύονταν σε μονάδα μακροχρόνιας φροντίδας ή σε γηροκομεία. Αυτοί οι ασθενείς θα πρέπει οπωσδήποτε να ελέγχονται μέσω λήψης ορθικού επιχρίσματος κατά την εισαγωγή τους στο νοσοκομείο ή στη ΜΕΘ. Η ακριβής συμβολή της ενεργητικής επιτήρησης στην πρόληψη της διασποράς των CPE στελεχών είναι ακόμα απροσδιόριστη, γι' αυτό θα πρέπει να εφαρμόζεται ταυτόχρονα και με τα υπόλοιπα μέτρα ελέγχου. Ωστόσο, η σημασία της στην μείωση της επίπτωσης στην ανίχνευση CPE στελεχών και στον έλεγχο των επιδημικών κρουσμάτων έχει μελετηθεί και είναι αδιαμφισβήτητη (Ben-David D *et al*, 2010; Munoz-Price LS *et al*, 2010a; Kochar S *et al*, 2009). Η ανίχνευση των στελεχών αυτών, επίσης, σε σύντομο χρονικό διάστημα από τη στιγμή του αποικισμού ή της λοίμωξης είναι κρίσιμη για

τον επιτυχή έλεγχο της διασποράς τους, για αυτό και πολλές φορές προτείνεται η ανίχνευση των γονιδίων αντοχής απευθείας από το ορθικό επίχρισμα ή το κλινικό δείγμα (Carmeli Y *et al*, 2012).

Η ταχεία και ορθή εργαστηριακή διαγνωστική προσέγγιση των κρουσμάτων από CPE στελέχη, αποτελεί τον τρίτο παράγοντα, μαζί με την επιτήρηση της αντιμικροβιακής αγωγής και την εφαρμογή των μέτρων ελέγχου των λοιμώξεων στην καταπολέμηση της διασποράς και την επιτυχή αντιμετώπιση των CPE στελεχών (Dik JW *et al*, 2016). Μεγάλη σημασία έχει η όσο το δυνατόν ταχύτερη ανίχνευση των στελεχών αυτών στα κλινικά δείγματα, κυρίως μέσα σε 24-48 ώρες. Η χρήση μεθόδων που βοηθούν σε αυτή την κατεύθυνση όπως οι μοριακές μέθοδοι, που μπορούν να δώσουν αποτέλεσμα μέσα σε 6h, βρίσκει περιορισμούς στο στενό φάσμα των μικροοργανισμών και των μηχανισμών αντοχής που ανιχνεύουν, στην αναγκαιότητα εξειδικευμένου προσωπικού και στο αυξημένο κόστος. Οι κλασσικές μικροβιολογικές μέθοδοι, ωστόσο, παραμένουν οι διαγνωστικές εργαστηριακές εξετάσεις εκλογής για την ανίχνευση αυτών των στελεχών. Ανεξάρτητα από τη μέθοδο ανίχνευσης των CPE στελεχών αυτό που είναι βασικό στην επιτυχή εφαρμογή ενός ολοκληρωμένου προγράμματος πρόληψης και ελέγχου λοιμώξεων από CPE στελέχη είναι η άμεση ενημέρωση της ομάδας διαχείρισης για τα εργαστηριακά δεδομένα, ώστε να υπάρξει εντοπισμός των κρουσμάτων, άμεση διαβούλευση και λήψη κλινικών αποφάσεων. Θα πρέπει να επισημανθεί, ωστόσο, ότι οι ομάδες των ασθενών που θα ελέγχονται, η χρήση των καλλιεργητικών μέσων, των βιοχημικών και μοριακών μεθόδων και η διάρκεια του προγράμματος ενεργητικής επιτήρησης εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τις οικονομικές δυνατότητες της υγειονομικής μονάδας και από την επιδημική ή ενδημική μορφή των παρατηρούμενων κρουσμάτων από CPE στελέχη (Savard P and Perl TM, 2014).

Οι ασθενείς που διαπιστώνεται ότι είναι αποικισμένοι ή έχουν λοίμωξη από CPE θα πρέπει να τίθενται κάτω από αυστηρά μέτρα προφύλαξης και περιορισμού της επαφής τους με άλλους ασθενείς και το προσωπικό (Munoz-Price LS *et al*, 2010b; Ohmagari N *et al*, 2014). Επίσης, σε ασθενείς που μεταφέρονται από άλλη ΜΕΘ ή από άλλη νοσηλευτική μονάδα με υψηλό επιπολασμό CPE πρέπει να εφαρμόζονται μέτρα περιορισμού μέχρι οι καλλιέργειες της ενεργητικής επιτήρησης γίνουν γνωστές, όπως και σε ασθενείς με αυξημένο κίνδυνο αποικισμού με CPE, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Τα μέτρα αυτά βοηθούν στην πρόληψη της

διασταυρούμενης μετάδοσης μέσω της άμεσης επαφής με τους ασθενείς και της έμμεσης επαφής με μολυσμένες επιφάνειες του περιβάλλοντος.

Η απομόνωση του αποικισμένου ή με λοίμωξη με CPE ασθενούς σε μονόκλινο δωμάτιο με δικό του μπάνιο ή εάν αυτό δεν είναι δυνατόν, η ομαδοποίηση ομοίως αποικισμένων ασθενών αποτελούν σημαντικό μέτρο προφύλαξης. Ομαδοποίηση μπορεί να γίνει και για το προσωπικό που ασχολείται αποκλειστικά με τους αποικισμένους ή με λοίμωξη ασθενείς, ώστε να μην υπάρχει πιθανότητα μετάδοσης των CPE στους μη αποικισμένους ή χωρίς λοίμωξη ασθενείς. Επιπλέον, η χρήση ατομικών μέτρων προστασίας αποτελεί σημαντική παράμετρο στην πρόληψη της διασταυρούμενης μετάδοσης και των λοιμώξεων από CPE. Τόσο το υγειονομικό προσωπικό όσο και οι επισκέπτες θα πρέπει να φορούν κατάλληλο προστατευτικό ένδυμα (ολόσωμη στολή ή ποδιά) και γάντια κατά την επαφή τους με τους ασθενείς αυτούς ή με δυνητικά μολυσμένες επιφάνειες, ενώ αν υπάρχει πιθανότητα επαφής με αίμα ή με σωματικά υγρά των ασθενών θα πρέπει να φορούν και ειδική μάσκα στο πρόσωπο που να προστατεύει και τους οφθαλμούς. Οι οδηγίες για τα μέτρα προφύλαξης θα πρέπει να είναι γνωστές σε όλο το προσωπικό και τους συγγενείς και θα πρέπει να αναρτούνται σε ορατό σημείο, ακόμα και δίπλα από το κρεβάτι του ασθενούς. Τα μέτρα αυτά καλό είναι να εφαρμόζονται μέχρι την έξοδο του ασθενούς από το νοσοκομείο ακόμα και εάν τα αποτελέσματα των καλλιιεργειών έχουν αρνητικοποιηθεί (CDC 2015; ECDC 2011; Munoz-Price LS *et al*, 2010a; Munoz-Price LS *et al*, 2010b; Kochar S *et al*, 2009; Akova M *et al*, 2012).

Ο περιορισμός της χρήσης των επεμβατικών συσκευών είναι ένα άλλο σημαντικό μέτρο παρέμβασης για την πρόληψη των CPE λοιμώξεων. Όπως ήδη έχουμε αναφέρει, αρκετά CPE στελέχη απομονώνονται σε ασθενείς με λοιμώξεις που σχετίζονται με επεμβατικά μέσα, ιδιαίτερα οι σχετιζόμενες με τον καθετήρα λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, οι βακτηριαμίες οι σχετιζόμενες με ενδοαγγειακό καθετήρα και οι πνευμονίες από αναπνευστήρα με τη χρήση ενδοτραχειακού σωλήνα. Ως εκ τούτου, στρατηγικές πρόληψης αυτών των λοιμώξεων περιλαμβάνονται στις κατευθυντήριες οδηγίες του CDC (CDC, 2015). Σχετικά με τους ουροκαθετήρες, οι προσπάθειες πρόληψης περιλαμβάνουν την χρήση τους μόνο σε αυτούς τους ασθενείς με κατάλληλες ενδείξεις και απομάκρυνση τους, το συντομότερο δυνατόν, χρησιμοποιώντας ασηπτική τεχνική και αποστειρωμένο εξοπλισμό για την εισαγωγή και διατήρηση του κλειστού συστήματος αποβολής των ούρων (Gould CV *et al*, 2010). Γενικότερα, η συνεχής παρακολούθηση της

αναγκαιότητας της ύπαρξης επεμβατικών συσκευών και η αφαίρεσή τους το συντομότερο δυνατό συμβάλλει στον αποτελεσματικό έλεγχο των λοιμώξεων από CPE στελέχη.

Το κλείσιμο μιας μονάδας για τον έλεγχο επιδημικών κρουσμάτων αποτελεί το έσχατο μέτρο για τον έλεγχο των λοιμώξεων από CPE (Wong H *et al*, 2015). Στη μονάδα που κλείνει δεν γίνονται πλέον νέες εισαγωγές, ενώ οι ασθενείς που είναι αποικισμένοι ή έχουν λοίμωξη παραμένουν στη μονάδα μέχρι να αποαποικισθούν ή ιαθούν. Οι ασθενείς που δεν είναι αποικισμένοι ή δεν έχουν λοίμωξη απομακρύνονται από τη μονάδα και μεταφέρονται σε άλλη. Η μονάδα θα ανοίξει ξανά όταν τα ποσοστά αποικισμού ή λοίμωξης είναι σε χαμηλά επίπεδα ή θεωρηθεί ότι τα επιδημικά κρούσματα αντιμετωπίστηκαν επιτυχώς. Αρκετά συχνά το κλείσιμο της μονάδας και ο επιτυχής έλεγχος του αποικισμού και των λοιμώξεων από τα στελέχη αυτά ακολουθούνται από την απολύμανση της μονάδας στο σύνολό της (άψυχα αντικείμενα και επιφάνειες).

Επιπρόσθετα, τα μέτρα ελέγχου των λοιμώξεων από CPE περιλαμβάνουν και την αυστηρή υγιεινή των χεριών του προσωπικού (Carmeli *et al*, 2010; CDC, 2015). Τα χέρια των εργαζομένων στον τομέα της υγείας αποτελούν την πιο σημαντική αιτία μεταφοράς στους ασθενείς και το νοσοκομειακό περιβάλλον των μικροβιακών παθογόνων, ιδιαίτερα των πολυανθεκτικών (Morgan DJ *et al*, 2012; Sypsa V *et al*, 2012). Η νοσοκομειακή μονάδα θα πρέπει να φροντίσει ώστε το προσωπικό του τομέα της υγείας να είναι ευαισθητοποιημένο και, κυρίως, εξοικειωμένο με την κατάλληλη τεχνική υγιεινής των χεριών, να εξασφαλίσει την πρόσβασή του στα μέσα υγιεινής των χεριών και να παρακολουθεί ενεργά τη συμμόρφωσή του. Η υγιεινή των χεριών περιλαμβάνει τη χρήση νερού και σαπουνιού ή ειδικής γέλης για τα χέρια με βάση την αλκοόλη.

Ο τακτικός και κατάλληλος καθαρισμός του περιβάλλοντος της μονάδας αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα για τον έλεγχο των λοιμώξεων από CPE (CDC, 2015; Tacconelli E *et al*, 2014; Munoz-Price LS *et al*, 2010a; Munoz-Price LS *et al*, 2010b; Carbonne A *et al*, 2010; Munoz-Price LS *et al*, 2009). Διατηρώντας ένα καθαρό και στεγνό περιβάλλον μπορεί να ελεγχθεί η ανάπτυξη και η αναπαραγωγή των πολυανθεκτικών μικροβίων. Ωστόσο, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η εξωτερική μεμβράνη των gram-αρνητικών μικροοργανισμών, όπως είναι τα CPE, τα καθιστούν ανθεκτικά στη διείσδυση των χημικών ουσιών και των απολυμαντικών που συνήθως χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό του νοσοκομειακού

περιβάλλοντος. Τα δωμάτια όλων των ασθενών θα πρέπει να καθαρίζονται καθημερινά, αλλά τα δωμάτια των ασθενών οι οποίοι είναι αποικισμένοι ή με λοίμωξη από CPE συστήνεται να καθαρίζονται με 2% χλωρεξιδίνη. Το ίδιο ισχύει και για τις ΜΕΘ που αποτελούν μονάδες υψηλού κινδύνου αποικισμού ή λοίμωξης των ασθενών με CPE και στις οποίες εκτός από τον καθημερινό περιβαλλοντικό καθαρισμό είναι αναγκαίος και ο καθαρισμός των επιφανειών επαφής των εξαρτημάτων των μηχανικών αναπνευστήρων.

Τέλος, η επιτυχή εφαρμογή των μέτρων ελέγχου των λοιμώξεων από CPE και γενικότερα από πολυανθεκτικούς μικροοργανισμούς προϋποθέτει δύο σημαντικούς παράγοντες: την ευαισθητοποίηση – εκπαίδευση και την κατάλληλη συνεργασία του υγειονομικού προσωπικού (Tacconelli E *et al*, 2014; Saidel-Odes L and Borer A, 2014). Πράγματι, η εκπαίδευση είναι καθοριστικός παράγοντας για την πρόληψη του αποικισμού και της λοίμωξης από CPE στελέχη και αφορά τόσο στην κατανόηση της σημασίας που έχουν οι παρεμβάσεις πρόληψης, ιδιαίτερα της προσωπικής υγιεινής και του περιβαλλοντικού καθαρισμού, όσο και στην εκμάθηση των κατάλληλων τεχνικών για την εφαρμογή τους. Επιπλέον, η συνεργασία μεταξύ των κλινικών ιατρών, των λοιμωξιολόγων και των εργαστηριακών ιατρών είναι απαραίτητη προκειμένου να υλοποιηθούν αποτελεσματικά τα προγράμματα ενεργητικής επιτήρησης, να εντοπισθούν εγκαίρως τα ύποπτα κρούσματα και να ακολουθηθούν οι κανόνες της ορθής αντιμικροβιακής αντιμετώπισης και του ελέγχου των λοιμώξεων από CPE.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

1. Ορισμοί

Η κατάσταση των λοιμώξεων από πολυανθεκτικούς μικροοργανισμούς σύμφωνα με την επιδημιολογία γίνεται βάσει χρονικών και κλινικών κριτηρίων.

Κάθε λοίμωξη που εμφανίζεται στο νοσοκομείο ή προκαλείται από μικροοργανισμούς που αποκτήθηκαν κατά τη διάρκεια της νοσηλείας ορίζεται ως **νοσοκομειακή λοίμωξη (Healthcare associated infection-HAI)**. Οφείλεται σε μικροβιακά αίτια είτε της χλωρίδας του ασθενούς είτε του νοσοκομειακού περιβάλλοντος. Η λοίμωξη δεν ήταν παρούσα ούτε καν στο στάδιο της επώασης κατά την εισαγωγή του ασθενούς στο Νοσοκομείο (δηλαδή ήταν άλλη η αιτία εισαγωγής) και εκδηλώνεται μετά από 48 ώρες από την εισαγωγή. Οι νοσοκομειακές λοιμώξεις αφορούν και σε λοιμώξεις του προσωπικού των νοσηλευτικών ιδρυμάτων. Αποτελούν σημαντικό δείκτη ποιότητας των παρεχόμενων υπηρεσιών υγείας σε ένα Νοσοκομείο/μονάδα φροντίδας.

Όταν το κλινικό δείγμα του ασθενούς έχει ληφθεί κατά την εισαγωγή του στο νοσοκομείο και σε διάστημα μέχρι 48 ώρες από αυτήν και ανιχνεύεται λοίμωξη κατά το διάστημα αυτό, τότε η λοίμωξη χαρακτηρίζεται ως “health care associated community onset” εφόσον ο ασθενής:

1. έχει λάβει ενδοφλέβια θεραπεία ή εξειδικευμένη νοσηλευτική φροντίδα κατ’ οίκον τουλάχιστον 30 μέρες πριν την λοίμωξη.
2. έχει επισκεφθεί νοσοκομείο ή κλινική αιμοκάθαρσης ή έχει λάβει ενδοφλέβια χημειοθεραπεία τουλάχιστον 30 ημέρες πριν την λοίμωξη.
3. έχει προηγούμενη νοσηλεία διάρκειας τουλάχιστον 2 ημερών μέσα σε 3 μήνες πριν την λοίμωξη.
4. είναι τρόφιμος γηροκομείου.

Στις περιπτώσεις που δεν πληρούνται τα ανωτέρω κριτήρια τότε η λοίμωξη χαρακτηρίζεται ως αμιγώς της κοινότητας “community associated infection” (Friedman ND *et al*, 2002; Cohen AL *et al*, 2008).

Η επιβεβαίωση και η κατηγοριοποίηση κάθε λοίμωξης γίνεται με βάση το χρόνο συλλογής του κλινικού δείγματος και το κλινικο - εργαστηριακό ιστορικό του ασθενούς.

Ως **αποικισμός (colonization)** χαρακτηρίζεται η παρουσία ενός παθογόνου μικροοργανισμού μέσα στους ιστούς ή πάνω σε ένα ξενιστή (ασθενή ή προσωπικό)

με αύξηση και πολλαπλασιασμό του μικροοργανισμού, χωρίς καμιά εμφανή κλινική εκδήλωση ή ανοσολογική αντίδραση κατά το χρόνο απομόνωσής του (Dani A, 2014).

Η **μόλυνση άψυχων επιφανειών (contamination)** αφορά μικροοργανισμούς, που παροδικά βρίσκονται επάνω στην επιφάνειά τους.

Όσον αφορά στην αξιολόγηση και την εκτίμηση της ακρίβειας των εργαστηριακών μεθόδων είναι χρήσιμο να προσδιορισθεί το **όριο ανίχνευσης (detection limit)** που ορίζεται ως η μικρότερη συγκέντρωση της ουσίας (εν προκειμένω ο μικρότερος αριθμός αποικιών cfu / ml του μικροοργανισμού) που μπορεί να ανιχνευθεί με την εξεταζόμενη μέθοδο.

Προκειμένου να συγκριθούν οι εργαστηριακές δοκιμασίες μεταξύ τους, για να αποφασιστεί το ποια δίνει τα πιο αξιόπιστα αποτελέσματα, έχουν επινοηθεί οι όροι της **ευαισθησίας (sensitivity)** και της **ειδικότητας (specificity)**. Μια εργαστηριακή εξέταση θεωρείται ευαίσθητη, όταν μπορεί να εντοπίσει με επιτυχία τα αληθώς θετικά αποτελέσματα. Η ευαίσθητη εξέταση, επομένως, έχει όσο το δυνατόν λιγότερα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Αντίθετα, μια εξέταση θεωρείται ειδική, όταν μπορεί να εντοπίσει με επιτυχία τα αληθώς αρνητικά αποτελέσματα. Η ειδική εξέταση, επομένως, έχει όσο το δυνατόν λιγότερα ψευδώς θετικά αποτελέσματα.

Μια εξέταση θεωρείται ότι διαθέτει **ακρίβεια (accuracy)**, αν διαθέτει αυξημένη ευαισθησία και ειδικότητα. Η **συνολική ακρίβεια (overall accuracy)** μιας μεθόδου είναι η πιθανότητα ορθής διάγνωσης ενός ατόμου (εν προκειμένω ορθής ανίχνευσης στελεχών CPE) με τη μέθοδο αυτή. Η **θετική προγνωστική αξία (positive predictive value, PPV)** εκφράζει την πιθανότητα ένα θετικό αποτέλεσμα να είναι πραγματικό, ενώ η **αρνητική προγνωστική αξία (negative predictive value, NPV)** εκφράζει την πιθανότητα ένα αρνητικό αποτέλεσμα να είναι πραγματικό. Συνοπτικά:

Sensitivity (%) = αληθώς θετικά αποτελέσματα/σύνολο των πασχόντων, επί 100

Specificity (%) = αληθώς αρνητικά αποτελέσματα/σύνολο των υγιών, επί 100

PPV (%) = αληθώς θετικά αποτελέσματα/σύνολο θετικών αποτελεσμάτων, επί 100

NPV (%) = αληθώς αρνητικά αποτελέσματα/σύνολο αρνητικών αποτελεσμάτων, επί 100

Overall accuracy (%) = άθροισμα των αληθών θετικών και αληθών αρνητικών αποτελεσμάτων/σύνολο των εξεταζόμενων ατόμων ή δειγμάτων, επί 100

2. Σκοπός – στόχοι

Σκοπός της παρούσης διδακτορικής διατριβής αποτελεί:

α. Η επιδημιολογική μελέτη του αποικισμού και των λοιμώξεων από μικρόβια της οικογένειας των *Enterobacteriaceae* που παράγουν καρβαπενεμάσες, με έμφαση σε στελέχη *Klebsiella pneumoniae*, στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ) Τριτοβάθμιου Νοσοκομείου.

β. Η διερεύνηση των γενετικών μηχανισμών της αντοχής.

γ. Η μοριακή τυποποίηση των στελεχών για τον εντοπισμό ενδημικών και επιδημικών κλώνων.

δ. Η διερεύνηση του τρόπου μετάδοσης από το προσωπικό και το περιβάλλον της ΜΕΘ στους νοσηλευόμενους ασθενείς και της διασποράς των στελεχών αυτών στο Νοσοκομείο.

ε. Ο σχεδιασμός μέτρων πρόληψης για τον περιορισμό της εξάπλωσης των στελεχών αυτών και η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητάς τους. Ο σχεδιασμός θα γίνεται με τέσσερις παράλληλες στρατηγικές : 1. Πρόληψη λοιμώξεως, 2. Σωστή και ταχεία διάγνωση και θεραπεία, 3. Ορθολογική χρήση αντιβιοτικών, και 4. Πρόληψη μετάδοσης.

στ. Η σύγκριση πέντε μεθόδων καλλιέργειας ορθικών επιχρισμάτων κι απομόνωσης στελεχών *Enterobacteriaceae* που παράγουν καρβαπενεμάσες, με στόχο την ταχύτερη ανίχνευση των στελεχών αυτών.

Μέσα από τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής επιδιώκεται η διεξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τον επιπολασμό των λοιμώξεων από εντεροβακτηριακά που παράγουν καρβαπενεμάσες στη ΜΕΘ του Νοσοκομείου και τη συσχέτισή τους με επιδημιολογικά δεδομένα, το είδος των στελεχών που αποικίζουν τη μονάδα (ασθενείς, προσωπικό, άψυχο περιβάλλον), τον τρόπο μετάδοσής τους, την επίδραση των μέτρων ελέγχου και πρόληψης στην καταπολέμησή τους και τη δυνατότητα έγκυρης και έγκαιρης ανίχνευσής τους με νέες καλλιεργητικές μεθόδους. Τα αποτελέσματα αυτά θα τεθούν υπόψη των διοικητικών παραγόντων του Νοσοκομείου και της Επιτροπής Νοσοκομειακών Λοιμώξεων ώστε να αξιολογηθεί το επίπεδο ελέγχου των λοιμώξεων και ο δείκτης ποιότητας της ΜΕΘ και του Νοσοκομείου και να υπάρξουν οι ανάλογες πρωτοβουλίες για διόρθωση τυχών προβλημάτων και καλύτερο σχεδιασμό και προγραμματισμό της λειτουργίας τους με κατεύθυνση τον αποτελεσματικό έλεγχο και πρόληψη των λοιμώξεων αυτών.

3. Σχεδιασμός

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια:

α. Κατά τη διάρκεια του πρώτου διαστήματος της μελέτης πραγματοποιήθηκαν:

1. Έλεγχος αποικισμού ασθενών, με λήψη ορθικού δείγματος κατά την εισαγωγή του ασθενούς στη ΜΕΘ και κάθε εβδομάδα έως την έξοδο του ασθενούς από τη ΜΕΘ.
2. Έλεγχος αποικισμού του περιβάλλοντος της ΜΕΘ, με λήψη δειγμάτων κάθε μήνα από νεροχύτες, επιφάνειες, χειρολαβές, κρεβάτια, υγραντήρες παροχής οξυγόνου και τραπεζίδια φαρμάκων.
3. Έλεγχος αποικισμού του προσωπικού της ΜΕΘ, με λήψη δειγμάτων από τα χέρια κάθε μήνα.
4. Καταγραφή των λοιμώξεων από *Enterobacteriaceae* που παράγουν καρβαπενεμάσες στη ΜΕΘ, συσχετισμός με τα κλινικά δεδομένα των ασθενών που τις εμφάνισαν, τη χορηγηθείσα θεραπευτική αγωγή και την έκβαση της συγκεκριμένης λοίμωξης.
5. Εφαρμογή συγκεκριμένων μέτρων πρόληψης και ελέγχου μετά την παρέλευση 3 μηνών όπου εφαρμόζονταν τα συνήθη μέτρα (περίοδος Ι) και επανάληψη της ανωτέρω διαδικασίας για άλλο ένα τρίμηνο (περίοδος ΙΙ). Αξιολόγηση της αποτελεσματικότητάς τους.

β. Κατά τη διάρκεια του δεύτερου διαστήματος της μελέτης πραγματοποιήθηκαν:

1. Λήψη ορθικών επιχρισμάτων από ασθενείς της ΜΕΘ και του παθολογικού τομέα και καλλιέργεια των δειγμάτων με πέντε διαφορετικές μεθόδους.
2. Σύγκριση των μεθόδων αυτών ως προς την ειδικότητα και ευαισθησία απομόνωσης στελεχών *Enterobacteriaceae* που παράγουν καρβαπενεμάσες.

4. Ηθικές προεκτάσεις

Για την έγκριση της διενέργειας της μελέτης ακολουθήθηκαν όλα τα απαιτούμενα βήματα για την κατοχύρωση των αρχών της ηθικής και δεοντολογίας που πρέπει να τη διέπουν:

- Έγκριση του Δ/ντη Ιατρικής Υπηρεσίας και του Επιστημονικού Συμβουλίου του Νοσοκομείου κατόπιν σχετικής αιτήσεως του υποψήφιου διδάκτορα και του επιβλέποντα Καθηγητή

- Έγκριση από Διοικητικό Συμβούλιο του Νοσοκομείου
- Έγκριση από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας
- Υπεύθυνη δήλωση για τήρηση ιατρικού απορρήτου και μη εκχώρησης δεδομένων σε τρίτους.

5. Πληθυσμός – δείγμα

Η μελέτη κατά το πρώτο διάστημα (Μάιος-Νοέμβριος 2010) πραγματοποιήθηκε με δείγματα από ασθενείς, το προσωπικό και το περιβάλλον της ΜΕΘ του Γενικού Νοσοκομείου Νίκαιας - Πειραιά «Άγιος Παντελεήμων», ενώ κατά το δεύτερο διάστημα (Φεβρουάριος-Απρίλιος 2011) ελήφθησαν δείγματα και από Παθολογικές κλινικές του Νοσοκομείου. Το Γ. Ν. Νίκαιας-Πειραιά «Ο Άγιος Παντελεήμων» είναι ένα Τριτοβάθμιο Νοσοκομείο με έδρα την Νίκαια Αττικής και αποτελεί Νομικό Πρόσωπο Δημοσίου Δικαίου (Ν.Π.Δ.Δ.) το οποίο υπόκειται στον έλεγχο και την εποπτεία του Διοικητή της 2ης Διοίκησης Υγειονομικής Περιφέρειας Πειραιώς και Αιγαίου. Έχει δυναμικότητα 800 κλινών, εκ των οποίων οι 12 κλίνες ανήκουν στην ΜΕΘ. Η ΜΕΘ απαρτίζεται από δύο μονάδες, μία 9 κλινών και μία 3 κλινών (ΜΑΦ). Από τις κλίνες της ΜΕΘ, μία βρίσκεται σε θάλαμο απομόνωσης.

Κατά το πρώτο διάστημα της μελέτης πραγματοποιήθηκε έλεγχος αποικισμού για εντεροβακτηριακά που παράγουν καρβαπενεμάσες σε συνολικά 80 ασθενείς της ΜΕΘ (43 άνδρες και 37 γυναίκες, ηλικίας $59,9 \pm 16,5$ έτη), με λήψη ορθικού δείγματος κατά την εισαγωγή κάθε ασθενή στη ΜΕΘ και κάθε εβδομάδα έως την έξοδό τους από τη ΜΕΘ. Ταυτόχρονα έγινε καταγραφή των ασθενών που εμφάνισαν λοίμωξη από *Enterobacteriaceae* που παράγουν καρβαπενεμάσες, συσχετισμός τους με τα κλινικά τους δεδομένα, τη χορηγηθείσα θεραπευτική αγωγή και την έκβαση της συγκεκριμένης λοίμωξης. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε μηνιαίος έλεγχος αποικισμού από εντεροβακτηριακά που παράγουν καρβαπενεμάσες των χεριών του προσωπικού που εργάζεται στη ΜΕΘ και αφορούσε σε 46 άτομα (9 άνδρες και 37 γυναίκες, ηλικίας $36,7 \pm 8,0$ έτη), από τα οποία 6 ήταν ιατροί, 36 νοσηλευτές/νοσοκόμοι και 4 βοηθοί θαλάμου. Για τον έλεγχο αποικισμού του περιβάλλοντος της ΜΕΘ κατά το διάστημα της μελέτης και κάθε μήνα πραγματοποιήθηκε λήψη δειγμάτων από 54 διαφορετικά σημεία της ΜΕΘ και συγκεκριμένα από 12 κλίνες ασθενών, 12 τραπέζια φαρμάκων, 12 υγραντήρες παροχής οξυγόνου, 12 επιφάνειες από μόνιτορς, 4 χειρολαβές πόρτας και 2 νεροχύτες. Όλα τα δείγματα εστάλησαν στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του Νοσοκομείου, όπου έγινε η απαραίτητη

καλλιέργεια για την απομόνωση εντεροβακτηριακών στελεχών, ο έλεγχος ευαισθησίας αυτών στα αντιμικροβιακά και η φαινοτυπική ανίχνευση του μηχανισμού αντοχής στις καρβαπενέμες για τα ύποπτα στελέχη.

Τέλος, εξετάσθηκε η δυνατότητα εφαρμογής επιπρόσθετων μέτρων ελέγχου και πρόληψης του αποικισμού και των λοιμώξεων από τα στελέχη αυτά στη ΜΕΘ. Κατόπιν συμφωνίας με το ιατρικό και νοσηλευτικό προσωπικό της ΜΕΘ εφαρμόσθηκαν συγκεκριμένα μέτρα επιπλέον του καθιερωμένου κλεισίματος και απολύμανσης της μονάδος που έγινε τέλη Ιουλίου με αρχές Αυγούστου (για διάστημα 15 ημερών). Με χρονικό όριο την περίοδο αυτή, το πρώτο διάστημα της μελέτης διαχωρίσθηκε σε δύο περιόδους: την περίοδο Ι, όπου εφαρμόζονταν τα συνήθη μέτρα ελέγχου στη ΜΕΘ, και την περίοδο ΙΙ μετά το κλείσιμο, την απολύμανση και την εφαρμογή πρόσθετων μέτρων ελέγχου.

Κατά το δεύτερο διάστημα της μελέτης συλλέχθηκαν δείγματα ορθικού επιχρίσματος από 200 διαφορετικούς ασθενείς του Νοσοκομείου που ανήκαν σε ομάδα υψηλού κινδύνου αποικισμού από εντεροβακτηριακά που παράγουν καρβαπενεμάσες, όπως οι νοσηλευόμενοι στη ΜΕΘ ή όσοι νοσηλεύονταν σε παθολογικές κλινικές αλλά είχαν προηγούμενη νοσηλεία τον τελευταίο χρόνο σε άλλα νοσοκομεία ή μονάδες μακροχρόνιας φροντίδας (n=93). Τα δείγματα αυτά εστάλησαν στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του Νοσοκομείου όπου έγινε η καλλιέργειά τους με πέντε διαφορετικές μεθόδους για την απομόνωση CPE και non-CPE στελεχών και ο έλεγχος ευαισθησίας τους στα αντιμικροβιακά. Η φαινοτυπική και μοριακή ανίχνευση των μηχανισμών αντοχής των ύποπτων CRE στελεχών και των στελεχών που παρήγαγαν ESBL πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

6. Μέθοδοι

6.1 Έλεγχος αποικισμού ασθενών

Η λήψη του ορθικού δείγματος από τους ασθενείς έγινε με ειδικό στείρο βαμβακοφόρο στυλέο με 5ml ημίρρευστο υλικό μεταφοράς Stuart/Amies σε πλαστική θήκη. Το άκρο του στυλεού, αφού διαβρέχθηκε με φυσιολογικό ορό 0,90% NaCl, εισχώρησε 1 inch από τον πρωκτικό σφιγκτήρα και με περιστροφικές κινήσεις έγινε η δειγματοληψία του επιχρίσματος του έξω ορθού. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε και

τοποθετήθηκε προσεκτικά στην πλαστική θήκη του υλικού μεταφοράς, όπου αναγράφονταν τα στοιχεία του ασθενούς και η ημερομηνία της λήψης. Τα ληφθέντα ορθικά δείγματα μεταφέρθηκαν άμεσα στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του Νοσοκομείου για την πραγματοποίηση της καλλιέργειας σύμφωνα με το πρωτόκολλο της μελέτης.

6.2 Έλεγχος αποικισμού χεριών προσωπικού της ΜΕΘ

Ο έλεγχος στα χέρια του προσωπικού της ΜΕΘ πραγματοποιήθηκε με δύο μεθόδους. Κατά την πρώτη μέθοδο έγινε λήψη δείγματος από την ραχιαία και παλαμιαία επιφάνεια, καθώς και από τις μεσοδακτύλιες πτυχές κάθε χεριού κάθε ατόμου με τη χρήση ειδικού στείρου βαμβakoφόρου στυλεού με 5ml ημίρρευστο υλικό μεταφοράς Stuart σε πλαστική θήκη. Πριν τη λήψη το άκρο του στυλεού διαβρέχθηκε με φυσιολογικό ορό 0,90% NaCl. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε προσεκτικά στην πλαστική θήκη του υλικού μεταφοράς, όπου αναγράφονταν τα στοιχεία του κάθε ατόμου και η ημερομηνία της λήψης.

Κατά τη δεύτερη μέθοδο χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία με MacConkey άγαρ στην επιφάνεια των οποίων τοποθετήθηκαν ξεχωριστά η παλαμιαία επιφάνεια και τα δάκτυλα κάθε χεριού, ενώ η διάρκεια επαφής με το υλικό ήταν ένα λεπτό. Μετά τη δειγματοληψία, τα τρυβλία κλείστηκαν, ανεγράφησαν τα στοιχεία κάθε ελεγχόμενου ατόμου και η ημερομηνία λήψης και μεταφέρθηκαν άμεσα στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του Νοσοκομείου για την καλλιέργεια σύμφωνα με το πρωτόκολλο της μελέτης.

6.3 Έλεγχος αποικισμού περιβάλλοντος της ΜΕΘ

Η λήψη του δείγματος από 54 διαφορετικά σημεία του περιβάλλοντος της ΜΕΘ έγινε με ειδικό στείρο βαμβakoφόρο στυλεό με 5ml ημίρρευστο υλικό μεταφοράς Stuart σε πλαστική θήκη. Το άκρο του στυλεού, αφού διαβρέχθηκε με φυσιολογικό ορό 0,90% NaCl, σάρωσε την επιφάνεια κάθε άψυχου αντικειμένου των σημείων μελέτης. Όσον αφορά στις βρύσες το άκρο του στυλεού εισήλθε στο σωλήνα ροής της βρύσης και στους υγραντήρες στο σημείο επαφής με τον σωλήνα του αναπνευστήρα. Στη συνέχεια κάθε στυλεός τοποθετήθηκε προσεκτικά στην πλαστική θήκη του υλικού μεταφοράς, όπου αναγράφονταν το σημείο ελέγχου και η ημερομηνία της λήψης, και τα δείγματα εστάλησαν στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο

του Νοσοκομείου για την περαιτέρω καλλιεργητική διαδικασία σύμφωνα με το πρωτόκολλο της μελέτης.

6.4 Καλλιέργεια δειγμάτων

Τα ορθικά επιχρίσματα από τους ασθενείς της ΜΕΘ κατά το πρώτο διάστημα της μελέτης καλλιεργήθηκαν απευθείας σε τρυβλία με MacConkey άγαρ, τα οποία στη συνέχεια επώασθηκαν στους 37°C για 24h. Με βάση τη χαρακτηριστική μορφολογία των αποικιών (ζύμωση ή μη της λακτόζης) έγινε επιλογή και εμβολιασμός των ύποπτων για *Klebsiella pneumoniae* ή άλλου είδους μικροβίων της οικογένειας *Enterobacteriaceae* αναπτυχθεισών αποικιών σε Kligler iron άγαρ και με τον ίδιο κρίκο σε αιματούχο άγαρ και MacConkey άγαρ με ενσωματωμένη ερταπενέμη σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (0.5, 1 και 2 μg/ml) και επώασή τους στους 37°C για 24h.

Τα δείγματα από το περιβάλλον της ΜΕΘ καλλιεργήθηκαν απευθείας σε τρυβλία με MacConkey άγαρ, τα οποία στη συνέχεια επώασθηκαν στους 37°C για 24h. Με βάση τη χαρακτηριστική μορφολογία των αποικιών (ζύμωση ή μη της λακτόζης) έγινε επιλογή και εμβολιασμός των ύποπτων για *Klebsiella pneumoniae* ή άλλου είδους μικροβίων της οικογένειας *Enterobacteriaceae* αναπτυχθεισών αποικιών σε Kligler iron άγαρ και με τον ίδιο κρίκο σε αιματούχο άγαρ και MacConkey άγαρ με ενσωματωμένη ερταπενέμη σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (0.5, 1 και 2 μg/ml) και επώασή τους στους 37°C για 24h.

Όσον αφορά στα δείγματα από τα χέρια του προσωπικού οι μεν βαμβακοφόροι στυλεοί καλλιεργήθηκαν σε αιματούχο άγαρ και MacConkey άγαρ και επώασθηκαν στους 37°C για 24h-48h, τα δε τρυβλία MacConkey άγαρ που χρησιμοποιήθηκαν για την εξ επαφής δειγματοληψία των χεριών επώασθηκαν απευθείας στους 37°C για 24h-48h. Με βάση τη χαρακτηριστική μορφολογία των αποικιών έγινε επιλογή και εμβολιασμός των ύποπτων για *Klebsiella pneumoniae* ή άλλου είδους μικροβίων της οικογένειας *Enterobacteriaceae* αναπτυχθεισών αποικιών σε Kligler iron άγαρ και με τον ίδιο κρίκο σε αιματούχο άγαρ και MacConkey άγαρ με ενσωματωμένη ερταπενέμη σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (0.5, 1 και 2 μg/ml) και επώασή τους στους 37°C για 24h.

Το MacConkey άγαρ με ενσωματωμένη ερταπενέμη χρησιμοποιήθηκε μέσα σε 48h από την παρασκευή του.

Κατά το δεύτερο διάστημα της μελέτης, οι βαμβακοφόροι στυλεοί με τα ορθικά επιχρίσματα των ασθενών μεταφέρθηκαν σε έτοιμα σωληνάρια με 1ml διαλύματος PBS (phosphate-buffered saline). Οι στυλεοί ανακινήθηκαν προσεκτικά προκειμένου να απελευθερωθούν μέσα στο διάλυμα οι μικροοργανισμοί που πιθανόν περιείχαν. Στη συνέχεια, 100μl από το μικροβιακό εναιώρημα που προέκυψε μεταφέρθηκε στα αρχικά καλλιεργητικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν σε καθεμία από τις παρακάτω πέντε διαφορετικές μεθόδους (Σχεδιάγραμμα 1):

α) σε εκλεκτικό εμπλουτιστικό tryptic soy (TS) ζωμό των 5ml που περιέχει δίσκο ερταπενέμης 10μg (τελική συγκέντρωση ερταπενέμης 2μg/ml). Μετά από 24ωρη επώαση στους $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, επίστρωση 100μl ζωμού σε MacConkey άγαρ (μέθοδος CDC-TS) (CDC, 2009),

β) σε εκλεκτικό εμπλουτιστικό brain heart infusion (BHI) ζωμό των 9ml που περιέχει δίσκο ερταπενέμης 10μg (τελική συγκέντρωση ερταπενέμης 1μg/ml). Μετά από 4-6 ώρες επώασης στους $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, επίστρωση 100μl ζωμού στο χρωμογόνο καλλιεργητικό μέσο chromID ESBL (bioMerieux, France), (μέθοδος ESBL-BH),

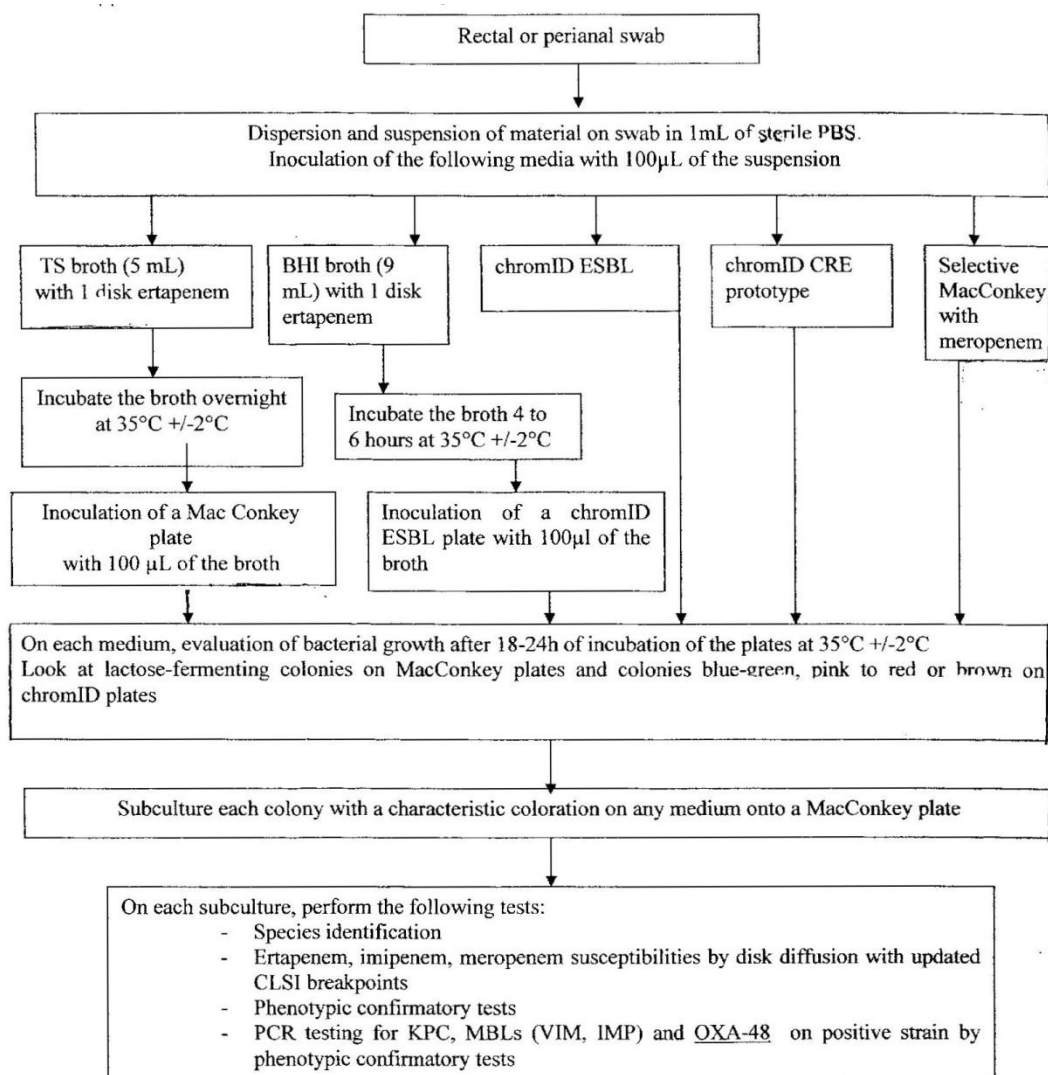
γ) απευθείας ενοφθαλμισμός και επίστρωση στο χρωμογόνο καλλιεργητικό μέσο chromID ESBL (bioMerieux, France), (μέθοδος chromID-ESBL),

δ) απευθείας ενοφθαλμισμός και επίστρωση στο πρωτότυπο χρωμογόνο καλλιεργητικό μέσο chromID CARBA (bioMerieux, France), το οποίο περιέχει θρεπτικό υλικό αποτελούμενο από διάφορες πεπτόνες, τρία χρωμογόνα υποστρώματα ικανά να ανιχνεύσουν τη δραστηριότητα ειδικών μεταβολικών ενζύμων για στελέχη *Escherichia coli*, *Klebsiella/Enterobacter/Serratia/Citrobacter* και *Proteaeae*, και κατάλληλο μείγμα αντιμικροβιακών ουσιών που επιτρέπουν την εκλεκτική ανάπτυξη των στελεχών *Enterobacteriaceae* που παράγουν καρβαπενεμάσες (CPE) (μέθοδος chromID CARBA), και

ε) απευθείας ενοφθαλμισμός και επίστρωση σε MacConkey άγαρ με ενσωματωμένη μεροπενέμη σε συγκέντρωση 1μg/ml (μέθοδος MCM). Το άγαρ αυτό χρησιμοποιήθηκε μέσα σε 48h από την παρασκευή του.

