



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Α΄ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής: Καθηγητής Γεώργιος Λ. Δαΐκος (2015 έως 31-08-2018)

Διευθύντρια: Καθηγήτρια Ελένη Γκόγκα (από 01-09-2018)

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΔΙΑΧΡΟΝΙΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗΝ ΚΟΛΙΜΥΚΙΝΗ ΠΟΛΥΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ
ΣΤΕΛΕΧΩΝ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΑΠΟ ΤΟ ΑΙΜΑ
ΑΣΘΕΝΩΝ**

ΓΙΑΝΝΟΥΛΑ ΤΑΝΣΑΡΛΗ

ΙΑΤΡΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2020

Ημερομηνία αίτησης διδακτορικής διατριβής: 12-06-2015

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής: 16-07-2015

Ημερομηνία καθορισμού θέματος: 28-03-2016

Ημερομηνία κατάθεσης πρώτης προόδου: 23-06-2017

Ημερομηνία κατάθεσης δεύτερης προόδου: 31-08-2018

Ημερομηνία κατάθεσης τρίτης προόδου: 27-01-2020

Ημερομηνία κατάθεσης διδακτορικής διατριβής: 10-04-2020

Μέλη τριμελούς επιτροπής:

Γεώργιος Λ. Δαΐκος, Καθηγητής Παθολογίας-Λοιμώξεων, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Μιχαήλ Σαμάρκος (επιβλέπον μέλος), Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας-Ανοσολογίας στην Α' Παθολογική κλινική της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, ΓΝΑ Λαϊκό

Ιωσήφ Παπαπαρασκευάς, Ιατρός-Βιοπαθολόγος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Εργαστήριο Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής: Καθηγητής Πέτρος Π. Σφηκάκης

Μέλη επταμελούς επιτροπής:

Γεώργιος Λ. Δαΐκος, Καθηγητής

Μιχαήλ Σαμάρκος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Ιωσήφ Παπαπαρασκευάς, Αναπληρωτής Καθηγητής

Μήνα Ψυχογιού, Επίκουρη Καθηγήτρια

Ελένη Ι. Γκόγκα, Καθηγήτρια

Ευαγγελία-Θεοφανώ Πυτεράκη, Επίκουρη Καθηγήτρια

Γκίκας Μαγιορκίνης, Επίκουρος Καθηγητής

Βαθμός διδακτορικής διατριβής:

Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (Οργανισμός του Πανεπιστημίου Αθηνών, άρθρο 202, Παράγραφος 2, Νόμος 5343).

ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΣ ΟΡΚΟΣ

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἵστορας ποιεύμενος, ἐπιτελέα ποιήσιν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν ὄρκον τόνδε καὶ ξυγγραφὴν τήνδε. ἡγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ αὐτοῦ ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξειν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ξυγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοις τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί. Διαιτημασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἶρξιν. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. ὁμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἄγνῳ δὲ καὶ ὁσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε. Ἐς οἰκίας δὲ ὁκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίας, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπηίης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρητα ἡγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ ξυγγέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιορκοῦντι, τάναντία τουτέων.

Η παρούσα διατριβή αφιερώνεται

στο σύζυγό μου Χρήστο

για την αγάπη και τη συνεχή του υποστήριξη όλα αυτά τα χρόνια

στο γιο μου Αργύριο

στους γονείς μου

Σωτήριο και Αφροδίτη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες.....	13
Βιογραφικό σημείωμα.....	17
Περίληψη.....	25

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή.....	29
1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	
1.1 Ιστορική αναδρομή – Γενικά μικροβιολογικά στοιχεία.....	33
1.2 Παθογένεια της λοίμωξης.....	33
1.3 Κλινική σημασία.....	35
1.4 Αντοχή στις καρβαπενέμες.....	36
2. Βακτηριαμία από <i>Klebsiella pneumoniae</i> που παράγει καρβαπενεμάσες	
2.1 Επιδημιολογία.....	38
2.2 Εργαστηριακή διάγνωση.....	41
2.2.1 Ταυτοποίηση.....	41
2.2.2 Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά.....	42
2.3 Θεραπεία.....	43
3. Κολιμυκίνη	
3.1 Εισαγωγικά - ιστορικά στοιχεία.....	47
3.2 Χημική δομή.....	47
3.3 Μηχανισμός δράσης.....	48
3.4 Αντιμικροβιακό φάσμα.....	49
3.5 Τοξικότητα – Ανεπιθύμητες ενέργειες.....	49

3.6 Στατιστικά στοιχεία κατανάλωσης κολιμυκίνης στην Ελλάδα.....	50
--	----

4. *Klebsiella pneumoniae* ανθεκτική στην κολιμυκίνη

4.1 Επιδημιολογία.....	53
------------------------	----

4.2 Μηχανισμοί αντοχής.....	53
-----------------------------	----

4.3 Προσδιορισμός ΕΑΠ κολιμυκίνης.....	55
--	----

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός.....	57
-------------	----

1. Υλικό

1.1 Τόπος και χρόνος διεξαγωγής της μελέτης.....	57
--	----

1.2 Βακτηριακά στελέχη.....	57
-----------------------------	----

2. Μέθοδοι

2.1 Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά «τελευταίας γραμμής».....	59
---	----

2.2 Ανίχνευση γονιδίων παραγωγής καρβαπενεμάσης με πολυπλεκτική (multiplex) PCR.....	60
--	----

2.3 Διαχρονική εξέλιξη της αντοχής της κολιμυκίνης κατά τη χρονική περίοδο της μελέτης: στατιστική προσέγγιση με ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης.....	61
---	----

2.4 Διερεύνηση δυναμικής συσχέτισης μεταξύ αντοχής στην κολιμυκίνη και χρήσης του αντιβιοτικού με τη χρήση της στατιστικής μεθόδου ανάλυσης χρονοσειρών.....	61
--	----

3. Αποτελέσματα

3.1 Ευαισθησίες του μικροβιακού πληθυσμού σε κολιμυκίνη, πολυμυξίνη Β, φωσφομυκίνη, μεροπενέμη και τιγκεκυκλίνη.....	67
--	----

3.2 Γονίδια παραγωγής καρβαπενεμασών.....	70
---	----

3.3 Διαχρονική εξέλιξη της αντοχής της κολιμυκίνης.....	71
---	----

3.4 Αντοχή στην κολιμυκίνη και χρήση του αντιβιοτικού με τη χρήση της στατιστικής μεθόδου ανάλυσης χρονοσειρών.....	72
3.4.1 Κατασκευή χρονοσειράς αντοχής στην κολιμυκίνη.....	72
3.4.2 Κατασκευή χρονοσειράς χρήσης κολιμυκίνης.....	72
3.4.3 Αποτελέσματα του μοντέλου γραμμικής συνάρτησης μεταφοράς.....	75
3.4.4 Ανάλυση χρονοσειρών και γραμμική συνάρτηση μεταφοράς χρησιμοποιώντας ποσοστά αντοχής (αντί επίπτωσης).....	77
III. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	79
IV. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	87
V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	89

Ευχαριστίες

Κατ' αρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Παθολογίας - Λοιμώξεων κ. Γεώργιο Λ. Δαΐκο που με τίμησε αναθέτοντάς μου την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για τον χρόνο που αφιέρωσε σε όλα τα στάδια της διατριβής, από τον σχεδιασμό της έρευνας και την οργάνωση του πειραματικού μέρους μέχρι τη δημοσίευση των αποτελεσμάτων. Με το διεθνώς αναγνωρισμένο κύρος του στην κλινική έρευνα των πολυανθεκτικών λοιμώξεων αλλά και τη μεγάλη του εμπειρία ως κλινικού ιατρού ο κ. Δαΐκος ήταν ο καταλληλότερος μέντορας για την εκπόνηση της διατριβής μου.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω ειλικρινά τον αναπληρωτή καθηγητή Μικροβιολογίας και μέλος της τριμελούς επιτροπής κ. Ιωσήφ Παπαπαρασκευά για την καθοδήγηση, ουσιαστική στήριξη και πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχε όλα αυτά τα χρόνια. Η οργανωτικότητά του ήταν καίρια για την επιτυχή ολοκλήρωση της διατριβής.