Κάθε ένα από τα παραπάνω καλλιεργητικά μέσα επώασθηκε αεροβίως στους $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ για 18 έως 24 ώρες και στη συνέχεια έγινε η αξιολόγηση της βακτηριακής ανάπτυξης από δύο ερευνητές. Επίσης, σε όλα τα χρωμογόνα καλλιεργητικά μέσα (chromID) έγινε ενοφθαλμισμός με τα παρακάτω πρότυπα στελέχη ελέγχου: carbapenemase-negative *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, carbapenemase-positive *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705, ESBL-positive *Escherichia coli* CIP

103982, ESBL-negative *Escherichia coli* ATCC 25922 και ESBL-positive *Proteus mirabilis* ATCC BAA-856.



Σχεδιάγραμμα 1: Πρωτόκολλο μελέτης αξιολόγησης του chromID CARBA συγκριτικά με άλλες τέσσερις μεθόδους για την απομόνωση CPE στελεχών.

6.5 Ανίχνευση και απομόνωση των ύποπτων για CPE αποικιών

Οι ύποπτες για CPE αποικίες που αναπτύχθηκαν στο MacConkey άγαρ με ενσωματωμένη ερταπενέμη σε οποιαδήποτε από τις τρεις συγκεντρώσεις αξιολογήθηκαν με βάση τη ζύμωση ή μη της λακτόζης και τη ζύμωση ή μη λακτόζης/γλυκόζης και την παραγωγή H₂S στο Kligler iron agar. Τα αζυμωτικά CPE στελέχη δεν ταυτοποιήθηκαν. Οι ύποπτες για CPE αποικίες που αναπτύχθηκαν στα χρωμογόνα καλλιεργητικά μέσα (chromID) αξιολογήθηκαν με βάση την χρωματική εμφάνιση των αποικιών σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (πρασινο-μπλέ με καφε-πράσινες, ροζ με μπορντώ ή καφέ αποικίες). Οι ύποπτες για CPE αποικίες που

αναπτύχθηκαν στο MacConkey άγαρ χωρίς ή με ενσωματωμένη ερταπενέμη (CDC-TS και MCM μέθοδοι αντίστοιχα), αξιολογήθηκαν με βάση τη ζύμωση ή μη της λακτόζης. Όλες οι ύποπτες για CPE αποικίες που απομονώθηκαν ανακαλλιιεργήθηκαν σε MacConkey άγαρ, τα οποία επώσθηκαν στους 35±2°C για 24h. Από τις ανακαλλιιεργηθείσες αποικίες πραγματοποιήθηκαν οι δοκιμασίες ταυτοποίησης και ελέγχου αντιμικροβιακής ευαισθησίας, καθώς και η φαινοτυπική και μοριακή ανίχνευση της παρουσίας γονιδίων καρβαπεμενάσων και άλλων ESBL.

6.6 Ταυτοποίηση και έλεγχος αντιμικροβιακής ευαισθησίας των ύποπτων για CPE αποικιών

Για την ταυτοποίηση και τον έλεγχο της αντιμικροβιακής ευαισθησίας χρησιμοποιήθηκε το αυτοματοποιημένο σύστημα Vitek 2 Compact (bioMerieux, France) με τη χρήση των χρωμομετρικών καρτών GN-ID και GN09, αντίστοιχα. Οι κάρτες αυτές φέρουν 64 πηγαδάκια καθένα από τα οποία περιέχουν ξεχωριστό δοκιμαστικό υπόστρωμα ή αντιμικροβιακό παράγοντα. Τα υποστρώματα μετρούν διάφορες μεταβολικές δραστηριότητες του μικροοργανισμού, όπως η αύξηση της οξύτητας, η αλκαλοποίηση, η ενζυματική υδρόλυση, καθώς και την ανάπτυξή του παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων.

Για την προετοιμασία του μικροβιακού εναιωρήματος, έγινε λήψη με αποστειρωμένο στυλέο ικανού αριθμού αποικιών από καθαρό μονοκαλλιέργημα των ύποπτων CPE αποικιών (όπου χρειάστηκε έγινε ανακαλλιέργεια σε MacConkey ή αιματούχο άγαρ και 24ωρη επώαση στους 37°C) και εμβολιασμός μέσα σε καθαρά ειδικά πλαστικά σωληνάρια (12x75mm) με αποστειρωμένο διάλυμα (0.45-0.50% NaCl, pH=4.5-7.0) . Το μικροβιακό εναιώρημα που προέκυψε μετρήθηκε για τη θολερότητά του σύμφωνα με την κλίμακα McFarland με τη χρήση θολοσίμετρου (για τις κάρτες GN η απαιτούμενη θολερότητα είναι 0.50-0.63). Στη συνέχεια τα σωληνάρια με το εναιώρημα και οι κάρτες GN τοποθετήθηκαν σε ειδική κασέτα (rack) 10 θέσεων συνδεδεμένα μεταξύ τους με ένα σωληνάριο μεταφοράς, έγινε η εγγραφή των δειγμάτων στο λογισμικό μέσω της οθόνης και συστήματος scanner και εισήλθε η κασέτα σε θάλαμο του μηχανήματος για την έναρξη της διαδικασίας. Η διαδικασία από την προετοιμασία του εναιωρήματος μέχρι την είσοδο της κασέτας στο μηχάνημα έγινε άμεσα και το πολύ εντός 30 λεπτών. Με μια συσκευή κενού αέρος μεταφέρθηκε αυτόματα το εναιώρημα σε κάθε ένα από τα πηγαδάκια της κάρτας, η οποία στη συνέχεια μεταφέρθηκε για επώαση σε ειδικό καρουσέλ επώασης

στους $35.5 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$, ενώ αποβλήθηκαν τα σωληνάρια με το ελαιώρημα. Κάθε κάρτα μεταφέρθηκε ανά 15 λεπτά από το καρουσέλ σε ένα οπτικό σύστημα ανίχνευσης των αντιδράσεων σε κάθε πηγαδάκι (μέτρηση θολερότητας ή αλλαγή χρώματος μεταβολικού υποστρώματος).

Τα δεδομένα από τις αντιδράσεις αυτές καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης συγκρίθηκαν με μια βάση δεδομένων στην οποία είναι καταχωρημένες οι αντιδράσεις και οι φαινότυποι μηχανισμών αντιμικροβιακής αντοχής των περισσότερων καλώς χαρακτηρισμένων μικροοργανισμών (150 είδη Gram αρνητικών μικροοργανισμών στην GN κάρτα). Από το λογισμικό του συστήματος αναφέρθηκε ο βióτυπος (Bionumber) και το είδος του μικροοργανισμού, το επίπεδο της ταυτοποίησης ("Excellent", "Very good", "Good", "Acceptable", "Low Discrimination", "Unidentified organism"), δόθηκε σε κάθε αντίδραση ο χαρακτηρισμός "+", "–", "(–)" ή "(+)" (μέσα σε παρένθεση οι ασθενείς αντιδράσεις), οι MICs στα αντιμικροβιακά, ο χαρακτηρισμός της αντιμικροβιακής ευαισθησίας "S", "I", "R", καθώς και η ύπαρξη ή μη μηχανισμού αντοχής, όπως ESBL, CARBAPENAMASE (METALLO- OR KPC), κ.α., και με βάση το μηχανισμό αντοχής έγινε αυτόματα τροποποίηση των ευαισθησιών ορισμένων αντιβιοτικών (Advanced Expert System, AES).

Τα αντιμικροβιακά που ελέγχθησαν χρησιμοποιώντας την κάρτα GN09 ήταν: Ampicillin, Amoxicillin/Clavulanic Acid, Ampicillin/Sulbactam, Ticarcillin, Ticarcillin/Clavulanic Acid, Piperacillin, Piperacillin/Tazobactam, Cefalotin, Cefuroxime, cefuroxime Acetil, Cefoxitin, Cefixime, Cefotaxime, Ceftazidime, Ceftriaxone, Cefepime, Aztreonam, Ertapenem, Imipenem, Meropenem, Amikacin, Gentamicin, Netilmicin, Tobramycin, Nalidixic Acid, Ciprofloxacin, Levofloxacin, Moxifloxacin, Norfloxacin, Ofloxacin, Minocycline, Tetracycline, Tigecycline, Nitrofurantoin, Chloramphenicol, Colistin, Trimethoprim, Trimethoprim/Sulfamethoxazole.

Για τον προσδιορισμό των MICs της ερταπενέμης, της ιμιπενέμης και της μεροπενέμης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των Etest (bioMerieux, France) σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του CLSI (CLSI, 2010). Τα Etest είναι πλαστικοποιημένες ταινίες μιας χρήσης που περιέχουν διαβαθμισμένες υποδιπλάσιες συγκεντρώσεις του αντιμικροβιακού παράγοντα (0.002 – 32 mg/ml). Για τη δοκιμασία αυτή προετοιμάστηκε μικροβιακό ελαιώρημα από τις ύποπτες για CPE απομονωμένες αποικίες θολερότητας 0.5 McFarland, το οποίο με βαμβακοφόρο

ξύλινο στυλεό επιστρώθηκε σε τρυβλίο με Mueller-Hinton (MH) άγαρ, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της μεθόδου διάχυσης σε άγαρ. Στη συνέχεια, στην επιφάνεια του MH άγαρ τοποθετήθηκε με άσηπτη λαβίδα ταινία E-test και το τρυβλίο επωάστηκε αεροβίως στους 37°C για 18h. Το αντιμικροβιακό που περιέχεται στην ταινία διαχέεται στο άγαρ, δημιουργώντας μια ζώνη αναστολής της ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε σχήμα έλλειψης γύρω από την ταινία. Για τον προσδιορισμό της MIC παρατηρήθηκε το σημείο που η ελλειπτική ζώνη αναστολής τέμνει την ταινία με τον αντιμικροβιακό παράγοντα και το οποίο αντιστοιχεί σε μια ορισμένη συγκέντρωσή του.

6.7 Όρια (breakpoints) ευαισθησίας των καρβαπενεμών

Για την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής ευαισθησίας των ύποπτων CPE στελεχών στις καρβαπενέμες χρησιμοποιήθηκαν τα breakpoints ευαισθησίας για τις καρβαπενέμες σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του CLSI (June 2010; M100-S22).

Carbapenem	Disc diffusion breakpoints (zone diameters in mm)			MIC breakpoints (μg/ml)		
	R	I	S	R	I	S
Imipenem 10μg	≥23	20-22	≤19	≤1	2	≥4
Meropenem 10μg	≥23	20-22	≤19	≤1	2	≥4
Ertapenem 10μg	≥23	20-22	≤19	≤0.25	0.5	≥1

Πίνακας 5: Όρια (breakpoints) ευαισθησίας για τις καρβαπενέμες σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του CLSI (CLSI, 2010).

Σύμφωνα με το CLSI διάμετρος ζώνης αναστολής 16-21 mm για την ερταπενέμη και 14-21 mm για τη μεροπενέμη στην μέθοδο διάχυσης δίσκων σε άγαρ (Kirby-Bauer test) μπορούν να θεωρηθούν ενδεικτικές της παραγωγής καρβαπενεμάσης παρά το γεγονός ότι δεν ανήκουν στις κατηγορίες της αντοχής. Ομοίως, MICs των 2-4 μg / ml για την ερταπενέμη και 2-8 μg / ml για την ιμιπενέμη και την μεροπενέμη θα μπορούσε να υποκρύπτουν πιθανή παραγωγή καρβαπενεμάσης. Οι MICs της ιμιπενέμης για *Proteus* spp., *Providencia* spp. και *M. morganii* τείνουν να είναι υψηλότερες από τις MICs της μεροπενέμης. Επειδή ο δίσκος ιμιπενέμης θεωρείται αμφίβολος στο screening για καρβαπενεμάσες, το CLSI συνιστά τη χρήση δίσκων ερταπενέμης ή/και μεροπενέμης. Η ερταπενέμη φαίνεται ότι έχει μεγαλύτερη ευαισθησία από ό,τι η ιμιπενέμη και η μεροπενέμη στην ανίχνευση στελεχών που

παράγουν KPC καρβαπενεμάσες. Για αυτούς τους λόγους στο φαινοτυπικό έλεγχο για την παραγωγή καρβαπενεμασών χρησιμοποιήθηκαν δίσκοι ερταπενέμης και μεροπενέμης.

6.8 Φαινοτυπικός έλεγχος για παραγωγή καρβαπενεμασών (screening tests)

Ο φαινοτυπικός έλεγχος για παραγωγή καρβαπενεμασών των ύποπτων CPE αποικιών που απομονώθηκαν από τις καλλιέργειες έγινε με τις παρακάτω μεθόδους:

α) Τροποποιημένη μέθοδος Hodge test (Modified Hodge Test, MHT): για την εκτέλεση της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε πρότυπο στέλεχος *E. coli* ATCC 25922 που ήταν ευαίσθητο στις καρβαπενέμες. Παρασκευάστηκε μικροβιακό εναιώρημα 0.5 McFarland του *E. coli* ATCC 25922 σε 5ml διαλύματος φυσιολογικού ορού 0.90% NaCl και από αυτό 0.5ml αραιώθηκαν σε 4.5ml διαλύματος φυσιολογικού ορού 0.90% NaCl (αραίωση 1:10). Στη συνέχεια από το προκύπτον διάλυμα με βαμβakoφόρο ξύλινο στυλεό μιας χρήσης επιστρώθηκε ολόκληρη η επιφάνεια τρυβλίου με MH άγαρ, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της μεθόδου διάχυσης δίσκων σε άγαρ, και αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5 λεπτά. Αφού στέγνωσε το MH άγαρ, τοποθετήθηκε στο κέντρο του ένα δισκίο μεροπενέμης 10μg. Από τις απομονωμένες ύποπτες για CPE αποικίες (όπου απαιτήθηκε έγινε ανακαλλιέργεια σε MacConkey ή αιματούχο άγαρ και 24ωρη επώαση στους 37°C) ελήφθησαν με βαμβakoφόρο ξύλινο στυλεό μιας χρήσης 3-5 αποικίες οι οποίες επιστρώθηκαν σε ευθεία γραμμή (μήκους 20-25mm), από το άκρο του δισκίου της μεροπενέμης ως το άκρο του τρυβλίου. Το τρυβλίο επώασθηκε αεροβίως στους 37°C για τουλάχιστον 16h. Κατόπιν, η αξιολόγηση και η ερμηνεία του αποτελέσματος έγινε ως εξής:

- **MHT θετικό (+):** ανάπτυξη του πρότυπου στελέχους *E. coli* ATCC 25922 γύρω από τον υπό εξέταση μικροοργανισμό προκαλώντας παραμόρφωσή της ζώνης αναστολής του γύρω από το δισκίο της μεροπενέμης «δίκην φύλλου τριφυλλιού». Παραγωγή καρβαπενεμασών από τον μικροοργανισμό.

- **MHT αρνητικό (-):** μη ανάπτυξη του πρότυπου στελέχους *E. coli* ATCC 25922 γύρω από τον υπό εξέταση μικροοργανισμό και μη παραμόρφωση της ζώνης αναστολής του γύρω από το δισκίο μεροπενέμης. Μη παραγωγή καρβαπενεμασών από τον μικροοργανισμό.

Όπως αναφέρθηκε, με το MHT δεν γίνεται διάκριση του τύπου των καρβαπενεμασών που παράγει το εξεταζόμενο μικροβιακό στέλεχος.

β) Έλεγχος διπλής συνέργειας με δίσκους (double disk synergy test, DDST): για την εκτέλεση της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε φαινυλ-βορονικό οξύ (PBA) (benzeneboronic acid, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethylsulfoxide, DMSO) σε συγκέντρωση 20 mg/ml. 20μl από το διάλυμα αυτό (που περιείχαν 400μg βορονικού οξέος) διανεμήθηκαν σε δίσκους μεροπενέμης 10μg. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε άνυδρο EDTA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) που διαλύθηκε σε απεσταγμένο νερό ώστε να προκύψει συγκέντρωση 0.1M. Από το διάλυμα αυτό 10μl (που περιείχαν 292μg EDTA) διανεμήθηκαν σε δίσκους μεροπενέμης 10μg. Στη συνέχεια οι δίσκοι αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 60min. Από τις ύποπτες απομονωμένες αποικίες για CPE (όπου χρειάστηκε έγινε ανακαλλιέργεια σε MacConkey ή αιματούχο άγαρ και 24ωρη επώαση στους 37°C) ελήφθησαν με ένα βαμβακοφόρο στυλεό μιας χρήσης 3-5 αποικίες και επιστρώθηκε ολόκληρη η επιφάνεια τρυβλίου που περιείχε MH άγαρ, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της μεθόδου διάχυσης δίσκων σε άγαρ, και αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5 λεπτά. Αφού στέγνωσε το τρυβλίο με το MH άγαρ, τοποθετήθηκαν στην επιφάνειά του ένας δίσκος μεροπενέμης 10μg και τρεις δίσκοι μεροπενέμης που περιείχαν ή 400 μg PBA, ή 292 μg EDTA ή 400 μg PBA μαζί με 292 μg EDTA. Το τρυβλίο MH άγαρ με τους δίσκους επώασθηκε αεροβίως στους 37°C για 16-24h. Για την αξιολόγηση του αποτελέσματος έγινε σύγκριση της διαμέτρου της ζώνης αναστολής γύρω από τους δίσκους της μεροπενέμης που περιείχαν τους ανασταλτικούς παράγοντες PBA και EDTA με τη διάμετρο της ζώνης αναστολής γύρω από το δίσκο της μη εμποτισμένης με αναστολείς μεροπενέμης. Η ερμηνεία του αποτελέσματος έγινε ως εξής:

- Διεύρυνση της διαμέτρου της ζώνης αναστολής $\geq 5\text{mm}$ γύρω από το δίσκο της μεροπενέμης με την προσθήκη PBA, καθώς και γύρω από το δίσκο μεροπενέμης που περιείχε μαζί PBA και EDTA σε σύγκριση με τη διάμετρο της ζώνης αναστολής της μεροπενέμης χωρίς προσθήκη αναστολέων είναι θετική για την παραγωγή τύπου KPC καρβαπεμενασών

- Διεύρυνση της διαμέτρου της ζώνης αναστολής $\geq 5\text{mm}$ γύρω από το δίσκο της μεροπενέμης με την προσθήκη EDTA, καθώς και γύρω από το δίσκο μεροπενέμης που περιείχε μαζί PBA και EDTA σε σύγκριση με τη διάμετρο της ζώνης αναστολής της μεροπενέμης χωρίς προσθήκη αναστολέων είναι θετική για την παραγωγή τύπου MBL καρβαπεμενασών

- Διεύρυνση της διαμέτρου της ζώνης αναστολής $\geq 5\text{mm}$ μόνο γύρω από το δίσκο της μεροπενέμης που περιείχε μαζί PBA και EDTA και διεύρυνση της ζώνης αναστολής $< 5\text{mm}$ γύρω από το δίσκο μεροπενέμης με προσθήκη PBA και το δίσκο μεροπενέμης με προσθήκη EDTA σε σύγκριση με τη διάμετρο της ζώνης αναστολής της μεροπενέμης χωρίς προσθήκη αναστολέων είναι θετική για την παραγωγή τύπου MBL και τύπου KPC καρβαπεμενασών.

- Τέλος, όταν καμία από τις παραπάνω συνδυαστικές μεθόδους δεν ήταν θετική, τότε το εξεταζόμενο μικροβιακό στέλεχος θεωρήθηκε ότι δεν παράγει τύπου MBL και τύπου KPC καρβαπενεμάσες (Tsakris *et al*, 2009; Tsakris *et al*, 2010)

6.9 Μοριακή τυποποίηση στελεχών

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της παρουσίας γονιδίων αντοχής στο μικροβιακό κύτταρο και την επιβεβαίωση των CPE στελεχών κατά το δεύτερο διάστημα της μελέτης. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση των γονιδίων *bla_{KPC}* για καρβαπενεμάσες τύπου KPC, των γονιδίων *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* και *bla_{NDM}* για μέταλλο-βήτα-λακταμάσες τύπου IMP, VIM (Tsakris *et al*, 2010) και NDM (Perry JD *et al*, 2011) αντίστοιχα, και του γονιδίου *bla_{OXA-48}* για καρβαπενεμάσες τύπου OXA-48 (Poirel L *et al*, 2004). Επιπλέον, με την PCR έγινε η ανίχνευση γονιδίων της πλασμιδιακής *AmpC* και γονιδίων των εκτεταμένου φάσματος βήτα-λακταμασών (ESBL), και ειδικότερα των γονιδίων *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{GES/IBC}* (Tsakris *et al*, 2010). Για την ανίχνευση των γονιδίων χρησιμοποιήθηκαν οι ειδικοί εκκινητές (primers) που περιγράφονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 6: Εκκινητές για την ανίχνευση καρβαπεμενασών

Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητή (5' → 3')	Μέγεθος προϊόντος PCR (bp)	Συνθήκες PCR	Αναφορά
<i>bla_{IMP}</i>	CTACCGCAGCAGAGTCTTTG AACCAGTTTTGCCTTACCAT	587		Ikonomidis <i>et al</i> , 2005
<i>bla_{VIM}</i>	ATGGTGTGTTGGTCGCATATC TGGGCCATTTCAGCCAGATC	510	94°C 2min	Poirel <i>et al</i> , 2000
<i>bla_{NDM}</i>	GGGCAGTCGCTTCCAACGGT GTAGTGGTCAGTGTCTGGCAT	475	95°C 5min 95°C 30s x 30 60°C 40s 72°C 50s 72°C 6min	Perry <i>et al</i> , 2011
<i>bla_{KPC}</i>	GCTACACCTAGCTCCACCTT GCATGGATTACCAACCACTGT	989		Tsakris <i>et al</i> , 2009
<i>bla_{OXA-48}</i>	TTGGTGGCATCGATTATCGG GAGCACTTCTTTTGTGATGGC	743		Poirel <i>et al</i> , 2004

Πίνακας 7: Εκκινητές για την ανίχνευση ESB�

Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητή (5'→ 3')	Μέγεθος προϊόντος PCR (bp)	Συνθήκες PCR	Αναφορά
<i>bla</i> _{TEM}	TTGGGTGCACGAGTGGGTTA TAATTGTTGCCGGAAGCTA	465	95°C 5min 94°C 1min 58°C 30s x 35 72°C 1min 72°C 10min	Tzelepi <i>et al</i> , 2003
<i>bla</i> _{CTX-M-3}	GTAAAAAATCACTGCG TGGGCCATTCAGCCAGATC	873	95°C 5min 94°C 1min 58°C 1min x 35 72°C 2min 72°C 10min	
<i>bla</i> _{SHV}	ACTGAATGAGGCGCTTCC CGCACCCCGCTTGCT	220	95°C 5min 94°C 45s 54°C 45s x 35 72°C 1min 72°C 10min	
<i>bla</i> _{GES/IBC}	CCCCAAGGAGAGATCGTCG GTAATCTCTCTCCTGGGCTT	618	95°C 5min 94°C 1min 62°C 1min x 35 72°C 2min 72°C 10min	Giakkoupi <i>et al</i> , 2000

Πίνακας 8: Εκκινητές για την πλασμιδιακή AmpC

Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητή (5' → 3')	Μέγεθος προϊόντος PCR (bp)	Συνθήκες PCR	Αναφορά
<i>bla_{MOX-1}</i> , <i>bla_{MOX-2}</i> , <i>bla_{CMY-1}</i> , <i>bla_{CMY-8}</i> to <i>bla_{CMY-11}</i>	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT CACATTGACATAGGTGTGGTGC	520	94°C 3min 94°C 30s x 25 64°C 30s 72°C 1min 72°C 7min	Pérez-Pérez <i>et al</i> , 2002
<i>bla_{LAT-1}</i> to <i>bla_{LAT-4}</i> , <i>bla_{CMY-2}</i> to <i>bla_{CMY-7}</i> , <i>bla_{BIL-1}</i>	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	462		
<i>a_{DHA-1}</i> , <i>bla_{DHA-2}</i>	AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT CCGTACGCATACTGGCTTTGC	405		
<i>bla_{ACC}</i>	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA TTCGCCGCAATCATCCCTAGC	346		
<i>bla_{MIR-1T}</i> <i>bla_{ACT-1}</i>	TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT	302		
<i>bla_{FOX-1}</i> to <i>bla_{FOX-5b}</i>	AACATGGGGTATCAGGGAGATG CAAAGCGCGTAACCGGATTGG	190		

Για την πραγματοποίηση της PCR έγινε εκχύλιση του DNA από τα βακτηριακά σώματα με τη χρήση του kit Nucleospin tissue (Macherey-Nagel, Lab Supplies). Επίσης, για τον καθαρισμό των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο ExoSAP-IT (USB Corporation, Cleavelant, OH). Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων της PCR (sequencing) για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων και την ανεύρεση τυχόν μεταλλάξεων έγινε με τη χρήση ABI Prism 377 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Τα αρνητικά στην PCR στελέχη εξετάσθηκαν επιπλέον με την τροποποιημένη μέθοδο Hodge test (MHT) όπως περιγράφηκε προηγουμένως.

6.10 Προσδιορισμός ορίου ανίχνευσης των μεθόδων

Για τον προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης (limit of detection, LOD) των πέντε διαφορετικών μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση CPE στελεχών κατά το δεύτερο διάστημα της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν ως CPE στελέχη αναφοράς τα παρακάτω επιβεβαιωμένα από το εργαστήριό μας μικροβιακά κλινικά στελέχη:

- τέσσερα στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάσες τύπου KPC (αναφέρονται ως *K. pneumoniae* 1, *K. pneumoniae* 2, *K. pneumoniae* 3, *K. pneumoniae* 4)
- ένα στέλεχος *E. coli* που παράγει καρβαπενεμάση τύπου KPC (*E. coli* 1)
- ένα στέλεχος *K. pneumoniae* που παράγει μέταλλο-βήτα-λακταμάση τύπου VIM (*K. pneumoniae* 5)
- ένα πρότυπο στέλεχος *K. pneumoniae* που παράγει μέταλλο-βήτα-λακταμάση τύπου NDM (*K. pneumoniae* ATCC BAA-2146), και
- ένα πρότυπο στέλεχος *K. pneumoniae* που παράγει καρβαπενεμάση τύπου OXA-48 (*K. pneumoniae* NCTC 13442)

Τα στελέχη αυτά αποψύχθηκαν και ανακαλλιεργήθηκαν σε τρυβλία με MacConkey άγαρ, τα οποία επώσθησαν αεροβίως στους 37°C για 24h. Στη συνέχεια δημιουργήθηκε μικροβιακό εναιώρημα 0.5 McFarland ($\approx 2 \times 10^8$ CFU/ml) σε διάλυμα φυσιολογικού ορού 0.90% NaCl λαμβάνοντας με ένα αποστειρωμένο στυλεό μιας χρήσης ικανό αριθμό απομονωμένων αποικιών. Στη συνέχεια έγιναν διαδοχικές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις σε διάλυμα φυσιολογικού ορού 0.90% NaCl του αρχικού μικροβιακού εναιωρήματος. Μια ποσότητα των 100μl από κάθε αραιώση μεταφέρθηκε σε κάθε ένα από τα καλλιεργητικά μέσα των πέντε διαφορετικών μεθόδων, όπως περιγράφηκε ανωτέρω. Ίδια ποσότητα μεταφέρθηκε και σε ένα απλό MacConkey άγαρ (μέσο αναφοράς) για τον υπολογισμό του αριθμού των αναπτυχθέντων αποικιών μετά από αερόβια επώαση στους 37°C για 24h. Η ανάπτυξη των αποικιών σε κάθε μία από τις καλλιεργητικές μεθόδους συνεκρίθει με την ανάπτυξη στο απλό MacConkey άγαρ. Το όριο ανίχνευσης (LOD) για κάθε μια από τις μεθόδους ήταν η χαμηλότερη συγκέντρωση των στελεχών αναφοράς στην οποία ανεπτύχθηκαν αποικίες τους. Ο τελικός υπολογισμός του LOD προέκυψε από την εκτέλεση της ανωτέρω διαδικασίας τρεις φορές.

6.11 Προσδιορισμός της ευαισθησίας και της ειδικότητας των μεθόδων ελέγχου

Στην παρούσα μελέτη υπολογίσθηκαν η ευαισθησία (sensitivity), η ειδικότητα (specificity), η θετική προγνωστική αξία (positive predictive value, PPV), η αρνητική προγνωστική αξία (negative predictive value, NPV) και η συνολική ακρίβεια (overall accuracy) για κάθε μία από τις συγκρινόμενες μεθόδους ελέγχου.

Ως *αληθώς θετικά στελέχη* ορίσθηκαν όσα ύποπτα για CPE στελέχη ανεπτύχθησαν στα καλλιεργητικά μέσα και επιβεβαιώθηκαν για την ύπαρξη γονιδίου αντοχής στις καρβαπενέμες (CPE θετικά) με τις μοριακές μεθόδους.

Ως *ψευδώς θετικά στελέχη* ορίσθηκαν όσα ύποπτα για CPE στελέχη ανεπτύχθησαν στα καλλιεργητικά μέσα αλλά δεν επιβεβαιώθηκαν μοριακώς (CPE αρνητικά).

Ως *αληθώς αρνητικό αποτέλεσμα* ορίσθηκε η μη ανάπτυξη μικροοργανισμών στα καλλιεργητικά μέσα όλων των συγκρινόμενων μεθόδων ελέγχου.

Ως *ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα* μιας συγκεκριμένης μεθόδου ορίσθηκε η μη ανάπτυξη μικροοργανισμών που επιβεβαιώθηκαν μοριακώς ως CPE θετικά στελέχη στο καλλιεργητικό μέσο της μεθόδου αυτής.

Οι διαφορές στην ευαισθησία και την ειδικότητα μεταξύ των συγκρινόμενων μεθόδων ελέγχου αναλύθηκαν στατιστικώς με την δοκιμασία χ^2 (chi-square test). Ως στατιστικώς σημαντική ορίσθηκε η διαφορά που προέκυψε από την ανάλυση με τιμή $P < 0.05$.

6.12 Καταγραφή ελέγχου αποικισμού ασθενών, προσωπικού και περιβάλλοντος της ΜΕΘ και λοιμώξεων από στελέχη CPE

Για την καταγραφή των δεδομένων που προέκυψαν κατά τον έλεγχο αποικισμού των ασθενών, του προσωπικού και του περιβάλλοντος της ΜΕΘ και των λοιμώξεων που προκλήθηκαν από στελέχη CPE στους ασθενείς της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν και συμπληρώθηκαν συγκεκριμένα έντυπα που παρατίθενται παρακάτω.

**ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΑΠΟ GRAM (-)
ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΥΝ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΤΗΣ
ΜΕΘ**

Α.Μ. Ασθενούς:

Κλίνη:

Ονοματεπώνυμο:

Ηλικία:

Φύλο: Άρρεν ☐ Θήλυ ☐

Ημερομηνία εισαγωγής στο Νοσοκομείο:

Ημερομηνία εισαγωγής στη ΜΕΘ:

Αιτία εισαγωγής:

Apache score II εισόδου:

Διασωλήνωση:

Ναι ☐ Όχι ☐

Ημερομηνία διασωλήνωσης:

Υποκείμενα νοσήματα:

ΣΔ ☐ ΧΑΠ ☐ ΧΝΑ ☐

Καρδιακή ανεπάρκεια ☐

Χρόνια Ηπατική Ανεπάρκεια ☐

Παχυσαρκία ☐

Κύηση ☐ Ανοσοκαταστολή ☐

Άλλο:

Ιστορικό Νοσηλείας σε άλλο Νοσοκομείο το προηγούμενο:

3 μηνο Ναι ☐ Όχι ☐

6 μηνο Ναι ☐ Όχι ☐

12 μηνο Ναι ☐ Όχι ☐

Έλεγχος αποικισμού από ορθικό επίχρισμα:

- Κατά την είσοδο:

2^η εβδομάδα

3^η εβδομάδα

4^η εβδομάδα

5^η εβδομάδα

6^η εβδομάδα

7^η εβδομάδα

8^η εβδομάδα

9^η εβδομάδα

10^η εβδομάδα

11^η εβδομάδα

12^η εβδομάδα

13^η εβδομάδα

14^η εβδομάδα

15^η εβδομάδα

16^η εβδομάδα

17^η εβδομάδα

18^η εβδομάδα

19^η εβδομάδα

20^η εβδομάδα

21^η εβδομάδα

22^η εβδομάδα

23^η εβδομάδα

24^η εβδομάδα

Ημερομηνία 1^{ης} θετικής καλλιέργειας για Gram (-) βακτήριο που παράγει καρβαπενεμάσες:

Υλικό απομόνωσης: Βρογχικές εκκρίσεις ☐ Ποσοτική καλλιέργεια:

Πύον ☐ Ούρα ☐ Αίμα ☐ λήψη από: ΚΦΚ ☐ ΠΦ ☐

Άκρο ΚΦΚ ☐ είδος και ημερομηνία τοποθέτησης ΚΦΚ:

Άλλο υλικό:

Κεντρικοί αγγειακοί καθετήρες την ημέρα της 1^{ης} θετικής καλλιέργειας: Ναι ☐

Όχι ☐

Είδος και ημερομηνία τοποθέτησης:

Αντιμικροβιακή αγωγή πριν την 1^η θετική καλλιέργεια (έως και 10 ημέρες πριν):

Ιμепенέμη ☐ Μεροπενέμη ☐ Κολιμυκίνη ☐ Τιγκεκυκλίνη ☐ Γενταμικίνη ☐

Άλλη αμινογλυκοσίδη ☐ Κεφαλοσπορίνες γ' και δ' γενεάς ☐ Κινολόνες ☐

Πιπερακιλλίνη/Ταζομπακτάμη ☐ Τικαρκιλλίνη/Κλαβουλανικό οξύ ☐

Αζτρεονάμη ☐ Γλυκοπεπτίδια ☐ Λινεζολίδη ☐ Άλλο:

Εντόπιση/ είδος λοίμωξης από Gram (-) βακτήρια που παράγουν καρβαπενεμάσες:

Πνευμονία ☐ είδος μικροβίου:

Ουρολοίμωξη ☐ είδος μικροβίου:

Λοίμωξη χειρουργικού πεδίου ☐ είδος μικροβίου:

Ενδοκοιλιακή λοίμωξη ☐ είδος μικροβίου:

Πρωτοπαθής μικροβιαμία ☐ είδος μικροβίου:

Δευτεροπαθής μικροβιαμία ☐ είδος μικροβίου:

Μικροβιαμία ΚΦΚ ☐ είδος μικροβίου:

Άλλη.....

Ο ασθενής την 1^η μέρα της θεραπείας είχε **σηπτικό σοκ**; Ναι ☐ Όχι ☐

Είδος θεραπευτικής αγωγής της λοίμωξης

Νεφρική ανεπάρκεια: Ναι ☐ Όχι ☐ Αιμοκάθαρση: Ναι ☐ Όχι ☐

Αντιβιοτικά	Δοσολογία	Κρεατινίνη ορού	Διάρκεια χορήγησης

Θετικές καλλιέργειες για Gram (-) που παράγουν καρβαπενεμάσες:

Ημ/νία									
Υλικό									

Κλινική έκβαση της λοίμωξης (14 ημέρες μετά την έναρξη της αγωγής):

Ίαση ☐ βελτίωση ☐ επιδείνωση ☐ υποτροπή ☐ θάνατος ☐ ημ/νία: αιτία:

Τελική έκβαση: έξοδος ☐ θάνατος ☐

**ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΤΗΣ ΜΕΘ ΑΠΟ
GRAM (-) ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΥΝ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ**

Α/α:

Αντικείμενο ελέγχου: νεροχύτης ☐

επιφάνεια ☐

χειρολαβή ☐

κλίνη ☐

υγραντήρας παροχής οξυγόνου ☐

τραπεζίδιο φαρμάκων ☐

Ημερομηνία 1^{ου} ελέγχου αποικισμού:

Αποτέλεσμα:

Ημερομηνία 2^{ου} ελέγχου αποικισμού:

Αποτέλεσμα:

Ημερομηνία 3^{ου} ελέγχου αποικισμού:

Αποτέλεσμα:

Ημερομηνία 4^{ου} ελέγχου αποικισμού:

Αποτέλεσμα:

Ημερομηνία 5^{ου} ελέγχου αποικισμού:

Αποτέλεσμα:

Ημερομηνία 6^{ου} ελέγχου αποικισμού:

Αποτέλεσμα:

**ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΧΕΡΙΩΝ ΤΟΥ ΠΡΟΣΩΠΙΚΟΥ ΤΗΣ
ΜΕΘ ΑΠΟ GRAM (-) ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΥΝ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ**

Α/α:

Ονοματεπώνυμο:

Φύλο: Άνδρας ☐ Γυναίκα ☐

Ηλικία:

Ιδιότητα: Ιατρός ☐ Νοσηλεύτης ☐ Άλλη: _____

Ημερομηνία 1^{ου} ελέγχου αποικισμού:

Αποτέλεσμα:

Ημερομηνία 2^{ου} ελέγχου αποικισμού:

Αποτέλεσμα:

Ημερομηνία 3^{ου} ελέγχου αποικισμού:

Αποτέλεσμα:

Ημερομηνία 4^{ου} ελέγχου αποικισμού:

Αποτέλεσμα:

Ημερομηνία 5^{ου} ελέγχου αποικισμού:

Αποτέλεσμα:

Ημερομηνία 6^{ου} ελέγχου αποικισμού:

Αποτέλεσμα:

6.13 Υπολογισμός βαρύτητας κλινικής νόσου εισόδου (APACHE II score)

Η βαρύτητα της κλινικής νόσου κάθε ασθενούς κατά την εισαγωγή του στη ΜΕΘ εκτιμήθηκε με βάση τον υπολογισμό του APACHE II score, σύμφωνα με το παρακάτω υπόδειγμα:

APACHE II Score εισόδου
A/α:
Ονοματεπώνυμο:
Θερμοκρασία:
Μέση ΑΠ:
Καρδιακή συχνότητα:
Αναπνευστική συχνότητα:
PaO₂:
pH:
Na:
K:
Cr:
Ht:
WBC:
15-GSC:
Ηλικία:
Χρόνια κατάσταση υγείας:
Ηπατική ανεπάρκεια:
Καρδιαγγειακή ανεπάρκεια:
Αναπνευστική ανεπάρκεια:
Νεφρική ανεπάρκεια:
Ανοσοκαταστολή:
Μη χειρουργικός ασθενής:
Χειρουργικός μετά από επείγουσα επέμβαση:
Χειρουργικός μετά από προγραμματισμένη επέμβαση:
APACHE II Score:

6.14 Στατιστική ανάλυση των δεδομένων

Για την στατιστική επεξεργασία των δεδομένων της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS (IBM, SPSS, version 22).

Για τον προσδιορισμό της τιμής P χρησιμοποιήθηκαν μη παραμετρικές μέθοδοι, όπως το Fisher's Exact test (χ^2 τεστ) για τις ποιοτητές μεταβλητές και το Mann Whitney U-test (t τεστ) για τις ποσοτικές μεταβλητές, σε περίπτωση μη κανονικής κατανομής των τιμών.

Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στην τιμή $P < 0.05$.

Υπολογίσθηκαν, επίσης, τα ποσοστά πιθανοτήτων (Odds ratios, OR), καθώς και τα διαστήματα εμπιστοσύνης (95% confidence intervals, CI).

6.15 Μέτρα ελέγχου αποικισμού και λοιμώξεων από CPE στελέχη στη ΜΕΘ

Όπως αναφέρθηκε, εξετάστηκε η δυνατότητα εφαρμογής επιπρόσθετων μέτρων ελέγχου και πρόληψης του αποικισμού και των λοιμώξεων από τα CPE στελέχη στη ΜΕΘ, μετά την πρώτη περίοδο (περίοδος Ι) μελέτης του αποικισμού και των λοιμώξεων από τα στελέχη αυτά (Μάιος - τέλη Ιουλίου 2010). Κατόπιν ενημέρωσης για τα αποτελέσματα της περιόδου Ι και συμφωνίας με το ιατρικό και νοσηλευτικό προσωπικό της ΜΕΘ εφαρμόστηκαν συγκεκριμένα μέτρα πλέον του καθιερωμένου κλεισίματος και απολύμανσης της μονάδος που έγινε τέλη Ιουλίου με αρχές Αυγούστου 2010 (για διάστημα 15 ημερών).

Τα μέτρα αυτά ήταν:

- Ορισμός προσωπικού που θα ασχολείται αποκλειστικά και καθημερινά με τον καθαρισμό και την απολύμανση των αντικειμένων της ΜΕΘ (κρεβάτια, τραπεζίδια, μόνιτορς, πόρτες, πόμολα, χερούλια, επιφάνειες). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν απολυμαντικά διαλύματα υποχλωριώδους νατρίου (1:10) και αλκοόλης. Ο καθαρισμός θα επαναλαμβάνεται κάθε φορά που θα υφίσταται ανάγκη.
- Ενημέρωση των ιατρών και του λοιπού προσωπικού ως προς τα συνήθη μέτρα ελέγχου (σύμφωνα με τις οδηγίες του ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.) και κυρίως για την εφαρμογή μέτρων υγιεινής με τη χρήση νερού και αντισηπτικού σαπουνιού ή ειδικής γέλης με βάση την αλκοόλη πριν και μετά την επαφή ή τον χειρισμό σε κάθε ασθενή και την αυστηρή χρήση γαντιών μιας χρήσεως.
- Συνέχιση του ελέγχου αποικισμού (ενεργητική επιτήρηση) των ασθενών που εισέρχονται στη ΜΕΘ (μετά το κλείσιμο και την απολύμανσή της, περίοδος

II) και άμεση ενημέρωση σε περίπτωση αποικισμού τους με στελέχη CPE. Ασθενείς με προηγούμενη νοσηλεία σε ΜΕΘ ή σε μονάδα μακροχρόνιας φροντίδας αντιμετωπίζονται ως πιθανώς αποικισμένοι με τα στελέχη αυτά εξ' αρχής, μέχρι την επιβεβαίωση του αποτελέσματος.