Στη συνέχεια, επιθυμώ να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή Παθολογίας – Ανοσολογίας και επιβλέποντα της διατριβής κ. Μιχαήλ Σαμάρκο για τη στήριξή του αλλά και τις ουσιαστικές παρατηρήσεις για τη βελτίωση της διατριβής.

Ακόμη, αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στη διευθύντρια του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου του «Λαϊκού» νοσοκομείου κ. Αγγελική Πανταζάτου για τις πολύτιμες γνώσεις μικροβιολογίας που μου μετέδωσε στα χρόνια που εργάστηκα ως ειδικευόμενη ιατρός στο εργαστήριο αλλά και για την άψογη δουλειά της στο εργαστήριο – σε συνεργασία με τους τεχνολόγους - που μας επέτρεψε να υλοποιήσουμε την παρούσα διατριβή.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τον τεχνολόγο στην έδρα της Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών κ. Θανάση Πρίφτη για την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχε σε μεγάλο μέρος των εργαστηριακών πειραμάτων της διατριβής, όπως και τους βιολόγους Κατερίνα Πολονούφη και Δημήτρη Γούκο για τη συνδρομή τους σε μέρος των εργαστηριακών πειραμάτων.

Τέλος, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω τον σύζυγό μου Χρήστο Θρασκιά – στον οποίο αφιερώνεται η διατριβή - για την αγάπη, κατανόηση και υποστήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου.

Δημοσιεύσεις - ανακοινώσεις από τη διατριβή

1. Colistin resistance in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates: Evolution over 15 years and temporal association with colistin use by time series analysis. **Tansarli GS**, Papaparaskevas J, Balaska M, Samarkos M, Pantazatou A, Markogiannakis A, Mantzourani M, Polonyfi K, Daikos GL. *Int J Antimicrob Agents*. 2018 Sep;52(3):397-403. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.06.012.
2. Evolution of resistance to colistin and other last-resort antibiotics among carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates: a 15-year study. **Tansarli GS**, Papaparaskevas J, Pantazatou A, Priftis A, Samarkos M, Daikos GL. *European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)*, Vienna 2017
3. Correlation between colistin use and colistin-resistance in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: modeling with time series analysis. **Tansarli GS**, Thraskias CA, Papaparaskevas J, Markogiannakis A, Pantazatou A, Samarkos M, Daikos GL. *European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)*, Vienna 2017
4. «Εξέλιξη της αντοχής της κολιμυκίνης, της φωσφομυκίνης και της τιγκεκυκλίνης έναντι στελεχών *Klebsiella pneumoniae* ανθεκτικών στις καρβαπενέμες, 2002-2016» (προφορική παρουσίαση) – 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας, Αθήνα, 9-11 Μαρτίου 2017 (προφορική παρουσίαση)
5. «Η δυναμική συσχέτιση ανάμεσα στη χρήση και την εξέλιξη της αντοχής στην κολιμυκίνη σε στελέχη *Klebsiella pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάσες: μοντελοποίηση με ανάλυση χρονοσειρών (time series analysis)» - 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας, Αθήνα, 9-11 Μαρτίου 2017 (προφορική παρουσίαση)

Άλλες δημοσιεύσεις στα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες Εντεροβακτηριακά

1. Antibiotic treatment of infections due to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: systematic evaluation of the available evidence. Falagas ME, Lourida P, Poulidakos P, Rafailidis PI, **Tansarli GS**. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Feb;58(2):654-63. doi: 10.1128/AAC.01222-13. Epub 2013 Sep 30.

2. Deaths attributable to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. Falagas ME, **Tansarli GS**, Karageorgopoulos DE, Vardakas KZ. *Emerg Infect Dis*. 2014 Jul;20(7):1170-5. doi: 10.3201/eid2007.121004.

Βιογραφικό σημείωμα

Γιαννούλα Τάνσαρλη, Ιατρός

Εξειδικευόμενη Κλινικής Μικροβιολογίας

Department of Pathology and Laboratory Medicine, Rhode Island Hospital

Warren Alpert Medical School of Brown University

Providence, RI, USA

Σπουδές - εκπαίδευση

2015 - παρόν: Υποψήφια διδάκτορας, Α' Παθολογική Κλινική, Ιατρική Σχολή Αθηνών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

2005 - 2011: Πτυχίο Ιατρικής, Τμήμα Ιατρικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Αλεξανδρούπολη

Άδειες ασκήσεως ιατρικού επαγγέλματος: Ελλάδα, Η.Π.Α. (Educational Commission for Foreign Medical Graduates - ECFMG)

Επαγγελματική εμπειρία

Φεβρουάριος 2019 – παρόν: Εξειδικευόμενη Κλινικής Μικροβιολογίας, Department of Pathology and Laboratory Medicine, Rhode Island Hospital, Warren Alpert Medical School of Brown University, Providence, Rhode Island, United States of America

Σεπτέμβριος 2017 – Ιανουάριος 2019: Βοηθός κλινικής έρευνας στις Λοιμώξεις, Department of Medicine, Alpert Medical School of Brown University/Rhode Island Hospital, Division of Infectious Diseases, Providence, USA

Οκτώβριος 2013 – Οκτώβριος 2016: Ειδικευόμενη Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Λαϊκό»

Αύγουστος 2011 - Αύγουστος 2017: Εκπαιδευόμενη ερευνήτρια, Άλφα Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Επιστημών, Αθήνα

Τομείς έρευνας:

- Κλινική Μικροβιολογία/Λοιμώξεις

- Επιδημιολογία
- Δημόσια Υγεία

Επίκεντρο έρευνας:

Αντιμικροβιακή αντοχή και θεραπεία λοιμώξεων προκαλούμενες από πολυανθεκτικά Gram-αρνητικά βακτηρίδια

Δημοσιεύσεις σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά με κριτές (καταχωρημένες στο PubMed)

1. Diagnostic test accuracy of the BioFire® FilmArray® meningitis/encephalitis panel: a systematic review and meta-analysis. **Tansarli GS**, Chapin KC. *Clin Microbiol Infect.* 2020 Mar;26(3):281-290. doi: 10.1016/j.cmi.2019.11.016.
2. The Effect of Influenza Vaccination on Mortality and Risk of Hospitalization in Patients With Heart Failure: A Systematic Review and Meta-analysis. Poudel S, Shehadeh F, Zacharioudakis IM, **Tansarli GS**, Zervou FN, Kalligeros M, van Aalst R, Chit A, Mylonakis E. *Open Forum Infect Dis.* 2019 Apr 2;6(4):ofz159. doi: 10.1093/ofid/ofz159. eCollection 2019 Apr.
3. Systematic Review and Meta-analysis of Antibiotic Treatment Duration for Bacteremia Due to Enterobacteriaceae. **Tansarli GS**, Andreatos N, Pliakos EE, Mylonakis E. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019 Apr 25;63(5). pii: e02495-18. doi: 10.1128/AAC.02495-18.
4. The Cost-Effectiveness of Corticosteroids for the Treatment of Community-Acquired Pneumonia. Pliakos EE, Andreatos N, **Tansarli GS**, Ziakas PD, Mylonakis E. *Chest.* 2019 Apr;155(4):787-794. doi: 10.1016/j.chest.2018.11.001.
5. Procalcitonin-guided antibiotic prescribing did not reduce antibiotic use in suspected LRTI in the ED. **Tansarli GS**, Mylonakis E. *Ann Intern Med.* 2018 Oct 16;169(8):JC39. doi: 10.7326/ACPJC-2018-169-8-039.
6. Systematic Review and Meta-analysis of the Efficacy of Short-Course Antibiotic Treatments for Community-Acquired Pneumonia in Adults. **Tansarli GS**, Mylonakis E. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018 Aug 27;62(9). pii: e00635-18. doi: 10.1128/AAC.00635-18.
7. Colistin resistance in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates: Evolution over 15 years and temporal association with colistin use by time series analysis. **Tansarli GS**, Papaparaskevas J, Balaska M, Samarkos M, Pantazatou A, Markogiannakis A, Mantzourani M, Polonyfi K, Daikos GL. *Int J Antimicrob Agents.* 2018 Sep;52(3):397-403. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.06.012.

8. Fecal transplant by oral capsule was noninferior to delivery by colonoscopy for *C. difficile* recurrence. **Tansarli GS**, Mylonakis E. *Ann Intern Med*. 2018 Mar 20;168(6):JC31. doi: 10.7326/ACPJC-2018-168-6-031.
9. Abnormal vaginal flora in symptomatic non-pregnant and pregnant women in a Greek hospital: a prospective study. **Tansarli GS**, Skolidis T, Legakis NJ, Falagas ME. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017 Feb;36(2):227-232. doi: 10.1007/s10096-016-2787-5.
10. Impact of oseltamivir use on the reduction of complications in patients with influenza: a prospective study. Vardakas KZ, Theocharis G, **Tansarli GS**, Rafailidis P, Falagas ME. *Arch Virol*. 2016 Sep;161(9):2511-8. doi: 10.1007/s00705-016-2941-5.
11. *Clostridium difficile* in Crete, Greece: epidemiology, microbiology and clinical disease. Samonis G, Vardakas KZ, **Tansarli GS**, Dimopoulou D, Papadimitriou G, Kofteridis DP, Maraki S, Karanika M, Falagas ME. *Epidemiol Infect*. 2016 Jan;144(1):161-70. doi: 10.1017/S0950268815000837.
12. Compliance with once-daily versus twice or thrice-daily administration of antibiotic regimens: a meta-analysis of randomized controlled trials. Falagas ME, Karagiannis A, Nakouti T, **Tansarli GS**. *PLoS One*. 2015 Jan 5;10(1):e0116207. doi: 10.1371/journal.pone.0116207.
13. Antimicrobial impregnated catheters for prevention of infections in patients with hydrocephalus: a systematic review and meta-analysis. Konstantelias AA, Vardakas KZ, Polyzos KA, **Tansarli GS**, Falagas ME. *J neurosurg* 2015 May;122(5):1096-112. doi: 10.3171/2014.12.JNS14908.
14. Hepatitis B Vaccine alone or in combination with Hepatitis B Immunoglobulin (HBIG) immunization strategies in neonates of HbsAg(+)/HbeAg(-) mothers: a systematic review and meta-analysis. Machaira M, Papaevangelou V, Vouloumanou EK, **Tansarli GS**, Falagas ME. *J Antimicrob Chemother*. 2015 Feb;70(2):396-404. doi: 10.1093/jac/dku404.
15. Determination of MIC distribution of arbekacin, cefminox, fosfomycin and biapenem against Gram-negative clinical isolates in South India: a prospective study. Sangeetha Rajenderan, Balaji V, Shalini Anandan, Sahni RD, **Tansarli GS**, Falagas ME. *PLoS One*. 2014 Jul 28;9(7):e103253. doi: 10.1371/journal.pone.0103253.
16. Deaths attributable to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. Falagas ME, **Tansarli GS**, Karageorgopoulos DE, Vardakas KZ. *Emerg Infect Dis*. 2014 Jul;20(7):1170-5. doi: 10.3201/eid2007.121004.
17. Combination antibiotic treatment versus monotherapy for multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant *Acinetobacter* infections: a systematic

- review. Poulikakos P, **Tansarli GS**, Falagas ME. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014 Oct;33(10):1675-85. doi: 10.1007/s10096-014-2124-9.
18. Effectiveness and safety of high-dose tigecycline-containing regimens for the treatment of severe bacterial infections. Falagas ME, Vardakas KZ, Tsiveriotis KP, Triarides NA, **Tansarli GS**. *Int J Antimicrob Agents*. 2014 Feb 6. pii: S0924-8579(14)00020-X. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.01.006.
 19. Proportion of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing isolates among Enterobacteriaceae in Africa: evaluation of the evidence--systematic review. **Tansarli GS**, Poulikakos P, Kapaskelis A, Falagas ME. *J Antimicrob Chemother*. 2014 May;69(5):1177-84. doi: 10.1093/jac/dkt500.
 20. Use of negative pressure wound therapy in breast tissues: evaluation of the literature. Kostaras E, **Tansarli GS**, Falagas ME. *Surg Infect (Larchmt)*. 2014 Dec;15(6):679-85. doi: 10.1089/sur.2013.165.
 21. Vacuum-Assisted Closure versus Closure without Vacuum Assistance for Preventing Surgical Site Infections and Infections of Chronic Wounds: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Tansarli GS**, Vardakas KZ, Stratoulis C, Peppas G, Kapaskelis A, Falagas ME. *Surg Infect (Larchmt)*. 2014 Aug;15(4):363-7. doi: 10.1089/sur.2013.028.
 22. Morbidity and outcomes of foreign travelers in Zakynthos island, Greece: a retrospective study. Plessa E, **Tansarli GS**, Xanthopoulos D, Falagas ME. *PLoS One*. 2014 Apr 11;9(4):e94416. doi: 10.1371/journal.pone.0094416.
 23. Clinical outcomes with extended or continuous versus short-term intravenous infusion of carbapenems and piperacillin/tazobactam: a systematic review and meta-analysis. Falagas ME, **Tansarli GS**, Ikawa K, Vardakas KZ. *Clin Infect Dis*. 2013 Jan;56(2):272-82. doi: 10.1093/cid/cis857.
 24. Continuous versus conventional infusion of amphotericin B deoxycholate: a meta-analysis. Falagas ME, Karageorgopoulos DE, **Tansarli GS**. *PLoS One*. 2013 Oct 21;8(10):e77075. doi: 10.1371/journal.pone.0077075.
 25. Antibiotic treatment of infections due to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: systematic evaluation of the available evidence. Falagas ME, Lourida P, Poulikakos P, Rafailidis PI, **Tansarli GS**. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Feb;58(2):654-63. doi: 10.1128/AAC.01222-13.
 26. Trends of mortality due to septicemia in Greece: an 8-year analysis. Falagas ME, Korbila IP, Kapaskelis A, Manousou K, Leontiou L, **Tansarli GS**. *PLoS One*. 2013 Jul 2;8(7):e67621. doi: 10.1371/journal.pone.0067621.