- Απομόνωση των ασθενών που είναι αποικισμένοι με CPE στελέχη, ανεξαρτήτως παρουσίας ή μη λοίμωξης. Σε περίπτωση που αυτό δεν είναι χωροταξικά δυνατόν η απομόνωση θα γίνει κατά προτεραιότητα σε ασθενείς με ενεργό λοίμωξη από CPE ή ομαδοποίησή αυτών. Σε περίπτωση ομαδοποίησης θα παρεμβάλλεται ανάμεσα στους ασθενείς κουρτίνα ή παραβάν.
- Καθορισμός νοσηλευτικού προσωπικού αποκλειστικής φροντίδας των ασθενών που είναι αποικισμένοι ή έχουν λοίμωξη από CPE στελέχη.
- Καλύτερη συνεργασία ιατρών της ΜΕΘ και ιατρών του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου όσον αφορά στην απομόνωση στελεχών CPE από κλινικά δείγματα ασθενών της ΜΕΘ και στα αποτελέσματα του ελέγχου ευαισθησίας τους στα αντιμικροβιακά, ώστε να καθοριστεί το ταχύτερο δυνατόν η κατάλληλη αντιμικροβιακή αγωγή και να εφαρμοσθούν εγκαίρως τα προτεινόμενα μέτρα ελέγχου.

Τα μέτρα αυτά εφαρμόστηκαν αφού πρώτα πραγματοποιήθηκε το κλείσιμο της ΜΕΘ, με την προηγουμένως κατάλληλη μεταφορά των ασθενών σε άλλες μονάδες, και η απολύμανση της που διήρκησε 15 ημέρες. Η απολύμανση της ΜΕΘ έγινε από ειδικό συνεργείο απολύμανσης και αφορούσε σε όλους τους χώρους, τις επιφάνειες και τα αντικείμενα της μονάδος. Τα απολυμαντικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν περιείχαν σταθεροποιημένο υδατικό διάλυμα διοξειδίου του χλωρίου ClO_2 περιεκτικότητας 10,000 ppm (1% κ.ο.) (DALCO-100, Dalcochem), ενώ για την απολύμανση των χώρων κατ' όγκο η χρήση του έγινε με τη μέθοδο της εκνέφωσης U/V (Ultra Low Volume) (ψεκασμός). Το διοξειδίου του χλωρίου ClO_2 έχει ισχυρή βιολογική δράση, 2.6 φορές ισχυρότερη από το υποχλωριώδες νάτριο και δεν επηρεάζεται από υψηλές θερμοκρασίες και μεταβολές του pH. Η βιοκτόνος δράση του οφείλεται στην ισχυρή οξειδωτική του ικανότητα και διαθέτει ευρύ αντιμικροβιακό φάσμα, καθώς καταπολεμά βακτήρια, άλγη, μύκητες και ιούς αλλά και καταστρέφει πλήρως βιομεμβράνες (biofilms) που είναι σημαντικό για τη ΜΕΘ.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Αποτελέσματα ελέγχου αποικισμού των ασθενών της ΜΕΘ

Από τους 80 ασθενείς που ελέγχθησαν με τη λήψη ορθικού επιχρίσματος για αποικισμό από *Enterobacteriaceae* που παράγουν καρβαπενεμάσες (CPE) καθ' όλο το πρώτο διάστημα της μελέτης (Μάϊος-Οκτώβριος 2010):

- 6 ασθενείς ήταν αποικισμένοι κατά την εισαγωγή τους με *K. pneumoniae* KPC (+). Από αυτούς 2 ασθενείς συνέχισαν να είναι αποικισμένοι μόνο με *K. pneumoniae* KPC (+), ενώ 3 ασθενείς βρέθηκαν σε επόμενους ελέγχους αποικισμένοι και με *K. pneumoniae* MBLs (+), εκ των οποίων 2 ασθενείς και με *Proteus mirabilis* KPC (+).
- 1 ασθενής ήταν αποικισμένος κατά την εισαγωγή του με *K. pneumoniae* MBLs (+) και σε επόμενους ελέγχους βρέθηκε αποικισμένος με *K. pneumoniae* KPC (+).

Επομένως, 7 στους 80 (8,8%) ασθενείς της μελέτης βρέθηκαν αποικισμένοι κατά την εισαγωγή τους στη ΜΕΘ.

Από τους υπόλοιπους 73 ασθενείς που δεν ήταν αρχικώς αποικισμένοι, 41 παρέμειναν στη ΜΕΘ >7 ημέρες και συμμετείχαν στον εβδομαδιαίο έλεγχο αποικισμού (ενεργητική επιτήρηση) μέχρι την έξοδό τους από τη ΜΕΘ (εξιτήριο ή θάνατος). Από αυτούς τους ασθενείς, 29/41 (70,7%) αποικίσθηκαν με στελέχη CPE. Αναλυτικότερα:

- 18 ασθενείς αποικίσθηκαν κατά την παραμονή τους στη ΜΕΘ μόνο με *K. pneumoniae* KPC (+), εκ των οποίων ένας ασθενής βρέθηκε αποικισμένος ταυτόχρονα με δυο διαφορετικά στελέχη *K. pneumoniae* KPC (+)
- 3 ασθενείς αποικίσθηκαν κατά την παραμονή τους στη ΜΕΘ μόνο με *K. pneumoniae* MBLs (+)
- 2 ασθενείς που αποικίσθηκαν αρχικώς με *K. pneumoniae* MBLs (+) βρέθηκαν σε επόμενους ελέγχους αποικισμένοι και με *K. pneumoniae* KPC (+), εκ των οποίων ένας ασθενής και με άλλο διαφορετικό στέλεχος *K. pneumoniae* KPC (+)
- 2 ασθενείς που αποικίσθηκαν αρχικώς με *K. pneumoniae* KPC (+) βρέθηκαν σε επόμενους ελέγχους αποικισμένοι και με *K. pneumoniae* MBLs (+), εκ των οποίων ένας ασθενής και με άλλο διαφορετικό στέλεχος *K. pneumoniae* KPC(+)

- ένας ασθενής αποικίσθηκε κατά την παραμονή του στη ΜΕΘ αρχικώς με *Enterobacter aerogenes* MBLs (+) και στη συνέχεια με *K. pneumoniae* MBLs (+)
- ένας ασθενής βρέθηκε αποικισμένος ταυτόχρονα με *K. pneumoniae* MBLs (+) και με *K. pneumoniae* KPC (+)
- ένας ασθενής βρέθηκε αποικισμένος ταυτόχρονα με *K. pneumoniae* KPC (+) και με *Proteus mirabilis* MBLs (+)
- ένας ασθενής αποικίσθηκε αρχικά με *K. pneumoniae* KPC (+) και στη συνέχεια βρέθηκε αποικισμένος ταυτόχρονα με *K. pneumoniae* KPC (+) και με *Enterobacter cloacae* KPC (+)

Συνολικά, από 36/80 (45,0%) ασθενείς της πρώτης περιόδου της μελέτης απομονώθηκαν 130 στελέχη CPE. Συγκεκριμένα:

- 99 στελέχη *K. pneumoniae* KPC (+)
- 24 στελέχη *K. pneumoniae* MBLs (+)
- 3 στελέχη *Proteus mirabilis* KPC (+)
- 2 στελέχη *Enterobacter cloacae* KPC (+)
- ένα στέλεχος *Enterobacter aerogenes* MBLs (+)
- και ένα στέλεχος *Proteus mirabilis* MBLs (+)

Θα πρέπει να αναφέρουμε ότι όλα τα παραπάνω στελέχη ανεπύχθησαν σε όλες τις συγκεντρώσεις (0.5, 1 και 2 µg/ml) της ενσωματωμένης ερταπενέμης στα McConkey άγαρ, εκτός από ένα στέλεχος *K. pneumoniae* και ένα στέλεχος *P. mirabilis* που δεν ανεπύχθησαν μόνο στο McConkey άγαρ με συγκέντρωση ενσωματωμένης ερταπενέμης 2µg/ml και τα οποία, ωστόσο, έδωσαν θετικές φαινοτυπικές δοκιμασίες για παραγωγή KPC τύπου καρβαπενεμάσες. Αντίθετα, ένα στέλεχος *E. coli* που ανεπύχθη μόνο στο McConkey άγαρ με συγκέντρωση ενσωματωμένης ερταπενέμης 0.5µg/ml, έδωσε αρνητικές δοκιμασίες για καρβαπενεμάσες, όπως συνέβη και με ένα στέλεχος *Proteus* spp. και ένα στέλεχος *Klebsiella* spp., που ανεπύχθησαν στο McConkey άγαρ με συγκέντρωση ενσωματωμένης ερταπενέμης 0.5 και 1µg/ml, αλλά ανεστάλλει η ανάπτυξή τους στο McConkey άγαρ με συγκέντρωση ενσωματωμένης ερταπενέμης 2 µg/ml.

	ΕΒΔΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΥ													
ΑΣΘΕΝΗΣ	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	-	ΕΕ												
2	-	-	ΕΕ											
3	-	1	1	1	1	Θ								
4	-	ΕΕ												
5	-	ΕΕ												
6	-	1	ΕΕ											
7	-	1α	1	1,1	1	1	1	1	Θ					
8	-	ΕΕ												
9	-	Θ												
10	-	ΕΕ												
11	-	1α	ΕΕ											
12	-	1	1	1,1	1	1α	1	1	ΕΕ					
13	-	1	1	1	1	1	ΕΕ							
14	-	ΕΕ												
15	-	-	-	1	1	ΕΕ								
16	-	ΕΕ												
17	-	1	ΕΕ											
18	-	ΕΕ												
19	-	-	ΕΕ											
20	-	ΕΕ												
21	-	ΕΕ												
22	-	ΕΕ												
23	-	-	ΕΕ											
24	-	-	1	1	Θ									
25	-	ΕΕ												
26	-	Θ												
27	-	1	1	1	ΕΕ									
28	-	1,1	1	Θ										
29	-	1	Θ											
30	-	ΕΕ												
31	1	Θ												
32	-	ΕΕ												
33	-	-	Θ											
34	-	-	1,3α	ΕΕ										
35	-	ΕΕ												
36	1	1α	1	ΕΕ										
37	-	1α	-	ΕΕ										
38	-	2α	1α	Θ										
39	-	-	Θ											
40	-	ΕΕ												
41	-	1	1	ΕΕ										
42	-	-	ΕΕ											
43	-	ΕΕ												
44	-	1	ΕΕ											
45	-	ΕΕ												
46	-	1α	1α	1	Θ									
ΚΛΕΙΣΙΜΟ ΜΕΘ – ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ – ΕΝΤΑΤΙΚΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΜΕΤΡΩΝ ΕΛΕΓΧΟΥ														
47	-	-	ΕΕ											
48	1	1	1	1	1α	1α	1	1	1	1	1α,3	ΕΕ		
49	1	1	1	1	1α	ΕΕ								
50	1	1	1	1	1α	1	1	1	1	1	1	1,3	1,3	Θ
51	1α	1	1	1	ΕΕ									
52	-	1	1	-	-	1	ΕΕ							
53	-	ΕΕ												
54	-	Θ												
55	-	Θ												
56	-	-	1α	1α	1α	1α	1α	1α	ΕΕ					
57	-	-	Θ											
58	-	-	-	1	-	1	Θ							
59	-	-	-	ΕΕ										
60	-	-	-	1	1α	1,1	1α	Θ						
61	-	ΕΕ												

62	-	ΕΞ												
63	-	Θ												
64	-	1	1	ΕΞ										
65	-	-	1	1	ΕΞ									
66	-	1	1	ΕΞ										
67	-	1α,1	1α	1	1	1	1	Θ						
68	-	-	ΕΞ											
69	-	ΕΞ												
70	1	1	ΕΞ											
71	-	ΕΞ												
72	-	ΕΞ												
73	-	ΕΞ												
74	-	-	ΕΞ											
75	-	-	1	ΕΞ										
76	-	-	1	1	1	ΕΞ								
77	-	-	1	1,4	1,4	ΕΞ								
78	-	ΕΞ												
79	-	ΕΞ												
80	-	-	ΕΞ											

Πίνακας 9: Αποτελέσματα ελέγχου αποικισμού ασθενών της ΜΕΘ και της τελικής έκβασης.

Στελέχη αποικισμού:

1. *Klebsiella pneumoniae* KPC (+)
- 1α. *Klebsiella pneumoniae* MBLs (+)
- 2α. *Enterobacter aerogenes* MBLs (+)
3. *Proteus mirabilis* KPC (+)
- 3α. *Proteus mirabilis* MBLs (+)
4. *Enterobacter cloacae* KPC (+)

Τελική έκβαση:

ΕΞ: Έξοδος ασθενούς

Θ: Θάνατος ασθενούς

2. Αποτελέσματα ελέγχου αποικισμού του περιβάλλοντος της ΜΕΘ

Από τα συνολικά 54 σημεία του περιβάλλοντος της ΜΕΘ που ελέγχθησαν μηνιαίως (συνολικά 324 δείγματα) για αποικισμό από *Enterobacteriaceae* που παράγουν καρβαπενεμάσες (CPE) καθ' όλο το πρώτο διάστημα της μελέτης (Μάιος-Οκτώβριος 2010), σε 9 δείγματα από 8 διαφορετικά σημεία απομονώθηκαν 10 στελέχη CPE. Συγκεκριμένα:

- 5 στελέχη *K. pneumoniae* KPC (+) (σε 3 κλίνες, 1 τραπεζίδιο και 1 μόνιτορ)
- 4 στελέχη *K. pneumoniae* MBLs (+) (σε 2 κλίνες και 1 μόνιτορ)
- 1 στέλεχος *Enterobacter cloacae* KPC (+) (σε 1 τραπεζίδιο)

Σε ένα σημείο (κλίνη) απομονώθηκε μία φορά *K. pneumoniae* KPC (+) και *K. pneumoniae* MBLs (+) και άλλη μια φορά μόνο *K. pneumoniae* MBLs (+).

Σε ένα μόνιτορ απομονώθηκαν ταυτόχρονα 2 διαφορετικά στελέχη *K. pneumoniae*, ένα στέλεχος που παρήγαγε τύπου KPC καρβαπενεμάση και ένα στέλεχος που παρήγαγε MBLs.

Στο τραπεζίδιο μιας κλίνης στην οποία απομονώθηκε *K. pneumoniae* MBLs (+) ανευρέθηκε *K. pneumoniae* KPC (+). Στην κλίνη αυτή νοσηλεύθηκε ασθενής από τον οποίο στον έλεγχο αποικισμού απομονώθηκαν δύο τέτοια στελέχη.

Σε 4 σημεία (5 δείγματα) ανευρέθησαν στελέχη *K. pneumoniae* που παρήγαγαν του ίδιου τύπου καρβαπενεμάση με τον ασθενή που νοσηλευόταν στην ίδια κλίνη (3 στελέχη *K. pneumoniae* KPC θετική και 2 στελέχη *K. pneumoniae* MBLs θετική), σε ένα σημείο ανευρέθη στέλεχος *K. pneumoniae* που παρήγαγε διαφορετικού τύπου καρβαπενεμάσες (MBLs) από τον ασθενή (KPC), σε ένα σημείο ανευρέθη διαφορετικό είδος *Enterobacteriaceae* που παρήγαγε καρβαπενεμάσες (*Enterobacter cloacae* KPC θετικό) από τον ασθενή (*K. pneumoniae* KPC θετική και MBLs θετική) και σε 2 σημεία που ανευρέθη *K. pneumoniae* KPC (+) οι ασθενείς δεν ήταν αποικισμένοι κατά την εισαγωγή τους και δεν παρέμειναν πάνω από 7 ημέρες για να ελεγχθούν για αποικισμό.

3. Αποτελέσματα ελέγχου αποικισμού των χεριών του προσωπικού της ΜΕΘ

Από το σύνολο των 36 ατόμων του προσωπικού της ΜΕΘ που ελέγχθησαν για αποικισμό των χεριών τους από στελέχη CPE κάθε μήνα καθ' όλο το πρώτο διάστημα της μελέτης (Μάιος-Οκτώβριος 2010), μόνο σε ένα άτομο (νοσηλευτικό προσωπικό) κατέστη δυνατόν να απομονωθεί στέλεχος *K. pneumoniae* που παρήγαγε τύπου KPC

καρβαπενεμάση. Οι MICs του στελέχους αυτού ήταν: Αμικασίνη ≤ 2 (E), Αζτρεονάμη=16 (ME), Γενταμικίνη ≤ 1 (E), Ερταπενέμη=4 (A), Ιμιπενέμη=2 (ME), Κεφεπίμη ≤ 1 (E), Κεφταζιδίμη=2 (E), Κολιστίνη $\leq 0,5$ (E), Μεροπενέμη ≥ 16 (A), Νετιλμισίνη ≤ 1 (E), Πιπερακιλλίνη/Ταζομπακτάμη ≥ 128 (A), Σιπροφλοξασίνη $\leq 0,25$ (E), Τομπραμικίνη ≤ 1 (E) και Τιγκεκυκλίνη $\leq 0,5$ (E). Όλοι οι υπόλοιποι έλεγχοι απέβησαν αρνητικοί για τα αναζητούμενα στελέχη της μελέτης.

4. Δεδομένα ασθενών

4.1 Δημογραφικά και κλινικά δεδομένα ασθενών αποικισμένων και μη αποικισμένων με *Enterobacteriaceae* που παράγουν καρβαπενεμάσες

Τα 130 στελέχη CPE που απομονώθηκαν κατά τον έλεγχο αποικισμού προέρχονται από τα ορθικά επιχρίσματα 36 ασθενών, 25 ανδρών και 11 γυναικών, ηλικίας 26 – 88 ετών (Μ.Ο. $62,4 \pm 16,5$ έτη). Από αυτούς, 28 ασθενείς ανέφεραν ιστορικό προηγούμενης νοσηλείας, εκ των οποίων 14 ασθενείς νοσηλεύθηκαν στο ίδιο Νοσοκομείο, ενώ 20 ασθενείς ανέφεραν ιστορικό προηγούμενης νοσηλείας σε άλλο Νοσοκομείο (18 ασθενείς μέσα στο προηγούμενο τρίμηνο και 2 ασθενείς μέσα στο προηγούμενο εξάμηνο). Η Μέση Διάρκεια Νοσηλείας (ΜΔΝ) στο Νοσοκομείο για τους αποικισμένους με CPE ασθενείς ήταν $37,0 \pm 29,6$ ημέρες, ενώ η ΜΔΝ των ασθενών αυτών κατά την παραμονή τους στην ΜΕΘ ήταν $32,3 \pm 21,6$ ημέρες. Τέσσερις από αυτούς τους ασθενείς είχαν εμφανίσει λοίμωξη από στέλεχος CPE κατά το προηγούμενο διάστημα της νοσηλείας τους.

Επιπλέον, οι 36 αποικισμένοι ασθενείς είχαν APACHE II score κατά Μ.Ο. $18,5 \pm 5,8$ κατά την εισαγωγή τους στη ΜΕΘ. Με βάση την κύρια αιτία εισόδου στη ΜΕΘ, 10 ασθενείς εισήλθαν με οξεία αναπνευστική ανεπάρκεια, 6 ασθενείς με εγκεφαλική αιμορραγία, 4 ασθενείς με σηπτικό σοκ, 3 ασθενείς με κρανιοεγκεφαλική κάκωση, 3 ασθενείς ήταν πολυτραυματίες, 3 ασθενείς μετά από χειρουργική αφαίρεση όγκου, 3 ασθενείς από διάφορες άλλες αιτίες, 2 ασθενείς με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, ένας ασθενής με σήψη και ένας ασθενής με λοίμωξη του ΚΝΣ. Επίσης, 35 στους 36 αποικισμένους ασθενείς κατά την εισαγωγή τους ήταν διασωληνωμένοι με μηχανήμα αναπνευστικής υποστήριξης και ίδιος αριθμός ασθενών κατά τη στιγμή του αποικισμού τους έφεραν κεντρικό αγγειακό καθετήρα.

Οι κύριες υποκείμενες νόσοι των ασθενών αυτών με βάση το ιστορικό τους ήταν: 13 ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη, 9 ασθενείς με παχυσαρκία, 7 ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια, 6 ασθενείς με Χρόνια Αναπνευστική Ανεπάρκεια, 4 ασθενείς με ανοσοκαταστολή, 3 ασθενείς με Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια και 2 ασθενείς με ηπατική ανεπάρκεια, ενώ σε 31 ασθενείς αναφέρονταν διάφορες άλλες υποκείμενες νόσοι. Σε 19/36 ασθενείς αναφέρεται κάποιου είδους χειρουργική επέμβαση πριν την εισαγωγή στη ΜΕΘ κατά το προηγούμενο έτος.

Τέλος, 32 από τους 36 ασθενείς που ευρέθησαν αποικισμένοι με CPE είχαν λάβει αντιμικροβιακή θεραπεία τις προηγούμενες 30 ημέρες και συγκεκριμένα 15 ασθενείς έλαβαν λινεζολίδη, 13 ασθενείς έλαβαν μεροπενέμη, 13 ασθενείς έλαβαν πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη, 13 ασθενείς έλαβαν γλυκοπεπτίδια, 12 ασθενείς έλαβαν κεφαλοσπορίνες γ' και δ' γενιάς, 12 ασθενείς έλαβαν κολιμυκίνη, 10 ασθενείς έλαβαν αμινογλυκοσίδες, 6 ασθενείς έλαβαν αμπικιλλίνη/σουλμπακτάμη, 4 ασθενείς έλαβαν κινολόνες, 3 ασθενείς έλαβαν ιμιπενέμη/σιλαστατίνη, 2 ασθενείς έλαβαν τιγκεκυκλίνη, και ένας ασθενής τικαρκιλλίνη/κλαβουλανικό.

Τα δημογραφικά και κλινικά δεδομένα τόσο για τους αποικισμένους όσο και για τους μη αποικισμένους με CPE στελέχη ασθενείς παρουσιάζονται συνοπτικά στον πίνακα

Πίνακας 10: Δημογραφικά και κλινικά δεδομένα αποικισμένων και μη αποικισμένων με CPE στελέχη ασθενών

Δημογραφικά και κλινικά δεδομένα	Αποικισμένοι με CPE ασθενείς (N=36)	Μη αποικισμένοι με CPE ασθενείς (N=44)	OR (95% CI) ^a	P value ^δ
Φύλο, Άνδρες	25 (69,4%)	18 (40,9%)	3.28 (1.18-9.30)	0.014
Ηλικία (έτη)	62,4±16,5	57,8±16,4	NA	0.225
Προηγούμενη νοσηλεία^β	28 (77,7%)	28 (63,6%)	2.00 (0.67-6.12)	0.222
ΜΑΝ (ημέρες)	37,0±29,6	10,7±9,6	NA	<0.001
APACHE II score εισόδου	18,5±5,8	15,5±7,4	NA	0.027
Μηχανική αναπν. υποστήριξη	35 (97,2%)	35 (79,6%)	9.00 (1.06-199.83)	0.020
Κεντρικός Αγγειακός Καθετήρας	35 (97.2%)	13 (29.6%)	83.46 (10.18–1814.41)	<0.001
Αιτία εισόδου στη ΜΕΘ:				
- ΟΑΑ	10 (27,8%)	10 (22,7%)	1.31 (0.42-4.05)	0.615
- Εγκεφ. Αιμορραγία	6 (16,7%)	1 (2,3%)	8.60 (0.94-119.6)	0.042
- ΚΕΚ	3 (8,3%)	1 (2,3%)	3.91 (0.34-102.30)	0.322
- Σηπτικό Σοκ	4 (11,1%)	1 (2,3%)	5.38 (0.52-132.67)	0.169
- Πολυτραυματίας	3 (8,3%)	3 (6,8%)	1.242 (0.18-8.42)	1.000
- Μετεγχειρητικός	3 (8,3%)	15 (34,1%)	0.176 (0.04-0.75)	0.007
- OEM	2 (5,6%)	1 (2,3%)	2.529 (0.17-73.81)	0.585
- Σήψη	1 (2,8%)	0	INF	0.450
- Λοίμωξη ΚΝΣ	1 (2,8%)	0	INF	0.450
- Κόμα	0	4 (9,1%)	0.00 (0.00-1.85)	0.123

- Άλλες	3 (8,3%)	8 (18,2%)		
Χειρουργική επέμβαση (κατά το προηγούμενο έτος)	19 (52,8%)	27 (61,4%)	0.70 (0.26-1.89)	0.499
Υποκείμενη νόσος:				
- ΣΔ	13 (36,1%)	11 (25,0%)	1.696 (0.58-4.97)	0.332
- Παχυσαρκία	9 (25,0%)	6 (13,6%)	2.11 (0.59-7.71)	0.253
- Καρδ. Ανεπάρκεια	7 (19,4%)	7 (15,9%)	1.28 (0.35-4.67)	0.771
- ΧΑΠ	6 (16,7%)	6 (13,6%)	1.27 (0.32-5.05)	0.760
- Ανοσοκαταστολή	5 (13,9%)	2 (4,6%)	3.39 (0.53-27.23)	0.234
- ΧΝΑ	3 (8,3%)	2 (4,6%)	1.91 (0.24-17.55)	0.653
- Ηπατική Ανεπάρκεια	2 (5,6%)	1 (2,3%)	2.53 (0.17-73.81)	0.585
- Απουσία νόσου	2 (5,6%)	7 (15,9%)	0.31 (0.04-1.82)	0.175
Προηγούμενη λοίμωξη από CPE	4 (11,1%)	0	INF	0.037
Προηγούμενη λήψη αντιμικροβιακών^γ	32 (72,7%)	21 (47,7%)	8.76 (2.39-35.14)	<0.001

^αOR: odds ratio, CI: confidence interval

^βκατά τους προηγούμενους 3, 6 και 12 μήνες είτε στο ίδιο είτε σε άλλο Νοσοκομείο.

^γκατά τις προηγούμενες 30 ημέρες

^δη τιμή *P*-value με έντονη γραφή υποδηλώνει στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με την εμφάνιση αποικισμού με CPE στελέχη στους ασθενείς.

Με έντονη γραφή αναφέρονται οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές

(επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $P < 0.05$).

4.2 Δημογραφικά και κλινικά δεδομένα ασθενών που παρέμειναν περισσότερο από 7 ημέρες στη ΜΕΘ και αποικίσθηκαν από *Enterobacteriaceae* που παράγουν καρβαπενεμάσες

Όπως αναφέρθηκε, από τους 73 ασθενείς που δεν ήταν αρχικώς αποικισμένοι με στελέχη CPE, 41 παρέμειναν στη ΜΕΘ >7 ημέρες και συμμετείχαν στον εβδομαδιαίο έλεγχο αποικισμού (ενεργητική επιτήρηση) μέχρι την έξοδό τους από τη ΜΕΘ (εξιτήριο ή θάνατος). Από αυτούς τους ασθενείς, 29/41 (70,7%) αποικίσθηκαν με στελέχη CPE και απομονώθηκαν συνολικά 88 στελέχη. Πρόκειται για 19 άνδρες και 10 γυναίκες, ηλικίας 26 – 87 ετών (Μ.Ο. 61,3±16,9 έτη). Από αυτούς, 21 ασθενείς ανέφεραν ιστορικό προηγούμενης νοσηλείας, εκ των οποίων 11 στο ίδιο Νοσοκομείο, ενώ 13 ασθενείς ανέφεραν ιστορικό προηγούμενης νοσηλείας σε άλλο Νοσοκομείο (11 ασθενείς μέσα στο προηγούμενο τρίμηνο και 2 ασθενείς μέσα στο προηγούμενο εξάμηνο). Η ΜΔΝ τους στο Νοσοκομείο ήταν 31,8±18,7 ημέρες, ενώ ο μέσος χρόνος παραμονής τους στη ΜΕΘ ήταν 29,6±15,6 ημέρες. Κανένας από αυτούς δεν εμφάνισε λοίμωξη από στέλεχος CPE κατά το προηγούμενο διάστημα της νοσηλείας του.

Επιπρόσθετα, οι 29 αποικισμένοι ασθενείς είχαν APACHE II score κατά Μ.Ο. 18,1±6,0 κατά την εισαγωγή τους στη ΜΕΘ. Με βάση την κύρια αιτία εισόδου τους στη ΜΕΘ, 9 ασθενείς εισήλθαν με οξεία αναπνευστική ανεπάρκεια, 6 ασθενείς με εγκεφαλική αιμορραγία, 3 ασθενείς με σηπτικό σοκ, 2 ασθενείς με κρανιοεγκεφαλική κάκωση, 2 ασθενείς μετά από χειρουργική αφαίρεση όγκου, ένας ασθενής ήταν πολυτραυματίας, ένας ασθενής με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, ένας ασθενής με σήψη, ένας ασθενής με λοίμωξη του ΚΝΣ και 3 ασθενείς από διάφορες άλλες αιτίες. Επίσης, 28 στους 29 αποικισμένους ασθενείς κατά την εισαγωγή τους ήταν διασωληνωμένοι με μηχανήματα αναπνευστικής υποστήριξης και ίδιος αριθμός ασθενών κατά τη στιγμή του αποικισμού τους έφεραν κεντρικό αγγειακό καθετήρα.

Οι κύριες υποκείμενες νόσοι των ασθενών αυτών με βάση το ιστορικό τους ήταν: 9 ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη, 7 ασθενείς με παχυσαρκία, 5 ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια, 5 ασθενείς με Χρόνια Αναπνευστική Ανεπάρκεια, 2 ασθενείς με ανοσοκαταστολή, 2 ασθενείς με Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια και 2 ασθενείς με ηπατική ανεπάρκεια, ενώ σε 25 ασθενείς αναφέρονταν διάφορες άλλες υποκείμενες νόσοι. Σε 14/29 ασθενείς αναφέρεται κάποιου είδους χειρουργική επέμβαση πριν την εισαγωγή στη ΜΕΘ και κατά το προηγούμενο έτος.

Τέλος, 25/29 ασθενείς που ευρέθησαν αποικισμένοι με CPE είχαν λάβει αντιμικροβιακή θεραπεία τις προηγούμενες 30 ημέρες και συγκεκριμένα: 12 ασθενείς έλαβαν πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη, 11 ασθενείς λινεζολίδη, 10 ασθενείς έλαβαν μεροπενέμη, 10 ασθενείς έλαβαν γλυκοπεπτίδια, 9 ασθενείς έλαβαν κεφαλοσπορίνες γ' και δ' γενεάς, 9 ασθενείς έλαβαν αμινογλυκοσίδες, 8 ασθενείς έλαβαν κολιμυκίνη, 4 ασθενείς έλαβαν κινολόνες, 4 ασθενείς έλαβαν αμπικιλλίνη/σουλμπακτάμη, 2 ασθενείς έλαβαν ιμιπενέμη/σιλαστατίνη και ένας ασθενής τικαρκιλλίνη/κλαβουλανικό.

Τα δημογραφικά και κλινικά δεδομένα τόσο για τους αποικισμένους όσο και για τους μη αποικισμένους με CPE στελέχη ασθενείς που παρέμειναν στη ΜΕΘ περισσότερο από 7 ημέρες παρουσιάζονται συνοπτικά στον πίνακα

Πίνακας 11: Δημογραφικά και κλινικά δεδομένα αποικισμένων και μη αποικισμένων με CPE στελέχη ασθενών

Δημογραφικά και κλινικά δεδομένα	Αποικισμένοι με CPE ασθενείς (N=29)	Μη αποικισμένοι με CPE ασθενείς (N=12)	OR (95% CI) ^a	P value ^δ
Φύλο, Άνδρες	19 (65,5%)	6 (50,0%)	1.90 (0.40-9.26)	0.485
Ηλικία (έτη)	61,3±16,9	61,3±18,7	NA	0.966
Προηγούμενη νοσηλεία ^β	21 (72,4%)	9 (75,0%)	0.875 (0.14-5.02)	1.000
ΜΔΝ (ημέρες)	31,8±18,7	19,0±10,6	NA	0.025
ΜΔΝ στη ΜΕΘ (ημέρες)	29,6±15,6	12,3±3,2	NA	<0.001
APACHE II score	18,1±6,0	19,4±7,8	NA	0.788
Μηχανική αναπν. υποστήριξη	28 (96,6%)	10 (83,3%)	5.60 (0.34-176.81)	0.200
Κεντρικός Αγγειακός Καθετήρας	28 (96.6%)	6 (50.0%)	28.00 (2.42-750.28)	0.001
Αιτία εισόδου στη ΜΕΘ:				
- ΟΑΑ	9 (31,0%)	4 (33,3%)	0.90 (0.17-4.77)	1.000
- Εγκεφ. Αιμορραγία	6 (20,7%)	1 (8,3%)	2.87 (0.27-71.27)	0.651
- ΚΕΚ	2 (6,9%)	0	INF	1.000
- Σηπτικό Σοκ	3 (10,3%)	0	INF	0.543
- Πολυτραυματίας	1 (3,5%)	3 (25,0%)	0.11 (0.00-1.43)	0.068
- Μετεγχειρητικός	2 (6,9%)	1 (8,3%)	0.82 (0.05-25.38)	1.000
- OEM	1 (3,5%)	0	INF	1.000
- Σήψη	1 (3,5%)	0	INF	1.000
- Λοίμωξη ΚΝΣ	1 (3,5%)	0	INF	1.000

- Άλλες	3 (10,3%)	3 (25,0%)		
Χειρουργική επέμβαση (κατά το προηγούμενο έτος)	14 (48,3%)	7 (58,3%)	0.07 (0.14-3.14)	0.734
Υποκείμενη νόσος:				
- ΣΔ	9 (31,0%)	4 (33,3%)	0.90 (0.17-4.77)	1.000
- Παχυσαρκία	7 (24,1%)	0	INF	0.085
- Καρδ. Ανεπάρκεια	5 (17,2%)	0	INF	0.298
- ΧΑΠ	5 (17,2%)	3 (25,0%)	0.63 (0.10-4.21)	0.672
- Ανοσοκαταστολή	2 (6,9%)	0	INF	1.000
- ΧΝΑ	2 (6,9%)	1 (8,3%)	0.82 (0.05-25.38)	1.000
- Ηπατική Ανεπάρκεια	2 (6,9%)	1 (8,3%)	0.82 (0.05-25.38)	1.000
- Απουσία νόσου	1 (3,5%)	4 (33,3%)	0.07 (0.00-0.88)	0.020
Προηγούμενη λήψη αντιμικροβιακών^γ	25 (86,2%)	7 (58,3%)	4.46 (0.75-28.49)	0.093

^αOR: odds ratio, CI: confidence interval

^βκατά τους προηγούμενους 3, 6 και 12 μήνες είτε στο ίδιο είτε σε άλλο Νοσοκομείο.

^γκατά τις προηγούμενες 30 ημέρες

^δη τιμή *P*-value με έντονη γραφή υποδηλώνει στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με την εμφάνιση αποικισμού με CPE στελέχη στους ασθενείς.

Με έντονη γραφή αναφέρονται οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές

(επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $P < 0.05$).

4.3 Δημογραφικά και κλινικά δεδομένα ασθενών που εμφάνισαν λοίμωξη από *Enterobacteriaceae* που παράγουν καρβαπενεμάσες

Από τους 36 ασθενείς που βρέθηκαν αποικισμένοι από CPE στελέχη, 19 (52,8%) ασθενείς (17 άνδρες και 2 γυναίκες, ηλικίας $65,3 \pm 13,3$ έτη) εμφάνισαν λοίμωξη από τα στελέχη αυτά. Συνολικά, απομονώθηκαν 63 στελέχη *Enterobacteriaceae* που παράγουν καρβαπενεμάσες από ισάριθμα κλινικά δείγματα των αποικισμένων ασθενών με λοίμωξη (32 δείγματα βρογχικών εκκρίσεων, 16 δείγματα αιμοκαλλιιεργειών, 11 δείγματα άκρων αγγειακών καθετήρων, 2 δείγματα ENY, ένα δείγμα ούρων και ένα δείγμα εγκεφαλικού αποστήματος). Συγκεκριμένα, απομονώθηκαν:

- 38 στελέχη *K. pneumoniae* KPC (+)
- 10 στελέχη *Serratia marcescens* KPC (+)
- 8 στελέχη *K. pneumoniae* MBLs (+)
- 5 στελέχη *Proteus mirabilis* KPC (+)
- ένα στέλεχος *Proteus mirabilis* MBLs (+), και
- ένα στέλεχος *Enterobacter cloacae* MBLs (+)

Από τους 19 αποικισμένους ασθενείς που εμφάνισαν λοίμωξη από CPE στελέχη, 10 ασθενείς εμφάνισαν μόνο ένα είδος λοίμωξης, 5 ασθενείς εμφάνισαν δύο είδη λοιμώξεων, 3 ασθενείς εμφάνισαν τρία είδη και ένας ασθενής εμφάνισε έξι διαφορετικές λοιμώξεις. Αναλυτικότερα, τα είδη των λοιμώξεων ήταν:

- 21 λοιμώξεις αναπνευστικού συστήματος
- 5 πρωτοπαθείς βακτηριαιμίες
- 3 βακτηριαιμίες από κεντρικό φλεβικό καθετήρα (ΚΦΚ)
- 3 δευτεροπαθείς βακτηριαιμίες
- 2 λοιμώξεις ΚΝΣ, και
- μία λοίμωξη ουροποιητικού συστήματος.

Επιπλέον, όλοι οι ασθενείς που εμφάνισαν CPE λοίμωξη είχαν λάβει αντιμικροβιακή θεραπεία τις προηγούμενες 30 ημέρες και συγκεκριμένα: 10 ασθενείς έλαβαν κολιμυκίνη, 8 ασθενείς έλαβαν πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη, 8 ασθενείς λινεζολίδη, 7 ασθενείς έλαβαν μεροπενέμη, 9 ασθενείς έλαβαν γλυκοπεπτίδια, 8 ασθενείς έλαβαν κεφαλοσπορίνες γ' και δ' γενεάς, 7 ασθενείς έλαβαν αμινογλυκοσίδες, 2 ασθενείς έλαβαν κινολόνες, 4 ασθενείς έλαβαν

αμπικιλλίνη/σουλμπακτάμη, 2 ασθενείς έλαβαν ιμιπενέμη/ σιλαστατίνη και ένας ασθενής τικαρκιλλίνη/κλαβουλανικό.

Κατά την πρώτη ημέρα εμφάνισης της λοίμωξης όλοι οι ασθενείς με CPE λοίμωξη έφεραν ΚΦΚ, ενώ κατά την έναρξη της θεραπευτικής αντιμετώπισης της λοίμωξης 10 ασθενείς ευρίσκονταν σε κατάσταση σηπτικού σοκ.

Οι λοιμώξεις από CPE αντιμετωπίστηκαν με αντιμικροβιακή αγωγή και συγκεκριμένα: 9 με συνδυασμό καρβαπενέμης και κολιμυκίνης, 5 με συνδυασμό καρβαπενέμης και αμικασίνης, 4 με συνδυασμό κολιμυκίνης και αμικασίνης, 4 με κολιμυκίνη ως μονοθεραπεία, 3 με συνδυασμό τιγκεκυκλίνης, καρβαπενέμης και γενταμικίνης, 2 με συνδυασμό καρβαπενέμης και γενταμικίνης, 2 με συνδυασμό κολιμυκίνης, καρβαπενέμης και αμικασίνης, 2 με συνδυασμό τιγκεκυκλίνης, κολιμυκίνης και καρβαπενέμης, μία με συνδυασμό τιγκεκυκλίνης και αμικασίνης, μία με συνδυασμό τιγκεκυκλίνης και κολιμυκίνης, μία με συνδυασμό κολιμυκίνης, καρβαπενέμης και γενταμικίνης, και μία με καρβαπενέμη ως μονοθεραπεία.

Όσον αφορά στην τελική έκβαση των ασθενών με λοίμωξη, 11 εξήλθαν της ΜΕΘ και 8 απεβίωσαν. Τα είδη των λοιμώξεων στους ασθενείς που απεβίωσαν ήταν 10 λοιμώξεις αναπνευστικού, 2 πρωτοπαθείς βακτηριαιμίες, μία δευτεροπαθή βακτηριαιμία, μια βακτηριαιμία από ΚΦΚ, μία λοίμωξη ουροποιητικού και μία λοίμωξη του ΚΝΣ. Στα ορθικά επιχρίσματα των ασθενών αυτών κατά τον έλεγχο αποικισμού τους απομονώθηκαν 33 στελέχη *K. pneumoniae* KPC (+), 8 στελέχη *K. pneumoniae* MBLs (+) και 2 στελέχη *Pr. mirabilis* KPC (+), ενώ από τα κλινικά δείγματά τους απομονώθηκαν 17 στελέχη *K. pneumoniae* KPC (+), 4 μόνο στελέχη *K. pneumoniae* MBLs (+), 3 στελέχη *S. marcescens* KPC (+), 3 στελέχη *Pr. mirabilis* KPC (+), ένα στέλεχος *Pr. mirabilis* MBLs (+) και ένα στέλεχος *E. cloacae* MBLs (+).