27. Extended or continuous versus short-term intravenous infusion of cephalosporins: a meta-analysis. Korbila IP, **Tansarli GS**, Karageorgopoulos DE, Vardakas KZ, Falagas ME. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013 Jun;11(6):585-95. doi: 10.1586/eri.13.44.
28. Evaluation of antimicrobial susceptibility of Enterobacteriaceae causing urinary tract infections in Africa. **Tansarli GS**, Athanasiou S, Falagas ME. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Aug;57(8):3628-39. doi: 10.1128/AAC.00359-13.
29. Evaluation of fosfomycin activity against uropathogens in a fosfomycin-naive population in South India: a prospective study. Sahni RD, Balaji V, Varghese R, John J, **Tansarli GS**, Falagas ME. *Future Microbiol*. 2013 May;8(5):675-80. doi: 10.2217/fmb.13.31.
30. Iron deficiency and susceptibility to infections: evaluation of the clinical evidence. **Tansarli GS**, Karageorgopoulos DE, Kapaskelis A, Gkegkes I, Falagas ME. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013 Oct;32(10):1253-8. doi: 10.1007/s10096-013-1877-x.
31. Antimicrobial activity and clinical effectiveness of sisomicin: an evaluation of the literature (1995-2011). **Tansarli GS**, Rafailidis PI, Papazoglou AA, Falagas ME. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013 Apr;11(4):421-8. doi: 10.1586/eri.13.18.
32. Reply to Soman et al and Fripiat et al. Falagas ME, **Tansarli GS**, Ikawa K, Vardakas KZ. *Clin Infect Dis*. 2013 Jul;57(2):325-7. doi: 10.1093/cid/cit202.
33. Impact of antimicrobial multidrug resistance on inpatient care cost: an evaluation of the evidence. **Tansarli GS**, Karageorgopoulos DE, Kapaskelis A, Falagas ME. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013 Mar;11(3):321-31. doi: 10.1586/eri.13.4.
34. Prevalence and treatment of aerobic vaginitis among non-pregnant women: evaluation of the evidence for an underestimated clinical entity. **Tansarli GS**, Kostaras EK, Athanasiou S, Falagas ME. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013 Aug;32(8):977-84. doi: 10.1007/s10096-013-1846-4.
35. Ertapenem use and antimicrobial resistance to group 2 carbapenems in Gram-negative infections: a systematic review. Falagas ME, **Tansarli GS**, Kapaskelis A, Vardakas KZ. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013 Jan;11(1):69-78. doi: 10.1586/eri.12.149.
36. β -Lactam plus aminoglycoside or fluoroquinolone combination versus β -lactam monotherapy for *Pseudomonas aeruginosa* infections: a meta-analysis. Vardakas KZ, **Tansarli GS**, Bliziotis IA, Falagas ME. *Int J Antimicrob Agents*. 2013 Apr;41(4):301-10. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.12.006.
37. A prospective study of characteristics and outcomes of bacteremia in patients with solid organ or hematologic malignancies. Samonis G, Vardakas KZ, Maraki S, **Tansarli GS**,

- Dimopoulou D, Kofteridis DP, Andrianaki AM, Falagas ME. *Support Care Cancer*. 2013 Sep;21(9):2521-6. doi: 10.1007/s00520-013-1816-5.
38. Impact of vacuum-assisted closure (VAC) therapy on clinical outcomes of patients with sternal wound infections: a meta-analysis of non-randomized studies. Falagas ME, **Tansarli GS**, Kapaskelis A, Vardakas KZ. *PLoS One*. 2013 May 31;8(5):e64741. doi: 10.1371/journal.pone.0064741.
 39. Association between use of air-conditioning or fan and survival of elderly febrile patients: a prospective study. Theocharis G, **Tansarli GS**, Mavros MN, Spiropoulos T, Barbas SG, Falagas ME. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013 Sep;32(9):1143-7. doi: 10.1007/s10096-013-1860-6.
 40. Frequency of the off-label use of antibiotics in clinical practice: a systematic review. **Tansarli GS**, Rafailidis PI, Kapaskelis A, Falagas ME. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012 Dec;10(12):1383-92. doi: 10.1586/eri.12.137.
 41. Impact of vancomycin minimum inhibitory concentration on clinical outcomes of patients with vancomycin-susceptible *Staphylococcus aureus* infections: a meta-analysis and meta-regression. Mavros MN, **Tansarli GS**, Vardakas KZ, Rafailidis PI, Karageorgopoulos DE, Falagas ME. *Int J Antimicrob Agents*. 2012 Dec;40(6):496-509. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.07.023.
 42. Carbapenems versus alternative antibiotics for the treatment of bacteraemia due to Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases: a systematic review and meta-analysis. Vardakas KZ, **Tansarli GS**, Rafailidis PI, Falagas ME. *J Antimicrob Chemother*. 2012 Dec;67(12):2793-803. doi: 10.1093/jac/dks301.
 43. Impact of antibiotic MIC on infection outcome in patients with susceptible Gram-negative bacteria: a systematic review and meta-analysis. Falagas ME, **Tansarli GS**, Rafailidis PI, Kapaskelis A, Vardakas KZ. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Aug;56(8):4214-22. doi: 10.1128/AAC.00663-12. Epub 2012 May 21.

Αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών (citations) ερευνητικού έργου σύμφωνα με το Google Scholar: >2.200

Ανακοινώσεις σε ελληνικά και διεθνή συνέδρια

- *Mycoplasma genitalium* assay results in low and high-risk populations: implications for sexually transmitted infection panel menu. Vickery L, **Tansarli GS**, Andrade M, Gomes J, Chapin K. *Association for Molecular Pathology (AMP)*, Baltimore 2019
- Evolution of resistance to colistin and other last-resort antibiotics among carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates: a 15-year study. **Tansarli GS**, Papaparaskevas J, Pantazatou A, Priftis A, Samarkos M, Daikos GL. *European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)*, Vienna 2017
- Correlation between colistin use and colistin-resistance in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: modeling with time series analysis. **Tansarli GS**, Thraskias CA, Papaparaskevas J, Markogiannakis A, Pantazatou A, Samarkos M, Daikos GL. *European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)*, Vienna 2017
- Aerobic vaginitis in pregnant and non-pregnant women in a Greek hospital: a prospective study. Skolidis T, **Tansarli GS**, Legakis NJ, Falagas ME. *European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)*, Amsterdam 2016
- Αρθρίτιδα από *Rhizopus oryzae* σε ασθενή με IgA nephropathy. **Τάνσαρλη Γ**, Σμυλάκου Σ, Τζαμπάρλης Ε, Σκαλιώτη Χ, Μαρινάκη Σ, Πανταζάτου Α. 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας, Αθήνα, 25-28 Φεβρουαρίου 2015
- β -Lactam plus aminoglycoside or fluoroquinolone combination versus β -lactam monotherapy for *Pseudomonas aeruginosa* infections: a meta-analysis. Vardakas KZ, **Tansarli GS**, Bliziotis IA, Falagas ME. *European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)*, Berlin 2013
- Impact of vacuum-assisted closure (VAC) therapy on clinical outcomes of patients with sternal wound infections: a meta-analysis of non-randomized studies. Falagas ME, **Tansarli GS**, Kapaskelis A, Vardakas KZ. *European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)*, Berlin 2013

Εισηγήσεις/διαλέξεις σε ελληνικά συνέδρια

- «Εξέλιξη της αντοχής της κολιμυκίνης, της φωσφομυκίνης και της τιγκεκυκλίνης έναντι στελεχών *Klebsiella pneumoniae* ανθεκτικών στις καρβαπενέμες, 2002-2016» – 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας, Αθήνα, 9-11 Μαρτίου 2017
- «Η δυναμική συσχέτιση ανάμεσα στη χρήση και την εξέλιξη της αντοχής στην κολιμυκίνη σε στελέχη *Klebsiella pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάσες: μοντελοποίηση με ανάλυση χρονοσειρών (time series analysis)» - 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας, Αθήνα, 9-11 Μαρτίου 2017
- «Κυρίαρχοι μηχανισμοί αντοχής Gram-αρνητικών μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά στην Ελλάδα» – 11^{ος} Δεκάλογος για τις Λοιμώξεις, Νοσοκομείο «Ιασώ», Αθήνα, 12 Δεκεμβρίου 2015
- «Αποδοτέα θνητότητα λοιμώξεων που προκαλούνται από Εντεροβακτηριακά που παράγουν καρβαπενεμάσες» – 8^{ος} Δεκάλογος για τις Λοιμώξεις, Νοσοκομείο «Μητέρα», Αθήνα, 15 Δεκεμβρίου 2012

Βραβεία - διακρίσεις

- Έγκριση EB-1A πράσινης κάρτας (green card) για μόνιμη άδεια παραμονής στις ΗΠΑ από το Υπουργείο Εσωτερικής Ασφάλειας των ΗΠΑ (USCIS) το Μάρτιο 2019 κατηγορία «άτομο με εξαιρετικές ικανότητες – extraordinary ability» στην έρευνα στον τομέα των Λοιμώξεων και της Μικροβιολογίας
- Βραβείο από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών για άριστη επίδοση στις σπουδές στο τμήμα Ιατρικής του Δημοκριτείου Πανεπιστημίου Θράκης σχολή κατά το ακαδημαϊκό έτος 2005-2006
- Τιμητική διάκριση από τη Γενική Γραμματεία Νέας Γενιάς του Υπουργείου Παιδείας για άριστη επίδοση στις πανελλαδικές κατά το σχολικό έτος 2003-2004

Περίληψη

Η βακτηριαμία από *Klebsiella pneumoniae* που παράγει καρβαπενεμάσες (CP-Kp) σχετίζεται με υψηλά ποσοστά θνητότητας και συχνά, η κολιμυκίνη αποτελεί το μοναδικό αντιβιοτικό που διατηρεί δραστικότητα έναντι αυτών των παθογόνων μικροοργανισμών. Στην παρούσα μελέτη i) ελέγξαμε τη δραστικότητα αντιβιοτικών «τελευταίας γραμμής» έναντι CP-Kp στελεχών που απομονώθηκαν από το αίμα ασθενών που νοσηλεύτηκαν στο Λαϊκό νοσοκομείο την περίοδο 2002-2016 και ii) διερευνήσαμε την εξέλιξη της αντοχής στην κολιμυκίνη την ίδια χρονική περίοδο, καθώς και την ύπαρξη δυναμικής συσχέτισης μεταξύ της αντοχής στην κολιμυκίνη και της χρήσης του αντιβιοτικού.

Συνολικά, 313 στελέχη βρέθηκαν θετικά για την παραγωγή τουλάχιστον μίας καρβαπενεμάσης με τη μέθοδο της πολυπλεκτικής PCR κατά την χρονική περίοδο της μελέτης μας και ονομάστηκαν CP-Kp (carbapenemase-producing *K. pneumoniae*). Από τα 313 CP-Kp στελέχη, τα 197 (62,9%) ήταν ανθεκτικά στη μεροπενέμη (ΕΑΠ >8 mg/L), τα 79 (25,2%) είχαν ΕΑΠ στη μεροπενέμη που κυμαινόταν στο εύρος 4–8 mg/L και τα 37 (11,8%) ήταν ευαίσθητα (ΕΑΠ ≤2 mg/L). Όσον αφορά τα υπόλοιπα αντιβιοτικά που ελέγχθηκαν, 35,1% (110/313) ήταν ανθεκτικά στην κολιμυκίνη, 30% (94/313) στη φωσφομυκίνη και 5,4% (17/313) στην τιγκεκυκλίνη. Η πολυμυξίνη Β παρουσίασε το ίδιο προφίλ ευαισθησίας με την κολιμυκίνη και οι τιμές ΕΑΠ διέφεραν κατά μία ή δύο αραιώσεις, χωρίς διαφορά στην κατηγοριοποίηση των αποτελεσμάτων ως ευαίσθητα ή ανθεκτικά. Από τα 313 στελέχη που περιείχαν γονίδια που κωδικοποιούσαν καρβαπενεμάσες, 198 (63,3%) ήταν KPC, 89 (28,4%) ήταν VIM, 17 (5,4%) ήταν NDM-1 και 4 (1,3%) ήταν OXA-48. Πέντε στελέχη έφεραν περισσότερα από ένα γονίδια αντοχής (3 στελέχη είχαν KPC και VIM, 1 KPC και NDM-1 και 1 VIM και NDM-1).

Στη συνέχεια, μελετήσαμε την τάση της αντοχής της κολιμυκίνης στο νοσοκομείο μας κατά τη χρονική περίοδο 2002-2016 εφαρμόζοντας την στατιστική ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης (linear regression analysis). Βρήκαμε ότι η αντοχή στην κολιμυκίνη παρουσίασε στατιστικώς σημαντική αυξητική τάση στον χρόνο, από 0% το 2002 σε 26,9% το 2016 [$R^2 = 0,5$, $p < 0,01$; point estimate of coefficient, 2,97, 95% confidence interval (CI) 1,20–4,75; standard error of the slope coefficient, 0,82]. Επιπλέον, παρατηρήθηκε αυξητική τάση στον χρόνο στην χρήση της κολιμυκίνης, από 0,2 DDDs/100 ασθενο-ημέρες το πρώτο τρίμηνο του 2002 σε 7,10 DDDs/100 ασθενο-ημέρες το δεύτερο τρίμηνο του 2016 ($R^2 = 0,54$, $p < 0,01$; point estimate of coefficient, 0,66, 95% CI 0,49–0,82; standard error of the slope coefficient, 0,08).

Τέλος, για να διερευνήσουμε την πιθανή συσχέτιση μεταξύ της αντοχής στην κολιμυκίνη και χρήσης του αντιβιοτικού στο νοσοκομείο μας εφαρμόσαμε την στατιστική μέθοδο ανάλυσης χρονοσειρών (time series analysis). Η συνολική επίπτωση της ανθεκτικής στην κολιμυκίνη *K. pneumoniae* υπολογίστηκε ότι ήταν 0,37 στελέχη ανά 10.000 ασθενο-ημέρες και η μέση χρήση κολιμυκίνης ανά τρίμηνο ήταν 5,14 DDDs/100 ασθενο-ημέρες. Αφού δημιουργήσαμε τις επιμέρους χρονοσειρές της αντοχής και της χρήσης της κολιμυκίνης χρησιμοποιώντας τη μέθοδο των Box και Jenkins, στη συνέχεια κατασκευάσαμε το μοντέλο γραμμικής συνάρτησης μεταφοράς (linear transfer function model) το οποίο μας έδωσε τη δυνατότητα να ποσοτικοποιήσουμε τη δυναμική συσχέτιση μεταξύ χρήσης κολιμυκίνης και αντοχής στο φάρμακο. Το μοντέλο ανέδειξε την ύπαρξη αυτής της δυναμικής συσχέτισης και συγκεκριμένα, ότι η αύξηση της χρήσης κολιμυκίνης κατά 1 DDD/100 ασθενο-ημέρες οδηγεί σε +0.05 αύξηση της επίπτωσης αντοχής στην κολιμυκίνη. Μάλιστα, η επίδραση της κολιμυκίνης στην αύξηση της αντοχής εμφανίζεται μετά από διάστημα 3 μηνών. Σύμφωνα με το μοντέλο, η χρήση κολιμυκίνης και η προηγούμενη αντοχή στην κολιμυκίνη μπορούν να εξηγήσουν το 69% της αντοχής στην κολιμυκίνη. Άλλοι παράγοντες συμβάλλουν στην ανάπτυξη του υπόλοιπου 31% της αντοχής.