Τα δημογραφικά και κλινικά δεδομένα τόσο για τους αποικισμένους ασθενείς που εμφάνισαν λοίμωξη από CPE όσο και για τους αποικισμένους ασθενείς που δεν εμφάνισαν λοίμωξη παρουσιάζονται συνοπτικά στον πίνακα

Όσον αφορά στην τελική έκβαση των ασθενών, την έκβαση των λοιμώξεων και την μικροβιολογική τους έκβαση, τα αντίστοιχα ποσοστά περιγράφονται στον πίνακα

Πίνακας 12: Δημογραφικά και κλινικά δεδομένα αποικισμένων ασθενών με λοίμωξη και αποικισμένων ασθενών χωρίς λοίμωξη από CPE στελέχη

Δημογραφικά και κλινικά δεδομένα	Αποικισμένοι ασθενείς με CPE λοίμωξη (N=19)	Αποικισμένοι ασθενείς χωρίς CPE λοίμωξη (N=17)	OR (95% CI) ^a	P value ^δ
Φύλο, Άνδρες	17 (89,5%)	8 (47,1%)	9.56 (1.37-84.04)	0.010
Ηλικία (έτη)	65,3±13,3	59,2±19,3	NA	0.363
Προηγούμενη νοσηλεία ^β	16 (84,2%)	12 (70,6%)	2.22 (0.35-15.05)	0.434
ΜΑΝ (ημέρες)	47,0±35,8	25,9±14,9	NA	0.009
ΜΑΝ στη ΜΕΘ (ημέρες)	39,3±25,0	24,5±13,9	NA	0.087
APACHE II score	18,2±5,3	18,8±6,4	NA	0.707
Μηχανική αναπν. υποστήριξη	18 (94,7%)	17 (100%)	0.00 (0.00-20.32)	1.000
Κεντρικός Αγγειακός Καθετήρας	19 (100%)	16 (94.1%)	INF	0.472
Αιτία εισόδου στη ΜΕΘ:				
- Εγκεφ. Αιμορραγία	5 (26,3%)	1 (5,9%)	5.71 (0.52-146.02)	0.182
- ΟΑΑ	3 (15,8%)	7 (41,2%)	0.27 (0.04-1.58)	0.139
- Πολυτραυματίας	2 (10,5%)	1 (5,9%)	1.88 (0.11-58.44)	1.000
- Μετεγχειρητικός	2 (10,5%)	1 (5,9%)	1.88 (0.11-58.44)	1.000
- OEM	2 (10,5%)	0	INF	0.487
- Σήψη	1 (5,3%)	0	INF	1.000
- Λοίμωξη ΚΝΣ	0	1 (5,9%)	0.00 (0.00-16.16)	0.472
- Σηπτικό Σοκ	1 (5,3%)	3 (17,6%)	0.26 (0.01-3.39)	0.326
- ΚΕΚ	1 (5,3%)	2 (11,8%)	0.42 (0.01-6.87)	0.593
- Άλλες	2 (10,5%)	1 (5,9%)		

Χειρουργική επέμβαση (κατά το προηγούμενο έτος)	9 (47,4%)	10 (58,8%)	0.63 (0.14-2.9)	0.525
Υποκείμενη νόσος:				
- ΣΔ	8 (42,1%)	5 (29,4%)	1.75 (0.36-8.78)	0.502
- Παχυσαρκία	4 (21,1%)	5 (29,4%)	0.64 (0.11-3.67)	0.706
- Ανοσοκαταστολή	4 (21,1%)	1 (5,9%)	4.27 (0.36-112.68)	0.342
- Καρδ. Ανεπάρκεια	3 (15,8%)	4 (23,5%)	0.61 (0.09-4.13)	0.684
- ΧΑΠ	2 (10,5%)	4 (23,5%)	0.38 (0.04-3.06)	0.391
- ΧΝΑ	2 (10,5%)	1 (5,9%)	1.88 (0.11-58.44)	1.000
- Ηπατική Ανεπάρκεια	0 (7,1%)	2 (11,8%)	0.00 (0.00-3.75)	0.216
- Απουσία νόσου	1 (5,3%)	1 (5,9%)	0.89 (0.02-36.07)	1.000
Προηγούμενη λήψη αντιμικροβιακών ^γ	19 (100%)	13 (76,8%)	INF	0.040
Τελική έκβαση, θάνατος	8 (42,1%)	3 (17,7%)		0.112

^αOR: odds ratio, CI: confidence interval

^βκατά τους προηγούμενους 3, 6 και 12 μήνες είτε στο ίδιο είτε σε άλλο Νοσοκομείο.

^γκατά τις προηγούμενες 30 ημέρες

^δη τιμή *P*-value με έντονη γραφή υποδηλώνει στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με την εμφάνιση λοιμώξεων από CPE στελέχη στους αποικισμένους ασθενείς.

Με έντονη γραφή αναφέρονται οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές (επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $P < 0.05$).

Πίνακας 13: Έκβαση ασθενών με λοίμωξη από CPE στελέχη και έκβαση των λοιμώξεων αυτών.

Έκβαση ασθενών (N=19)	
(από οποιαδήποτε αιτία)	
- Τελική έκβαση, θάνατος	8 (42,1%)
- Θνητότητα την 14 ^η ημέρα	1 (5,3%)
Έκβαση λοιμώξεων (N=33)	
- Ίαση	4 (11,4%)
- Βελτίωση	14 (40,0%)
- Υποτροπή	11 (31,4%)
- Θάνατος	6 (17,1%)
Μικροβιολογική έκβαση λοιμώξεων	
- Ανταπόκριση	18 (51,4%)
- Αποτυχία	10 (28,6%)
- Ασαφής	7 (20,0%)

5. Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας

5.1 Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας για τα στελέχη CPE που απομονώθηκαν από τους αποικισμένους ασθενείς της ΜΕΘ

Οι MICs έναντι των αντιμικροβιακών των 130 στελεχών CPE που απομονώθηκαν κατά τον έλεγχο αποικισμού από τα ορθικά επιχρίσματα 36 ασθενών της ΜΕΘ, όπως μετρήθηκαν και αναφέρθηκαν στα αποτελέσματα από το Vitek 2 Compact (bioMerieux, France), παρουσιάζονται στον πίνακα 14.

Πίνακας 14: Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας έναντι των αντιμικροβιακών των CPE στελεχών των αποικισμένων ασθενών

Αντιβιοτικό	MIC (mg/L)	<i>K. pneumoniae</i> KPC (+) (N=99)	<i>K. pneumoniae</i> MBLs (+) (N=24)	<i>P. mirabilis</i> KPC (+) (N=3)	<i>P. mirabilis</i> MBLs (+) (N=1)	<i>E. cloacae</i> KPC (+) (N=2)	<i>E. aerogenes</i> MBLs (+) (N=1)
Αμικασίνη	≤2	7	0	0	1	0	1
	4	1	0	1	0	0	0
	16	24	20	2	0	2	0
	32	10	1	0	0	0	0
	≥64	57	3	0	0	0	0
Αζτρεονάμη	≤1	1	18	3	1	0	1
	16	2	0	0	0	0	0
	32	1	0	0	0	0	0
	≥64	95	6	0	0	2	0
Γενταμικίνη	≤1	29	11	0	0	0	1
	2	12	3	0	0	2	0
	4	35	1	1	1	0	0
	8	17	5	0	0	0	0
	≥16	6	4	2	0	0	0
Ερταπενέμη	≤0.5	0	2	3	1	0	1
	4	3	11	0	0	0	0
	≥8	96	11	0	0	2	0
Κεφεπίμη	≤1	3	2	0	0	1	1
	2	8	1	0	0	0	0
	4	10	1	0	0	1	0
	8	32	2	2	1	0	0
	16	18	5	1	0	0	0
	32	14	9	0	0	0	0
	≥64	14	4	0	0	0	0
Κεφταζιδίμη	≤1	0	1	0	0	0	1
	2	2	0	0	0	0	0
	8	3	0	0	0	0	0
	16	22	1	3	0	1	0
	32	4	0	0	0	0	0
	≥64	68	22	0	1	1	0

Αντιβιοτικό	MIC (mg/L)	<i>K. pneumoniae</i> KPC (+) (N=99)	<i>K. pneumoniae</i> MBLs (+) (N=24)	<i>P. mirabilis</i> KPC (+) (N=3)	<i>P. mirabilis</i> MBLs (+) (N=1)	<i>E. cloacae</i> KPC (+) (N=2)	<i>E. aerogenes</i> MBLs (+) (N=1)
Κολιστίνη	≤0.5	33	13	0	0	1	1
	1	9	0	0	0	0	0
	2	14	1	0	0	0	0
	4	8	1	0	0	0	0
	8	5	0	0	0	0	0
	≥16	30	9	3	1	1	0
Ιμιπενέμη	≤1	5	2	0	0	1	1
	2	6	1	0	0	0	0
	4	27	7	0	0	0	0
	8	18	5	2	0	1	0
	≥16	43	9	1	1	0	0
Μεροπενέμη	≤0.25	0	1	0	0	0	1
	1	10	0	3	0	0	0
	2	7	0	0	0	0	0
	4	8	0	0	0	0	0
	8	9	1	0	0	0	0
	≥16	65	22	0	1	2	0
Νετιλμικίνη	≤1	5	0	3	0	0	1
	8	2	0	0	0	0	0
	16	1	1	0	0	0	0
	≥32	91	23	0	1	2	0
Πιπερακιλλίνη/ Ταζομπακτάμη	16	0	0	0	0	0	1
	≥128	99	24	3	1	2	0
Σιπροφλοξασίνη	≤0.25	4	0	0	0	1	1
	1	2	10	0	0	1	0
	2	11	2	0	0	0	0
	≥4	82	12	3	1	0	0
Τομπραμυκίνη	≤1	5	0	0	0	0	1
	8	9	2	1	1	1	0
	≥16	85	22	2	0	1	0
Τιγκεκυκλίνη	≤0.5	5	3	0	0	0	0
	1	9	9	0	0	0	0
	2	45	4	0	1	0	1
	4	19	6	2	0	1	0
	≥8	20	2	1	0	1	0

5.2 Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας για τα στελέχη CPE που απομονώθηκαν από τα κλινικά δείγματα των αποικισμένων ασθενών της ΜΕΘ με λοίμωξη

Οι MICs έναντι των αντιμικροβιακών των 63 στελεχών *Enterobacteriaceae* που παράγουν καρβαπενεμάσες που απομονώθηκαν από ισάριθμα κλινικά δείγματα των αποικισμένων ασθενών της ΜΕΘ που εμφάνισαν λοίμωξη (19 ασθενείς), όπως μετρήθηκαν και αναφέρθηκαν στα αποτελέσματα από το Vitek 2 Compact (bioMerieux, France), παρουσιάζονται στον πίνακα 15.

Πίνακας 15: Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας έναντι των αντιμικροβιακών των CPE στελεχών από τα κλινικά δείγματα των αποικισμένων ασθενών με λοίμωξη

Αντιβιοτικό	MIC (mg/L)	<i>K. pneumoniae</i> KPC (+) (N=38)	<i>S. marcescens</i> KPC (+) (N=10)	<i>K. pneumoniae</i> MBLs (+) (N=8)	<i>P. mirabilis</i> KPC (+) (N=5)	<i>P. mirabilis</i> MBLs (+) (N=1)	<i>E. cloacae</i> MBLs (+) (N=1)
Αμικασίνη	≤2	2	0	0	5	1	0
	4	0	0	0	0	0	1
	16	6	0	6	0	0	0
	32	0	2	0	0	0	0
	≥64	30	8	2	0	0	0
Αζτρεονάμη	≤1	0	1	0	2	0	1
	8	0	0	0	0	1	0
	16	0	0	0	0	0	0
	32	0	3	0	0	0	0
	≥64	38	6	8	3	0	0
Γενταμικίνη	≤1	2	2	0	2	0	1
	2	7	1	0	1	1	0
	4	21	6	1	2	0	0
	8	6	1	1	0	0	0
	≥16	2	0	6	0	0	0
Ερταπενέμη	≤0.5	0	1	0	5	0	0
	4	0	0	4	0	1	1
	≥8	38	9	4	0	0	0
Κεφερίμη	≤1	0	4	0	2	0	0
	2	3	0	0	0	0	1
	4	3	0	0	0	0	0
	8	12	0	3	0	0	0
	16	4	0	3	3	0	0
	32	14	1	1	0	0	0
	≥64	2	5	1	0	1	0
Κεφταζιδίμη	≤1	0	1	0	0	0	0
	2	0	2	0	0	0	0
	4	0	1	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0
	16	4	1	0	5	0	0
	32	1	1	0	0	0	0
	≥64	33	4	8	0	1	1

Αντιβιοτικό	MIC (mg/L)	<i>K. pneumoniae</i> KPC (+) (N=38)	<i>S. marcescens</i> KPC (+) (N=10)	<i>K. pneumoniae</i> MBLs (+) (N=8)	<i>P. mirabilis</i> KPC (+) (N=5)	<i>P. mirabilis</i> MBLs (+) (N=1)	<i>E. cloacae</i> KPC (+) (N=1)
Κολιστίνη	≤0.5	9	0	4	0	0	1
	1	4	0	0	0	0	0
	2	9	0	0	0	0	0
	4	5	0	1	0	0	0
	8	1	0	1	0	0	0
	≥16	10	10	2	5	1	0
Ιμιπενέμη	≤1	1	1	0	0	0	0
	2	1	0	0	0	0	1
	4	6	0	1	2	0	0
	8	17	0	4	0	0	0
	≥16	13	9	3	3	1	0
Μεροπενέμη	≤0.25	0	1	0	1	0	0
	1	1	2	3	2	0	0
	2	2	1	1	0	0	0
	4	1	0	0	0	0	0
	8	3	0	0	0	1	0
	≥16	31	6	4	2	0	1
Νετιλμικίνη	≤1	0	0	0	0	0	0
	8	2	0	0	1	0	0
	16	0	0	0	1	0	0
	≥32	36	10	8	3	1	1
Πιπερακιλλίνη/ Ταζομπακτάμη	4	0	1	0	0	0	0
	8	0	0	0	2	0	0
	16	0	0	0	2	0	0
	≥128	38	9	8	1	1	1
Σιπροφλοξασίνη	≤0.25	0	9	0	0	0	1
	0.5	0	1	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0
	2	3	0	1	0	0	0
	≥4	35	0	7	5	1	0
Τομπραμυκίνη	≤1	0	0	0	0	0	0
	8	5	0	0	5	1	1
	≥16	33	10	8	0	0	0

Αντιβιοτικό	MIC (mg/L)	<i>K. pneumoniae</i> KPC (+) (N=38)	<i>S. marcescens</i> KPC (+) (N=10)	<i>K. pneumoniae</i> MBLs (+) (N=8)	<i>P. mirabilis</i> KPC (+) (N=5)	<i>P. mirabilis</i> MBLs (+) (N=1)	<i>E. cloacae</i> KPC (+) (N=1)
Τιγκεκυκλίνη	≤0.5	3	0	0	0	0	0
	1	1	3	0	0	0	0
	2	22	7	1	2	0	1
	4	7	0	7	2	1	0
	≥8	5	0	0	1	0	0

6. Αποτελέσματα ελέγχου αποικισμού από CPE στελέχη πριν και μετά την εφαρμογή μέτρων ελέγχου και πρόληψης στη ΜΕΘ

Από τους 41 ασθενείς που νοσηλεύθηκαν στη ΜΕΘ πάνω από 7 ημέρες, 24 νοσηλεύθηκαν κατά την περίοδο πριν το κλείσιμο της ΜΕΘ (περίοδος Ι), ενώ 17 ασθενείς νοσηλεύθηκαν κατά την περίοδο μετά το κλείσιμο της ΜΕΘ, την απολύμανσή της, τον επανακαθορισμό και την εντατικοποίηση της εφαρμογής των μέτρων ελέγχου και πρόληψης των λοιμώξεων (περίοδος ΙΙ). Κατά τον έλεγχο αποικισμού 18/24 (75,0%) ασθενείς της περιόδου Ι βρέθηκαν αποικισμένοι με στελέχη *Enterobacteriaceae* που παρήγαγαν καρβαπενεμάσες, ενώ 11/17 (64,7%) ασθενείς της περιόδου ΙΙ αποικίσθηκαν με αυτά τα στελέχη. Σε σύγκριση με την επίπτωση περιπτώσεων αποικισμού με CPE των ασθενών της περιόδου Ι, καταγράφηκε μια μείωση στην επίπτωση περιπτώσεων αποικισμού με CPE των ασθενών κατά την περίοδο ΙΙ, που δεν ήταν, όμως, στατιστικά σημαντική (4,0 περιπτώσεις/100 ασθενο-ημέρες και 2,8 περιπτώσεις/100 ασθενο-ημέρες, αντίστοιχα, χ^2 -test, $P=0.782$).

Ωστόσο, οι ασθενείς που νοσηλεύθηκαν στη ΜΕΘ κατά την περίοδο ΙΙ είχαν μια καθυστερημένη εμφάνιση του αποικισμού με CPE στελέχη σε σύγκριση με τους ασθενείς που νοσηλεύθηκαν την περίοδο Ι. Συγκεκριμένα, κατά την περίοδο Ι, 15/18 ασθενείς (83,3%) αποικίσθηκαν με CPE στελέχη μέσα στην πρώτη εβδομάδα της νοσηλείας τους στη ΜΕΘ, ενώ το ποσοστό αυτό ήταν 4/11 (36,4%) κατά την περίοδο ΙΙ, διαφορά που ήταν στατιστικώς σημαντική (χ^2 -test, $P=0.017$).

Όσον αφορά στον αποικισμό του περιβάλλοντος της ΜΕΘ, διαπιστώθηκε μείωση του αριθμού των σημείων του περιβάλλοντος που αποικίσθηκαν κατά την περίοδο ΙΙ σε 3/54 σημεία (2 κλίνες και 1 τραπεζίδιο) από 6/54 σημεία (4 κλίνες, 1 μόνιτορ και 1 τραπεζίδιο) που βρέθηκαν αποικισμένα με CPE στελέχη κατά την περίοδο Ι, (χ^2 -test, $P=0.489$). Αντίστοιχη μείωση παρατηρήθηκε και στον αριθμό των στελεχών CPE που απομονώθηκαν από τα σημεία αυτά μεταξύ των περιόδων Ι και ΙΙ (από 7 στελέχη CPE σε 3 στελέχη CPE, αντίστοιχα). Επίσης, θα πρέπει να αναφερθεί ότι κατά τον έλεγχο αποικισμού αμέσως μετά το κλείσιμο της ΜΕΘ και την απολύμανσή της ουδέν σημείο βρέθηκε αποικισμένο με CPE στελέχη, ενώ μετά από ένα μήνα μόλις ένα σημείο (κλίνη) βρέθηκε αποικισμένο με CPE, στο οποίο νοσηλευόταν ασθενής που είχε αποικισθεί με *K. pneumoniae* KPC (+) πριν μια εβδομάδα.

7. Αποτελέσματα σύγκρισης των πέντε μεθόδων ελέγχου για CPE στελέχη

7.1 Αποτελέσματα προσδιορισμού του ελάχιστου ορίου ανίχνευσης (LOD) των πέντε μεθόδων ελέγχου

Τα οκτώ πρότυπα CPE στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του ελάχιστου ορίου ανίχνευσης (LOD) των πέντε συγκρινόμενων μεθόδων ελέγχου για CPE στελέχη, οι MICs αυτών των στελεχών στις καρβαπενέμες και οι τιμές των LODs των μεθόδων για κάθε ένα από αυτά παρουσιάζονται στον πίνακα 16.

Όλα τα πρότυπα στελέχη ανεπτύχθησαν στις CDC-TS, MCM και chromID CARBA μεθόδους, ενώ 7 από αυτά τα στελέχη ανεπτύχθησαν στις chromID ESBL και ESBL-BH μεθόδους, καθώς το OXA-48 θετικό στέλεχος *K. pneumoniae* δεν ανεπτύχθει σε αυτές. Στις CDC-TS και MCM μεθόδους, η τιμή του LOD ήταν μικρότερη από 10^2 CFU/ml στα 3/8 στελέχη, ενώ στις μεθόδους chromID ESBL, ESBL-BH και chromID CARBA, η τιμή του LOD ήταν μικρότερη από 10^2 CFU/ml στα 6/8 στελέχη.

Όλες οι συγκρινόμενες μέθοδοι ελέγχου ανίχνευσαν επιτυχώς τα στελέχη που παρήγαγαν τύπου KPC και VIM καρβαπενεμάσες, με MIC στις καρβαπενέμες >32 g/ml, σε συγκέντρωση ενοφθαλμίσματος από 5.9×10^0 έως 2.3×10^1 CFU/ml, ενώ το στέλεχος που παρήγαγε NDM καρβαπενεμάση, με MIC στις καρβαπενέμες >32 g/ml, ανιχνεύθηκε σε όλες τις μεθόδους σε μεγαλύτερη συγκέντρωση ενοφθαλμίσματος από 1.3×10^2 έως 8.5×10^3 CFU/ml. Τα KPC θετικά στελέχη με μικρότερη MICs στις καρβαπενέμες ανιχνεύθηκαν σε συγκεντρώσεις ενοφθαλμίσματος από 7×10^0 έως 6.5×10^1 CFU/ml στις μεθόδους με τα χρωμογόνα μέσα, ενώ στις μεθόδους CDC-TS και MCM ανιχνεύθηκαν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ενοφθαλμίσματος (9.5×10^0 έως 5×10^2 CFU/ml). Επιπρόσθετα, το στέλεχος που παρήγαγε τύπου OXA-48 καρβαπενεμάση ανιχνεύθηκε σε υψηλές συγκεντρώσεις στη μέθοδο με chromID CARBA (1.1×10^7 CFU/ml), όπως και στις CDC-TS and MCM μεθόδους (5.2×10^7 έως 5.5×10^7 CFU/ml), παρά την χαμηλή MIC του στις καρβαπενέμες. Όπως αναμενόταν, το OXA-48 στέλεχος δεν ανεπτύχθει στις μεθόδους ESBL-BH και chromID ESBL, δεδομένου ότι το στέλεχος αυτό εμφανίζει χαμηλές MICs στις ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες.

Πίνακας 16: Τα οκτώ πρότυπα CPE στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του ελάχιστου ορίου ανίχνευσης (LOD) των πέντε συγκρινόμενων μεθόδων ελέγχου για CPE στελέχη, οι MICs αυτών των στελεχών στις καρβαπενέμες και οι τιμές των LODs των μεθόδων.

Στελέχη	Καρβαπενεμάση	MIC (μg/ml)			LOD (CFU/ml) των συγκρινόμενων καλλιεργητικών μεθόδων ελέγχου ^a				
		Μεροπενέμη	Ιμιπενέμη	Ερταπενέμη	CDC-TS	ESBL-BH	ChromID ESBL	ChromID CARBA	MCM
<i>K. pneumoniae</i> 1	KPC	>32	>32	>32	9.2x10 ⁰	9x10 ⁰	5.9x10 ⁰	8.9x10 ⁰	6.7x10 ⁰
<i>K. pneumoniae</i> 2	KPC	8	16	16	9.5x10 ⁰	8.5x10 ⁰	7x10 ⁰	9.3x10 ⁰	1.2x10 ¹
<i>K. pneumoniae</i> 3	KPC	4	8	16	1.1x10 ²	4.2x10 ¹	8.4x10 ⁰	1.8x10 ¹	1.5x10 ²
<i>K. pneumoniae</i> 4	KPC	2	8	16	4.2x10 ²	5.7x10 ¹	4.3x10 ¹	4.8x10 ¹	5x10 ²
<i>E. coli</i> 1	KPC	2	8	16	3.8x10 ²	6.5x10 ¹	5.5x10 ¹	5.8x10 ¹	3.9x10 ²
<i>K. pneumoniae</i> 5	VIM	>32	>32	>32	9.5x10 ⁰	1.4x10 ¹	8.9x10 ⁰	2x10 ¹	2.3x10 ¹
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA-2146	NDM	>32	>32	>32	7.9x10 ³	2.2x10 ²	1.3x10 ²	4.1x10 ³	8.5x10 ³
<i>K. pneumoniae</i> NCTC 13442	OXA-48	1	2	2	5.2x10 ⁷	NA	NA	1.1x10 ⁷	5.5x10 ⁷

^a Το ελάχιστο όριο ανίχνευσης (LOD) είναι ο μέσος όρος των τιμών που προέκυψαν και από τις τρεις εκτελέσεις των δοκιμασιών.

CDC-TS: ενοφθαλμισμός των στυλεών σε tryptic soy broth (TSB) με δίσκο 10-μg ερταπενέμης ακολουθούμενος από καλλιέργεια σε MacConkey άγαρ (100 μL από το εκλεκτικό TSB μετά από 24ωρη επώαση).

ESBL-BH: ενοφθαλμισμός των στυλεών σε brain heart infusion (BHI) broth με δίσκο 10-μg ερταπενέμης ακολουθούμενος από καλλιέργεια σε τρυβλίο chromID ESBL (100 μl από το εκλεκτικό BHI broth μετά από 4-6 h επώασης).

MCM: τρυβλία με MacConkey άγαρ με ενσωματωμένη μεροπενέμη (1 μg/ml). NA: μη ανίχνευση.

7.2 Αποτελέσματα από την καλλιέργεια των ορθικών επιχρίσμάτων με τις συγκρινόμενες μεθόδους ελέγχου.

Τα αποτελέσματα για την ανίχνευση και απομόνωση των CPE στελεχών από τα ορθικά επιχρίσματα των ασθενών της μελέτης για κάθε μία από τις πέντε συγκρινόμενες μεθόδους ελέγχου παρουσιάζονται στον πίνακα 17 και το σχεδιάγραμμα 2.

Συνολικά, 133 ύποπτα CPE στελέχη απομονώθηκαν σε 87 από τα 200 ορθικά επιχρίσματα των ασθενών της μελέτης με μία τουλάχιστον μέθοδο. Οι φαινοτυπικές και γονοτυπικές μέθοδοι επιβεβαίωσαν την ανίχνευση 92 CPE στελεχών (85 στελέχη *K. pneumoniae* και 7 στελέχη *Enterobacter aerogenes*) που απομονώθηκαν από 73 (36,5%) ορθικά επιχρίσματα ασθενών, ενώ τα υπόλοιπα 41 στελέχη επιβεβαιώθηκαν ως non CPE.

- Κατά τη μέθοδο CDC-TS, σε 75 από τα 200 ορθικά επιχρίσματα απομονώθηκαν 102 ύποπτα CPE στελέχη. Από τα στελέχη αυτά, 82 επιβεβαιώθηκαν φαινοτυπικώς και μοριακώς ως CPE στελέχη (52 στελέχη *K. pneumoniae* ως KPC-θετικά, 23 στελέχη *K. pneumoniae* ως VIM-θετικά και 7 στελέχη *E. aerogenes* ως KPC-θετικά), ενώ τα υπόλοιπα 20 στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως non-CPE (1 στέλεχος *P. mirabilis* ESBL-θετικό και 19 αζυμωτικά στελέχη).



Εικόνα 23: CDC-TS μέθοδος, α. Κόκκινες αποικίες και κόκκινες βλεννώδεις αποικίες σε MacConkey άγαρ, β. Κόκκινες βλεννώδεις αποικίες με ανοιχτόχρωμο κέντρο και αζυμωτικές αποικίες σε MacConkey άγαρ

- Κατά τη μέθοδο MCM, σε 78 από τα 200 ορθικά επιχρίσματα απομονώθηκαν 104 ύποπτα CPE στελέχη, από τα οποία παρομοίως τα 82 επιβεβαιώθηκαν γονοτυπικώς ως CPE στελέχη (52 στελέχη *K. pneumoniae* ως KPC-θετικά, 23 στελέχη *K.pneumoniae* ως VIM-θετικά και 7 στελέχη *E. aerogenes* ως KPC-θετικά), ενώ τα υπόλοιπα 22 στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως αζυμωτικά.



α



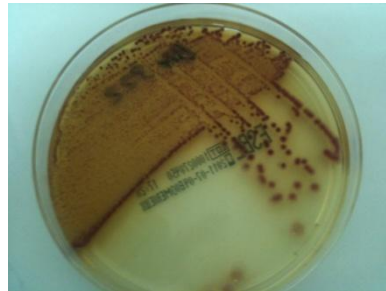
β

Εικόνα 24: MCM μέθοδος, α. Κόκκινες βλεννώδεις αποικίες με ροζ κέντρο σε MacConkey άγαρ με ενσωματωμένη μεροπενέμη (1 $\mu\text{g/ml}$), β. Μικρές κόκκινες αποικίες και ροζ βλεννώδεις σε MacConkey άγαρ με ενσωματωμένη μεροπενέμη (1 $\mu\text{g/ml}$).

- Κατά τη μέθοδο ESBL-BH, σε 77 από τα 200 ορθικά επιχρίσματα απομονώθηκαν 94 στελέχη με χρώμα αποικιών συμβατή με CPE (89 στελέχη με πράσινο-μπλε αποικίες, 4 στελέχη με μπορντώ αποικίες και 1 στέλεχος με καφέ αποικίες), από τα οποία 85 επιβεβαιώθηκαν γονοτυπικώς ως CPE στελέχη (54 στελέχη *K. pneumoniae* ως KPC-θετικά, 25 στελέχη *K.pneumoniae* ως VIM-θετικά και 6 στελέχη *E. aerogenes* ως KPC-θετικά), ενώ τα υπόλοιπα 9 στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως non-CPE (4 στελέχη *E. coli*, 1 στέλεχος *P. mirabilis* ESBL-θετικό και 4 αζυμωτικά στελέχη).



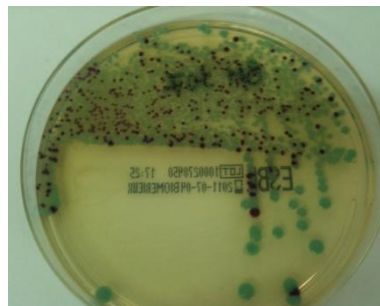
α



β

Εικόνα 25: ESBH-BH μέθοδος, α. Πράσινες και καφέ αποικίες στο chromID ESB, β. Μπορντώ αποικίες στο chromID ESB.

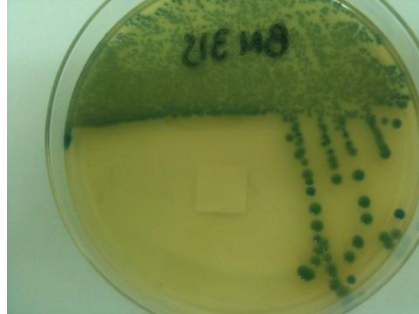
- Κατά τη μέθοδο chromID ESB, σε 87 από τα 200 ορθικά επιχρίσματα απομονώθηκαν 108 στελέχη με χρώμα αποικιών συμβατή με CPE (89 στελέχη με πράσινο-μπλε αποικίες, 15 στελέχη με μπορντώ αποικίες και 4 στελέχη με καφέ αποικίες), από τα οποία 85 επιβεβαιώθηκαν γονοτυπικώς ως CPE στελέχη (54 στελέχη *K. pneumoniae* ως KPC-θετικά, 25 στελέχη *K. pneumoniae* ως VIM-θετικά και 6 στελέχη *E. aerogenes* ως KPC-θετικά), ενώ τα υπόλοιπα 23 στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως non-CPE (15 στελέχη *E. coli*, 4 στελέχη *P. mirabilis* ESBH-θετικό και 4 αζυμωτικά στελέχη).



Εικόνα 26: chromID ESB μέθοδος, πράσινες και μπορντώ αποικίες στο chromID ESB.

- Κατά τη μέθοδο chromID CARBA, σε 73 από τα 200 ορθικά επιχρίσματα απομονώθηκαν 89 στελέχη με πράσινο-μπλε αποικίες ύποπτες για CPE

στελέχη, από τα οποία 85 επιβεβαιώθηκαν γονοτυπικώς ως CPE στελέχη (54 στελέχη *K. pneumoniae* ως KPC-θετικά, 25 στελέχη *K. pneumoniae* ως VIM-θετικά και 6 στελέχη *E. aerogenes* ως KPC-θετικά), ενώ τα υπόλοιπα 4 στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως non-CPE αζυμωτικά στελέχη.



Εικόνα 27: chromID CARBA μέθοδος, πράσινες και σκούρες πρασινο-μπλε αποικίες στο chromID CARBA.

Με τις φαινοτυπικές και τις μοριακές μεθόδους επιβεβαιώθηκαν ως CPE 85 στελέχη που απομονώθηκαν από όλες τις τρεις τελευταίες προαναφερόμενες μεθόδους που χρησιμοποιούσαν χρωμογόνα καλλιεργητικά μέσα. (54 στελέχη *K. pneumoniae* KPC-θετικά, 25 στελέχη *K. pneumoniae* VIM-θετικά και 6 στελέχη *E. aerogenes* KPC-θετικά). 15 στελέχη με μπορντώ αποικίες ταυτοποιήθηκαν ως στελέχη *E. coli* που παρήγαγαν ESBL, ενώ 4 στελέχη με μπορντώ αποικίες ταυτοποιήθηκαν ως στελέχη *P. mirabilis* που παρήγαγαν ESBL.

Επίσης, από 4 δείγματα ανεπτύχθησαν σε όλα τα χρωμογόνα καλλιεργητικά μέσα αποικίες μικροσκοπικού μεγέθους με ανοιχτό πράσινο χρώμα, οι οποίες αρχικά θεωρήθηκαν ύποπτες για CPE στελέχη και υποβλήθηκαν σε περαιτέρω επιβεβαιωτικό εργαστηριακό έλεγχο, που τις ταυτοποίησε όμως ως *Acinetobacter baumannii* (ψευδώς θετικά CPE στελέχη). Τέλος, οι λευκού χρώματος αποικίες που αναπτύχθηκαν σε όλα τα χρωμογόνα καλλιεργητικά μέσα θεωρήθηκαν ως αζυμωτικά στελέχη και δεν υποβλήθηκαν σε περαιτέρω επιβεβαιωτικό φαινοτυπικό και μοριακό έλεγχο.

Πίνακας 17: Αριθμός CPE και non-CPE στελεχών που απομονώθηκαν από 200 ορθικά επιχρίσματα με τη χρήση των πέντε συγκρινόμενων μεθόδων.

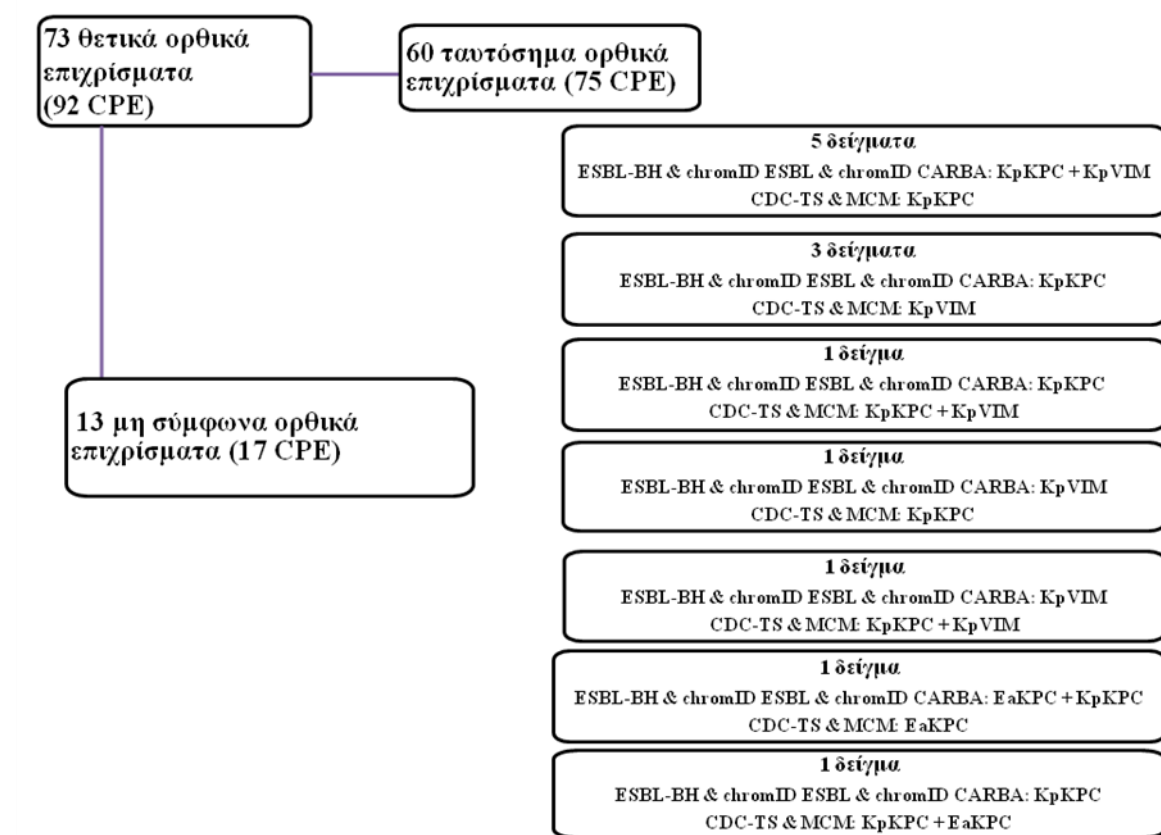
Μέθοδος^α	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. aerogenes</i>	Σύνολο	<i>E. coli</i>	<i>P. mirabilis</i>	Αζυμωτικά	Σύνολο
	KPC (+)	VIM (+)	KPC (+)	CPE	ESBL (+)	ESBL (+)	στελέχη	non-CPE
CDC-TS	52	23	7	82	-	1	19	20
ESBL-BH	54	25	6	85	4	1	4	9
ChromID ESBL	54	25	6	85	15	4	4	23
ChromID CARBA	54	25	6	85	-	-	4	4
MCM	52	23	7	82	-	-	22	22
Σύνολο	56	29	7	92	15	4	22	41

^αCDC-TS: ενοφθαλμισμός των στυλεών σε tryptic soy broth (TSB) με δίσκο 10-μg ερταπενέμης ακολουθούμενος από καλλιέργεια σε MacConkey άγαρ (100 μL από το εκλεκτικό TSB μετά από 24ωρη επώαση).

ESBL-BH: ενοφθαλμισμός των στυλεών σε brain heart infusion (BHI) broth με δίσκο 10-μg ερταπενέμης ακολουθούμενος από καλλιέργεια σε τρυβλίο chromID ESBL (100 μl από το εκλεκτικό BHI broth μετά από 4-6 h επώασης).

MCM: τρυβλία με MacConkey άγαρ με ενσωματωμένη μεροπενέμη (1 μg/ml)

Σχεδιάγραμμα 2: Απομόνωση 92 CPE στελεχών από 73 θετικά ορθικά επιχρίσματα και αναλυτική παρουσίαση των μη σύμφωνων αποτελεσμάτων.



CDC-TS: ενοφθαλμισμός των στελεχών σε tryptic soy broth (TSB) με δίσκο 10-μg ερταπενέμης ακολουθούμενος από καλλιέργεια σε MacConkey άγαρ (100 μL από το εκλεκτικό TSB μετά από 24ωρη επώαση).

ESBL-BH: ενοφθαλμισμός των στελεχών σε brain heart infusion (BHI) broth με δίσκο 10-μg ερταπενέμης ακολουθούμενος από καλλιέργεια σε τρυβλίο chromID ESBL (100 μl από το εκλεκτικό BHI broth μετά από 4-6 h επώασης).

MCM: τρυβλία με MacConkey άγαρ με ενσωματωμένη μεροπενέμη (1 μg/ml)

KpKPC: στελέχη *K. pneumoniae* KPC-θετικά

KpVIM: στελέχη *K. pneumoniae* VIM-θετικά

EaKPC: στελέχη *E. aerogenes* KPC-θετικά.

7.3 Αποτελέσματα προσδιορισμού ευαισθησίας, ειδικότητας, θετικής προγνωστικής αξίας, αρνητικής προγνωστικής αξίας και ακρίβειας των μεθόδων ελέγχου.

Σύμφωνα με τα ευρήματα της μελέτης, 60 από τα 73 θετικά ορθικά επιχρίσματα εμφάνισαν ταυτόσημα αποτελέσματα σε όλες τις συγκρινόμενες μεθόδους ελέγχου, ενώ 13 ορθικά επιχρίσματα εμφάνισαν μη ταυτόσημα αποτελέσματα είτε στον αριθμό των CPE στελεχών με διαφορετικά γονίδια καρβαπεμενασών (11 δείγματα) είτε στον αριθμό των διαφορετικών ειδών στελεχών CPE που ταυτοποιήθηκαν (2 δείγματα). Η απομόνωση CPE στελεχών στις μεθόδους με τα χρωμογόνα μέσα (ChromID CARBA, ESBL-BH και ChromID ESBL) ήταν καλύτερη (85/92 CPE στελέχη, ευαισθησία 92.4%) από ό,τι στις μεθόδους CDC-TS και MCM (82/92 CPE στελέχη, ευαισθησία 89.1%) (Πίνακας 18). Η ειδικότητα ήταν μεγαλύτερη για τις μεθόδους ChromID CARBA (96.9%) και ESBL-BH (93.3%) από ό,τι στις μεθόδους CDC-TS (86.4%), MCM (85.2%) και ChromID ESBL (84.7%), γεγονός που αποδίδεται κυρίως στην απομόνωση των στελεχών *Enterobacteriaceae* που παρήγαγαν ESBL στα ESBL χρωμογόνα και των αζυμωτικών βακτηρίων στις μεθόδους CDC-TS και MCM.

Η θετική προγνωστική αξία (PPV) και η αρνητική προγνωστική αξία (NPV) των συγκρινόμενων μεθόδων για την ανίχνευση CPE στελεχών ήταν, αντίστοιχα, 93.4% και 94.8% για τη μέθοδο ChromID CARBA, 90.4% και 94.8% για τη μέθοδο ESBL-BH, 80.4% και 92.7% για τη μέθοδο CDC-TS, 78.8% και 92.7% για τη μέθοδο MCM, και 73.9% και 94.8% για τη μέθοδο ChromID ESBL. Οι μέθοδοι ChromID CARBA και ESBL-BH ήταν οι πιο ακριβείς μέθοδοι ελέγχου για την ανίχνευση CPE στελεχών από ορθικά επιχρίσματα σε 24 ώρες μετά την λήψη τους (συνολική ακρίβεια 95.1% και 93%, αντίστοιχα).

Πίνακας 18: Αξιολόγηση των πέντε συγκρινόμενων μεθόδων ελέγχου

Μέθοδος ^α	Ευαισθησία ^β (%)	Ειδικότητα ^γ (%)	PPV (%)	NPV (%)	Ακρίβεια (%)
CDC-TS	89.1	86.4	80.4	92.7	87.4
ESBL-BH	92.4	93.3	90.4	94.8	93.0
ChromID ESBL	92.4	84.7	73.9	94.8	85.1
ChromID CARBA	92.4	96.9	93.4	94.8	95.1
MCM	89.1	85.2	78.8	92.7	86.7

^αCDC-TS: ενοφθαλμισμός των στυλεών σε tryptic soy broth (TSB) με δίσκο 10-μg ερταπενέμης ακολουθούμενος από καλλιέργεια σε MacConkey άγαρ (100 μL από το εκλεκτικό TSB μετά από 24ωρη επώαση).

ESBL-BH: ενοφθαλμισμός των στυλεών σε brain heart infusion (BHI) broth με δίσκο 10-μg ερταπενέμης ακολουθούμενος από καλλιέργεια σε τρυβλίο chromID ESBL (100 μl από το εκλεκτικό BHI broth μετά από 4-6 h επώασης).

MCM: τρυβλία με MacConkey άγαρ με ενσωματωμένη μεροπενέμη (1 μg/ml)

^βΗ διαφορά στην ευαισθησία μεταξύ των πέντε συγκρινόμενων μεθόδων δεν ήταν στατιστικώς σημαντική ($P = 0.631$).

^γΗ διαφορά στην ειδικότητα μεταξύ των πέντε συγκρινόμενων μεθόδων ήταν στατιστικώς σημαντική ($P = 0.014$).

8. Συζήτηση

Η εξάπλωση των στελεχών *Enterobacteriaceae* που παράγουν καρβαπενεμάσες (CPE) έχει αυξηθεί την τελευταία δεκαετία σε πολλά μέρη του κόσμου (van Duin D and Doi Y, 2017; Cuzon G *et al*, 2010; Nordmann P *et al*, 2011). Οι μεταλλο-β-λακταμάσες (ένζυμα MBL, τάξης B κατά Ambler) και η *Klebsiella pneumoniae* καρβαπενεμάση (KPC, τάξης A κατά Ambler) είναι ευρύτατα διαδεδομένες και αποτελούν τους σημαντικότερους παράγοντες αντοχής των μικροβιακών αυτών στελεχών στις καρβαπενέμες. Τα CPE στελέχη έχουν τη δυνατότητα να μεταφέρουν τα γονίδια ανθεκτικότητας σε άλλους παθογόνους παράγοντες στο νοσοκομειακό περιβάλλον και να προκαλέσουν μονο- και πολυκλωνικές επιδημίες λοιμώξεων, με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας, αποτελώντας ένα σημαντικό πρόβλημα που καλούνται να αντιμετωπίσουν οι νοσοκομειακές μονάδες. (Cuzon G *et al*, 2010; Fukigai S *et al*, 2007; Samuelsen Ø *et al*, 2009; Souli M *et al*, 2010; Tsakris A *et al*, 2010).

Οι μεταλλο - β - λακταμάσες, με κύριους εκπροσώπους τα ένζυμα VIM και IMP, αρχικά απομονώνονταν κυρίως από στελέχη *P. aeruginosa*, στα οποία επικρατεί το χρωμοσωμικό γονίδιο *bla_{VIM-2}*, αλλά στη συνέχεια εξαπλώθηκαν σε στελέχη *A. baumannii*, καθώς και σε *K. pneumoniae* και σε λοιπά *Enterobacteriaceae*, στα οποία επικρατεί το πλασμιδιακό γονίδιο *bla_{VIM-1}* (Cornaglia G *et al*, 2011; Poirel *et al*, 2000; Walsh TR *et al*, 2005). Τα ένζυμα MBL υδρολύουν όλα τα β-λακταμικά αντιμικροβιακά, εκτός από την αζτρεονάμη, ωστόσο δεν είναι σπάνιο το φαινόμενο να συνυπάρχουν και με άλλες λακταμάσες, όπως ESBL, AmpC, τύπου KPC διευρύνοντας το υδρολυτικό τους φάσμα. Η συχνότητα απομόνωσής τους είναι μεγάλη κυρίως στην Άπω Ανατολή και στις χώρες της Μεσογείου, ενώ έχουν αναφερθεί επιδημίες νοσοκομειακών λοιμώξεων παγκοσμίως από στελέχη εντεροβακτηριακών που παράγουν MBL με αυξημένη θνησιμότητα. Στη χώρα μας η απομόνωση μικροβιακών στελεχών που παράγουν MBL στο νοσοκομειακό περιβάλλον και ειδικά στις μονάδες εντατικής θεραπείας έχει λάβει ενδημικές διαστάσεις τα τελευταία χρόνια, ενώ έχουν αναφερθεί και απομονώσεις των στελεχών αυτών από λοιμώξεις ασθενών της κοινότητας (Nordmann P and Poirel L, 2014; Queenan AM and Bush K, 2007; Grundmann H *et al*, 2010; Vatopoulos A, 2008). Από το 2009 οι NDM MBL εμφανίζουν ταχεία εξάπλωση σε διάφορα μικροβιακά είδη και σε πολλές χώρες παγκοσμίως, ξεκινώντας από την Ινδία και φτάνοντας σε πολλές χώρες της Ασίας, της Άπω Ανατολής, το Ηνωμένο Βασίλειο και άλλες

ευρωπαϊκές χώρες, τις ΗΠΑ, τον Καναδά και την Αυστραλία (Dortet L *et al*, 2014; Kim MN *et al*, 2012; Nordmann P *et al*, 2012; Poirel L *et al*, 2012; van Duin D and Doi Y, 2017). Το γονίδιο που κωδικοποιεί την NDM-1 βρίσκεται σε ένα πολύ κινητό γενετικό στοιχείο, με αποτέλεσμα την εύκολη και ευρεία μετάδοσή του (Rolain JM *et al*, 2010; Walsh TR *et al*, 2011). Τα στελέχη που φέρουν NDM προκαλούν τόσο νοσοκομειακές λοιμώξεις όσο και λοιμώξεις της κοινότητας. Στη χώρα μας η πρώτη περιγραφή επιδημικών κρουσμάτων από στελέχη *K. pneumoniae* που έφεραν NDM-1 έγινε το 2014 και αφορούσε σε νοσοκομειακούς ασθενείς (Voulgari E *et al*, 2014).

Επιπρόσθετα, η παγκόσμια εξάπλωση των KPC-τύπου καρβαπεμενασών παρουσιάζει αξιοσημείωτες κλινικές και θεραπευτικές προκλήσεις. Οι KPCs απομονώθηκαν σε διάφορα είδη *Enterobacteriaceae* και μη ζυμούντων τη γλυκόζη Gram (-) μικροοργανισμών στις Η.Π.Α., το Πουέρτο Ρίκο, την Ελλάδα, το Ισραήλ, την Ιταλία, την Κολομβία, την Τουρκία, την ανατολική ακτή της Κίνας, την Ινδία και το Ηνωμένο Βασίλειο (van Duin D and Doi Y, 2017; Bratu *et al*, 2005; Walther-Rasmussen J and Høiby, 2007; Patel JB *et al*, 2009; Robledo IE *et al*, 2010; Nordmann P *et al*, 2011; Cantón RN *et al*, 2012; Munoz-Price LS *et al*, 2010). Η αυξανόμενη επικράτηση σοβαρών λοιμώξεων από στελέχη που παράγουν KPC, με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας, και το εξαιρετικά περιορισμένο πρότυπο ευαισθησίας τους στα αντιμικροβιακά (υδρολύουν και την αζτρεονάμη) υπογραμμίζει την ανάγκη περιορισμού της εξάπλωσής τους καθώς και της ταχείας ανίχνευσής τους προκειμένου να κατευθυνθεί ο έλεγχος της λοίμωξης και η αντιμικροβιακή διαχείριση. Η ανίχνευση στελεχών KPC απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή καθώς κατά το παρελθόν ήταν συχνή η διαφυγή τους από την εργαστηριακή εντόπισή τους καθώς οι MICs τους στις καρβαπενέμες ποικίλλει προκαλώντας υποανίχνευση, γεγονός που οδήγησε σε αναθεωρήσεις των breakpoints στις καρβαπενέμες από το CLSI (CLSI 2010, 2011). Στην χώρα μας τα στελέχη *Enterobacteriaceae* που παράγουν KPC-τύπου καρβαπενεμάσες ενδημούν στα νοσοκομειακά περιβάλλοντα και κυρίως στις Μονάδες Εντατικής Θεραπείας, εμφανίζοντας το υψηλότερο ποσοστό στην Ευρώπη (Giakkouri P *et al*, 2010; Souli M *et al*, 2010). Επίσης, τα ένζυμα τύπου OXA-48, που για πρώτη φορά ανιχνεύθηκαν στην Τουρκία και εξαπλώθηκαν παγκοσμίως, βρίσκονται κυρίως στην *K. pneumoniae* και αποτελούν συχνά πηγή νοσοκομειακών επιδημιών (Carrër A *et al*, 2010; Glupczynski Y *et al*, 2012; Nordmann P *et al*, 2011).

Η συλλογή επιδημιολογικών και κλινικών δεδομένων σχετικά με τις λοιμώξεις από *Enterobacteriaceae* που παράγουν καρβαπενεμάσες είναι αναγκαία προκειμένου να σχεδιασθούν και να εφαρμοσθούν μέτρα ελέγχου των λοιμώξεων αυτών καθώς και να αντιμετωπισθούν θεραπευτικά αποτελεσματικώς. Στην παρούσα έρευνα, κατά το πρώτο στάδιο, έγινε μελέτη του αποικισμού από CPE στελέχη σε ασθενείς, το προσωπικό και το περιβάλλον της ΜΕΘ. Οι ασθενείς εμφάνισαν ένα ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό αποικισμού από CPE στελέχη καθώς 36 από τους 80 ασθενείς της μελέτης (45%) βρέθηκαν αποικισμένοι ή αποικίσθηκαν κατά τη νοσηλεία τους. Το ποσοστό αυτό είναι μικρότερο (8,8%) για όσους βρέθηκαν ήδη αποικισμένοι κατά την εισαγωγή τους, ενώ σε όσους νοσηλεύθηκαν πάνω από μία εβδομάδα και δεν ήταν αποικισμένοι κατά την εισαγωγή τους το ποσοστό αυτό είναι κατά πολύ μεγαλύτερο, καθώς 29/41 (70,7%) ασθενείς αποικίσθηκαν με στελέχη CPE. Παρόμοιο ποσοστό (72,6%) αποικισμού ασθενών, αλλά μόνο με στελέχη *K. pneumoniae* που παρήγαγαν τύπου KPC καρβαπενεμάση κατά την νοσηλεία τους στη ΜΕΘ έδειξε και μια άλλη μελέτη στη ΜΕΘ του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Πάτρας (Papadimitriou-Olivgeris M *et al*, 2013). Το ποσοστό αποικισμού με CPE των ασθενών της ΜΕΘ που προέκυψε από τη μελέτη μας είναι από τα υψηλότερα που έχουν καταγραφεί μέχρι σήμερα. Επίσης, το μικρότερο ποσοστό ασθενών που ήταν ήδη αποικισμένοι κατά την εισαγωγή τους στη ΜΕΘ σε σχέση με αυτό των ασθενών που αποικίσθηκαν κατά την παραμονή τους σε αυτήν έχει βρεθεί και σε άλλες μελέτες και κυμαίνεται από μηδενικό μέχρι και 12.8% (Oteo J *et al*, 2015; Papadimitriou-Olivgeris M *et al*, 2012; Vasudevan A *et al*, 2013; Burns K *et al*, 2013; Maseda E *et al*, 2017; Dautzenberg MJ *et al*, 2015; Sypsa V *et al*, 2012). Το γεγονός αυτό αναδεικνύει τη σημαντικότητα του συνεχή εβδομαδιαίου ελέγχου αποικισμού των ασθενών έναντι του ελέγχου αποικισμού μόνο κατά την εισαγωγή. Την αξία της συνεχούς ενεργητικής επιτήρησης υπογραμμίζει επίσης και το γεγονός ότι αν και ο αποικισμός των ασθενών έγινε στη μεγαλύτερη πλειοψηφία τους (46,3%) κατά την πρώτη εβδομάδα της νοσηλείας τους, δεν ήταν λίγες οι περιπτώσεις που ο πρώτος αποικισμός ή ο αποικισμός ενός ήδη αποικισμένου ασθενούς από διαφορετικό CPE στέλεχος εμφανίσθηκε αργότερα. Από τους 36 ασθενείς που βρέθηκαν αποικισμένοι με CPE μόνο 4 είχαν ήδη διαγνωσμένη (κλινικά και εργαστηριακά) λοίμωξη από τα στελέχη αυτά, ενώ το ποσοστό όσων αποικισμένων ασθενών εμφάνισαν λοίμωξη από CPE συνολικά ήταν ιδιαίτερα υψηλό (52,8%). Συνεπώς, η ενεργητική επιτήρηση με τον συνεχή εβδομαδιαίο έλεγχο αποικισμού των ασθενών συμβάλλει στην εντόπιση

των ασθενών που δεν έχουν διαγνωσθεί με λοίμωξη από CPE στελέχη (με αρνητικές καλλιέργειες) και έχουν αυξημένη πιθανότητα να εμφανίσουν. Αυτό είναι πολύ σημαντικό δεδομένου ότι οι ασυμπτωματικοί αυτοί ασθενείς που είναι αποικισμένοι με CPE στελέχη αποτελούν μια σοβαρή πηγή μετάδοσης των στελεχών αυτών σε άλλους ασθενείς στη ΜΕΘ και το νοσοκομειακό περιβάλλον ευρύτερα από τη μία, και από την άλλη θα προσφερθεί βοήθεια στην απόφαση των κλινικών ιατρών για την έγκαιρη αντιμικροβιακή αντιμετώπιση των λοιμώξεων από τα στελέχη αυτά (όπως με την προσθήκη στην εμπειρική θεραπεία ενός αντιμικροβιακού παράγοντα αποτελεσματικού έναντι των CPE) με στόχο την μείωση της θνητότητας και την επιτυχή έκβαση (Gijón D *et al*, 2012; Saidel-Odes L and Borer A, 2008).

Τα συχνότερα απομονούμενα CPE στελέχη κατά τον έλεγχο αποικισμού των ασθενών ήταν στελέχη *Klebsiella pneumoniae* που παρήγαγαν καρβαπενεμάσες τύπου KPC, με τα στελέχη *Klebsiella pneumoniae* που παρήγαγαν μέταλλο-βήτα-λακταμάσες να ακολουθούν. Από τον έλεγχο ευαισθησίας διαπιστώνεται ότι τα στελέχη *Klebsiella pneumoniae* που παρήγαγαν καρβαπενεμάσες τύπου KPC εμφάνισαν υψηλές MICs στην ερταπενέμη ($\geq 8\text{mg/L}$) και την ιμιπενέμη ($\geq 16\text{mg/L}$) πολύ περισσότερο από ό,τι τα στελέχη που παρήγαγαν μέταλλο-βήτα-λακταμάσες, τα οποία στην συντριπτική τους πλειοψηφία εμφάνισαν υψηλότερες MICs στην μεροπενέμη ($\geq 16\text{mg/L}$). Επιπλέον, τα στελέχη *Klebsiella pneumoniae* που παρήγαγαν καρβαπενεμάσες τύπου KPC εμφάνισαν και μεγαλύτερα ποσοστά αντοχής και ενδιάμεσης ευαισθησίας στην αζτρεονάμη, την αμικασίνη και τις κινολόνες. Από τις κεφαλοσπορίνες οι MICs στην κεφεπίμη ποικίλλουν σε σχέση με τις υψηλές MICs που παρατηρούνται για την κεφταζιδίμη και για τα δύο αυτά είδη στελεχών. Επίσης, περίπου το 1/3 αυτών των στελεχών εμφανίζουν υψηλές τιμές MICs στην κολιστίνη και την τιγκεκυκλίνη, που αποτελούν αντιμικροβιακούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται συχνά στην αντιμετώπιση των λοιμώξεων από CPE στελέχη. Όσον αφορά στα υπόλοιπα στελέχη CPE που απομονώθηκαν κατά τον έλεγχο αποικισμού των ασθενών της ΜΕΘ, αυτά εμφάνισαν ποικιλία στο προφίλ των ευαισθησιών τους στα αντιβιοτικά, με κύριο χαρακτηριστικό την ανίχνευση αντοχής ή ενδιάμεσης ευαισθησίας μόνο σε ένα είδος καρβαπενέμης και περισσότερες ευαισθησίες σε κεφαλοσπορίνες, αζτρεονάμη και αμικασίνη σε σχέση με τα στελέχη *Klebsiella pneumoniae*. Τα στελέχη που παρουσιάζουν ένα τέτοιο προφίλ ευαισθησιών μπορούν να διαλάβουν της προσοχής κατά την εργαστηριακή διερεύνηση, να μην υποβληθούν

σε περαιτέρω φαινοτυπικό ή άλλο έλεγχο του μηχανισμού αντοχής και να μην επιβεβαιωθούν ως CPE στελέχη.

Η μελέτη των δημογραφικών και κλινικών δεδομένων των ασθενών της ΜΕΘ που αποικίσθηκαν ή όχι από στελέχη CPE κρίθηκε απαραίτητη, καθώς αναγνωρίζεται η συμμετοχή διαφόρων παραγόντων κινδύνου στην εμφάνιση του αποικισμού συμβάλλοντας στον καλύτερο σχεδιασμό των μέτρων ελέγχου και πρόληψης. Στην παρούσα μελέτη κύριοι παράγοντες κινδύνου για τον αποικισμό των ασθενών της ΜΕΘ από στελέχη CPE ήταν η παρατεταμένη διάρκεια νοσηλείας του ασθενούς τόσο στη ΜΕΘ όσο και στο νοσοκομείο και η ύπαρξη κεντρικού αγγειακού καθετήρα στον ασθενή, ευρήματα που έχουν παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες αποικισμού ή/και λοίμωξης από CPE ή γενικότερα από CRE στελέχη (Papadimitriou-Olivgeris M *et al*, 2012; Papadimitriou-Olivgeris M *et al*, 2013; Maseda E *et al*, 2017; Gasink *et al*, 2007; Vasudevan A *et al*, 2013; Torres-Gonzalez P *et al*, 2015; Mariappan S *et al*, 2017). Η πλειοψηφία των ασθενών που βρέθηκαν αποικισμένοι είχαν λάβει αντιμικροβιακή θεραπεία κατά τις προηγούμενες 30 ημέρες, η οποία περιελάμβανε ευρέως φάσματος αντιβιοτικά, όπως β-λακτάμες με αναστολέα, κεφαλοσπορίνες γ' και δ' γενεάς, καρβαπενέμες, κινολόνες και κολιμυκίνη. Είναι γεγονός ότι η κατανάλωση αντιμικροβιακών παραγόντων και ιδιαίτερος ευρέως φάσματος αντιβιοτικών αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης ανθεκτικών μικροβιακών στελεχών και συνεπώς και τον αποικισμό των ασθενών από αυτά (Galán JC *et al*, 2013; Gómez-Zorrilla S *et al*, 2014; McGowan JE Jr, 1983; Gould IM, 1999; Mulvey MR and Simor AE, 2009; Torres-Gonzalez P *et al*, 2015; Saidel-Odes L and Borer A, 2014; Mariappan S *et al*, 2017;). Τα υψηλά ποσοστά απομόνωσης ESBLs στελεχών σε ασθενείς της ΜΕΘ που έχουν καταγραφεί τα προηγούμενα χρόνια και που είχε οδηγήσει στην μεγαλύτερη χρήση καρβαπενεμών είναι άλλος ένας λόγος ανάπτυξης CPE στελεχών στις ΜΕΘ κάτω από τη πίεση της φυσικής επιλογής (Fraimow HS and Tsigrelis C, 2011). Όσον αφορά στα αίτια εισόδου των ασθενών στη ΜΕΘ, οι ασθενείς με εγκεφαλική αιμορραγία φαίνεται να έχουν αυξημένο κίνδυνο αποικισμού με CPE, ενώ όσοι εισήχθησαν για μετεγχειρητική παρακολούθηση είχαν μειωμένο κίνδυνο, πιθανόν λόγω της βραχύτερης νοσηλείας τους. Οι ασθενείς που βρέθηκαν αποικισμένοι με CPE ήταν σε βαρύτερη κλινική κατάσταση κατά την εισαγωγή τους στη ΜΕΘ καθώς είχαν μεγαλύτερο APACHE II score από τους μη αποικισμένους. Το υψηλό APACHE II score που δείχνει την κρισιμότητα της κατάστασης των ασθενών έχει αναγνωρισθεί και σε άλλες μελέτες ως παράγων κινδύνου εμφάνισης αποικισμού

ή/και λοίμωξης από ανθεκτικά gram αρνητικά στελέχη γενικότερα αλλά και από *K. pneumoniae* που παράγει KPC (Papadimitriou-Olivgeris M *et al*, 2012; Papadimitriou-Olivgeris M *et al*, 2013; Maseda E *et al*, 2017; Dautzenberg MJ *et al*, 2015; Vasudevan A *et al*, 2013). Πράγματι, όσο βαρύτερη είναι η κλινική κατάσταση του ασθενούς τόσο μεγαλύτερο το διάστημα νοσηλείας του και συνεπώς και η πιθανότητα να αποικισθεί ή να εμφανίσει λοίμωξη από CPE στελέχη (Nouvenne A *et al*, 2014). Οι αποικισμένοι ασθενείς είχαν ιστορικό διαφόρων υποκειμένων νοσημάτων, με τους ανοσοκατασταλμένους και τους παχύσαρκους να εμφανίζουν μεγαλύτερο κίνδυνο αποικισμού, ενώ η απουσία υποκειμένης νόσου φαίνεται να μειώνει τον κίνδυνο αυτό. Επίσης, φαίνεται να είναι σε μεγαλύτερο κίνδυνο αποικισμού από CPE όσοι ασθενείς βρίσκονται διασωληνωμένοι σε μηχανήματα αναπνευστικής υποστήριξης (όπου υπάρχουν διαταραχή του αναπνευστικού βλενογοννικού φραγμού και αυξημένες εκκρίσεις), εύρημα που βρίσκεται σε συμφωνία με αυτά άλλων μελετών (Gasink *et al*, 2007; Mittal G *et al*, 2016) . Σχετικά με το άρρεν φύλο, ως παράγοντα κινδύνου αποικισμού με CPE, δεν είναι ξεκάθαρη η συσχέτιση, όπως συμβαίνει και με πολλές μελέτες. Στη παρούσα μελέτη η ηλικία και η προηγούμενη υποβολή σε χειρουργική επέμβαση δεν συσχετίστηκαν με αποικισμό από CPE στελέχη, παράγοντες που η συσχέτισή τους ποικίλλει στις διάφορες μελέτες (Papadimitriou-Olivgeris M *et al*, 2012; Papadimitriou-Olivgeris M *et al*, 2013; Maseda E *et al*, 2017; Dautzenberg MJ *et al*, 2015; Vasudevan A *et al*, 2013; Mittal G *et al*, 2016; Torres-Gonzalez P *et al*, 2015; Mariappan S *et al*, 2017; Kofteridis DP *et al*, 2014).

Ένα άλλο εύρημα της έρευνάς μας αποτέλεσε η περιορισμένη δυνατότητα απομόνωσης στελεχών CPE σε σημεία του περιβάλλοντος της ΜΕΘ. Παρά το γεγονός ότι το πλήθος των σημείων αυτών και η συχνότητα των ελέγχων αποικισμού τους ήταν αρκετά μεγάλος (324 δείγματα από 54 διαφορετικά σημεία), μόλις σε 8 διαφορετικά σημεία (9 δείγματα θετικά) ανευρέθησαν στελέχη CPE. Σε 6 από αυτά τα σημεία (είτε αφορούσαν κλίνες είτε παράπλευρα της κλίνης αντικείμενα) νοσηλεύονταν ασθενείς που είχαν βρεθεί αποικισμένοι με CPE στελέχη, εύρημα που μπορεί να ερμηνεύσει τη διασπορά τους ή την ανάπτυξη ακόμα και διαφορετικών ειδών στελεχών CPE στο άμεσο περιβάλλον. Τα περισσότερα αφορούσαν κλίνες που ευνοούν την άμεση μόλυνσή τους από τον ίδιο τον ασθενή (είτε με άμεση επαφή είτε με εκκρίσεις), ενώ τα τραπέζια και τα μόνιτορς μολύνονται περισσότερο από τη μεταφορά μικροβίων με τα χέρια του προσωπικού ή με ιατρικά αντικείμενα. Σε άλλη

μελέτη που αφορούσε τον έλεγχο αποικισμού του περιβάλλοντος της ΜΕΘ σε γενικό νοσοκομείο των Αθηνών απομονώθηκαν 3 στελέχη *K. pneumoniae* που παρήγαγαν καρβαπενεμάση στο άμεσο περιβάλλον της νοσηλείας αποικισμένων με παρόμοια στελέχη ασθενών (Poulou A *et al*, 2012), ενώ σε μια άλλη μελέτη ελέγχου αποικισμού περιβάλλοντος της ΜΕΘ Ελληνικού Νοσοκομείου για KPC-2 *K. pneumoniae* απομονώθηκε μόλις ένα στέλεχος στα 114 σημεία που ελέγχθησαν (Souli M *et al*, 2010).

Η περιορισμένη απομόνωση στελεχών CPE από το περιβάλλον της ΜΕΘ μπορεί να αποδοθεί στην μέθοδο που επιλέχθηκε για τον έλεγχο αποικισμού που περιελάμβανε την λήψη περιβαλλοντικού δείγματος με διαβρεγμένο βαμβακοφόρο στυλεό και την χωρίς προηγούμενο εμπλουτισμό καλλιέργειά του σε MacConkey άγαρ με ενσωματωμένη ερταπενέμη 1μg/ml. Πολλές μελέτες στο παρελθόν έχουν προσπαθήσει να ερμηνεύσουν τα πτωχά αποτελέσματα της δειγματοληψίας με βαμβακοφόρο στυλεό για την απομόνωση λοιμογόνων μικροοργανισμών στο νοσοκομειακό περιβάλλον (Lerner A *et al*, 2013). Ως κύριες αιτίες αναφέρονται η βλάβη στα μικροβιακά κύτταρα κατά τη δειγματοληψία με το βαμβακοφόρο στυλεό, η πρόσφυση των μικροβιακών κυττάρων στις βαμβακοφόρες ίνες και η παγίδευσή τους στο στυλεό, η δύναμη της πίεσης που εφαρμόζεται στο στυλεό κατά την δειγματοληψία που εάν δεν είναι κατάλληλη μπορεί να μην συλλεχθεί επαρκής αριθμός μικροβίων, και φυσικά το μέσο μεταφοράς που μπορεί να επηρεάσει την βακτηριακή επιβίωση. Κάποιοι από αυτούς τους παράγοντες πιθανόν να ευθύνονται και για την περιορισμένη απομόνωση στελεχών CPE από το περιβάλλον της ΜΕΘ κατά τη μελέτη μας. Άλλοι ανεξάρτητοι από τη μέθοδο δειγματοληψίας παράγοντες που αναφέρονται είναι η απόσταση των αντικειμένων από τον αποικισμένο ασθενή, τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας που ελέγχεται (π.χ. φορτίο, υδροφοβικότητα), ο χρόνος από τον προηγούμενο καθαρισμό του σημείου, καθώς και ο εφαρμοζόμενος τρόπος καθαρισμού και απολύμανσης. Παρ' όλα αυτά ο ρόλος του περιβάλλοντος στην μετάδοση των μικροοργανισμών, και κυρίως των πολυανθεκτικών, δεν πρέπει να υποβαθμίζεται (Hota B, 2004)

Ακόμα πιο περιορισμένη υπήρξε η απομόνωση στελεχών CPE κατά τον έλεγχο αποικισμού των χεριών του προσωπικού της ΜΕΘ, αφού μόνο σε ένα άτομο από το νοσηλευτικό προσωπικό βρέθηκε *K. pneumoniae* που παρήγαγε τύπου KPC καρβαπενεμάση. Δεν είναι γνωστές μέχρι σήμερα μελέτες που να αναφέρονται στην απομόνωση CPE στελεχών απευθείας από τα χέρια του προσωπικού σε νοσοκομεία.

Υπάρχει μελέτη που αναφέρεται σε απομόνωση στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάσες, αλλά από τις στολές ή τα γάντια του προσωπικού, και η οποία σχετίζεται με το χρόνο και το είδος της δραστηριότητας του προσωπικού στο θάλαμο των ασθενών (Rock C *et al*, 2014). Σε μια άλλη μελέτη σχετικά με την απομόνωση στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν ESBLs από τα χέρια προσωπικού σε μονάδα προώρων μόνο σε 2/158 άτομα ανευρέθησαν αυτά τα στελέχη (Gupta A *et al*, 2004), ενώ σε μια μελέτη για την απομόνωση μεταξύ των άλλων MDRO και ανθεκτικών στην κεφτριαξόνη στελεχών *K. pneumoniae* από τα χέρια του προσωπικού ενός νοσοκομείου δεν ανιχνεύθηκε κανένα στέλεχος (Tan TY *et al*, 2013). Ωστόσο, η συχνότητα απομόνωσης άλλων MDRO στελεχών από τα χέρια του προσωπικού στις μελέτες αυτές ήταν σημαντική. Επίσης, σε μια άλλη μελέτη απομονώθηκε *K. pneumoniae* που παρήγαγε καρβαπενεμάσες από τα χέρια στο 15% του προσωπικού, αφού πρώτα τους ζητήθηκε να έρθουν σε επαφή τουλάχιστον για 30 δευτερόλεπτα με αποικισμένους ασθενείς (Syrpsa V *et al*, 2012). Επίσης, σε αυτές τις μελέτες ο τρόπος λήψης του δείγματος (μέθοδος γαντιού με θεραπευτικό υλικό- glove juice method) από τα χέρια του προσωπικού είναι διαφορετικός από την μεθοδολογία που ακολουθήθηκε στην παρούσα μελέτη που περιελάμβανε τη λήψη με βαμβακοφόρο στυλεό και την απευθείας, χωρίς προηγούμενο εμπλουτισμό, καλλιέργεια, καθώς και την άμεση επαφή των χεριών με το καλλιεργητικό μέσο. Θα μπορούσε να υποθέσει κανείς ότι ο τρόπος λήψης του δείγματος με τις αδυναμίες που αναφέρθηκαν παραπάνω και κυρίως η εν γένει δυσκολία απομόνωσης των στελεχών *Klebsiella* spp. από τα χέρια είναι παράγοντες που μπορούν να ερμηνεύσουν την εξαιρετικά μικρή συχνότητα απομόνωσης CPE στελεχών από τα χέρια του προσωπικού της ΜΕΘ που συμμετείχαν στη μελέτη μας.

Επιπρόσθετα, σημαντικό εύρημα της παρούσης μελέτης αποτελεί το υψηλό ποσοστό (52,8%) των λοιμώξεων από CPE στελέχη που καταγράφηκε μεταξύ των ασθενών που βρέθηκαν αποικισμένοι με τα στελέχη αυτά. Σε μια άλλη μελέτη στη ΜΕΘ του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Πάτρας (Papadimitriou-Olivgeris M *et al*, 2013) το ποσοστό αυτό ήταν χαμηλότερο (16.6%), ενώ όσον αφορά στα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη (CRE) τα ποσοστά αυτά ποικίλλουν ευρέως από 0%-89% στις διάφορες μελέτες, με την πλειονότητα των μελετών να αναφέρουν ποσοστά από 7.6%-44.4% (Tischendorf J *et al*, 2016). Ο αριθμός των ασθενών που εμφάνισαν πάνω από δύο είδη λοιμώξεων είναι σημαντικός (9/19 ασθενείς), ενώ οι περισσότεροι ασθενείς εμφάνισαν αναπνευστική λοίμωξη (πνευμονία), με τις βακτηριαμίες να

έπονται. Στις περισσότερες μελέτες σχετικά με τις λοιμώξεις από CPE στελέχη (κυρίως από *K. pneumoniae* που παράγει καρβαπενεμάσες τύπου KPC) οι λοιμώξεις του ουροποιητικού και οι βακτηριαιμίες εμφανίζουν το μεγαλύτερο ποσοστό, ακολουθούμενες από τις αναπνευστικές λοιμώξεις και τις λοιμώξεις των χειρουργικών τραυμάτων (da Silva RM *et al*, 2012). Αξιοσημείωτο είναι το εύρημα ότι 10 από τους 19 ασθενείς με λοίμωξη από CPE ευρίσκονταν σε κατάσταση σηπτικού σοκ.

Τα στελέχη CPE που απομονώθηκαν από τα κλινικά δείγματα των ασθενών με λοίμωξη ήταν στο μεγαλύτερο ποσοστό τους στελέχη *K. pneumoniae* που παρήγαγαν καρβαπενεμάσες τύπου KPC, ενώ σημαντικός ήταν και το αριθμός των στελεχών *Serratia marcescens* και *Proteus mirabilis* που παρήγαγαν του ίδιου τύπου καρβαπενεμάσες, γεγονός που ήταν αναμενόμενο από τον μεγάλο αριθμό των αναπνευστικών λοιμώξεων που εμφάνισαν οι ασθενείς αυτοί. Ωστόσο, κανένα στέλεχος *Serratia marcescens* που παράγει καρβαπενεμάσες δεν απομονώθηκε κατά τον έλεγχο αποικισμού των ασθενών, όπως έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες αποικισμού, όπου τα απομονούμενα στελέχη ήταν κυρίως *K. pneumoniae*, *E. coli* και *E. cloacae* (Torres-Gonzalez P *et al*, 2015; Mariappan S *et al*, 2017; Mittal G *et al*, 2016). Επίσης, το ποσοστό των CPE στελεχών που παρήγαγαν KPC καρβαπενεμάσες που απομονώθηκαν στα κλινικά δείγματα των ασθενών με λοίμωξη ήταν μεγαλύτερο από το ποσοστό αυτών των στελεχών που απομονώθηκαν από τα ορθικά επιχρίσματα κατά τον έλεγχο αποικισμού. Όσον αφορά στον έλεγχο ευαισθησίας των CPE στελεχών που απομονώθηκαν από τα κλινικά των αποικισμένων ασθενών με λοίμωξη, όλα τα στελέχη *K. pneumoniae* που παρήγαγαν καρβαπενεμάσες τύπου KPC εμφάνισαν υψηλές MICs στην ερταπενέμη ($\geq 8\text{mg/L}$), ένα μεγάλο ποσοστό στην μεροπενέμη ($\geq 16\text{mg/L}$), ενώ οι MICs στην ιμιπενέμη εμφάνισαν σημαντική διακύμανση. Διαφορετική είναι η εικόνα για τα στελέχη *Serratia marcescens* και *Proteus mirabilis* που παρήγαγαν KPC τύπου καρβαπενεμάσες, όπου δείκτης αντοχής στις καρβαπενέμες αποτέλεσε κυρίως η εμφάνιση υψηλών MICs στην ιμιπενέμη ($\geq 16\text{mg/L}$), και λιγότερο στην μεροπενέμη και την ερταπενέμη που εμφάνισαν χαμηλότερες MICs. Μάλιστα όλα τα στελέχη *Proteus mirabilis* ήταν ευαίσθητα στην ερταπενέμη (MIC $\leq 0.5\text{ mg/L}$). Όλα τα στελέχη *K. pneumoniae* εμφάνισαν στην συντριπτική τους πλειοψηφία υψηλές MICs στην αζτρεονάμη, την κεφταζιδίμη, την πιπερακυλλίνη/ταζομπακτάμη και την σιπροφλοξασίνη, ενώ το 1/3 περίπου εμφάνισε

υψηλές ή ενδιάμεσες τιμές MICs στην κολιστίνη και την τιγκεκυκλίνη. Από την άλλη πλευρά όλα τα στελέχη *Serratia marcescens* ήταν ευαίσθητα στην τιγκεκυκλίνη και τα στελέχη *Proteus mirabilis* εμφάνισαν ενδιάμεσες ευαισθησίες.

Επιπρόσθετα, στην μελέτη μας βρέθηκε ότι η παρατεταμένη διάρκεια νοσηλείας του ασθενούς κατά κύριο λόγο στο νοσοκομείο βρέθηκε επίσης να αποτελεί παράγοντα κινδύνου στους αποικισμένους ασθενείς με λοίμωξη από CPE στελέχη, και δευτερευόντως η παρατεταμένη διάρκεια παραμονής στη ΜΕΘ, καθώς και η ύπαρξη κεντρικού αγγειακού καθετήρα, ενώ η πλειοψηφία των ασθενών αυτών είχαν λάβει αντιμικροβιακή θεραπεία κατά τις προηγούμενες 30 ημέρες, η οποία περιελάμβανε ευρέως φάσματος αντιβιοτικά, κατά κύριο λόγο κολιμυκίνη αλλά και β-λακτάμες με αναστολέα, καρβαπενέμες, κεφαλοσπορίνες γ' και δ' γενεάς, και κινολόνες, ευρήματα που ανευρίσκονται στις περισσότερες μελέτες λοίμωξης από CPE ή CRE στελέχη (Saidel-Odes L and Borer A, 2014; Mariappan S *et al*, 2017; Giannella M *et al*, 2014; Kofteridis DP *et al*, 2014; Gómez Rueda V and Zuleta Tobón JJ, 2014). Επίσης, οι άνδρες εμφάνισαν σημαντικά αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης λοίμωξης από CPE στελέχη, και σε μικρότερο βαθμό όσοι είχαν προηγούμενη νοσηλεία, όσοι εισήχθησαν με εγκεφαλική αιμορραγία, οι ανοσοκατεσταλμένοι και οι διαβητικοί ασθενείς (Mariappan S *et al*, 2017; Kofteridis DP *et al*, 2014).

Η συντριπτική πλειοψηφία των λοιμώξεων από CPE στελέχη αντιμετωπίστηκε με συνδυασμό αντιμικροβιακών, που περιελάμβανε κατά κύριο λόγο κάποια καρβαπενέμη, την κολιμυκίνη και την αμικασίνη, εναλλάξ με τιγκεκυκλίνη και γενταμικίνη. Έχει καταδειχθεί σε πρόσφατα δημοσιευμένες μελέτες ότι η συνδυασμένη αντιμικροβιακή θεραπεία υπερτερεί έναντι της μονοθεραπείας κατά την αντιμετώπιση των λοιμώξεων από στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάσες (Tängdén T *et al*, 2015). Ο συνδυασμός κολιστίνης με καρβαπενέμη ή/και τιγκεκυκλίνη ήταν ο συχνότερα χρησιμοποιούμενος αντιμικροβιακός συνδυασμός, ενώ η μονοθεραπεία με κολιστίνη έχει συσχετισθεί με μη ευνοϊκές εκβάσεις και την εμφάνιση αντοχής στην κολιστίνη (Giacobbe DR *et al*, 2015; Pournaras S *et al*, 2011). Έχει παρατηρηθεί θετική επίδραση της χορήγησης καρβαπενέμης με MIC <8 mg/mL όταν αυτή συνδυάστηκε με μια άλλη κατηγορία αντιμικροβιακών δραστικών σε ασθενείς με λοίμωξη από *K. pneumoniae* που παράγει καρβαπενεμάσες (Daikos GL and Markogiannakis A, 2011). Παρά τις προσπάθειες για την αποτελεσματική θεραπεία των λοιμώξεων από CPE, η βέλτιστη θεραπεία δεν

έχει ακόμη προσδιοριστεί με σαφήνεια. Ορισμένα νέα φάρμακα που είναι δραστικά έναντι των CPE βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο παραγωγής, αλλά πολύ λίγα από αυτά αναμένεται να είναι διαθέσιμα για κλινική χρήση σύντομα. Επομένως, καλά σχεδιασμένες κλινικές δοκιμές που επικεντρώνονται: α) στον προσδιορισμό του βέλτιστου δοσολογικού σχήματος της κολιστίνης, β) στις λοιμώξεις από CPE που θα μπορούσαν να ελεγχθούν αποτελεσματικά από τιγκεκυκλίνη, γ) στα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά των καρβαπενεμών που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και δ) στην ανακάλυψη των πλέον αποτελεσματικών συνδυασμών αντιμικροβιακών, μπορούν να αποδειχθούν πολύτιμες στην προσπάθεια ελέγχου και καταπολέμησης των λοιμώξεων από CPE.

Η συνολική θνητότητα στους αποικισμένους ασθενείς της ΜΕΘ με λοίμωξη από CPE ήταν υψηλή (42,1%) αν και χαμηλότερη από αυτή που παρατηρήθηκε σε άλλες μελέτες (Mariappan S *et al*, 2017; Dautzenberg MJ *et al*, 2015; da Silva RM *et al*, 2012; Zarkotou O *et al*, 2011) πιθανόν να αντικατοπτρίζει την κρίσιμη κλινική κατάσταση που βρίσκονταν οι ασθενείς αυτοί, όπως μετρήθηκε με την βαθμολογία APACHE II κατά την εισαγωγή. Ωστόσο, το ποσοστό θνητότητας 14 ημερών (5,4%) ήταν σχετικά χαμηλό. Η θνησιμότητα των λοιμώξεων από CPE στους ασθενείς αυτούς (17,1%) ήταν σημαντική αν και έχουν παρατηρηθεί υψηλότερα ποσοστά σε άλλες μελέτες (da Silva RM *et al*, 2012; Zarkotou O *et al*, 2011), ενώ το ποσοστό των ατόμων που εμφάνισαν υποτροπή των λοιμώξεων ήταν σχετικά υψηλό (31,4%). Επιπλέον, λίγο πάνω από το ήμισυ των περιπτώσεων αυτών εμφάνισε κλινική βελτίωση ή ίαση καθώς και μικροβιολογική ανταπόκριση στη θεραπεία.

Από τα παραπάνω ευρήματα της παρούσας μελέτης ήταν προφανής η αναγκαιότητα εφαρμογής μέτρων ελέγχου και πρόληψης τόσο του αποικισμού των ασθενών που νοσηλεύονται στη ΜΕΘ όσο και των λοιμώξεων που εμφανίζουν και οφείλονται σε στελέχη CPE. Αυτό πραγματοποιήθηκε μετά το πρώτο τρίμηνο της μελέτης, οπότε αποφασίσθηκαν και εφαρμόσθηκαν εντατικά συγκεκριμένα μέτρα ελέγχου μαζί με τα συνήθη, όπως το περιοδικό κλείσιμο της ΜΕΘ και η απολύμανσή της, ενώ συνεχίσθηκε η ενεργητική επιτήρηση με τον έλεγχο αποικισμού. Τα αποτελέσματα από την εφαρμογή των μέτρων αυτών υπήρξαν ενθαρρυντικά τόσο ως προς τη μείωση στην επίπτωση περιπτώσεων αποικισμού με CPE των ασθενών της ΜΕΘ και πολύ περισσότερο ως προς την επιμήκυνση του χρονικού διαστήματος εμφάνισης του αποικισμού αυτού. Επίσης, όπως αναμενόταν, καθολικός υπήρξε ο αποαποικισμός του περιβάλλοντος από CPE αμέσως μετά το κλείσιμο και την

απολύμανση της ΜΕΘ, ενώ και σε αυτή την περίπτωση υπήρξε μείωση των αποικισμένων σημείων και καθυστέρηση του αποικισμού. Υπάρχει πλήθος μελετών που καταδεικνύουν την αποτελεσματικότητα των μέτρων πρόληψης και ελέγχου σχετικά με τα CRE στελέχη, δίνοντας έμφαση στην ενεργητική επιτήρηση του αποικισμού και των λοιμώξεων και το συνδυασμό των μέτρων σε μια συνολική στρατηγική αντιμετώπισης των CRE στελεχών (Saidel-Odes L and Borer A, 2014; da Silva RM *et al*, 2012; Poulou A *et al*, 2012).

Το γεγονός ότι περίπου ένας στους δέκα ασθενείς που εισάγονται στην ΜΕΘ βρίσκονται αποικισμένοι με CPE στελέχη, το υψηλό ποσοστό του αποικισμού κατά τη διάρκεια παραμονής στη ΜΕΘ και το νοσοκομείο γενικότερα, και ο αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης σοβαρών, δυνητικά θανατηφόρων λοιμώξεων των ασθενών που είναι αποικισμένοι σε συνδυασμό με την περιορισμένη «φαρέτρα» των αντιμικροβιακών παραγόντων έναντι των λοιμώξεων από CPE κατέστησαν επιτακτική την ανάγκη σχεδιασμού και εφαρμογής, παράλληλα με τα συνιστώμενα μέτρα ελέγχου, και αποτελεσματικών εργαστηριακών μεθόδων screening για CPE των ασθενών αυτών. Επιπλέον, η ανίχνευση αυτών των παθογόνων θα πρέπει να πραγματοποιηθεί σε σύντομο χρονικό διάστημα από την εισαγωγή του ασθενούς στο νοσοκομείο προκειμένου να αποφευχθεί η περαιτέρω διάδοση στο νοσοκομειακό περιβάλλον.