Συνοψίζοντας, τα ευρήματά μας μπορούν και πρέπει να αποτελέσουν το σημείο εκκίνησης για την εφαρμογή αυστηρών μέτρων με σκοπό την ελάττωση της αντοχής στην κολιμυκίνη στο νοσοκομείο μας.

Summary

Bacteremia caused by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* (CP-Kp) is associated with increased mortality and often, colistin is the only available antibiotic against these infections. In the present study, we i) tested last-resort antibiotics against CP-Kp blood isolates from patients who were hospitalized in Laiko hospital, a 500-bed tertiary care hospital in Athens, Greece, between 2002 and 2016, ii) investigated the trends of antimicrobial resistance to colistin over time as well as its temporal association of colistin use during the study period.

In total, 313 blood isolates were tested positive for carbapenemase production with multiplex PCR during the study period. Of them, 197 (62.9%) were resistant to meropenem (MIC >8 mg/L), 79 (25.2%) exhibited meropenem MICs of 4-8 mg/L and 37 (11.8%) displayed MICs in the susceptible range (MIC ≤2 mg/L). Resistance frequencies to colistin, fosfomycin and tigecycline were 35.1% (110/313), 30.0% (94/313) and 5.4% (17/313), respectively. Polymyxin B displayed the same susceptibility pattern as colistin, with the MICs of the two antibiotics differing by one or two dilutions without difference in interpretation. Among 313 isolates containing carbapenemase-encoding gene(s), *bla*_{KPC} was detected in 198 isolates (63.3%), *bla*_{VIM} in 89 (28.4%), *bla*_{NDM-1} in 17 (5.4%) and *bla*_{OXA-48} in 4 (1.3%). Five isolates carried more than one carbapenemase gene (three carried *bla*_{KPC} + *bla*_{VIM}, one carried *bla*_{KPC} + *bla*_{NDM-1} and one carried *bla*_{VIM} + *bla*_{NDM-1}).

Then, we studied the trends of antimicrobial resistance to colistin in our hospital during 2002-2016 using the linear regression analysis. The analysis revealed a statistically significant increasing trend in colistin resistance over time from 0% in 2002 to 26.9% in 2016 [$R^2 = 0.5$, $p < 0.01$; point estimate of coefficient, 2.97, 95% confidence interval (CI) 1.20–4.75; standard error of the slope coefficient, 0.82]. Similarly, an increasing trend in the use of colistin over time was observed ($R^2 = 0.54$, $p < 0.01$; point estimate of coefficient, 0.66, 95% CI 0.49–0.82; standard error of the slope coefficient, 0.08), from 0.2 DDDs/100 patient-days in the first trimester of 2002 to 7.10 DDDs/100 patient-days in the second trimester of 2016.

Last, in order to examine the potential correlation between colistin use and resistance we used time series analysis. The overall incidence rate of colistin-resistant *K. pneumoniae* was 0.37 isolates per 10.000 patient-days and the average quarterly colistin use was 5.14 DDDs/100 patient-days. After constructing the individual time series for colistin resistance and use, we built a linear transfer function model which enabled us to quantify the dynamic

relationship between colistin use and resistance. Specifically, a temporal association between colistin use and resistance was observed; an increase in colistin use by 1 DDD/100 patient-days led to a 0.05 increase in the incidence rate of colistin resistance. The time lag between the effect of colistin use on subsequent variations in colistin resistance was 3 months. Colistin use and prior levels of colistin resistance could explain 69% of colistin resistance; in the remaining 31%, other factors might have played a role.

In conclusion, the findings of the present study have important implications in implementing strategies to contain colistin resistance in our hospital.

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή

Οι λοιμώξεις από στελέχη *Klebsiella pneumoniae* (Κλεμπσιέλλα της πνευμονίας) ανθεκτική στις καρβαπενέμες έχουν αναδειχθεί σε μείζον πρόβλημα στα νοσοκομεία ανά τον κόσμο. Στα ελληνικά νοσοκομεία η ανθεκτική στις καρβαπενέμες *K. pneumoniae* είναι το συχνότερο αίτιο βακτηριακών σύμφωνα με δεδομένα του ελληνικού σχεδίου δράσης «Προκρούστης»¹. Η αντοχή στις καρβαπενέμες οφείλεται κυρίως στην παραγωγή καρβαπενεμασών οι οποίες είναι β-λακταμάσες που υδρολύουν όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά συμπεριλαμβανομένου και των καρβαπενεμών. Οι καρβαπενεμάσες που απαντώνται συχνότερα είναι οι KPC (*K. pneumoniae* carbapenemase) (class A κατά Ambler) και οι μεταλλο-β-λακταμάσες VIM (Verona integron metallo-beta-αμφότερες). Η KPC καρβαπενεμάση υδρολύει επιπλέον και τις μονοβακτάμες, σε αντίθεση με τις μεταλλο-β-λακταμάσες.

Το πρώτο στέλεχος *K. pneumoniae* που παρήγαγε καρβαπενεμάση ανιχνεύθηκε στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής το 1996² και η καρβαπενεμάση ήταν KPC. Το 2002 ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα *K. pneumoniae* που παρήγαγε καρβαπενεμάση η οποία ήταν VIM³. Η πρώτη KPC *K. pneumoniae* στην Ελλάδα ανιχνεύθηκε το 2008⁴. Έκτοτε, τα στελέχη VIM σταδιακά ελαττώνονταν και παράλληλα αυξάνονταν τα στελέχη KPC τα οποία πλέον κυριαρχούν στα ελληνικά νοσοκομεία. Όσον αφορά τα στελέχη που παράγουν NDM-1 καρβαπενεμάση, η πρώτη NDM-1 *K. pneumoniae* ανιχνεύθηκε στην Ελλάδα το 2013⁵, αλλά δεν έχει εξαπλωθεί ευρέως μέχρι αυτήν τη στιγμή.

Σύμφωνα με στοιχεία του ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) η Ελλάδα θεωρείται χώρα ενδημική για λοιμώξεις από KPC *K. pneumoniae*⁶. Μάλιστα, η χώρα μας πρωτοστατεί μαζί με την Ιταλία και τη Μάλτα στην απομόνωση στελεχών Εντεροβακτηριακών που παράγουν καρβαπενεμάσες⁶. Ειδικότερα, σύμφωνα με τα στοιχεία του EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network) η χώρα μας καταλαμβάνει τη χειρότερη θέση στον ευρωπαϊκό χάρτη όσον αφορά το ποσοστό των *K. pneumoniae* (μόνο στελέχη που απομονώνονται από ασθενείς με βακτηριαιμία) που είναι ανθεκτικές στις καρβαπενέμες με το ποσοστό να βρίσκεται μεταξύ 25 και 49% για τα έτη 2005-2010 και να ξεπερνά το 50% από το 2011 μέχρι σήμερα⁷. Ωστόσο, σύμφωνα πάλι με τα δεδομένα του EARS-Net, αξίζει να σημειωθεί ότι τα έτη 2012 και 2013 η αντοχή της *K.*

pneumoniae στις καρβαπενέμες εμφανίζει για πρώτη φορά από το 2005 πτωτική πορεία στην Ελλάδα⁷.