Για αυτό τον λόγο, κατά τη δεύτερη περίοδο της παρούσης μελέτης, αξιολογήσαμε ένα νέο χρωμογόνο καλλιεργητικό μέσο, το chromID CARBA, την απόδοση του οποίου συνεκρίναμε με εκείνη των τεσσάρων άλλων καλλιεργητικών τεχνικών όσον αφορά στην ανίχνευση των CPE στελεχών σε ορθικά επιχρίσματα. Ως μεθόδους σύγκρισης χρησιμοποιήσαμε την τεχνική screening που προτείνεται από το CDC (CDC, 2009), το παρόμοιο με του CDC πρωτόκολλο της bioMérieux που χρησιμοποιεί το chromID ESBL medium, το chromID ESBL screening medium που σχεδιάστηκε για την ανίχνευση των στελεχών που παράγουν ESBL (Réglie-Poupet H *et al*, 2008) και μια in-house μέθοδο που χρησιμοποιεί τρυβλία με MacConkey άγαρ με ενσωματωμένη μεροπενέμη (1g/ml). Στο τελευταίο μέσο προτιμήσαμε να χρησιμοποιήσουμε την μεροπενέμη αντί της ιμιπενέμης, επειδή η σταθερότητα της ιμιπενέμης στα καλλιεργητικά μέσα δεν είναι ικανοποιητική (Turgeon PL and Desrochers C, 1985).

Η παρούσα συγκριτική μελέτη έδειξε ότι το chromID CARBA επιδεικνύει τη μεγαλύτερη ειδικότητα και τη μεγαλύτερη θετική προγνωστική αξία (96,9% και

93,4% αντίστοιχα) ως προς την ανίχνευση CPE στελεχών. Ωστόσο, πρέπει να αναφερθεί ότι η μελέτη διεξήχθη σε μια χώρα και σε μια μονάδα όπου οι νοσοκομειακοί ασθενείς, και ιδιαίτερα οι ασθενείς της ΜΕΘ, αποικίζονται συχνά με στελέχη που παράγουν KPC και/ή VIM, ενώ σε χώρες με μικρά ποσοστά ανίχνευσης CPE στελεχών, η μέθοδος ελέγχου μπορεί να εμφανίζει σημαντικά χαμηλότερη θετική προγνωστική αξία. Το chromID CARBA έδειξε επίσης την ίδια ευαισθησία (92,4%) με τη μέθοδο της απευθείας καλλιέργειας στο ESBL medium, καθώς και με την μέθοδο του σύντομου εκλεκτικού εμπλουτισμού που ακολουθείται από την καλλιέργεια σε chromID ESBL medium. Όλες οι μέθοδοι που χρησιμοποιούν χρωμογόνα μέσα παρουσίασαν υψηλότερες ευαισθησίες και αρνητικές προγνωστικές αξίες από εκείνες των μεθόδων CDC-TS και MCM. Ωστόσο, συμπέρασμα σχετικά με την ευαισθησία των συγκρινόμενων μεθόδων για την ανίχνευση άλλων τύπων CPE στελεχών, και ιδιαίτερα αυτών που παράγουν OXA-48, οι οποίοι θα μπορούσαν να παρουσιάσουν χαμηλά επίπεδα MICs στις καρβαπενέμες, δεν μπορεί να εξαχθεί. Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι η μέθοδος CDC-TS έδωσε αποτελέσματα σε μία επιπλέον ημέρα σε σύγκριση με τις μεθόδους άμεσης επίστρωσης, γεγονός που μπορεί να καθυστερήσει την εφαρμογή κατάλληλων μέτρων ελέγχου των λοιμώξεων (Landman D *et al*, 2005; Lolans K *et al*, 2010; Panagea T *et al*, 2011).

Σε προηγούμενες μελέτες ενεργητικής παρακολούθησης, η απόδοση ενός άλλου χρωμογόνου μέσου, του CHROMagar KPC, συνεκρίθει με εκείνη άλλων μεθόδων διαλογής για την ανίχνευση στελεχών *Enterobacteriaceae* ανθεκτικών στις καρβαπενέμες (Panagea T *et al*, 2011; Samra Z *et al*, 2008). Το CHROMagar KPC βρέθηκε ότι παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα από το παρασκευασμένο στο εργαστήριο MacConkey άγαρ με ενσωματωμένη ιμιπενέμη (Panagea T *et al*, 2011) ή άγαρ MacConkey με δίσκους καρβαπενέμης (Samra Z *et al*, 2008). Επίσης, οι Adler *et al*. (Adler A *et al*, 2011) συνέκριναν τις επιδόσεις του CHROMagar KPC με τις επιδόσεις των MacConkey άγαρ με ενσωματωμένη ιμιπενέμη συγκέντρωσης 1 g / ml (MacI) και των τρυβλίων με MacConkey με δίσκους καρβαπενέμης. Σε αυτή τη μελέτη, το MacI εμφάνισε την μεγαλύτερη υπεροχή όσον αφορά στην ανίχνευση *Enterobacteriaceae* ανθεκτικών στις καρβαπενέμες, παρόλο που το MacI και το CHROMagar KPC είχαν παρόμοιες ευαισθησίες και αρνητικές προγνωστικές αξίες (Adler A *et al*, 2011). Τέλος, οι Carrër *et al*. (Carrër A *et al*, 2010) συνέκριναν την απόδοση του chromID ESBL με εκείνη του CHROMagar KPC και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το chromID ESBL είναι

πιο ευαίσθητο για την ανίχνευση στελεχών με χαμηλού επιπέδου αντοχή στις καρβαπενέμες.

Αυτή είναι η πρώτη μελέτη που περιγράφει τη χρήση του πρωτοτύπου χρωμογόνου μέσου chromID CARBA για ταχεία και άμεση ανίχνευση των στελεχών CPE από κλινικά δείγματα. Αυτό το χρωμογόνο μέσο, ειδικά σχεδιασμένο για την ανίχνευση CPE, έδειξε εξαιρετική ικανότητα ανίχνευσης των στελεχών αυτών και η τιμή του ορίου ανίχνευσής του (LOD) ήταν συγκρίσιμη με τις τιμές του LOD άλλων μεθόδων ελέγχου. Το chromID CARBA έδειξε ότι έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύσει CPE στελέχη με μεταβλητές τιμές MICs στις καρβαπενέμες (από 2 έως 32g/ml), εύρημα τελείως διαφορετικό από εκείνο του CHROMagar KPC (Carrër A *et al*, 2010). Επιπλέον, σε αντίθεση με το chromID ESBL και το ESBL-BH, το chromID CARBA έδειξε ότι είναι ικανό να ανακτήσει το μοναδικό στέλεχος αναφοράς OXA-48 σε πειράματα LOD, αλλά αυτό επετεύχθη μόνο σε υψηλή συγκέντρωση εναιωρήματος (10^7 CFU/ml). Αυτό έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς η ανίχνευση παθογόνων μικροβιακών παραγόντων που παράγουν OXA-48 παραμένει προβληματική, ειδικά σε χώρες όπου αυτά τα στελέχη έχουν εξαπλωθεί (Glupczynski Y *et al*, 2012, Nordmann P *et al*, 2011).

Τα χρωματικά χαρακτηριστικά που εμφανίζονται στο chromID CARBA (η *E. coli* εμφανίζει ροζ προς μπορντό, τα *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp. και *Citrobacter* spp. εμφανίζουν πράσινο-μπλε προς καφέ-πράσινο και η οικογένεια των *Proteeae* εμφανίζουν βαθύ προς ανοικτό καφέ χρώμα αποικιών) επιτρέπει την εύκολη διαφοροποίηση των αναπτυχθέντων στο μέσο βακτηριακών αποικιών. Έτσι, με το chromID CARBA ήταν δυνατό να γίνει διάκριση μιας ποικιλίας στελεχών CPE που αναπτύχθηκαν ταυτόχρονα στο μέσο λόγω των διαφορετικών χρωματισμών των αποικιών. Επιπλέον, αυτό το μέσο ανέστειλε όλα τα στελέχη που παρήγαγαν ESBL τα οποία ανακτήθηκαν στο ChromID ESBL ή με τη μέθοδο ESBL-BH. Πρόσφατα, το chromID CARBA συνεκρίθη με το Colorex KPC (το μόνο προπαρασκευασμένο χρωμογόνο μέσο για την απομόνωση CPE που διατίθεται στο εμπόριο στο Ηνωμένο Βασίλειο) σχετικά με την ικανότητα ανάπτυξης στελεχών CPE (Perry JD *et al*, 2011). Η συγκριτική αξιολόγηση δεν διενεργήθηκε με απευθείας καλλιέργεια των ορθικών επιχρισμάτων, αλλά πραγματοποιήθηκε με καλλιέργεια βακτηριακών εναιωρημάτων που παρασκευάστηκαν από δείγματα κοπράνων. Το chromID CARBA βρέθηκε να είναι πιο ευαίσθητο από το Colorex KPC όσον αφορά

στην ανίχνευση μικροβιακών παθογόνων που παράγουν NDM MBL (Perry JD *et al*, 2011).

Θα πρέπει να αναφερθεί ότι διαφορετικά στελέχη CPE μπορεί να συνυπάρχουν σε ένα δείγμα κοπράνων, ιδιαίτερα σε περιοχές όπου αυτά ενδημούν. Αυτά τα στελέχη δεν μπορούν εύκολα να διακριθούν με βάση το χρώμα ή τη μορφολογία των αποικιών στα διάφορα μέσα διαλογής. Στην παρούσα μελέτη, το γεγονός αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει γιατί ορισμένα στελέχη CPE που συνυπάρχουν στο κλινικό δείγμα με άλλα στελέχη που παράγουν καρβαπενεμάσες δεν ανιχνεύθηκαν ούτε με τη χρήση των χρωμογόνων μέσων ούτε με τις μεθόδους CDC-TS και MCM (Σχεδιάγραμμα 2).

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη ανέδειξε το σημαντικό πρόβλημα αποικισμού με CPE των ασθενών της ΜΕΘ που εμφάνισε υψηλά ποσοστά και τη συσχέτισή του με συγκεκριμένους παράγοντες, όπως το φύλο, τη διάρκεια νοσηλείας, τη χρήση αντιμικροβιακών παραγόντων, τη βαρύτητα της κλινικής κατάστασης των ασθενών, την ύπαρξη υποστηρικτικού μηχανικού αερισμού και κεντρικού αγγειακού καθετήρα. Το μεγάλο ποσοστό εμφάνισης λοιμώξεων από CPE στους αποικισμένους ασθενείς και τα σχετικά υψηλά ποσοστά θνητότητας και κλινικής επιβάρυνσης των ασθενών αυτών τους καθιστούν ως ομάδα υψηλού κινδύνου που πρέπει να αντιμετωπισθεί καταλλήλως. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το στενό φάσμα αντιμικροβιακής θεραπείας αναβαθμίζει την σημασία που έχει ο κατάλληλος σχεδιασμός και η ορθή εφαρμογή των μέτρων ελέγχου και πρόληψης, τα αποτελέσματα των οποίων αξιολογήθηκαν θετικά και στην παρούσα μελέτη ως προς τον έλεγχο της επίπτωσης αποικισμού με CPE και της επιμήκυνσης του χρόνου εμφάνισής του. Επιπρόσθετα, το chromID CARBA βρέθηκε ότι αποτελεί μια εύκολη διενεργούμενη και αποκλειστική μέθοδος για την ανίχνευση CPE στελεχών σε επιχρίσματα από το ορθό. Λαμβάνοντας υπόψη ότι ο χρόνος ανίχνευσης τέτοιων παθογόνων παραγόντων είναι ιδιαίτερα κρίσιμος για την πρόληψη της μετάδοσης και την καταπολέμηση των λοιμώξεων από αυτά τα στελέχη, αυτή η μέθοδος εντόπισε αποτελεσματικά τους ασθενείς που αποικίσθηκαν με στελέχη CPE σε πολύ μικρότερο χρονικό διάστημα (24 ώρες από την παραλαβή του δείγματος) σε σχέση με τις in-house μεθόδους. Αυτό είναι ζωτικής σημασίας για την έγκαιρη αναφορά στους κλινικούς ιατρούς των αποτελεσμάτων απομόνωσης στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες και την εφαρμογή των κατάλληλων παρεμβάσεων για τον έλεγχο

της λοίμωξης, καθώς και για τον εντοπισμό αποικισμένων ασθενών που διατρέχουν κίνδυνο διεισδυτικής λοίμωξης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσης διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε η επιδημιολογική μελέτη του αποικισμού και των λοιμώξεων από στελέχη *Enterobacteriaceae* που παράγουν καρβαπενεμάσες (CPE) στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ) Τριτοβάθμιου Νοσοκομείου, ο σχεδιασμός και η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας μέτρων πρόληψης, καθώς και η διερεύνηση και συγκριτική αξιολόγηση καλλιεργητικών μεθόδων για την ταχεία ανίχνευση CPE στελεχών απευθείας από κλινικά δείγματα.

Κατά το πρώτο στάδιο της μελέτης, διάρκειας έξι μηνών, πραγματοποιήθηκε έλεγχος αποικισμού με CPE με λήψη ορθικού δείγματος εβδομαδιαίως σε συνολικά 80 ασθενείς της ΜΕΘ του Γ.Ν.Ν. Π. «Άγιος Παντελεήμων», έλεγχος αποικισμού με CPE των χειρών 46 ατόμων του προσωπικού της ΜΕΘ και έλεγχος αποικισμού με CPE του περιβάλλοντός της. Επιδημιολογικά και κλινικά δεδομένα κατεγράφησαν όλο το ανωτέρω διάστημα. Επιπλέον, εφαρμόστηκαν συγκεκριμένα μέτρα ελέγχου αποικισμού και λοιμώξεων, πλέον του καθιερωμένου κλεισίματος και απολύμανσης της ΜΕΘ, και αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητά τους.

Κατά το δεύτερο στάδιο της μελέτης συλλέχθηκαν δείγματα ορθικού επιχρίσματος από 200 ασθενείς του Νοσοκομείου (ΜΕΘ και Παθολογικής κλινικής) και πραγματοποιήθηκε η καλλιέργειά τους με πέντε διαφορετικές μεθόδους για την απομόνωση CPE. Συγκεκριμένα, αξιολογήθηκε η λειτουργία ενός πρωτότυπου χρωμογόνου καλλιεργητικού μέσου (chromID CARBA) συγκρινόμενη με άλλες τέσσερις screening μεθόδους: α) Μετά από 24ωρη επώαση στους $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ σε 5ml εκλεκτικού εμπλουτιστικού tryptic soy (TS) ζωμού που περιέχει δίσκο ερταπενέμης 10μg καλλιέργεια σε MacConkey άγαρ (CDC-TS), β) μετά από 4-6 ώρες επώασης στους $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ σε 9ml εκλεκτικού εμπλουτιστικού brain heart infusion (BHI) ζωμού που περιέχει δίσκο ερταπενέμης 10μg καλλιέργεια σε χρωμογόνο καλλιεργητικό μέσο chromID ESBL (ESBL-BH), γ) απευθείας ενοφθαλμισμός στο χρωμογόνο καλλιεργητικό μέσο chromID ESBL (chromID-ESBL), και δ) απευθείας ενοφθαλμισμός σε MacConkey άγαρ με ενσωματωμένη μεροπενέμη 1μg/ml (MCM). Η καλλιέργεια των ληφθέντων δειγμάτων κατά τους ελέγχους αποικισμού έγινε σε MacConkey άγαρ και κατόπιν σε MacConkey άγαρ με ενσωματωμένη ερταπενέμη σε συγκεντρώσεις 0.5, 1 και 2μg/ml. Η ταυτοποίηση και ο έλεγχος της αντιμικροβιακής ευαισθησίας των ύποπτων για CPE αποικιών πραγματοποιήθηκαν με το σύστημα Vitek 2. Οι MICs των καρβαπενεμών κατά το δεύτερο στάδιο της μελέτης

επιβεβαιώθηκαν με Etest μέθοδο. Η παραγωγή καρβαπεμενασών επιβεβαιώθηκε με τη χρήση φαινοτυπικών μεθόδων (modified Hodge test και double-disk synergy test) και μέθοδο PCR.

Σε 36/80 (45,0%) ασθενείς της ΜΕΘ κατά τον έλεγχο αποικισμού τους απομονώθηκαν 130 στελέχη CPE, κυρίως *K. pneumoniae* (CP-Kp). 7/80 (8,8%) βρέθηκαν αποικισμένοι κατά την εισαγωγή τους, ενώ 29/41 (70,7%) ασθενείς που παρέμειναν >1 εβδομάδα στη ΜΕΘ αποικίσθηκαν. Κύριοι παράγοντες κινδύνου για τον αποικισμό με CPE ήταν η παρατεταμένη διάρκεια νοσηλείας, η προηγούμενη λήψη αντιμικροβιακών, η ύπαρξη κεντρικού αγγειακού καθετήρα, η μηχανική αναπνευστική υποστήριξη, το υψηλό APACHE II score εισόδου και το άρρεν φύλο. 19/36 (52,8%) αποικισμένους ασθενείς εμφάνισαν λοίμωξη από CPE, κυρίως αναπνευστικές λοιμώξεις και βακτηριαμίες, ενώ η θνητότητά τους ανήλθε στο 42,1%. Κατά τον έλεγχο αποικισμού των χειρών του προσωπικού απομονώθηκε μόνο ένα στέλεχος CP-Kp, ενώ από το περιβάλλον σε 8 διαφορετικά σημεία της ΜΕΘ απομονώθηκαν 10 στελέχη CPE, κυρίως CP-Kp. Κατά την περίοδο μετά το κλείσιμο της ΜΕΘ, την απολύμανση και την εντατική εφαρμογή μέτρων ελέγχου παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του ποσοστού (36,4%) των ασθενών που αποικίσθηκαν από την πρώτη βδομάδα νοσηλείας τους στη ΜΕΘ σε σχέση με εκείνο της προηγούμενης περιόδου (83,3%), ($P=0.017$), αλλά και μια σχετική μείωση της συνολικής επίπτωσης αποικισμού με CPE. Η αναγκαιότητα συνέχισης εφαρμογής μέτρων ελέγχου αποικισμού συνδυάστηκε με τη χρησιμότητα της ταχείας ανίχνευσης των CPE στελεχών. Κατά την συγκριτική αξιολόγηση των πέντε screening μεθόδων για CPE, απομονώθηκαν συνολικά 133 ύποπτα CPE στελέχη. Φαινοτυπικώς και μοριακώς επιβεβαιώθηκαν ως CPE τα 92 στελέχη (56 KPC-θετικά *K. pneumoniae*, 29 VIM-θετικά *K. pneumoniae*, και 7 KPC-θετικά *Enterobacter aerogenes*) που απομονώθηκαν από 73 ασθενείς, ενώ τα υπόλοιπα 41 ήταν non-CPE (19 ESBL-θετικά και 22 αζυμωτικά). Οι μέθοδοι chromIDCARBA, ESBL-BH, και chromIDESBL παρουσίασαν την υψηλότερη ευαισθησία (92.4%), ακολουθούμενες από τις CDC-TS και MCM (89.1%)($P=0.631$). Η ειδικότητα ήταν μεγαλύτερη για την chromIDCARBA (96.9%) και την ESBL-BH (93.2%) σε σύγκριση με την CDC-TS (86.4%), την MCM (85.2%), και την chromIDESBL (84.7%)($P=0.014$) μεθόδους. Συμπερασματικά, στη μελέτη μας καταδεικνύεται ότι οι ασθενείς της ΜΕΘ βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο αποικισμού και λοίμωξης από CPE στελέχη, με αυξημένο ποσοστό θνητότητας των ασθενών με λοίμωξη. Ο κίνδυνος αυτός είναι πιο

αυξημένος όσο μεγαλύτερη είναι η διάρκεια παραμονής του ασθενούς στη ΜΕΘ. Ο ρόλος του αποικισμού του περιβάλλοντος στη μετάδοση των CPE συνεχώς και επισημαίνεται. Ο συνδυασμός των συνήθων μέτρων ελέγχου, όπως η ενεργητική επιτήρηση, με το κλείσιμο και την απολύμανση της μονάδος έχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην καθυστέρηση της εμφάνισης του αποικισμού, και κατ' επέκταση των λοιμώξεων από CPE. Στη μελέτη μας τεκμηριώνεται για πρώτη φορά ότι το chromIDCARBA είναι μια ταχεία και ασφαλής screening καλλιεργητική μέθοδος κατά την ενεργητική επιτήρηση για CPE στελέχη.

ABSTRACT

The aim of this study was to examine the epidemiology of colonization and infections with carbapenemase – producing *Enterobacteriaceae* (CPE) strains in intensive care unit (ICU), to plan control intervention measures and assess their effectiveness on management of CPE colonization, and to investigate and evaluate comparatively screening cultures methods for rapid and direct detection of CPE strains from clinical specimens.

During the first six-month study period rectal swabs were obtained weekly from 80 patients hospitalized in ICU of the General Hospital of Nikea-Piraeus “St. Panteleimon” and examined for CPE, 46 ICU health-care workers examined for hand CPE colonization and environmental samples were collected at the ICU for CPE detection. Epidemiological and clinical data were collected, also. Control intervention measures including active CPE surveillance were implemented assiduously after the ICU closing and its decontamination.

During the second study period, the performance of a prototype chromogenic medium (chromID CARBA) was evaluated and compared with media tested by four other screening methods: (i) overnight selective enrichment in 5 ml tryptic soy broth with a 10-μg ertapenem disk followed by plating onto MacConkey agar (CDC-TS), (ii) short selective enrichment in 9 ml brain heart infusion broth with a 10-μg ertapenem disk followed by plating onto chromID ESBL medium (ESBL-BH), (iii) direct plating onto chromID ESBL, and (iv) direct plating onto MacConkey agar supplemented with meropenem (1μg/ml) (MCM). The screening methods were applied to detect CPE in 200 rectal swab specimens taken from different hospitalized patients in ICU and medical wards. At the first study period, the rectal swabs, the swabs collected from healthcare workers hands, and the environmental swabs were directly cultured onto MacConkey agar followed by culture onto MacConkey agar supplemented with ertapenem (0.5, 1 and 2μg/ml). Identification and antimicrobial susceptibility were performed by the Vitek 2 system. At the second study period, carbapenem MICs were checked by Etest, also. Carbapenemase production was confirmed using the modified Hodge test, combined-disk tests, and PCR assays.

36/80 (45.0%) ICU patients were colonized with a total of 130 CPE strains, mainly carbapenemase producing *K. pneumoniae* (CP-Kp). 7/80 (8.8%) were found colonized at the ICU admission, while 29/41 (70,7%) patients who stayed >1 week in ICU became colonized during their ICU stay. The main risk factors of CPE enteric carriage

were prolonged hospitalization, previous antimicrobial usage, presence of central catheter line, mechanical ventilation and high APACHE II score at patient admission and male gender. 19/36 (52,8%) colonized patients were infected by CPE strains, occurred mostly respiratory and bloodstream infections and their overall mortality was estimated at 42,1%. Only one CP-Kp strain was recovered from healthcare workers hands, while 10 CPE strains, mainly CP-Kp, were detected in environmental swabs. The patients who hospitalized in ICU during the post-intervention period revealed a late colonization with CPE compared to patients hospitalized previously (36.4% and 82.4% of patients were colonized at the first week of staying, respectively; $P=0.013$). Moreover, there was a decline of the incidence of new colonized cases in the postintervention period but not to a significant level. The necessity of the strict discipline in control measures was combined with the usefulness of rapid CPE detection. During the comparative evaluation of the five screening cultures methods 133 presumptive CPE strains were detected, totally. Phenotypic and genotypic assays confirmed 92 strains to be CPE (56 KPC-positive *Klebsiella pneumoniae*, 29 VIM-positive *K. pneumoniae*, and 7 KPC-positive *Enterobacter aerogenes* strains) recovered from 73 patients, while the remaining 41 strains were confirmed to be CPE negative (19 ESBL producers and 22 non-fermenters). chromID CARBA, ESBL-BH, and chromID ESBL exhibited the highest sensitivity (92.4%), followed by CDC-TS and MCM (89.1%) ($P=0.631$). The specificity was greater for chromID CARBA (96.9%) and ESBL-BH (93.2%) than for CDC-TS (86.4%), MCM (85.2%), and chromID ESBL (84.7%) ($P=0.014$).

In conclusion, ICU patients are at a high risk of colonization and infections with CPE strains, with a high rate of mortality as shown by this study. The possibility of colonization with these strains is increasing as long as the patient staying in ICU. There is increasing evidence that environmental colonization may play a significant role in the transmission of CPE in ICU. The strict discipline in control measures, such as active CPE surveillance, combined with ICU closing and decontamination, may be effective in delay of colonization and, therefore, of appearance of invasive infections by these strains. This is the first study which showed that chromID CARBA was found to be a rapid and accurate culture screening method for CPE active surveillance.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adler A, Navon-Venezia S, Moran-Gilad J, Marcos E, Schwartz D, Carmeli Y. Laboratory and Clinical Evaluation of Screening Agar Plates for Detection of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* from Surveillance Rectal Swabs. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011; 49: 2239-2242.

Akova M, Daikos GL, Tzouvelekis L, Carmeli Y. Interventional strategies and current clinical experience with carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18: 439–48.

Aktas Z, Bal C, Midilli K, Poirel L, Nordmann P. First IMP-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate in Turkey. *Clin. Microbiol. Infect*. 2006; 12: 695–696.

Alba J, Ishii Y, Thomson K, Moland ES, Yamaguchi K. Kinetics study of KPC-3, a plasmid-encoded class A carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* . 2005; 49: 4760–4762.

Almaghrabi R, Clancy CJ, Doi Y, Hao B, Chen L, Shields RK, Press EG, Iovine NM, Townsend BM, Wagener MM, Kreiswirth B, Nguyen MH. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains exhibit diversity in aminoglycoside-modifying enzymes, which exert differing effects on plazomicin and other agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58: 4443-4451

Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980; 289: 321-31.

Ambler RP, Coulson AF, Frère JM, et al. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochemical Journal*. 1991; 276: 269-270.

Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, et al. Evaluation of Methods To Identify the *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase in *Enterobacteriaceae* . *Journal of Clinical Microbiology*. 2007; 45: 2723-2725.

Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. 2001; 29: 1303-10.

Anna S. Levin, MD; Satiko Gobara, RN; Caio M.F. Mendes, MD; M. Rosa Cursino, RN; Sumiko Sinto, BSc, Environmental Contamination by Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in an Intensive Care Unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2001; 22: 717-720

Anthony KB, Fishman NO, Linkin DR, Gasink LB, Edelstein PH, Lautenbach E. Clinical and microbiological outcomes of serious infections with multidrug-resistant gram-negative organisms treated with tigecycline. *Clin Infect Dis*. 2008; 46: 567–70.

Antunes NT, Lamoureaux TL, Toth M, Stewart NK, Frase H, Vakulenko SB. Class D β -Lactamases: Are They All Carbapenemases? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014; 58: 2119-2125.

Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, et al. Convenient Test for Screening Metallo- β -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria by Using Thiol Compounds. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000; 38: 40-43.

Arias CA, Murray BE. Antibiotic-resistant bugs in the 21st century – a clinical super-challenge. *N Engl J Med*. 2009; 360: 439-43.

Armbruster CE, Mobley HLT, Pearson MM. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* Infection. *EcoSal Plus*. 2018; 8: 10.1128/ecosalplus.ESP-0009-2017.

Arnold RS, Thom K, Sharma S, Phillips M, Kristie Johnson J, Morgan DJ. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *South Med J*. 2011; 104: 40–45

Asensio A, Oliver A, González-Diego P, Baquero F, Pérez-Díaz JC, Ros P, Cobo J, Palacios M, Lasheras D, Cantón R. Outbreak of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an intensive care unit: antibiotic use as risk factor for colonization and infection. *Clin Infect Dis*. 2000; 30: 55-60.

Avlami A, et al. Detection of metallo- β -lactamase genes in clinical specimens by a commercial multiplex PCR system. *J. Microbiol. Methods*. 2010; 83: 185–187.

Babini GS, Livermore DM. Are SHV β -Lactamases Universal in *Klebsiella pneumoniae*? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000 ;44: 2230.

Bae IK, Suh B, Jeong SH, Wang KK, Kim YR, Yong D, Lee K. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Korea producing β -lactamases with extended spectrum activity. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014; 79: 373-377

Baraniak A, Izdebski R, Herda M, Fiett J, Hryniewicz W, Gniadkowski M, Kern-Zdanowicz I, Filczak K, Łopaciuk U. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 with KPC-2 in Poland. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53: 4565-7.

Barriere SL. Clinical, economic and societal impact of antibiotic resistance. *Expert Opin Pharmacother*. 2015; 16: 151-3.

Bebrone C. Metallo-beta-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem Pharmacol*. 2007; 74: 1686-701.

Beesley T, Gascoyne N, Knott-Hunziker V, et al. The inhibition of class C beta-lactamases by boronic acids. *Biochemical Journal*. 1983; 209: 229-233.

Ben-David D, Maor Y, Keller N, Regev-Yochay G, Tal I, Shachar D, Zlotkin A, Smollan G, Rahav G. Potential role of active surveillance in the control of a hospital-wide outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2010; 31: 620-6.

Bernabeu S, Poirel L, Nordmann P. Spectrophotometry-based detection of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012; 74: 88-90

Bernusset S, Naas T, Tandé D, et al. Characterisation of carbapenemase IMI-2 in *Enterobacter* spp. clinical isolates from France. In: 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, London, United Kingdom, 31 March - 3 April 2012; P1238

Berrazeg M, Diene S, Medjahed L, Parola P, Drissi M, Raoult D, Rolain J. New Delhi Metallo-beta-lactamase around the world: an eReview using Google Maps. *Euro Surveill*. 2014; 19: pii: 20809

Bhavnani SM, Rubino CM, Hammel JP, Forrest A, Dartois N, Cooper A, Korth-Bradley J, Ambrose PG. . Pharmacological and patient-specific response determinants in patients with hospital-acquired pneumonia treated with tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56: 1065–72.

Birgy A, Bidet P, Genel N, et al. Phenotypic Screening of Carbapenemases and Associated β -Lactamases in Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012; 50: 1295-1302.

Birnbaum J, Kahan FM, Kropp H, MacDonald JS. Carbapenems, a new class of beta-lactam antibiotics. Discovery and development of imipenem/cilastatin. *Am J Med*. 1985; 78: 3–21

Bisiklis A, Papageorgiou F, Frantzidou F, Alexiou-Daniel S. Specific detection of blaVIM and blaIMP metallo- β -lactamase genes in a single real-time PCR. *Clin. Microbiol. Infect*. 2007; 13:1201–1203.

Bodmann KF, Heizmann WR, von Eiff C, Petrik C, Loßschmann PA, Eckmann C. Therapy of 1,025 severely ill patients with complicated infections in a German multicenter study: safety profile and efficacy of tigecycline in different treatment modalities. *Chemotherapy*. 2012; 58: 282–94.

Bogdanovich T, Adams-Haduch JM, Tian GB, Nguyen MH, Kwak EJ, Muto CA, Doi Y. Colistin-resistant, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to the international epidemic clone ST258. *Clin Infect Dis*. 2011; 53: 373–6.

Bonnefoy A, Dupuis-Hamelin C, Steier V, Delachaume C, Seys C, Stachyra T, Fairley M, Guitton M, Lampilas M. In vitro activity of AVE1330A, an innovative broad-spectrum non-beta-lactam beta-lactamase inhibitor. *J Antimicrob Chemother*. 2004; 54: 410-7.

Bonten M, Weinstein R. The Role of Colonization in the Pathogenesis of Nosocomial Infections. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 1996; 17: 193-200.

Bradford PA. Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001; 14: 933-951.

Bratu S, Landman D, Alam M, Tolentino E, Quale J. Detection of KPC Carbapenem-Hydrolyzing Enzymes in *Enterobacter* spp. from Brooklyn, New York. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005; 49: 776-778.

Bratu S, Mooty M, Nichani S, Landman D, Gullans C, Pettinato B, Karumudi U, Tolaney P, Quale J. Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49: 3018-20.

Bratu S, Tolaney P, Karumudi U, Quale J, Mooty M, Nichani S, Landman D. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 56: 128–32

Bratu S, Brooks S, Burney S, Kochar S, Gupta J, Landman D, Quale J. Detection and spread of *Escherichia coli* possessing the plasmid-borne carbapenemase KPC-2 in Brooklyn, New York. *Clin Infect Dis*. 2007; 44: 972-5.

Brem J, van Berkel SS, Zollman D, Lee SY, Gileadi O, McHugh PJ, Walsh TR, McDonough MA, Schofield CJ. Structural Basis of Metallo- β -Lactamase Inhibition by Captopril Stereoisomers. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 60: 142-50.

Buckley MM, Brogden RN, Barradell LB, Goa KL. Imipenem/Cilastatin : A Reappraisal of its Antibacterial Activity, Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Efficacy. *Drugs*. 1992; 44: 408-444

Buehlmann M, Fankhauser H, Laffer R, Bregenzer T, Widmer AF. The inguinal skin: an important site of colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2010; 31: 427-8.

Burkhardt O, Rauch K, Kaever V, Hadem J, Kielstein JT, Welte T. Tigecycline possibly underdosed for the treatment of pneumonia: a pharmacokinetic viewpoint. *Int J Antimicrob Agents*. 2009; 34: 101–2.

Burckhardt I, Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J. Clin. Microbiol*. 2011; 49: 3321–3324.

Burns K, Morris D, Murchan S, Cunney R, Smyth E, Power M, Schaffer K, Collins C, Sheahan A, Cormican M, Fitzpatrick F. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Irish critical care units: results of a pilot prevalence survey, June 2011. *J Hosp Infect*. 2013; 83: 71-3

Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39: 1211-33

Boutal H, Vogel A, Bernabeu S, Devilliers K, Creton E, Cotellon G, Plaisance M, Oueslati S, Dortet L, Jousset A, Simon S, Naas T, Volland H. A multiplex lateral flow

immunoassay for the rapid identification of NDM-, KPC-, IMP- and VIM-type and OXA-48-like carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* 2018; 73: 909-915.

Buynak JD, Chen H, Vogeti L, Gadhachanda VR, Buchanan CA, Palzkill T, Shaw RW, Spencer J, Walsh TR. Penicillin-derived inhibitors that simultaneously target both metallo- and serine-beta-lactamases. *Bioorg Med Chem Lett.* 2004; 14: 1299-304.

Calfee D. and Jenkins SG. Use of active surveillance cultures to detect asymptomatic colonization with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in intensive care unit patients. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2008; 29: 966-8

Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Miriagou V, Naas T, Rossolini GM, Samuelsen Ø, Seifert H, Woodford N, Nordmann P. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18: 413-431

Carbonne A, Thiolet JM, Fournier S, Fortineau N, Kassis-Chikhani N, Boytchev I, Aggoune M, Segulier JC, Senechal H, Tivolacci MP, Coignard B, Astagneau P, Jarlier V. Control of a multi-hospital outbreak of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* type 2 in France, September to October 2009. *Euro Surveill.* 2010; 15: pii: 19734.

Carmeli Y, Akova M, Cornaglia G, Daikos GL, Garau J, Harbarth S, Rossolini GM, Souli M, Giamarellou H. Controlling the spread of carbapenemase-producing Gram negatives: therapeutic approach and infection control. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16: 102-11

Carrer A, Poirel L, Eraksoy H, Cagatay AA, Badur S, Nordmann P. Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008; 52: 2950–2954.

Carrër A, Poirel L, Pitout JD, Church D, Nordmann P. Occurrence of an SME-2-producing *Serratia marcescens* isolate in Canada. *Int.J.Antimicrob.Agents.* 2008; 31: 181-182

Carrër A, Fortineau N, Nordmann P. Use of ChromID extended spectrum β -lactamase medium for detecting carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48: 1913–1914.

Carrër A, Poirel L, Yilmaz M, Akan OA, Feriha C, Cuzon G, Matar G, Honderlick P, Nordmann P. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54: 1369-73.

Carvalhoes CG, Cayô R, Assis DM, Martins ER, Juliano L, Juliano MA, Gales AC. Detection of SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* and class D β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* isolates by use of liquid chromatography-mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2013; 51: 287-290

Carvalhoes CG, Cayô R, Visconde MF, Barone T, Frigatto EA, Okamoto D, Assis DM, Juliano L, Machado AM, Gales AC. Detection of carbapenemase activity directly from blood culture vials using MALDI-TOF MS: a quick answer for the right decision. *J Antimicrob Chemother*. 2014; 69: 2132-2136

Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, *blaGIM-1*, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48: 4654-61

Castanheira M, Mendes RE, Walsh TR, Gales AC, Jones RN. Emergence of the Extended-Spectrum β -Lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* Strain from Brazil: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004; 48: 2344-2345.

Castanheira M, Deshpande LM, Mathai D, Bell JM, Jones RN, Mendes RE. Early Dissemination of NDM-1- and OXA-181-Producing *Enterobacteriaceae* in Indian Hospitals: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011; 55: 1274-1278.

Centers for Disease Control and Prevention. Facility Guidance for Control of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* (CRE). November 2015 Update. Atlanta, Ga, USA.

Centers for Disease Control and Prevention. Guidance for control of infections with carbapenem-resistant or carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in acute care facilities. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep*. 2009; 58: 256–260.

Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory protocol for detection of carbapenem-resistant or carbapenemase-producing, *Klebsiella* spp. and *E. coli* from rectal swabs. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA. 2009. http://www.cdc.gov/NCIDOD/DHQP/pdf/ar/Klebsiella_or_Ecoli.pdf.

Centers for Disease Control and Prevention. Management of Multidrug-Resistant Organisms in Healthcare Settings. *CDC*. 2006. <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/mdro/prevention-control.html>

Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States. *CDC*. 2013. <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>.

Chaskar P, Mahajan RK, Madan P, Duggal N, Hanset C. A fatal case of septicemia caused by multi-drug resistant (MDR) *Serratia marcescens*; a case report from a tertiary care hospital. *Sch J Med Case Rep*. 2014; 2: 662-664.

Chen L, Al Laham N, Chavda KD, Mediavilla JR, Jacobs MR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. First Report of an OXA-48-Producing Multidrug-Resistant *Proteus mirabilis* Strain from Gaza, Palestine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015; 59: 4305-4307.

Cheng KC, Chuang YC, Wu LT, Huang GC, Yu WL. Clinical experiences of the infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Serratia marcescens* at a medical center in Taiwan. *Jpn J Infect Dis.* 2006; 59: 147-52.

Chmelnitsky I, Navon-Venezia S, Strahilevitz J, Carmeli Y. Plasmid-mediated qnrB2 and carbapenemase gene blaKPC-2 carried on the same plasmid in carbapenem-resistant ciprofloxacin-susceptible *Enterobacter cloacae* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008; 52: 2962–2965

Ciccolini M, Donker T, Köck R Mielke M, Hendrix R, Jurke A, Rahamat-Langendoen J, Becker K, Niesters HG, Grundmann H, Friedrich AW. Infection prevention in a connected world: the case for a regional approach. *Int. J. Med. Microbiol.* 2013; 303: 380–387.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 20th informational supplement (June 2010 update). CLSI document M100-S20-U. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement. 2011, Wayne, PA: CLSI, Document M100-S21.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI document M100-S24, 2014. Available at: [http://www.ctmperu.org.pe/anexos/bibliotecavirtual/exposiciones/guia CLSI 2014.pdf](http://www.ctmperu.org.pe/anexos/bibliotecavirtual/exposiciones/guia%20CLSI%202014.pdf)

Cohen AL, Calfee D, Fridkin SK, Huang SS, Jernigan JA, Lautenbach E, Oriola S, Ramsey KM, Salgado CD, Weinstein RA; Society for Healthcare Epidemiology of America and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. Recommendations for metrics for multidrug-resistant organisms in healthcare settings: SHEA/HICPAC Position paper . *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008; 29: 901-13.

Cohen Stuart J, Leverstein-Van Hall MA; Dutch Working Party on the Detection of Highly Resistant Microorganisms. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents.* 2010; 36: 205-10.

Cohen Stuart J, Voets G, Scharringa J, Fluit AC, Leverstein-Van Hall MA. Detection of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* with a commercial DNA Microarray. *J. Med. Microbiol.* 2012; 61: 809-12.

Cohen Stuart J, Voets G, Rottier W, Voskuil S, Scharringa J, Van Dijk K, Fluit AC, Leverstein-Van Hall M. Evaluation of the Oxoid Brilliance™ CRE Agar for the detection of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013; 32: 1445-1449

Concha NO, Rasmussen BA, Bush K, Herzberg O. Crystal structure of the wide-spectrum binuclear zinc beta-lactamase from *Bacteroides fragilis*. *Structure* 1996; 4: 823-836

Cornaglia G, Akova M, Amicosante G, Cantón R, Cauda R, Docquier JD, Edelstein M, Frère JM, Fuzi M, Galleni M, Giamarellou H, Gniadkowski M, Koncan R, Libisch B, Luzzaro F, Miriagou V, Navarro F, Nordmann P, Pagani L, Peixe L, Poirel L, Souli M, Tacconelli E, Vatopoulos A, Rossolini GM. Metallo-beta-lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. *Int J Antimicrob Agents*. 2007; 29: 380-388

Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? *Lancet Infect Dis*. 2011; 11: 381-93.

Correia M, Boavida F, Grosso F, et al. Molecular Characterization of a New Class 3 Integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003; 47: 2838-2843.

Cosgrove SE. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs. *Clin Infect Dis*. 2006; 42: S82-9.

Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas MV, Wisell KT, Carmeli Y, Gales AC, Venezia SN, Quinn JP, Nordmann P. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce β -lactamase blaKPC-2 gene. *Emerg. Infect. Dis*. 2010; 16: 1349–1356.

Cuzon G, Naas T, Lesenne A, Benhamou M, Nordmann P. Plasmid- mediated carbapenem-hydrolysing OXA-48 β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from Tunisia. *Int.J.Antimicrob.Agents*. 2010; 36: 91–93.

Cuzon G, Ouanich J, Gondret R, Naas T, Nordmann P. Outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 2420-2423

da Silva RM, Traebert J, Galato D. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae*: a review of epidemiological and clinical aspects. *Expert Opin Biol Ther*. 2012; 12: 663-71.

Daikos GL, Petrikos P, Psychogiou M, Kosmidis C, Vryonis E, Skoutelis A, Georgousi K, Tzouvelekis LS, Tassios PT, Bamia C, Petrikos G. Prospective observational study of the impact of VIM-1 metallo-beta-lactamase on the outcome of patients with *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53: 1868–73

Daikos GL, Markogiannakis A. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: (when) might we still consider treating with carbapenems? *Clin Microbiol Infect*. 2011; 17: 1135–41.

Dalfino L, Puntillo F, Mosca A, Monno R, Spada ML, Coppolecchia S, Miragliotta G, Bruno F, Brienza N. High-dose, extended-interval colistin administration in critically

ill patients: is this the right dosing strategy? A preliminary study. *Clin Infect Dis*. 2012; 54: 1720–6.

Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010; 65: 490–495.

Dani A. Colonization and infection. *Central European Journal of Urology*. 2014; 67: 86-87

Daoud Z, Hobeika E, Choucair A, Rohban R. Isolation of the first metallo- β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in Lebanon. *Rev. Esp. Quimioter.* 2008; 21: 123–126

Das S, Sheorey H, Taylor HR, Vajpayee RB. Association Between Cultures of Contact Lens and Corneal Scraping in Contact Lens–Related Microbial Keratitis. *Arch Ophthalmol*. 2007; 125:1182–1185.

Dautzenberg MJ, Wekesa AN, Gniadkowski M, Antoniadou A, Giamarellou H, Petrikos GL, Skiada A, Brun-Buisson C, Bonten MJ, Derde LP; Mastering hOSpital Antimicrobial Resistance in Europe Work Package 3 Study Team. The association between colonization with carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and overall ICU mortality: an observational cohort study. *Crit Care Med*. 2015; 43: 1170-7.

Davey P, Brown E, Charani E Charani E, McNeil K, Brown E, Gould IM, Ramsay CR, Michie S. Interventions to improve antibiotic prescribing practices for hospital inpatients. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2017; 4: CD003543.

Davin-Regli A, Pagès J-M. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Frontiers in Microbiology*. 2015; 6: 392.

Day KM, Ali S, Mirza IA, Sidjabat HE, Silvey A, Lanyon CV, Cummings SP, Abbasi SA, Raza MW, Paterson DL, Perry JD. Prevalence and molecular characterization of *Enterobacteriaceae* producing NDM-1 carbapenemase at a military hospital in Pakistan and evaluation of two chromogenic media. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013; 75: 187-191

Denyer SP, Maillard JY. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria. *J Appl Microbiol*. 2002; 92:35S-45S

Deshpande LM, Rhomberg PR, Sader H S, Jones RN. Emergence of serine carbapenemases (KPC and SME) among clinical strains of *Enterobacteriaceae* isolated in the United States Medical Centers: report from the MYSTIC Program (1999–2005). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. 2006; 56: 367–372.

Devrari JC and Pai V. Nosocomial *Klebsiella* infection and its virulence factor associated with drug resistance. *Int. Res. J. Biological Sci*. 2017; 6: 48-54.

Dhillon R, Clark J. Infection in the intensive care unit (ICU). *Current Anaesthesia & Critical Care*. 2009; 20: 175–182

Dik JW, Hendrix R, Lo-Ten-Foe JR, Wilting KR, Panday PN, van Gemert-Pijnen LE, Leliveld AM, van der Palen J, Friedrich AW, Sinha B. Automatic day-2 intervention by a multidisciplinary antimicrobial stewardship-team leads to multiple positive effects. *Front Microbiol*. 2015; 6: 546.

Dik JW, Hendrix R, Friedrich AW, Luttjeboer J, Panday PN, Wilting KR, Lo-Ten-Foe JR, Postma MJ, Sinha B. Cost-minimization model of a multidisciplinary antibiotic stewardship team based on a successful implementation on a urology ward of an academic hospital. *PLoS One*. 2015; 10: e0126106.

Dik JW, Poelman R, Friedrich AW, Panday PN, Lo-Ten-Foe JR, van Assen S, van Gemert-Pijnen JE, Niesters HG, Hendrix R, Sinha B. An integrated stewardship model: antimicrobial, infection prevention and diagnostic (AID). *Future Microbiol*. 2016; 11: 93-102.

Dima S, Kritsotakis EI, Roumbelaki M, Metalidis S, Karabinis A, Maguina N, Klouva F, Levidiotou S, Zakynthinos E, Kioumis J, Gikas A. Device-associated nosocomial infection rates in intensive care units in Greece. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2007; 28: 602-5

Dixon N, Fowler RC, Yoshizumi A, Horiyama T, Ishii Y, Harrison L, Geyer CN, Moland ES, Thomson K, Hanson ND. IMP-27, a Unique Metallo- β -Lactamase Identified in Geographically Distinct Isolates of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016; 60: 6418-21.

Docquier JD, Lamotte-Brasseur J, Galleni M, Amicosante G, Frère JM, Rossolini GM. On functional and structural heterogeneity of VIM-type metallo-beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 51: 257-66

Docquier JD, Mangani S. An update on β -lactamase inhibitor discovery and development. *Drug Resist Updat*. 2018; 36: 13-29.

Doi Y, Potoski BA, Adams-Haduch JM, Sidjabat HE, Pasculle AW, Paterson DL. Simple Disk-Based Method for Detection of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Type β -Lactamase by Use of a Boronic Acid Compound. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008; 46: 4083-4086.

Donald HM, Scaife W, Amyes SGB, Young H-K. Sequence Analysis of ARI-1, a Novel OXA β -Lactamase, Responsible for Imipenem Resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000; 44: 196-199.

Donker T, Wallinga J, Grundmann H. Patient referral patterns and the spread of hospital-acquired infections through national healthcare networks. *PLoS Comput. Biol*. 2010; 6: e1000715.

Donowitz LG, Marsik FJ, Fisher KA, Wenzel RP. High risk of hospital-acquired infection in the ICU patient. *Crit Care Med*. 1982 ; 10:355–7.

Donskey CJ. The Role of the Intestinal Tract as a Reservoir and Source for Transmission of Nosocomial Pathogens, *Clinical Infectious Diseases*. 2004; 39: 219–226

Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid identification of carbapenemase types in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56: 6437-6440

Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of carbapenemase producing *Pseudomonas* spp. *J Clin Microbiol*. 2012; 50: 3773-3776

Dortet L, Poirel L and Nordmann P. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 249856

Dortet L, Bréchar L, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from blood cultures. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20: 340-344

Dortet L, Poirel L, Abbas S, Oueslati S, Nordmann P. Genetic and Biochemical Characterization of FRI-1, a Carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59: 7420-5

Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JD. Laboratory detection of *Enterobacteriaceae* that produce carbapenemases. *J Clin Microbiol*. 2012; 50: 3877-3880

Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev*. 2010; 23: 160-201.

Duarte A, Boavida F, Grosso F, et al. Outbreak of GES-1 β -Lactamase-Producing Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in a University Hospital in Lisbon, Portugal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003; 47: 1481-1482.

Dudhani RV, Turnidge JD, Coulthard K, Milne RW, Rayner CR, Li J, Nation RL. Elucidation of the pharmacokinetic/pharmacodynamic determinant of colistin activity against *Pseudomonas aeruginosa* in murine thigh and lung infection models. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54: 1117–24.

Dudhani RV, Turnidge JD, Nation RL, Li J. fAUC/MIC is the most predictive pharmacokinetic/pharmacodynamic index of colistin against *Acinetobacter baumannii* in murine thigh and lung infection models. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65: 1984–90.

El Salabi A, Borra PS, Toleman MA, Samuelsen Ø, Walsh TR. Genetic and Biochemical Characterization of a Novel Metallo- β -Lactamase, TMB-1, from an *Achromobacter xylosoxidans* Strain Isolated in Tripoli, Libya. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012; 56: 2241-2245.

Elemam A, Rahimian J, Doymaz M. *In vitro* evaluation of antibiotic synergy for polymyxin B-resistant carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 2010; 48: 3558–62.

Ejrnæs K. Bacterial characteristics of importance for recurrent urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Dan Med Bull*. 2011; 58: B4187.

Emmerson AM, Enstone JE, Griffin M, Kelsey MC, Smyth ET. The second national prevalence survey of infection in hospitals – overview of the results. *J Hosp Infect*. 1996; 32: 175–90.

Endimiani A, Luzzaro F, Brigante G, et al. *Proteus mirabilis* Bloodstream Infections: Risk Factors and Treatment Outcome Related to the Expression of Extended-Spectrum β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005; 49: 2598-2605.

Endimiani A, Depasquale JM, Forero S, Perez F, Hujer AM, Roberts-Pollack D, Fiorella PD, Pickens N, Kitchel B, Casiano-Colón AE, Tenover FC, Bonomo RA. Emergence of *blaKPC*-containing *Klebsiella pneumoniae* in a long-term acute care hospital: a new challenge to our healthcare system. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009; 64: 1102–1110.

Endimiani A, Hujer AM, Perez F, Bethel CR, Hujer KM, Kroeger J, Oethinger M, Paterson DL, Adams MD, Jacobs MR, Diekema DJ, Hall GS, Jenkins SG, Rice LB, Tenover FC, Bonomo RA. Characterization of *blaKPC*-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates detected in different institutions in the eastern USA. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009; 63: 427–437.

Endimiani A, Patel G, Hujer KM, Swaminathan M, Perez F, Rice LB, Jacobs MR, Bonomo RA. In vitro activity of fosfomycin against *blaKPC* containing *Klebsiella pneumoniae* isolates, including those nonsusceptible to tigecycline and/or colistin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54: 526–9.

European Center for Disease Control and Prevention. Directory of online resources for prevention and control of antimicrobial resistance (AMR) and healthcare-associated infections (HAI). <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/directory-online-resources-prevention-and-control-antimicrobial-resistance-amr>

European Centre for Disease Prevention and Control. Risk assessment on the spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) through patient transfer between healthcare facilities, with special emphasis on cross-border transfer. Stockholm: ECDC; 2011.

European Center for Disease Control and Prevention. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2017

European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2016 – Healthcare-associated infections acquired in intensive care units. 2016.

Stockholm: ECDC. https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/AER-HCAI_ICU_3_0.pdf

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2014. Available at: <http://www.eucast.org>

Evans BA, Hamouda A, Amyes SG. The rise of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii*. *Curr Pharm Des*. 2013; 19: 223-238

Evans BA, Amyes SGB. OXA β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*. 2014; 27: 241-263.

Fairfax MR, Queenan AM, Lephart PR et al. Detection of two SME-1 carbapenemase-producing *Serratia marcescens* in Detroit. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 71: 325–326.

Falagas ME, Rafailidis PI. Nephrotoxicity of colistin: new insight into an old antibiotic. *Clin Infect Dis*. 2009; 48: 1729–31.

Falagas ME, Rafailidis PI, Ioannidou E, Alexiou VG, Matthaïou DK, Karageorgopoulos DE, Kapaskelis A, Nikita D, Michalopoulos A. Colistin therapy for microbiologically documented multidrug-resistant Gram negative bacterial infections: a retrospective cohort study of 258 patients. *Int J Antimicrob Agents*. 2010; 35: 194–9.

Falagas ME, Karageorgopoulos DE, Nordmann P. Therapeutic options for infections with *Enterobacteriaceae* producing carbapenem hydrolyzing enzymes. *Future Microbiol*. 2011; 6: 653–66.

Falagas ME, Tansarli GS, Karageorgopoulos DE, Vardakas KZ. Deaths attributable to carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections. *Emerg Infect Dis*. 2014; 20: 1170–5.

Fernandes R, Amador P, Prudêncio C. β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Reviews in Medical Microbiology*. 2013. 24: 7-17

Fisher JF, Mobashery S. Three decades of the class A beta-lactamase acyl-enzyme. *Curr Protein Pept Sci*. 2009;10: 401-7.

Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature reviews Microbiology*. 2015; 13: 269-284.

Fontana R, Aldegheri M, Ligozzi M, Lopez H, Sucari A, Satta G. Overproduction of a low-affinity penicillin-binding protein and high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1994; 38: 1980-1983.

Foris LA, Snowden J. *Proteus Mirabilis Infections*. 2018; In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Fraimow HS, Tsigrelis C. Antimicrobial resistance in the intensive care unit: mechanisms, epidemiology, and management of specific resistant pathogens. *Crit Care Clin*. 2011; 27: 163-205.

Frère JM. Beta-lactamases and bacterial resistance to antibiotics. *Mol Microbiol*. 1995; 16: 385-95.

Friedman ND, Kaye KS, Stout JE, McGarry SA, Trivette SL, Briggs JP, Lamm W, Clark C, MacFarquhar J, Walton AL, Reller LB, Sexton DJ. Health care—associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. *Ann Intern Med*. 2002; 137: 791-7

Fukasawa M, Sumita Y, Harabe ET, et al. Stability of meropenem and effect of 1 beta-methyl substitution on its stability in the presence of renal dehydropeptidase I. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1992; 36: 1577-1579.

Fukigai S, Alba J, Kimura S, Iida T, Nishikura N, Ishii Y, Yamaguchi K. Nosocomial outbreak of genetically related IMP-1 β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a general hospital in Japan. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2007; 29: 306–310.

Galán JC, González-Candelas F, Rolain JM, Cantón R. Antibiotics as selectors and accelerators of diversity in the mechanisms of resistance: from the resistome to genetic plasticity in the β -lactamases world. *Front Microbiol*. 2013; 4: 9

Galani I, Souli M, Koratzanis E, Chrysouli Z, Giamarellou H. 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. *J Antimicrob Chemother*. 2006; 58: 432-3

Galani I, Souli M, Daikos GL, Chrysouli Z, Poulakou G, Psychogiou M, Panagea T, Argyropoulou A, Stefanou I, Plakias G, Giamarellou H, Petrikkos G. Activity of plazomicin (ACHN-490) against MDR clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Enterobacter* spp. from Athens, Greece. *J Chemother*. 2012; 24: 191-4.

Galani I, Panagea T, Chrysouli Z, Giamarellou H, Souli M. In vivo transmission of a plasmid containing the KPC-2 gene in a single patient. *J Glob Antimicrob Resist*. 2013; 1: 35-38.

Galdiero S, Falanga A, Cantisani M, et al. Microbe-Host Interactions: Structure and Role of Gram-Negative Bacterial Porins. *Current Protein & Peptide Science*. 2012; 13: 843-854

García-Salguero C, Rodríguez-Avial I, Picazo JJ, Culebras E. Can Plazomicin Alone or in Combination Be a Therapeutic Option against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015; 59: 5959-5966

Gasink LB, Edelstein PH, Lautenbach E, Synnestvedt M, Fishman NO. Risk factors and clinical impact of carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2009; 30: 1180-1185

Gauthier L, Bonnin RA, Dortet L, Naas T. Retrospective and prospective evaluation of the Carbapenem inactivation method for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *PLoS One*. 2017; 12: e0170769.

Gaynes R. The Discovery of Penicillin—New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. *Emerg Infect Dis*. 2017; 23: 849-853.

Giacobbe DR, Del Bono V, Trecarichi EM, De Rosa FG, Giannella M, Bassetti M, Bartoloni A, Losito AR, Corcione S, Bartoletti M, Mantengoli E, Saffioti C, Pagani N, Tedeschi S, Spanu T, Rossolini GM, Marchese A, Ambretti S, Cauda R, Viale P, Viscoli C, Tumbarello M; ISGRI-SITA (Italian Study Group on Resistant Infections of the Società Italiana Terapia Antinfettiva). Risk factors for bloodstream infections due to colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: results from a multicenter case-control-control study. *Clin Microbiol Infect*. 2015; 21: 1106.e1-8

Giakkoupi P, Tzouvelekis LS, Tsakris A, Loukova V, Sofianou D, Tzelepi E. IBC-1, a novel integron-associated class A beta-lactamase with extended-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44: 2247-53

Giakkoupi P, Maltezou H, Polemis M, Pappa O, Saroglou G, Vatopoulos A. The Greek System for the Surveillance of Antimicrobial Resistance Collective. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Greek hospitals are mainly due to a hyperepidemic clone. *Euro Surveill*. 2009;14: pii=19218.

Giakkoupi P, Papagiannitsis CC, Miriagou V, Pappa O, Polemis M, Tryfinopoulou K, Tzouvelekis LS, Vatopoulos AC. An update of the evolving epidemic of blaKPC-2-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009-10). *J Antimicrob Chemother*. 2010; 66: 1510-3.

Giani T, D'Andrea MM, Pecile P, Borgianni L, Nicoletti P, Tonelli F, Bartoloni A, Rossolini GM. Emergence in Italy of *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 producing KPC-3 Carbapenemase. *J Clin Microbiol*. 2009; 47: 3793-4.

Giannella M, Trecarichi EM, De Rosa FG, Del Bono V, Bassetti M, Lewis RE, Losito AR, Corcione S, Saffioti C, Bartoletti M, Maiuro G, Cardellino CS, Tedeschi S, Cauda R, Viscoli C, Viale P, Tumbarello M. Risk factors for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection among rectal carriers: a prospective observational multicentre study. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20: 1357-62.

Gijón D, Curiao T, Baquero F, Coque TM, Cantón R. Fecal Carriage of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*: a Hidden Reservoir in Hospitalized and Nonhospitalized Patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012; 50: 1558-1563.

Gikas A, Pediaditis J, Papadakis JA, Starakis J, Levidiotou S, Nikolaides P, Kioumis G, Maltezos E, Lazanas M, Anevlavis E, Roubelaki M, Tselentis Y; Greek Infection

Control Network. Prevalence study of hospital-acquired infections in 14 Greek hospitals: planning from the local to the national surveillance level. *J Hosp Infect.* 2002; 50: 269-75.

Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Novel Ambler Class A Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase from a *Pseudomonas fluorescens* Isolate from the Seine River, Paris, France . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2010; 54: 328-332.

Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2012; 50: 477-479

Girlich D, Bonnin RA, Bogaerts P, De Laveleye M, Huang DT, Dortet L, Glaser P, Glupczynski Y, Naas T. Chromosomal Amplification of the blaOXA-58 Carbapenemase Gene in a Proteus mirabilis Clinical Isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017 ; 61: e01697-16

Girmenia C, Serrao A, Canichella M. Epidemiology of Carbapenem Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infections in Mediterranean Countries. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases.* 2016; 8: e2016032.

Giske CG, Monnet DL, Cars O, Carmeli Y. ReAct-Action on Antibiotic Resistance. Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52: 813-21

Giske CG, Gezeliu L, Samuelsen Ø Warner M, Sundsfjord A, Woodford N. 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. *Clin Microbiol Infect.* 2011; 17: 552–556.

Glupczynski Y, Huang TD, Bouchahrouf W, Rezende de Castro R, Bauraing C, Gérard M, Verbruggen AM, Deplano A, Denis O, Bogaerts P. Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates in Belgian hospitals. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2012; 39: 168–172.

Goldstein EJ, Snyderman DR. Intra-abdominal infections: review of the bacteriology, antimicrobial susceptibility and the role of ertapenem in their therapy. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 53 Suppl 2: ii29-36.

Gomez SA, Pasteran FG, Faccone D, Tijet N, Rapoport M, Lucero C, Lastovetska , Albornoz E, Galas M, KPC Group, Melano RG, Corso A, Petroni A. Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST258 harbouring KPC-2 in Argentina. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011; 17: 1520– 1524.

Gómez Rueda V, Zuleta Tobón JJ. Risk factors for infection with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a case-case-control study. *Colombia Médica : CM.* 2014 ;45: 54-60.

Gómez-Zorrilla S, Camoez M, Tubau F, Periche E, Cañizares R, Dominguez MA, Ariza J, Peña C. Antibiotic pressure is a major risk factor for rectal colonization by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in critically ill patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58: 5863-5870

Goncalves D, Cecilio P, Ferreira H. First detection of OXA-48like producing *Acinetobacter baumannii* in the faecal flora of nursing home residents in Northern Portugal, abstr eP748. Abstr. 23rd Eur. Congr. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 2013, Berlin, Germany

Goren MG, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Carmeli Y. Carbapenem-Resistant KPC-2-Producing *Escherichia coli* in a Tel Aviv Medical Center, 2005 to 2008. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010; 54: 2687-2691.

Gould IM. A review of the role of antibiotic policies in the control of antibiotic resistance, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1999; 43: 459–465

Greek system for the surveillance of antimicrobial resistance (WHONET); 2016, [http:// www.mednet.gr/whonet](http://www.mednet.gr/whonet)

Grundmann H, Livermore DM, Giske CG, Canton R, Rossolini GM, Campos J, Vatopoulos A, Gniadkowski M, Toth A, Pfeifer Y, Jarlier V, Carmeli Y; CNSE Working Group. Carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Euro Surveill*. 2010; 15: pii=19711.

Gupta A, Della-Latta P, Todd B, San Gabriel P, Haas J, Wu F, Rubenstein D, Saiman L. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit linked to artificial nails. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2004; 25: 210-5.

Hagiya H, Ojima M, Yoshida T, Matsui T, Morii E, Sato K, Tahara S, Yoshida H, Tomono K. Necrotizing soft tissue infection caused by *Serratia marcescens*: A case report and literature review. *J Infect Chemother*. 2016; 22: 335-8.

Halaby T, Reuland AE, Al Naiemi N, Potron A, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM, Nordmann P. A case of New Delhi metallo- β -lactamase 1 (NDM-1)-producing *Klebsiella pneumoniae* with putative secondary transmission from the Balkan region in the Netherlands. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56: 2790-1.

Hall BG, Barlow M. Revised Ambler classification of {beta}-lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 55: 1050-1.

Hartman BJ, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 1984; 158: 513-516.

Hashizume T, Ishino F, Nakagawa J, Tamaki S, Matsuhashi M. Studies on the mechanism of action of imipenem (N-formimidoylthienamycin) in vitro: binding to the penicillin-binding proteins (PBPs) in *Escherichia coli* and *Pseudomonas*

aeruginosa, and inhibition of enzyme activities due to the PBPs in *E. coli*. *J Antibiot (Tokyo)*. 1984; 37: 394-400.

Hejazi A, Falkiner FR. *Serratia marcescens*. *J Med Microbiol*. 1997; 46: 903-12.

Hejazi A, Aucken HM, Falkiner FR. Epidemiology and susceptibility of *Serratia marcescens* in a large general hospital over an 8-year period. *J Hosp Infect*. 2000; 45: 42-6.

Hernandez V, Crépin T, Palencia A, Cusack S, Akama T, Baker SJ, Bu W, Feng L, Freund YR, Liu L, Meewan M, Mohan M, Mao W, Rock FL, Sexton H, Sheoran A, Zhang Y, Zhang YK, Zhou Y, Nieman JA, Anugula MR, Keramane el M, Savariraj K, Reddy DS, Sharma R, Subedi R, Singh R, O'Leary A, Simon NL, De Marsh PL, Mushtaq S, Warner M, Livermore DM, Alley MR, Plattner JJ. Discovery of a novel class of boron-based antibacterials with activity against gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57: 1394-403

Higgins PG, Stefanik D, Page MGP, Hackel M, Seifert H. In vitro activity of the siderophore monosulfactam BAL30072 against meropenem-non-susceptible *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67: 1167-9.

Hindiyeh M, Smollen G, Grossman Z, Ram D, Davidson Y, Mileguir F, Vax M, Ben David D, Tal I, Rahav G, Shamiss A, Mendelson E, Keller N. Rapid detection of *blaKPC* carbapenemase genes by real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2008; 46: 2879-83.

Hooff GP, van Kampen JJ, Meesters RJ, van Belkum A, Goessens WH, Luider TM. Characterization of β -lactamase enzyme activity in bacterial lysates using MALDI-mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2012; 11: 79-84

Horcajada JP, Martínez JA, Alcón A, Marco F, De Lazzari E, de Matos A, Zaragoza M, Sallés M, Zavala E, Mensa J. Acquisition of multidrug-resistant *Serratia marcescens* by critically ill patients who consumed tap water during receipt of oral edication. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2006; 27: 774-7

Hota B. Contamination, disinfection, and cross-colonization: are hospital surfaces reservoirs for nosocomial infection? *Clin Infect Dis*. 2004; 39: 1182-9.

Hrabák J, Walková R, Studentová V, Chudácková E, Bergerová T. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol*. 2011; 49: 3222–3227.

Hrabák J, Studentová V, Walková R, Zemlicková H, Jakubu V, Chudácková E, Gniadkowski M, Pfeifer Y, Perry JD, Wilkinson K, Bergerová T. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2012; 50: 2441-

Huang TD, Berhin C, Bogaerts P, Glupczynski Y. Comparative evaluation of two chromogenic tests for rapid detection of carbapenemase in *Enterobacteriaceae* and in *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *J Clin Microbiol*. 2014; 52: 3060-3063

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

Ikonomidis A, Tokatlidou D, Kristo I, Sofianou D, Tsakris A, Mantzana P, Pournaras S, Maniatis AN. 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; 43: 5344-5347.

Indar AA, Beckingham IJ. Acute cholecystitis. *BMJ: British Medical Journal*. 2002; 325: 639-643.

Ito-Horiyama T, Ishii Y, Ito A, Sato T, Nakamura R, Fukuhara N, Tsuji M, Yamano Y, Yamaguchi K, Tateda K. Stability of Novel Siderophore Cephalosporin S-649266 against Clinically Relevant Carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016; 60: 4384-6.

Jacoby GA, Mills DM, Chow N. Role of beta-lactamases and porins in resistance to ertapenem and other beta-lactams in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48: 3203-6

Jafari A, Aslani M, Bouzari S. *Escherichia coli*: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. *Iranian Journal of Microbiology*. 2012; 4: 102-117.

James CE, Mahendran KR, Molitor A, Bolla JM, Bessonov AN, Winterhalter M, Pagès JM. How beta-lactam antibiotics enter bacteria: a dialogue with the porins. *PLoS One*. 2009; 4: e5453.

Jeon JH, Lee JH, Lee JJ, et al. Structural Basis for Carbapenem-Hydrolyzing Mechanisms of Carbapenemases Conferring Antibiotic Resistance. Collyer CA, ed. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015; 16: 9654-9692.

Jeong SH, Bae IK, Kim D, et al. First Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates Producing GES-5 and SHV-12 Extended-Spectrum β -Lactamases in Korea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005; 49: 4809-4810.

Johnson AP, Woodford N. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. *J Med Microbiol*. 2013; 62: 499-513

Jones RN. Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia. *Clin Infect Dis*. 2010; 51: S81-87

Kaase M, Szabados F, Wassill L, Gatermann SG. Detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae* by a commercial multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2012; 50: 3115–8.

Kahan JS, Kahan FM, Goegelman R, Currie SA, Jackson M, Stapley EO, Miller TW, Miller AK, Hendlin D, Mochales S, Hernandez S, Woodruff HB, Birnbaum J. Thienamycin, a new beta-lactam antibiotic. I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. *J Antibiot (Tokyo).* 1979; 32: 1-12

Kalinin DV, Holl R. Insights into the Zinc-Dependent Deacetylase LpxC: Biochemical Properties and Inhibitor Design. *Curr Top Med Chem.* 2016; 16: 2379-430.

Kalinin DV, Holl R. LpxC inhibitors: a patent review (2010-2016). *Expert Opin Ther Pat.* 2017; 27: 1227-1250

Karageorgopoulos DE, Miriagou V, Tzouvelekis L, Spyridopoulou K, Daikos GL. Emergence of resistance to fosfomycin used as adjunct therapy in KPC *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia: report of three cases. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67: 2777–9.

Kartali G, Tzelepi E, Pournaras S, Kontopoulou C, Kontos F, Sofianou D, Maniatis AN, Tsakris A. Outbreak of infections caused by *Enterobacter cloacae* producing the integron-associated β -lactamase IBC-1 in a neonatal intensive care unit of a Greek hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46: 1577-1580.

Karthikeyan K, Thirunarayan MA, Krishnan P. Coexistence of blaOXA-23 with blaNDM-1 and armA in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65: 2253-2254

Kasiakou SK, Michalopoulos A, Soteriades ES, Samonis G, Sermaides GJ, Falagas ME. Combination Therapy with Intravenous Colistin for Management of Infections Due to Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria in Patients without Cystic Fibrosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2005; 49: 3136-3146.

Katsiari M, Panagiota G, Likousi S, Roussou Z, Polemis M, Alkiviadis Vatopoulos C, Evangelia Platsouka D, Maguina A. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections in a Greek intensive care unit: Molecular characterization and treatment challenges. *J Glob Antimicrob Resist.* 2015; 3: 123-127.

Kattan JN, Villegas MV and Quinn JP. New developments in carbapenems. *Clinical Microbiology and Infection.* 2008; 14: 1102–1111

Kelesidis T, Karageorgopoulos DE, Kelesidis I, Falagas ME. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*: a systematic review of the evidence from microbiological and clinical studies. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 62: 895–904.

Khanna A, Khanna M, Aggarwal A. *Serratia Marcescens*- A Rare Opportunistic Nosocomial Pathogen and Measures to Limit its Spread in Hospitalized Patients. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*. 2013; 7: 243-246.

Khosravi Y, Loke MF, Chua EG, Tay ST, Vadivelu J. Phenotypic Detection of Metallo- β -Lactamase in Imipenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *The Scientific World Journal*. 2012; 2012: 654939

Kim B-N, Choi S-I, Ryoo N-H. Three-Year Follow-up of an Outbreak of *Serratia marcescens* Bacteriuria in a Neurosurgical Intensive Care Unit. *Journal of Korean Medical Science*. 2006; 21: 973-978.

Kim JY, Jung HI, An YJ, Lee JH, Kim SJ, Jeong SH, Lee KJ, Suh PG, Lee HS, Lee SH, Cha SS. Structural basis for the extended substrate spectrum of CMY-10, a plasmid-encoded class C betalactamase. *Mol Microbiol* 2006; 60: 907-916

Kim MN, Yong D, An D, Chung HS, Woo JH, Lee K, Chong Y. Nosocomial clustering of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 340 strains in four patients at a South Korean tertiary care hospital. *J Clin Microbiol*. 2012; 50: 1433-6.

Kim S-Y, Hong SG, Moland ES, Thomson KS. Convenient test using a combination of chelating agents for detection of metallo- β -lactamases in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol*. 2007; 45: 2798–2801.

Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, Srinivasan A, Navon-Venezia S, Carmeli Y, Brolund A, Giske CG. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in the United States: clonal expansion of MLST sequence type 258. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2009; 53: 3365–3370.

Kochar S, Sheard T, Sharma R, Hui A, Tolentino E, Allen G, Landman D, Bratu S, Augenbraun M, Quale J. Success of an infection control program to reduce the spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Control Hosp. Epidemiol*. 2009; 30: 447–452

Kofteridis DP, Valachis A, Dimopoulou D, Maraki S, Christidou A, Mantadakis E, Samonis G. Risk factors for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection/colonization: a case-case-control study. *J Infect Chemother*. 2014; 20: 293-7.

Kollef MH. Optimizing antibiotic therapy in the intensive care unit setting. *Critical Care*. 2001; 5: 189-195.

Kong KF, Schneper L, Mathee K. Beta-lactam Antibiotics: From Antibiosis to Resistance and Bacteriology. *APMIS*. 2010; 118: 1–36

Kontopoulou K, Protonotariou E, Vasilakos K, Kriti M, Koteli A, Antoniadou E, Sofianou D. Hospital outbreak caused by *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 β -lactamase resistant to colistin. *J Hosp Infect*. 2010; 76: 70–3.

Krzyminińska S, Mokracka J, Koczura R, Kaznowski A. Cytotoxic activity of *Enterobacter cloacae* human isolates. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009 ; 56: 248-52.

Ktari S, Arlet G, Mnif B, Gautier V, Mahjoubi F, Ben Jmeaa M, Bouaziz M, Hammami A. Emergence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates producing VIM-4 metallo-beta-lactamase, CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase, and CMY-4 AmpC beta-lactamase in a Tunisian university hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50: 4198-201.

Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, Chaudhary U, Doumith M, Giske CG, Irfan S, Krishnan P, Kumar AV, Maharjan S, Mushtaq S, Noorie T, Paterson DL, Pearson A, Perry C, Pike R, Rao B, Ray U, Sarma JB, Sharma M, Sheridan E, Thirunarayan MA, Turton J, Upadhyay S, Warner M, Welfare W, Livermore DM, Woodford N. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 2010; 10: 597-602

Landman D, Salvani JK, Bratu S, Quale J. Evaluation of techniques for detection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in stool surveillance cultures. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43: 5639–5641.

Landman D, Kelly P, Bäcker M, Babu E, Shah N, Bratu S, Quale J. Antimicrobial activity of a novel aminoglycoside, ACHN-490, against *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* from New York City. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66: 332-4.

Landman D, Singh M, El-Imad B, Miller E, Win T, Quale J. In vitro activity of the siderophore monosulfactam BAL30072 against contemporary Gram-negative pathogens from New York City, including multidrug-resistant isolates. *Int J Antimicrob Agents.* 2014; 43: 527-532

Lapuebla A, Abdallah M, Olafisoye O, Cortes C, Urban C, Landman D, Quale J. Activity of Imipenem with Relebactam against Gram-Negative Pathogens from New York City. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59: 5029-31

Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1584-1590

Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AK, Wertheim HF, Sumpradit N, Vlieghe E, Hara GL, Gould IM, Goossens H, Greko C, So AD, Bigdeli M, Tomson G, Woodhouse W, Ombaka E, Peralta AQ, Qamar FN, Mir F, Kariuki S, Bhutta ZA, Coates A, Bergstrom R, Wright GD, Brown ED, Cars O. Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect Dis.* 2013; 13: 1057-98.

Leavitt A, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Schwaber MJ, Carmeli Y. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007; 51: 3026–3029.

Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect*. 2001; 7: 88-91.

Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol*. 2003; 41: 4623-4629

Lee K, Yum JH, Yong D, et al. Novel Acquired Metallo- β -Lactamase Gene, *bla*_{SIM-1}, in a Class 1 Integron from *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates from Korea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005; 49: 4485-4491.

Lerner A, Adler A, Abu-Hanna J, Meitus I, Navon-Venezia S, Carmeli Y. Environmental contamination by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*. 2013; 51: 177-81

Leung V, Loo VG, Frenette C, Domingo MC, Bourgault AM, Mulvey MR, Robson HG. First Canadian outbreak of Enterobacteriaceae expressing *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase type 3. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2012; 23: 117-120

Levin AS, Gobara S, Mendes CM, Cursino MR, Sinto S. Environmental contamination by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2001; 22: 717-20.

Lewis AM, Stephenson JR, Garner J, Afshar F, Tabaqchali S. A hospital outbreak of *Serratia marcescens* in neurosurgical patients. *Epidemiology and Infection*. 1989; 102: 69-74.

Li XZ, Plésiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev*. 2015; 28: 337-418.

Lincopan N, McCulloch JA, Reinert C, Cassettari VC, Gales AC, Mamizuka EM. First isolation of metallo-beta-lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 516-9.

Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1995; 8: 557-84

Livermore DM, Mushtaq S, Warner M, Zhang JC, Maharjan S, Doumith M, Woodford N. Activity of aminoglycosides, including ACHN-490, against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2011; 66: 48-53.

Lolans K, Calvett K, Won S, Clark J, Hayden MK. Direct ertapenem disk screening method for identification of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in surveillance swab specimens. *J. Clin. Microbiol*. 2010; 48: 836–841.

- Loli A, Tzouveleakis LS, Tzelepi E, Carattoli A, Vatopoulos AC, Tassios PT, Miriagou V. Sources of diversity of carbapenem resistance levels in *Klebsiella pneumoniae* carrying blaVIM-1. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 58: 669-672
- Lomovskaya O, Watkins W. Inhibition of efflux pumps as a novel approach to combat drug resistance in bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2001; 3: 225-36
- Lomovskaya O, Sun D, Rubio-Aparicio D, Nelson K, Tsivkovski R, Griffith DC, Dudley MN. Vaborbactam: Spectrum of Beta-Lactamase Inhibition and Impact of Resistance Mechanisms on Activity in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61: e01443-17.
- Lopez N, Kobayashi L, Coimbra R. A Comprehensive review of abdominal infections. *World Journal of Emergency Surgery : WJES.* 2011; 6:7.
- Maltezou HC. Metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria: introducing the era of pan-resistance? *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 33: 405.e1-7.
- Maragakis LL, Winkler A, Tucker MG, Cosgrove SE, Ross T, Lawson E, Carroll KC, Perl TM. Outbreak of multidrug-resistant *Serratia marcescens* infection in a neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008; 29: 418-23.
- Marcano D, Pasterán F, Rapoport M, Faccone D, Ugarte C, Salgado N, Payares D, Spadola E, López Y, Maggi G, Galas M, Sánchez D. First isolation of a VIM-producing *Klebsiella pneumoniae* from a seven-year-old child in Venezuela. *J Infect Dev Ctries.* 2008; 2: 241-4.
- Marciano DC, Karkouti OY, Palzkill T. A fitness cost associated with the antibiotic resistance enzyme SME-1 beta-lactamase. *Genetics.* 2007; 176: 2381-2392
- Mariappan S, Sekar U, Kamalanathan A. Carbapenemase - producing *Enterobacteriaceae*: Risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *International Journal of Applied and Basic Medical Research.* 2017; 7: 32-39.
- Marrie TJ, Fine MJ, Obrosky DS, Coley C, Singer DE, Kapoor WN. Community-acquired pneumonia due to *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect.* 1998 ;4: 717-723.
- Maseda E, Salgado P, Anillo V, Ruiz-Carrascoso G, Gómez-Gil R, Martín-Funke C, Gimenez MJ, Granizo JJ, Aguilar L, Gilsanz F. Risk factors for colonization by carbapenemase-producing enterobacteria at admission to a Surgical ICU: A retrospective study. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2017; 35: 333-337.
- Massova I, Mobashery S. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42: 1-17.
- Mataseje LF, Boyd DA, Delport J, Hoang L, Imperial M, Lefebvre B, Kuhn M, Van Caesele P, Willey BM, Mulvey MR. *Serratia marcescens* harbouring SME-type class A carbapenemases in Canada and the presence of blaSME on a novel genomic island, SmarGI1-1. *J Antimicrob Chemother.* 2014; 69: 1825-1829

Matthaiou DK, Michalopoulos A, Rafailidis PI, Karageorgopoulos DE, Papaioannou V, Ntani G, Samonis G, Falagas ME. Risk factors associated with the isolation of colistin-resistant Gram-negative bacteria: a matched case-control study. *Crit Care Med*. 2008; 36: 807–11.

Maureen H, Diaz BS, Christina Silkaitis, MT; Michael Malczynski, BS; Gary A. Noskin, MD; John R. Warren, MD; Teresa Zembower, MD Contamination of Examination Gloves in Patient Rooms and Implications for Transmission of Antimicrobial-Resistant Microorganisms. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008; 29: 63-65

Mazzei T, Novelli A. Pharmacological rationale for antibiotic treatment of intra-abdominal infections. *J Chemother*. 2009; 21: S19–29.

McGowan JE Jr. Antimicrobial resistance in hospital organisms and its relation to antibiotic use. *Rev Infect Dis*. 1983; 5:1033-48.

McMullen AR, Yarbrough ML, Wallace MA, Shupe A, Burnham CD. Evaluation of Genotypic and Phenotypic Methods to Detect Carbapenemase Production in Gram-Negative Bacilli. *Clin Chem*. 2017; 63: 723-730.

Medeiros AA. beta-Lactamases: quality and resistance. *Clin Microbiol Infect*. 1997; 4: S2-S9.

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. Bonomo R, ed. *PLoS Pathogens*. 2015; 11: e1004949.

Meini MR, Llarrull LI, Vila AJ. Overcoming differences: The catalytic mechanism of metallo-β-lactamases. *FEBS Lett*. 2015; 589: 3419-32

Meletis G, Tzampaz E, Sianou E, Tzavaras I, Sofianou D. Colistin heteroresistance in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*. 2011; 66: 946–7.

Mendes RE, et al. Rapid detection and identification of metallo-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. *J. Clin. Microbiol*. 2007; 45: 544–547

Mendes RE, Bell JM, Turnidge JD, Yang Q, Yu Y, Sun Z, Jones RN. Carbapenem-Resistant Isolates of *Klebsiella pneumoniae* in China and Detection of a Conjugative Plasmid (*bla*_{KPC-2} plus *qnrB4*) and a *bla*_{IMP-4} Gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2008 ;52: 798-799.

Mezzatesta ML, Gona F, Caio C, Petrolito V, Sciortino D, Sciacca A, Santangelo C, Stefani S. Outbreak of KPC-3-producing, and colistin-resistant, *Klebsiella pneumoniae* infections in two Sicilian hospitals. *Clin Microbiol Infect*. 2011; 17: 1444–7.

Mezzatesta ML, Gona F, Stefani S. Enterobacter cloacae complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiol.* 2012;7: 887-902.

Michalopoulos A, Virtzili S, Rafailidis P, Chalevelakis G, Damala M, Falagas ME. Intravenous fosfomycin for the treatment of nosocomial infections caused by carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* in critically ill patients: a prospective evaluation. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16: 184–6.

Migliavacca R, Docquier JD, Mugnaioli C, Amicosante G, Daturi R, Lee K, Rossolini GM, Pagani L. Simple microdilution test for detection of metallo-beta-lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 4388-90.

Miriagou V, et al. Efficacy of BAL30072, alone and combined with meropenem, against VIM-producing enterobacteria in a murine thigh infection model, abstr P1240. Abstr. 20th Eur. Congr. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2010, Vienna, Austria

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

Miriagou V, Tzelepi E, Kotsakis SD, Daikos GL, Bou Casals J, Tzouvelekis LS. Combined disc methods for the detection of KPC- and/or VIM-positive *Klebsiella pneumoniae*: improving reliability for the double carbapenemase producers. *Clin Microbiol Infect.* 2013; 19: 412–415.

Mittal G, Gaiind R, Kumar D, Kaushik G, Gupta KB, Verma PK, Deb M. Risk factors for fecal carriage of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* among intensive care unit patients from a tertiary care center in India. *BMC Microbiol.* 2016; 16: 138.

Moloughney JG, D Thomas J, Toney JH. Novel IMP-1 metallo-beta-lactamase inhibitors can reverse meropenem resistance in *Escherichia coli* expressing IMP-1. *FEMS Microbiol Lett.* 2005; 243: 65-71.

Montagnani C, Cocchi P, Lega L, Campana S, Biermann KP, Braggion C, Pecile P, Chiappini E, de Martino M, Galli L. *Serratia marcescens* outbreak in a neonatal intensive care unit: crucial role of implementing hand hygiene among external consultants. *BMC Infectious Diseases.* 2015; 15: 11.

Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First Report of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2009; 53: 333-334.

Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67: 906-909

Moquet O, Bouchiat C, Kinana A, Seck A, Arouna O, Bercion R, Breurec S, Garin B. Class D OXA-48 carbapenemase in multidrug-resistant enterobacteria, Senegal. *Emerg Infect Dis*. 2011; 17: 143-4.

Morgan DJ, Rogawski E, Thom KA, Johnson JK, Perencevich EN, Shardell M, Leekha S, Harris AD. Transfer of multidrug-resistant bacteria to healthcare workers' gloves and gowns after patient contact increases with environmental contamination. *Crit Care Med*. 2012; 40: 1045-51.

Mulla S, Charan J, Rajdev S. Antibiotic sensitivity pattern in *bla*NDM-1-positive and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*. 2016; 6: 14-17

Mulvey MR, Simor AE. Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be? *CMAJ: Canadian Medical Association Journal*. 2009; 180: 408-415.

Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum*. 2016; 4: 10

Munoz-Price LS, Hota B, Stermer A, Weinstein RA. Prevention of bloodstream infections by use of daily chlorhexidine baths for patients at a long-term acute care hospital. *Infect. Control Hosp. Epidemiol*. 2009; 30: 1031–1035.

Munoz-Price LS, De La Cuesta C, Adams S, Wyckoff M, Cleary T, McCurdy SP, Huband MD, Lemmon MM, Lescoe M, Dibhajj FB, Hayden MK, Lolans K, Quinn JP. Successful eradication of a monoclonal strain of *Klebsiella pneumoniae* during a *K. pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* outbreak in a surgical intensive care unit in Miami, Florida. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2010; 31: 1074-1077

Munoz-Price LS, Hayden MK, Lolans K, Won S, Calvert K, Lin M, Stermer A, Weinstein RA. Successful control of an outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* at a long-term acute care hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2010; 31: 341-7.

Murphy TA, Simm AM, Toleman MA, Jones RN, Walsh TR. Biochemical characterization of the acquired metallo-beta-lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 582-587

Naas T, Nordmann P. Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 7693-7697

Naas T, Livermore DM, Nordmann P. Characterization of an LysR family protein, SmeR from *Serratia marcescens* S6, its effect on expression of the carbapenem-hydrolyzing b-lactamase Sme-1, and comparison of this regulator with other b-lactamase regulators. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39: 629-637.

Naas T, Nordmann P, Vedel G, Poyart C. Plasmid-Mediated Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* Isolate from France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005; 49: 4423-4424.