Οι λοιμώξεις από πολυανθεκτική *K. pneumoniae* συμβαίνουν κυρίως σε ασθενείς με υψηλό δείκτη συννοσηρότητας και χαρακτηρίζονται από πολύ υψηλά ποσοστά θνησιμότητας, αύξηση της διάρκειας νοσηλείας των ασθενών και κατ' επέκταση αύξηση του οικονομικού κόστους για τα νοσοκομεία. Οι θεραπευτικές επιλογές για την αντιμετώπιση αυτών των λοιμώξεων είναι πολύ περιορισμένες, καθώς δεν υπάρχουν διαθέσιμα νέα αποτελεσματικά αντιβιοτικά. Συνεπώς, χορηγούνται συνδυασμοί των ήδη υπαρχόντων αντιβιοτικών ανάμεσα από αμινογλυκοσίδες, κολιμυκίνη, τιγκεκυκλίνη ή φωσφομυκίνη.

Η κολιμυκίνη (πολυμυξίνη Ε) είναι παλιό αντιβιοτικό η χρήση του οποίου είχε εγκαταλειφθεί λόγω της προκαλούμενης νεφροτοξικότητας. Ωστόσο, η έλλειψη αποτελεσματικών αντιβιοτικών για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων από πολυανθεκτικά μικρόβια σε συνδυασμό με την υψηλή δραστηριότητα της κολιμυκίνης έναντι αυτών των μικροβίων επανέφερε το αντιβιοτικό αυτό στη θεραπευτική φαρέτρα των κλινικών ιατρών. Δυστυχώς, η πολύ υψηλή κατανάλωση της κολιμυκίνης στα ελληνικά νοσοκομεία - η Ελλάδα κατέλαβε την πρώτη θέση στην Ευρώπη το 2013 όσον αφορά την κατανάλωση κολιμυκίνης¹ - είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων αντοχής της *K. pneumoniae* στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Σύμφωνα με δεδομένα του «Προκρούστη» που αφορούν βακτηριαμίες το έτος 2013, τα απομονωθέντα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *K. pneumoniae* (κλινικές και ΜΕΘ) εμφανίζουν ποσοστό αντοχής στην κολιμυκίνη 26%¹. Οι μηχανισμοί αντοχής της *K. pneumoniae* στην κολιμυκίνη είναι ένα θέμα το οποίο δεν έχει μελετηθεί εκτενώς και μέχρι αυτήν τη στιγμή δε γνωρίζουμε τίποτα για τους μηχανισμούς αντοχής των στελεχών που ενδημούν στην Ελλάδα. Ο κύριος μηχανισμός αντοχής που έχει μελετηθεί αφορά την απενεργοποίηση του *mgrB* γονιδίου⁸. Ειδικότερα, η παρουσία κατιονικών πεπτιδίων, όπως είναι η κολιμυκίνη, ενεργοποιεί την κινάση *PhoQ* του *PhoPQ* συστήματος μεταγωγής σημάτων του μικροβίου κι αυτό στη συνέχεια ενεργοποιεί το *PhoP* με φωσφορυλίωση. Ακολούθως, το *PhoP* ενεργοποιεί την έκφραση του *pmrHFIJKLM* οπερονίου το οποίο κωδικοποιεί ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση και τη μεταφορά της 4-αμινο-4-δεοξυ-L-αραβινόζης (L-Ara4N). Η προσκόλληση της L-Ara4N στο λιπίδιο Α τροποποιεί τη λιποπολυσακχαριδική υπομονάδα (LPS) της εξωτερικής μεμβράνης του μικροβίου μεταβάλλοντας το φορτίο της, κι έτσι ελαττώνεται η συνδεσιμότητα της κολιμυκίνης στο μικρόβιο με τελικό αποτέλεσμα την αντοχή του μικροβίου στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Το *mgrB* γονίδιο είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που ενισχύει αρνητικά με

το *PhoPQ* σύστημα αναστέλλοντας τη δραστηριότητα της *PhoQ* κινάσης κι έπειτα τη φωσφορυλίωση του *PhoP*. Επομένως, η απενεργοποίηση του *mgrB* γονιδίου ενισχύει θετικά το *PhoPQ* σύστημα και άρα την έκφραση του *pmrHFIJKLM* οπερονίου, με αποτέλεσμα την τροποποίηση της λιποπολυσακχαριδικής υπομονάδας της εξωτερικής μεμβράνης της *K. pneumoniae* από τα προϊόντα του οπερονίου και τελικά την αντοχή της *K. pneumoniae* στην κολιμυκίνη.

Πρόσφατα ανιχνεύθηκε ένας νέος μηχανισμός αντοχής στην κολιμυκίνη ο οποίος οφείλεται στο γονίδιο *mcr-1*. Ο μηχανισμός αυτός πρωτο-ανιχνεύθηκε στην Κίνα σε μικροβιακά στελέχη *Escherichia coli* και *Klebsiella pneumoniae* που απομονώθηκαν από ζώα παραγωγής τροφίμων αλλά και από νοσηλευόμενους ασθενείς που έπασχαν από λοίμωξη⁹. Το γονίδιο *mcr-1* βρίσκεται σε πλασμίδιο, σε αντίθεση με τους μέχρι τώρα γνωστούς μηχανισμούς αντοχής έναντι της κολιμυκίνης οι οποίοι ήταν χρωμοσωμιακοί. Το νέο αυτό εύρημα έχει μεγάλη σημασία καθώς οι πλασμιδιακοί μηχανισμοί αντοχής είναι δυνατό να μεταδοθούν οριζόντια με αποτέλεσμα να έχουν μεγάλο δυναμικό εξάπλωσης.

Ο έλεγχος της αντοχής της κολιμυκίνης είναι μια αμφιλεγόμενη από τεχνικής άποψης διαδικασία. Μεθοδολογικά και τεχνικά προβλήματα έχουν διαπιστωθεί σχεδόν σε όλες τις μεθόδους που εφαρμόζονται, καθιστώντας τα πολυκεντρικά δεδομένα αντοχής που έχουν ήδη συγκεντρωθεί και τα οποία βασίζονται είτε στην μέθοδο διάχυσης δίσκων κατά Kirby-Bauer είτε την μέθοδο των ταινιών διαβαθμισμένης συγκέντρωσης, το λιγότερο συζητήσιμα. Τα δεδομένα στον Ελλαδικό χώρο που έχουν παραχθεί με την πρότυπη μέθοδο αναφοράς, που είναι η μέθοδος αραιώσεων του αντιβιοτικού σε άγαρ, είναι ουσιαστικά ανύπαρκτα.