Naas T, Cuzon G, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray (Check-MDR CT102) for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum β -lactamases and of KPC, OXA-48, VIM, IMP, and NDM-1 carbapenemases. *J Clin Microbiol*. 2011; 49: 1608-1613

Naas T, Dortet L, Iorga BI. Structural and Functional Aspects of Class A Carbapenemases. *Current Drug Targets*. 2016; 17: 1006-1028.

Nagano R, Adachi Y, Imamura H, Yamada K, Hashizume T, Morishima H. Carbapenem Derivatives as Potential Inhibitors of Various β -Lactamases, Including Class B Metallo- β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999; 43: 2497-2503.

Nagano R, Adachi Y, Hashizume T, Morishima H. In vitro antibacterial activity and mechanism of action of J-111, 225, a novel 1 β - methylcarbapenem, against transferable IMP-1 metallo- β -lactamase producers. *J. Antimicrob. Chemother.* 2000; 45:2 71–276.

Nakashima AK, McCarthy MA, Martone WJ, Anderson RL. Epidemic septic arthritis caused by *Serratia marcescens* and associated with a benzalkonium chloride antiseptic. *Journal of Clinical Microbiology*. 1987; 25: 1014-1018.

Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 1998; 11: 142-201.

Neuwirth C, Siébor E, Duez JM, Péchinot A, Kazmierczak A. Imipenem resistance in clinical isolates of *Proteus mirabilis* associated with alterations in penicillin-binding proteins. *J Antimicrob Chemother*. 1995; 36: 335-42

NNIS System. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2003, issued August 2003. *Am J Infect Control*. 2003; 31: 481-98.

Nordmann P, Mariotte S, Naas T, Labia R, and Nicolas M-H. Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing-lactamase for *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1993; 37: 939–946.

Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect. Dis*. 2009; 9: 228–236.

Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg. Infect. Dis*. 2011; 17: 1791–1798.

Nordmann P, Poirel L, Toleman MA, Walsh TR. Does broadspectrum β -lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of

infections caused by Gram-negative bacteria? *J. Antimicrob. Chemother.* 2011; 66: 689–692.

Nordmann P, Couard JP, Sansot D, Poirel L. Emergence of an autochthonous and community-acquired NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Europe. *Clin. Infect. Dis.* 2012; 54: 150–151.

Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm!. *Trends in Molecular Medicine.* 2012; 18: 263-272

Nordmann P, Girlich D, Poirel L. Detection of carbapenemase producers in *Enterobacteriaceae* by use of a novel screening medium. *J Clin Microbiol.* 2012; 50: 2761-2766

Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18: 1503-1507

Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20: 821-30.

Nouvenne A, Ticinesi A, Lauretani F, Maggio M, Lippi G, Guida L, Morelli I, Ridolo E, Borghi L, Meschi T. Comorbidities and Disease Severity as Risk Factors for Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Colonization: Report of an Experience in an Internal Medicine Unit. *PLoS ONE.* 2014; 9: e110001

Ohmagari N, Kurai H, Yamagishi Y, Mikamo H. Are strict isolation policies based on susceptibility testing actually effective in the prevention of the nosocomial spread of multi-drug-resistant gram-negative rods? *Am J Infect Control.* 2014; 42: 739-743

Olaitan AO, Morand S, Rolain J-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in Microbiology.* 2014; 5: 643.

Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, et al. Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1994; 38: 71-78

Österblad M, Kirveskari J, Hakanen AJ, Tissari P, Vaara M, Jalava J. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Finland: the first years (2008-11). *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67: 2860-2864

Ostrowsky BE, Whitener C, Bredenberg HK, Carson LA, Holt S, Hutwagner L, Arduino MJ, Jarvis WR. *Serratia marcescens* bacteremia traced to an infused narcotic. *N Engl J Med.* 2002; 346: 1529-37.

Oteo J, Cercenado E, Vindel A, Bautista V, Fernández-Romero S, Saéz D, Padilla B, Zamora E, Campos J. Outbreak of multidrug-resistant CTX-M-15-producing *Enterobacter cloacae* in a neonatal intensive care unit. *J Med Microbiol.* 2013; 62: 571-5.

Oteo J, Alcaraz R, Bou G, Conejo C, Díaz-Lamas AM, Fernández-Martínez M, Fontanals D, González-López JJ, López-Contreras J, Martínez-Martínez L, Morarillo M, Muñoz M, Navarro F, Oliver A, Pintado V, Ruiz-Carrasco G, Ruiz-Garbajosa P, Sánchez-Porto A, Sánchez-Romero I, Zamorano L, Aracil B, Rodríguez-Baño J; Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI); GEIH-GEMARA (SEIMC). Rates of faecal colonization by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* among patients admitted to ICUs in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2015; 70: 2916-8.

Otter JA, Yezli S, Salkeld JA, French GL. Evidence that contaminated surfaces contribute to the transmission of hospital pathogens and an overview of strategies to address contaminated surfaces in hospital settings. *Am J Infect Control.* 2013; 41: S6-11

O'Connor C, Kiernan MG, Finnegan C, O'Hara M, Power L, O'Connell NH, Dunne CP.) An optimized work-flow to reduce time-to-detection of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* (CPE) using direct testing from rectal swabs. *Bioengineered.* 2016; 0: 1 – 8

O'Dwyer K, Spivak AT, Ingraham K, Min S, Holmes DJ, Jakielaszek C, Rittenhouse S, Kwan AL, Livi GP, Sathe G, Thomas E, Van Horn S, Miller LA, Twynholm M, Tomayko J, Dalessandro M, Caltabiano M, Scangarella-Oman NE, Brown JR. Bacterial resistance to leucyl-tRNA synthetase inhibitor GSK2251052 develops during treatment of complicated urinary tract infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59: 289-98.

O'Hara CM, Brenner FW, Miller JM. Classification, Identification, and Clinical Significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *Clinical Microbiology Reviews.* 2000;13: 534-546.

Page MG, Heim J. New molecules from old classes: revisiting the development of beta-lactams. *IDrugs.* 2009; 12: 561–565.

Page MG, Dantier C, Desarbre E. In vitro properties of BAL30072, a novel siderophore sulfactam with activity against multiresistant gram-negative bacilli. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54: 2291– 2302.

Palzkill T. Metallo- β -lactamase structure and function. *Ann N Y Acad Sci.* 2013; 1277: 91-104.

Pan C, Xu S, Zhou H, Fu Y, Ye M, Zou H. Recent developments in methods and technology for analysis of biological samples by MALDI-TOF-MS. *Anal Bioanal Chem.* 2007; 387: 193-204

Panagea T, Galani I, Souli M, Adamou P, Antoniadou A, Giamarellou H. Evaluation of CHROMagar™ KPC for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in rectal surveillance cultures. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2011; 37: 124–128.

Papadimitriou-Olivgeris M, Marangos M, Fligou F, Christofidou M, Bartzavali C, Anastassiou ED, Filos KS. Risk factors for KPC producing *Klebsiella pneumoniae* enteric colonization upon ICU admission. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67: 2976-2981

Papadimitriou-Olivgeris M, Marangos M, Fligou F, Christofidou M, Sklavou C, Vamvakopoulou S, Anastassiou ED, Filos KS. KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* enteric colonization acquired during intensive care unit stay: the significance of risk factors for its development and its impact on mortality. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013; 77: 169-73.

Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: Past, Present, and Future . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2011; 55: 4943-4960.

Papp-Wallace KM, Taracila MA, Gatta JA, Ohuchi N, Bonomo RA, Nukaga M. Insights into β -lactamases from *Burkholderia* species, two phylogenetically related yet distinct resistance determinants. *J Biol Chem.* 2013; 288: 19090-102.

Passaro DJ, Waring L, Armstrong R, Bolding F, Bouvier B, Rosenberg J, Reingold AW, McQuitty M, Philpott SM, Jarvis WR, Werner SB, Tompkins LS, Vugia DJ. Postoperative *Serratia marcescens* wound infections traced to an out-of-hospital source. *J Infect Dis.* 1997; 175: 992-5.

Pasteran F, Faccone D, Petroni A, Rapoport M, Galas M, Vázquez M, Procopio A. Novel variant (bla(VIM-11)) of the metallo- β -lactamase bla(VIM) family in a GES-1 extended-spectrum- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 474-5.

Pasteran F, Otaegui L, Guerriero L, et al. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. *Emerging Infectious Diseases.* 2008; 14: 1178-1180.

Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, Rapoport M, Corso A. Sensitive Screening Tests for Suspected Class A Carbapenemase Production in Species of *Enterobacteriaceae* . *Journal of Clinical Microbiology.* 2009; 47: 1631-1639.

Pasteran F, Mendez T, Rapoport M, Guerriero L, Corso A. Controlling false-positive results obtained with the Hodge and Masuda assays for detection of class a carbapenemase in species of *Enterobacteriaceae* by incorporating boronic Acid. *J Clin Microbiol.* 2010; 48: 1323-1332

Pasteran F, Veliz O, Rapoport M, Guerriero L, Corso A. Sensitive and Specific Modified Hodge Test for KPC and Metallo-Beta- Lactamase Detection in *Pseudomonas aeruginosa* by Use of a Novel Indicator Strain, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 . *Journal of Clinical Microbiology.* 2011; 49: 4301-4303.

Patel G, Huprikar S, Factor SH, Jenkins SG, Calfee DP. Outcomes of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008; 29: 1099–106

Patel JB, Rasheed JK, Kitchel B. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: Activity, Epidemiology, and Laboratory Detection. *Clinical Microbiology Newsletter*. 2009; 31: 55 - 62

Peleg AY, Franklin C, Bell JM, Spelman DW. Dissemination of the metallo- β -lactamase gene *bla*IMP-4 among gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia. *Clin. Infect. Dis*. 2005; 41: 1549–1556.

Peleg AY, Hooper DC. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. *The New England journal of medicine*. 2010; 362:1804-1813.

Peltroche-Llacsahuanga H, Lütticken R, Haase G. Temporally overlapping nosocomial outbreaks of *Serratia marcescens* infections: an unexpected result revealed by pulsed-field gel electrophoresis. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1999; 20: 387-388.

Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40: 2153-2162.

Perry JD, Naqvi SH, Mirza IA, Alizai SA, Hussain A, Ghirardi S, Orena S, Wilkinson K, Woodford N, Zhang J, Livermore DM, Abbasi SA, Raza MW. Prevalence of faecal carriage of *Enterobacteriaceae* with NDM-1 carbapenemase at military hospitals in Pakistan, and evaluation of two chromogenic media. *J Antimicrob Chemother*. 2011; 66: 2288-94.

Petersen PJ, Jones CH, Venkatesan AM, Mansour TS, Projan SJ, Bradford PA. Establishment of in vitro susceptibility testing methodologies and comparative activities of piperacillin in combination with the penem {beta}-lactamase inhibitor BLI-489. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53: 370-84.

Petrella S, Ziental-Gelus N, Mayer C, Renard M, Jarlier V, Sougakoff W. Genetic and structural insights into the dissemination potential of the extremely broad-spectrum class A beta-lactamase KPC-2 identified in an *Escherichia coli* strain and an *Enterobacter cloacae* strain isolated from the same patient in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 3725-3736

Phadke VK, Jacob JT. Marvelous but Morbid: Infective endocarditis due to *Serratia marcescens*. *Infectious diseases in clinical practice (Baltimore, Md)*. 2016; 24: 143-150.

Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-Determined AmpC-Type β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002;46: 1-11.

Philippon A, Slama P, Dény P, Labia R. A Structure-Based Classification of Class A β -Lactamases, a Broadly Diverse Family of Enzymes. *Clinical Microbiology Reviews*. 2016; 29: 29-57

Pires J, Novais A, Peixe L. Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *J Clin Microbiol*. 2013; 51: 4281-4283

Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015; 59: 5873-5884.

Plachouras D, Karvanen M, Friberg L, Papadomichelakis E, Antoniadou A, Tsangaris I, Karaiskos I, Poulakou G, Kontopidou F, Armaganidis A, Cars O, Giamarellou H. Population pharmacokinetic analysis of colistin methanesulfonate and colistin after intravenous administration in critically ill patients with infections caused by Gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53: 3430–6.

Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clinical Microbiology Reviews*. 1998; 11: 589-603.

Pogue JM, Lee J, Marchaim D, Yee V, Zhao JJ, Chopra T, Lephart P, Kaye KS. Incidence of and risk factors for colistin-associated nephrotoxicity in a large academic health system. *Clin Infect Dis*. 2011; 53: 879–84.

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; 44: 891-897.

Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical Sequence Analyses of GES-1, a Novel Class A Extended-Spectrum β -Lactamase, and the Class 1 Integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000; 44: 622-632.

Poirel L, H  ritier C, Podglajen I, Sougakoff W, Gutmann L, Nordmann P. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* of a chromosome-encoded SHV beta-lactamase that compromises the efficacy of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47: 755-8

Poirel L, H  ritier C, Tol  n V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2004; 48: 15–22.

Poirel L, Brinas L, Fortineau N, Nordmann P. Integron-Encoded GES-Type Extended-Spectrum β -Lactamase with Increased Activity toward Aztreonam in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005; 49: 3593-3597.

Poirel L, Pitout JD, Nordmann P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol*. 2007; 2: 501-512

- Poirel L, Rodríguez-Martínez J-M, Al Naiemi N, Debets-Ossenkopp YJ, Nordmann P. Characterization of DIM-1, an Integron-Encoded Metallo- β -Lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* Clinical Isolate in the Netherlands . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010; 54: 2420-2424.
- Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54: 24-38
- Poirel L, Benouda A, Hays C, Nordmann P. Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Morocco. *J. Antimicrob. Chemother*. 2011; 66: 2781–2783
- Poirel L, Ros A, Carricajo A, et al. Extremely Drug-Resistant *Citrobacter freundii* Isolate Producing NDM-1 and Other Carbapenemases Identified in a Patient Returning from India . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011; 55: 447-448.
- Poirel L, Castanheira M, Carrër A, Rodriguez CP, Jones RN, Smayevsky J, Nordmann P. OXA-163, an OXA-48-related class D β -lactamase with extended activity toward expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55: 2546-51.
- Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011; 70: 119-123
- Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother*. 2012 ; 67: 1597-606
- Polilli E, Parruti G, Fazii P, D'Antonio D, Palmieri D, D'Incecco C, Mangifesta A, Garofalo G, Del Duca L, D'Amario C, Scimia M, Cortesi V, Fortunato V. Rapidly controlled outbreak of *Serratia marcescens* infection/colonisations in a neonatal intensive care unit, Pescara General Hospital, Pescara, Italy, April 2011. *Euro Surveill*. 2011; 16: pii: 19892.
- Poole K. Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Current Opinion in Microbiology*. 2001; 4: 500–508.
- Poole K. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *J Appl Microbiol*. 2002; 92: 55S-64S.
- Poole K. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect*. 2004;10: 12-26
- Popovic M, Steinort D, Pillai S, Joukhadar C. Antimicrobial susceptibility of gram-negative non urinary bacteria to fosfomycin and other antimicrobials. *Future Microbiol*. 2010; 5: 961–70.
- Potron A, Kalpoe J, Poirel L, Nordmann P. European dissemination of a single OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clone. *Clin Microbiol Infect*. 2011; 17: E24-E26

Pottumarthy S, Moland ES, Juretschko S, Swanzy SR, Thomson KS, Fritsche TR. NmcA Carbapenem-hydrolyzing Enzyme in *Enterobacter cloacae* in North America. *Emerging Infectious Diseases*. 2003; 9: 999-1002

Poulou A, Voulgari E, Vrioni G, Xidopoulos G, Pliagkos A, Chatzipantazi V, Markou F, Tsakris A. Imported *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* clones in a Greek hospital: impact of infection control measures for restraining their dissemination. *J Clin Microbiol*. 2012; 50: 2618-23.

Poulou A, Grivakou E, Vrioni G, Koumaki V, Pittaras T, Pournaras S, Tsakris A. Modified CLSI extended-spectrum β -lactamase (ESBL) confirmatory test for phenotypic detection of ESBLs among *Enterobacteriaceae* producing various β -lactamases. *J Clin Microbiol*. 2014; 52: 1483-9.

Pournaras S, Protonotariou E, Voulgari E, Kristo I, Dimitroulia E, Vitti D, Tsalidou M, Maniatis AN, Tsakris A, Sofianou D. Clonal spread of KPC-2 carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greece. *J. Antimicrob. Chemother*. 2009; 64: 348–352

Pournaras S, Vrioni G, Neou E, Dendrinou J, Dimitroulia E, Poulou A. Activity of tigecycline alone and in combination with colistin and meropenem against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Enterobacteriaceae* strains by timekill assay. *Int J Antimicrob Agents*. 2011; 37: 244–7.

Prasad N, Labaze G, Kopacz J, Chwa S, Platis D, Pan CX, Russo D, LaBombardi VJ, Osorio G, Pollack S, Kreiswirth BN, Chen L, Urban C, Segal-Maurer S. Asymptomatic rectal colonization with carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* and *Clostridium difficile* among residents of a long-term care facility in New York City. *Am J Infect Control*. 2016; 44: 525-32.

Pulcini C, Defres S, Aggarwal I, Nathwani D, Davey P. Design of a 'day 3 bundle' to improve the reassessment of inpatient empirical antibiotic prescriptions. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 61: 1384-8.

Qi Y, Wei Z, Ji S, Du X, Shen P, Yu Y. ST11, the dominant clone of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China. *J. Antimicrob. Chemother*. 2011; 66: 307–312.

Quale J, Bratu S, Gupta J, Landman D. Interplay of Efflux System, *ampC*, and *oprD* Expression in Carbapenem Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006; 50: 1633-1641.

Queenan AM, Torres-Viera C, Gold HS, Carmeli Y, Eliopoulos GM, Moellering RC Jr, Quinn JP, Hindler J, Medeiros AA, Bush K. SME-type carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44: 3035-9.

Queenan AM, Shang W, Schreckenberger P, Lolans K, Bush K, Quinn J. SME-3, a novel member of the *Serratia marcescens* SME family of carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 3485-3487

Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*. 2007; 20: 440-458

Qureshi ZA, Paterson DL, Potoski BA, Kilayko MC, Sandovsky G, Sordillo E, Polsky B, Adams-Haduch JM, Doi Y. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56: 2108–13

Radice M, Power P, Gutkind G et al. First class A carbapenemase isolated from *Enterobacteriaceae* in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1068–9

Raimondi A, Sisto F, Nikaido H. Mutation in *Serratia marcescens* AmpC β -Lactamase Producing High-Level Resistance to Ceftazidime and Cefpirome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001; 45: 331-2339.

Rasmussen BA, Bush K, Keeney D, Yang Y, Hare R, O’Gara C, Medeiros AA. Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2080-2086

Réglier-Poupet H, Naas T, Carrer A, Cady A, Adam JM, Fortineau N, Poyart C, Nordmann P. Performance of chromID ESB, a chromogenic medium for detection of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases. *J Med Microbiol*. 2008; 57: 310-5.

Riccio ML, Franceschini N, Boschi L, Caravelli B, Cornaglia G, Fontana R, Amicosante G, Rossolini GM. Characterization of the metallo-beta-lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of bla(IMP) allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44: 1229-35

Richards M, Thursky K, Buising K. Epidemiology, prevalence, and sites of infections in intensive care units. *Semin Respir Crit Care Med*. 2003; 24: 3-22.

Robledo IE, Aquino EE, Santé MI, Santana JL, Otero DM, León CF, Vázquez GJ. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54: 1354-1357

Robustillo Rodela A, Díaz-Agero Pérez C, Sanchez Sagrado T, Ruiz-Garbajosa P, Pita López MJ, Monge V. Emergence and outbreak of carbapenemase-producing KPC-3 *Klebsiella pneumoniae* in Spain, September 2009 to February 2010: control measures. *Euro Surveill*. 2012; 17: pii: 20086.

Rock C, Thom KA, Masnick M, Johnson JK, Harris AD, Morgan DJ. Frequency of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing and non-KPC-producing *Klebsiella* species contamination of healthcare workers and the environment. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2014; 35: 426-9.

Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Retamar P, Picón E, Pascual Á; Extended-Spectrum Beta-Lactamases–Red Española de Investigación en Patología Infecciosa/Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria Group. β -Lactam/ β -lactam inhibitor combinations

for the treatment of bacteremia due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*: a post hoc analysis of prospective cohorts. *Clin Infect Dis*. 2012; 54: 167-74

Rodríguez-Baño J, Gutiérrez-Gutiérrez B, Machuca I, Pascual A. Treatment of Infections Caused by Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-, AmpC-, and Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Rev*. 2018; 31: e00079-17.

Rogers BA, Aminzadeh Z, Hayashi Y, Paterson DL. Country-to-country transfer of patients and the risk of multi-resistant bacterial infection. *Clin Infect Dis*. 2011; 53: 49-56

Rolain JM, Parola P, Cornaglia G. New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): towards a new pandemic? *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 1699-1701

Rossolini GM. Acquired metallo-beta-lactamases: an increasing clinical threat. *Clin Infect Dis*. 2005; 41: 1557-1558

Ruppé É, Woerther P-L, Barbier F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Annals of Intensive Care*. 2015; 5: 21

Sahare P, Moon A, Shinde GB. Emergence of drug resistance in bacteria: An insight into molecular mechanism. *International Journal of Scientific & Engineering Research*. 2013; 4: 807-818

Saidel-Odes L, Borer A. Limiting and controlling carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Drug Resistance*. 2014; 7: 9-14.

Samonis G, Matthaiou DK, Kofteridis D, Maraki S, Falagas ME. In vitro susceptibility to various antibiotics of colistin-resistant Gram-negative bacterial isolates in a general tertiary hospital in Crete, Greece. *Clin Infect Dis*. 2010; 50: 1689–91.

Samra Z, Bahar J, Madar-Shapiro L, Aziz N, Israel S, Bishara J. Evaluation of CHROMagar KPC for Rapid Detection of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008; 46: 3110-3111.

Samuelsen Ø, Naseer U, Tofteland S, Skutlaberg DH, Onken A, Hjetland R, Sundsfjord A, Giske CG. Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. *J. Antimicrob. Chemother*. 2009; 63: 654–658.

Sanders WE, Sanders CC. *Enterobacter* spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clinical Microbiology Reviews*. 1997; 10: 220-241.

Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev*. 2008; 32: 234-58

Savard P, Perl TM. Combating the spread of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: a battle that infection prevention should not lose. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20: 854-861

Sekiguchi J, Morita K, Kitao T, et al. KHM-1, a Novel Plasmid-Mediated Metallo- β -Lactamase from a *Citrobacter freundii* Clinical Isolate . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2008; 52: 4194-4197.

Sekizuka T, Matsui M, Yamane K, Takeuchi F, Ohnishi M, Hishinuma A, Arakawa Y, Kuroda M. Complete sequencing of the *bla*(NDM-1)-positive IncA/C plasmid from *Escherichia coli* ST38 isolate suggests a possible origin from plant pathogens. *PLoS One*. 2011; 6: e25334.

Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L, for the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. 2006. Management of multidrug- resistant organisms in healthcare settings. CDC, Atlanta, GA. <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/ar/mdroGuideline2006.pdf>

Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L; Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. Management of multidrug-resistant organisms in health care settings. 2006. *Am J Infect Control*. 2007; 35: S165-93

Slama TG. Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. *Crit Care*. 2008;12: S4.

Smith R, Coast J. The true cost of antimicrobial resistance. *BMJ* . 2013; 346, f1493.

Souli M, Galani I, Antoniadou A, Papadomichelakis E, Poulakou G, Panagea T, Vourli S, Zerva L, Armaganidis A, Kanellakopoulou K, Giamarellou H. An outbreak of infection due to beta-Lactamase *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* in a Greek University Hospital: molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Clin Infect Dis*. 2010; 50: 364-73.

Sousa CP. The versatile strategies of *Escherichia coli* pathotypes: a mini review. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis*. 2006; 12: 363-373.

Spanu T, Fiori B, D'Inzeo T, Canu G, Campoli S, Giani T, et al. Evaluation of the new NucliSENS EasyQ KPC test for rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes (*bla*KPC). *J Clin Microbiol*. 2012; 50: 2783–5.

Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against β -lactam antibiotics. *J Clin Microbiol*. 2012; 50: 927-937

Spyropoulou A, Papadimitriou-Olivgeris M, Bartzavali C, Vamvakopoulou S, Marangos M, Spiliopoulou I, Anastassiou ED, Christofidou M. 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. *J Med Microbiol*. 2016; 65: 240-246

Stachyra T, Levasseur P, Péchereau MC, Girard AM, Claudon M, Miossec C, Black MT. In vitro activity of the β -lactamase inhibitor NXL104 against KPC-2 carbapenemase and *Enterobacteriaceae* expressing KPC carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 64: 326-9

Stoesser N, Sheppard AE, Shakya M, Sthapit B, Thorson S, Giess A, Kelly D, Pollard AJ, Peto TE, Walker AS, Crook DW. Dynamics of MDR *Enterobacter cloacae* outbreaks in a neonatal unit in Nepal: insights using wider sampling frames and next-generation sequencing. *J Antimicrob Chemother.* 2015; 70: 1008-15.

Su L-H, Ou JT, Leu H-S, et al. Extended Epidemic of Nosocomial Urinary Tract Infections Caused by *Serratia marcescens*. *Journal of Clinical Microbiology.* 2003; 41: 4726-4732.

Sutcliffe JA, O'Brien W, Fyfe C, Grossman TH. Antibacterial activity of eravacycline (TP-434), a novel fluorocycline, against hospital and community pathogens. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57: 5548-58.

Sypsa V, Psychogiou M, Bouzala G-A, Hadjihannas L, Hatzakis A, Daikos GL. Transmission Dynamics of Carbapenemase-Producing *Klebsiella Pneumoniae* and Anticipated Impact of Infection Control Strategies in a Surgical Unit. *PLoS ONE.* 2012; 7: e41068

Tacconelli E, Cataldo MA, Dancer SJ, De Angelis G, Falcone M, Frank U, Kahlmeter G, Pan A, Petrosillo N, Rodríguez-Baño J, Singh N, Venditti M, Yokoe DS, Cookson B; European Society of Clinical Microbiology. ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20: 1-55.

Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Shimojima M, Kirikae T. IMP-43 and IMP-44 metallo- β -lactamases with increased carbapenemase activities in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57: 4427-4432

Tan TY, Tan JS, Tay H, Chua GH, Ng LS, Syahidah N. Multidrug-resistant organisms in a routine ward environment: differential propensity for environmental dissemination and implications for infection control. *J Med Microbiol.* 2013; 62: 766-72.

Tanaka T, Takahashi H, Kobayashi JM, Ohyama T, Okabe N. A nosocomial outbreak of febrile bloodstream infection caused by heparinized-saline contaminated with *Serratia marcescens*, Tokyo, 2002. *Jpn J Infect Dis.* 2004; 57: 189-92.

Tängdén T, Giske CG. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: clinical perspectives on detection, treatment and infection control. *J Intern Med.* 2015; 277: 501-12.

Tehrani KHME, Martin NI. Thiol-Containing Metallo- β -Lactamase Inhibitors Resensitize Resistant Gram-Negative Bacteria to Meropenem. *ACS Infectious Diseases*. 2017; 3: 711-717.

Temkin E, Torre-Cisneros J, Beovic B, Benito N, Giannella M, Gilarranz R, Jeremiah C, Loeches B, Machuca I, Jiménez-Martín MJ, Martínez JA, Mora-Rillo M, Navas E, Osthoff M, Pozo JC, Ramos Ramos JC, Rodríguez M, Sánchez-García M, Viale P, Wolff M, Carmeli Y. Ceftazidime-Avibactam as Salvage Therapy for Infections Caused by Carbapenem-Resistant Organisms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61: pii: e01964-16.

Tenover FC, Canton R, Kop J, Chan R, Ryan J, Weir F, RuizGarbajosa P, LaBombardi V, Persing DH. Detection of colonization by carbapenemase-producing Gram-negative Bacilli in patients by use of the Xpert MDRO assay. *J Clin Microbiol*. 2013; 51: 3780-3787

Thomson KS. Extended-spectrum- β -lactamase, AmpC, and Carbapenemase issues. *J. Clin. Microbiol*. 2010; 48: 1019–1025.

Tijet N, Boyd D, Patel SN, Mulvey MR, Melano RG. Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57: 4578-4580

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; 44: 539-543.

Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, Walsh TR. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother*. 2002; 50: 673-9

Torres-Gonzalez P, Cervera-Hernandez ME, Niembro-Ortega MD, Leal-Vega F, Cruz-Hervert LP, García-García L, Galindo-Fraga A, Martinez-Gamboa A, Bobadilla-Del Valle M, Sifuentes-Osornio J, Ponce-de-Leon A. Factors Associated to Prevalence and Incidence of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Fecal Carriage: A Cohort Study in a Mexican Tertiary Care Hospital. *PLoS One*. 2015; 10: e0139883.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiology : an introduction. 2007, 9th ed, San Francisco Pearson Benjamin Cummings

Toth M, Vakulenko V, Antunes NT, Frase H, Vakulenko SB. Class A carbapenemase FPH-1 from *Francisella philomiragia*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56: 2852-7.

Tsakris A, Kristo I, Poulou A, Themeli-Digalaki K, Ikonomidis A, Petropoulou D, Pournaras S, Sofianou D. Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol*. 2009;47: 362-7.

Tsakris A, Voulgari E, Poulou A, Kimouli M, Pournaras S, Ranellou K, Kosmopoulou O, Petropoulou D. In vivo acquisition of a plasmid-mediated blaKPC-2 gene among clonal isolates of *Serratia marcescens*. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48: 2546–2549.

Tsakris A, Poulou A, Pournaras S, Voulgari E, Vrioni G, Themeli-Digalaki K, Petropoulou D, Sofianou D. A simple phenotypic method for the differentiation of metallo-beta-lactamases and class A KPC carbapenemases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65: 1664-71.

Tsakris A, Poulou A, Bogaerts P, Dimitroulia E, Pournaras S, Glupczynski Y. Evaluation of a new phenotypic OXA-48 disk test for differentiation of OXA-48 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* clinical isolates. *J Clin Microbiol.* 2015; 53: 1245-51.

Turgeon PL, Desrochers C. Stability of imipenem in Mueller Hinton agar stored at 4 degrees C. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1985; 28: 711–712.

Tzelepi E, Magana Ch, Platsouka E, Sofianou D, Paniara O, Legakis NJ, Vatopoulos AC, Tzouvelekis LS. Extended-spectrum beta-lactamase types in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in two Greek hospitals. *Int J Antimicrob Agents.* 2003; 21: 285-8.

Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and Other *Enterobacteriaceae*: an Evolving Crisis of Global Dimensions. *Clinical Microbiology Reviews.* 2012; 25: 682-707.

Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Piperaki E, Souli M, Daikos GL. Treating infections caused by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20: 862-72.

Unal S, Garcia-Rodriguez JA. Activity of meropenem and comparators against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. isolated in the MYSTIC Program, 2002-2004. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005; 53: 265-71

Urban C, Bradford PA, Tuckman M, Segal-Maurer S, Wehbeh W, Grenner L, Colon-Urban R, Mariano N, Rahal JJ. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* harboring *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase beta-lactamases associated with long-term care facilities. *Clin Infect Dis.* 2008; 46: e127-30.

van der Zee A, Roorda L, Bosman G, Fluit AC, Hermans M, Smits PH, van der Zanden AG, Te Witt R, Bruijnesteijn van Coppenraet LE, Cohen Stuart J, Ossewaarde JM. Multi-centre evaluation of real-time multiplex PCR for detection of carbapenemase genes OXA-48, VIM, IMP, NDM and KPC. *BMC Infect Dis.* 2014; 14: 27

van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, Schouls LM. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative

for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PLoS One*. 2015; 10: e0123690.

van Dijk K, Voets GM, Scharringa J, Voskuil S, Fluit AC, Rottier WC, Leverstein-Van Hall MA, Cohen Stuart JW. A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in *Enterobacteriaceae* using phenyl boronic acid, dipicolinic acid and temocillin. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20: 345-349

van Duin D, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Virulence*. 2017; 8: 460–469

van Limburg M, Sinha B, Lo-Ten-Foe JR, van Gemert-Pijnen JEW. Evaluation of early implementations of antibiotic stewardship program initiatives in nine Dutch hospitals. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*. 2014; 3: 33

van Ogtrop ML, van Zoeren-Grobbe D, Verbakel-Salomons EM, van Boven CP. *Serratia marcescens* infections in neonatal departments: description of an outbreak and review of the literature. *J Hosp Infect*. 1997; 36: 95-103.

van 't Veen A, van der Zee A, Nelson J, Speelberg B, Kluytmans JA, Buiting AG. Outbreak of infection with a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain associated with contaminated roll boards in operating rooms. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 4961-7.

Vasudevan A, Mukhopadhyay A, Goh EY, Li J, Tambyah PA. Risk factors for infection/colonization caused by resistant Gram negative bacilli in critically ill patients (an observational study of 1633 critically ill patients). *Prev Med*. 2013; 57: S70-3.

Vatopoulos A. High rates of metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece—a review of the current evidence. *Euro Surveill*. 2008; 13: 8023.

Vila J, Sáez-López E, Johnson JR, Römling U, Dobrindt U, Cantón R, Giske CG, Naas T, Carattoli A, Martínez-Medina M, Bosch J, Retamar P, Rodríguez-Baño J, Baquero F, Soto SM. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS Microbiol Rev*. 2016; 40: 437-463

Villegas MV, Lolans K, Correa A, Suarez CJ, Lopez JA, Vallejo M, Quinn JP; Colombian Nosocomial Resistance Study Group. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50: 2880-2.

Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, Bruining HA, White J, Nicolas-Chanoin MH, Wolff M, Spencer RC, Hemmer M. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *JAMA*. 1995; 274: 639-44.

Vincent JL, Abraham E, Annane D, Bernard G, Rivers E, Van den Berghe G. Reducing mortality in sepsis: new directions. *Crit Care*. 2002; 6: S1-S18

Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, Moreno R, Lipman J, Gomersall C, Sakr Y, Reinhart K, EPIC II Group of Investigators. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*. 2009; 302: 2323.

Voets GM, et al. A set of multiplex PCRs for genotypic detection of extended-spectrum β -lactamases, carbapenemases, plasmidmediated AmpC β -lactamases and OXA β -lactamases. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2011; 37:356–359

Voulgari E, Zarkotou O, Ranellou K, Karageorgopoulos DE, Vrioni G, Mamali V, Themeli-Digalaki K, Tsakris A. Outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece involving an ST11 clone. *J Antimicrob Chemother*. 2013; 68: 84-8.

Voulgari E, Gartzonika C, Vrioni G, Politi L, Priavali E, Levidiotou-Stefanou S, Tsakris A. The Balkan region: NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 clonal strain causing outbreaks in Greece. *J Antimicrob Chemother*. 2014; 69: 2091-7.

Vourli S, Giakkoupi P, Miriagou V, Tzelepi E, Vatopoulos AC, Tzouvelekis LS. Novel GES/IBC extended-spectrum beta-lactamase variants with carbapenemase activity in clinical enterobacteria. *FEMS Microbiol Lett*. 2004; 234: 209-13.

Wachino J, Doi Y, Yamane K, Shibata N, Yagi T, Kubota T, Arakawa Y. Molecular characterization of a cephamycin-hydrolyzing and inhibitor-resistant class A beta-lactamase, GES-4, possessing a single G170S substitution in the omega-loop. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 ; 48: 2905-10.

Walsh F. Doripenem: A new carbapenem antibiotic a review of comparative antimicrobial and bactericidal activities. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 2007; 3: 789-794.

Walsh TR, Bolmström A, Qwärnström A, Gales A. Evaluation of a New Etest for Detecting Metallo- β -Lactamases in Routine Clinical Testing. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40: 2755-2759.

Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev*. 2005; 18: 306-25.

Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect. Dis*. 2011; 11: 355–362.

Walther-Rasmussen J, Høiby N. Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 60: 470-82.

Wang MC, Tseng CC, Chen CY, Wu JJ, Huang JJ. The role of bacterial virulence and host factors in patients with *Escherichia coli* bacteremia who have acute cholangitis or upper urinary tract infection. *Clin Infect Dis*. 2002; 35: 1161-6.

Wang M, Tseng C, Wu A, Huang J, Sheu B, Wu J. Different roles of host and bacterial factors in *Escherichia coli* extra-intestinal infections. *Clinical Microbiology and Infection*. 2009; 15: 372-379

Wareham DW, Abdul Momin MHF. Rapid Detection of Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: Evaluation of the Resist-3 O.K.N. (OXA-48, KPC, NDM) Lateral Flow Multiplexed Assay. Carroll KC, ed. *Journal of Clinical Microbiology*. 2017; 55: 1223-1225.

Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991; 35: 147-151

Weber DJ, Raasch R, Rutala WA. Nosocomial infections in the ICU: the growing importance of antibiotic-resistant pathogens. *Chest*. 1999;115: 34S-41S.

Wei Z-Q, Du X-X, Yu Y-S, Shen P, Chen Y-G, Li L-J. Plasmid-Mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* Isolate from China . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007; 51: 763-765.

Weinstein RA. Nosocomial infection update. *Emerg Infect Dis*. 1998; 4: 416–20.

Wernli D, Hausteil T, Conly J, Carmeli Y, Kickbusch I, Harbarth S. A Call for Action: The Application of the International Health Regulations to the Global Threat of Antimicrobial Resistance. *PLoS Medicine*. 2011; 8: e1001022.

Wexler HM. In vitro activity of ertapenem: review of recent studies. *J Antimicrob Chemother*. 2004; 53: ii11-21

Wilhelmi I, Bernaldo de Quirós JC, Romero-Vivas J, Duarte J, Rojo E, Bouza E. Epidemic outbreak of *Serratia marcescens* infection in a cardiac surgery unit. *Journal of Clinical Microbiology*. 1987; 25: 1298-1300.

Wilke MH. Multiresistant bacteria and current therapy - the economical side of the story. *Eur J Med Res*. 2010; 15: 571-6.

Wong H, Eso K, Ip A, Jones J, Kwon Y, Powelson S, de Grood J, Geransar R, Santana M, Joffe AM, Taylor G, Missaghi B, Pearce C, Ghali WA, Conly J. Use of ward closure to control outbreaks among hospitalized patients in acute care settings: a systematic review. *Syst Rev*. 2015; 4: 152.

Wong D, Spellberg B. Leveraging antimicrobial stewardship into improving rates of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Virulence*. 2017; 8: 383-390.

Woodford N., Dallow JW, Hill RL, Palepou MF, Pike R, Ward ME, Warner M, Livermore DM. Ertapenem resistance among *Klebsiella* and *Enterobacter* submitted in the UK to a reference laboratory. *Int J Antimicrob Agents*. 2007; 29: 456-9

Woodford N, Zhang J, Warner M, Kaufmann ME, Matos J, Macdonald A, Brudney D, Sompolinsky D, Navon-Venezia S, Livermore DM. Arrival of *Klebsiella*

pneumoniae producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 62: 1261-4.

Woodford N., Turton, J. F. and Livermore, D. M., Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews.* 2011; 35: 736–755.

World Health Organization. The evolving threat of antimicrobial resistance – options for action. WHO. 2012.

http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44812/1/9789241503181_eng.pdf

Wu YM, Hsu PC, Yang CC, Chang HJ, Ye JJ, Huang CT, Lee MH. *Serratia marcescens* meningitis: epidemiology, prognostic factors and treatment outcomes. *J Microbiol Immunol Infect.* 2013; 46: 259-65.

Yang Y, Wu P, and Livermore DM. Biochemical characterization of a b-lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1990; 34: 755–758

Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45: 1151-1161

Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM, Chong Y. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 3798-3801

Yong D, Choi YS, Roh KH, Kim CK, Park YH, Yum JH, Lee K, Chong Y. Increasing prevalence and diversity of metallo-beta-lactamases in *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., and *Enterobacteriaceae* from Korea. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50: 1884-6.

Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al. Characterization of a New Metallo-β-Lactamase Gene, *bla*_{NDM-1}, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2009; 53: 5046-5054.

Yong D, Toleman MA, Bell J, et al. Genetic and Biochemical Characterization of an Acquired Subgroup B3 Metallo-β-Lactamase Gene, *bla*_{AIM-1}, and Its Unique Genetic Context in *Pseudomonas aeruginosa* from Australia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2012; 56: 6154-6159.

Yu Y-S, Du X-X, Zhou Z-H, Chen Y-G, Li L-J. First Isolation of *bla*_{IMI-2} in an *Enterobacter cloacae* Clinical Isolate from China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2006; 50: 1610-1611

Zapun A, Contreras-Martel C, Vernet T. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2008; 32: 361-85.

Zeng X, Lin J. Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. *Front. Microbiol.* 2013; 4: 1-9

Zarkotou O, Pournaras S, Tselioti P, Dragoumanos V, Pitiriga V, Ranellou K, Prekates A, Themeli-Digalaki K, Tsakris A. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. *Clin Microbiol Infect.* 2011; 17: 1798–803.

Zhanel GG, Cheung D, Adam H, Zelenitsky S, Golden A, Schweizer F, Gorityala B, Lagacé-Wiens PR, Walkty A, Gin AS, Hoban DJ, Karlowsky JA. Review of Eravacycline, a Novel Fluorocycline Antibacterial Agent. *Drugs.* 2016; 76: 567-88.

Zhanel GG, Lawrence CK, Adam H, Schweizer F, Zelenitsky S, Zhanel M, Lagacé-Wiens PRS, Walkty A, Denisuik A, Golden A, Gin AS, Hoban DJ, Lynch JP 3rd, Karlowsky JA. Imipenem-Relebactam and Meropenem-Vaborbactam: Two Novel Carbapenem-β-Lactamase Inhibitor Combinations. *Drugs.* 2018;78: 65-98.

Zhang Y, Kashikar A, Bush K. In vitro activity of plazomicin against β-lactamase-producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE). *J Antimicrob Chemother.* 2017; 72: 2792-2795.

Zhao WH, Hu ZQ. Acinetobacter: a potential reservoir and dispenser for β-lactamases. *Crit Rev Microbiol.* 2012; 38: 30-51

Zilberberg M, Shorr A. Gram-negative resistance and need for ICU among urinary tract infections in the United States. *Critical Care.* 2013; 17: P74.

Zurawski RM. Carbapenem-resistant enterobacteriaceae: occult threat in the intensive care unit. *Crit Care Nurse.* 2014;3 4: 44-52.

Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων, Επιστημονική Επιτροπή Νοσοκομειακών Λοιμώξεων. Κατευθυντήριες Οδηγίες για τη Διάγνωση και την Εμπειρική Θεραπεία των Λοιμώξεων. ΚΕΕΛΠΝΟ, 2007. <http://www.keelpno.gr>

Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων. Μικροβιακή αντοχή - Οδηγίες / Πληροφορίες / Εκπαιδευτικά video. <http://www.keelpno.gr>

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Vrioni G, **Daniil I**, Voulgari E, Ranellou K, Koumaki V, Ghirardi S, Kimouli M, Zambardi G, Tsakris A. Comparative evaluation of a prototype chromogenic medium (ChromID CARBA) for detecting carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in surveillance rectal swabs. *J Clin Microbiol.* 2012; 50: 1841-6.

G. Vrioni, **I. Daniil**, E. Voulgari, K. Ranellou, V. Koumaki, P. Karle, A. Tsakris . Evaluation of a novel chromogenic medium for detecting carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in surveillance rectal swabs. P1717, 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease, London, U.K., 31/3 – 3/4/2012