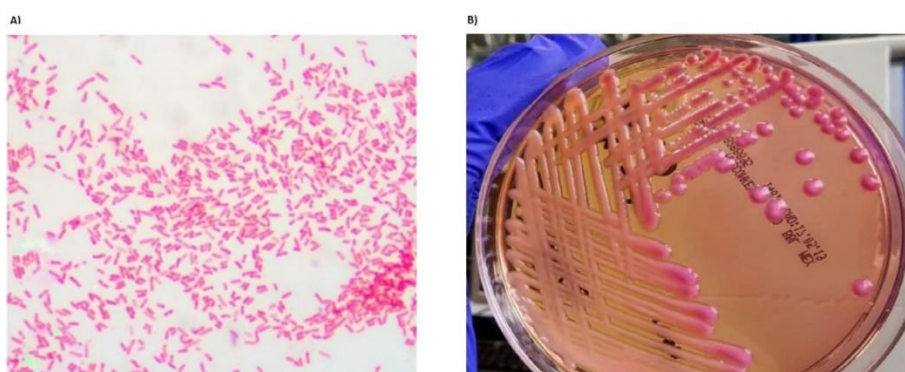
Σημαντική θέση στη θεραπεία των πολυανθεκτικών λοιμώξεων από *K. pneumoniae* κατέχουν επίσης η τιγκεκυκλίνη και η φωσφομυκίνη. Η τιγκεκυκλίνη είναι μια γλυκυλκυκλίνη η οποία εγκρίθηκε από τον FDA (Food and Drug Administration) το 2005 και έκτοτε χρησιμοποιείται για τη θεραπεία λοιμώξεων από πολυανθεκτικά στελέχη *Acinetobacter baumannii* και Εντεροβακτηριακών. Ωστόσο, η τιγκεκυκλίνη χρησιμοποιείται στη θεραπεία της βακτηριαμίας εκτός ενδείξεων, εξαιτίας της έλλειψης άλλων δραστικών αντιβιοτικών. Επιπλέον, η τιγκεκυκλίνη δεν επιτυγχάνει υψηλές συγκεντρώσεις στο αίμα των ασθενών. Συνεπώς, η χρήση της στην περίπτωση βακτηριαμίας χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή. Όσον αφορά τη φωσφομυκίνη, πρόκειται για ένα παλιό αντιβιοτικό το οποίο χρησιμοποιούνταν κατά κύριο λόγο στη θεραπεία των ουρολοιμώξεων και επανήλθε στο προσκήνιο τα τελευταία χρόνια λόγω της αναδυόμενης αντιμικροβιακής αντοχής. Χρησιμοποιείται στη θεραπεία της βακτηριαμίας από *K. pneumoniae* όταν δεν υπάρχουν αποτελεσματικές

εναλλακτικές θεραπευτικές επιλογές και πάντα σε συνδυασμό με άλλο αντιβιοτικό εξαιτίας της ιδιότητάς του να αναπτύσσει γρήγορα αντοχή όταν χορηγείται ως μονοθεραπεία.

1. *Klebsiella pneumoniae*

1.1 Ιστορική αναδρομή – Γενικά μικροβιολογικά στοιχεία

Η *K. pneumoniae* είναι παθογόνος μικροοργανισμός ο οποίος απομονώθηκε για πρώτη φορά στα τέλη του 19^{ου} αιώνα από τον μικροβιολόγο Edwin Klebs, από τον οποίο έλαβε και το όνομά της. Είναι ένα αρνητικό κατά Gram, μη κινητό, ραβδόμορφο αερόβιο βακτηρίδιο (Εικόνα 1Α) το οποίο ανήκει στο γένος *Klebsiella* spp. της οικογένειας των Εντεροβακτηριακών. Αναφορικά με τις βιοχημικές της ιδιότητες, η *K. pneumoniae* ζυμώνει τη λακτόζη γι' αυτό και οι αποικίες που δημιουργεί σε MacConkey άγαρ είναι ροζ χρώματος (Εικόνα 1Β). Επίσης, η *K. pneumoniae* είναι θετική στη δοκιμασία των κιτρικών και αρνητική στη δοκιμασία της ινδόλης. Το βακτήριο δεν περιέχει κυτόχρωμα c οξειδάση κι έτσι η δοκιμασία οξειδάσης είναι αρνητική. Η *K. pneumoniae* δημιουργεί βλεννώδεις αποικίες και η μεγάλη ποσότητα της βλέννης έχει συσχετιστεί με τη λοιμογονικότητα του μικροβιακού στελέχους¹⁰.



Εικόνα 1: Α) εικόνα από χρώση Gram θετικής αιμοκαλλιέργειας με *K. pneumoniae*. Β) καλλιέργημα *K. pneumoniae* σε MacConkey άγαρ.

1.2 Παθογένεια της λοίμωξης

Η *K. pneumoniae* διαθέτει πολλαπλούς λοιμογόνους παράγοντες οι οποίοι μπορούν να συμβάλλουν στην παθογένεση της λοίμωξης. Οι κυριότεροι παράγοντες λοιμογονικότητας αναφέρονται παρακάτω:

ι) Ορότυποι καψικού πολυσακχαρίτη

Τα αντιγόνα καψικού πολυσακχαρίτη της *K. pneumoniae* μπορούν να ταξινομηθούν σε 77 ορότυπους. Ο επιπολασμός των διαφόρων ορότυπων ποικίλλει ευρέως από περιοχή σε περιοχή¹¹. Ο K2 είναι ο συχνότερος ορότυπος που απαντάται σε στελέχη που

απομονώνονται από ασθενείς με ουρολοιμώξεις, πνευμονία ή βακτηραιμία παγκοσμίως. Επίσης, τα στελέχη με ορότυπο K1 θεωρούνται περισσότερο λοιμογόνα από τα υπόλοιπα και είναι αυτά που προκαλούν πυογόνο απόστημα ήπατος¹².

ii) Υπερβλεννώδης φαινότυπος

Τα στελέχη αυτά διακρίνονται για την αυξημένη παραγωγή βλέννης η οποία είναι εμφανής όταν οι αποικίες αναπτυχθούν στο άγαρ. Το γονίδιο *rmpA* είναι υπεύθυνο για την έκφραση του υπερβλεννώδους φαινότυπου, αφού ενεργοποιεί ένα γονιδιακό σύμπλεγμα (*cps*) για τη σύνθεση των βλεννοπολυσακχαριτών της κάψας. Τα υπερβλεννώδη στελέχη να προκαλέσουν σοβαρές διηθητικές λοιμώξεις (π.χ. οστεομυελίτιδα, σηπτική αρθρίτιδα, νεφρικά αποστήματα) σε ανοσοεπαρκή άτομα αλλά και πυογόνο απόστημα ήπατος.

iii) Σιδηροφόρα μόρια

Ο σίδηρος είναι απαραίτητο θρεπτικό συστατικό για την ανάπτυξη των βακτηρίων και άρα, της *K. pneumoniae*¹³. Εξαιτίας μηχανισμών του ξενιστή οι οποίοι δεσμεύουν το σίδηρο στα σημεία της λοίμωξης, τα μικρόβια παράγουν σιδηροφόρα μόρια ώστε να ενισχύουν την πρόσληψη σιδήρου. Τέτοια μόρια αποτελούν η εντεροβακτίνη (ή εντεροχηλίνη) και η αεροβακτίνη, με την εντεροβακτίνη να αποτελεί το κύριο σύστημα πρόσληψης σιδήρου¹⁴. Μάλιστα, τα υπερβλεννώδη στελέχη παράγουν σημαντικά μεγαλύτερες ποσότητες σιδηροφόρων μορίων σε σχέση με τα μη-υπερβλεννώδη¹⁵.

iv) Λιποπολυσακχαρίτης

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες λοιμογονικότητας της *K. pneumoniae* είναι ο λιποπολυσακχαρίτης. Το αντιγόνο O, το οποίο αποτελεί το εξωτερικό τμήμα του λιποπολυσακχαρίτη, είναι το κύριο στοιχείο της λοιμογονικότητάς του. Ένας άλλος σημαντικός ρόλος του αντιγόνου O είναι η προστασία του βακτηρίου από τη δράση του συμπληρώματος. Συνολικά υπάρχουν 12 ορότυποι του αντιγόνου O με τον O1 να αποτελεί το συχνότερο στα στελέχη *K. pneumoniae*.

v) Μόρια προσκόλλησης (κροσσοί)

Οι κροσσοί (ή ινίδια) είναι νηματοειδή οργανίδια στην κυτταρική επιφάνεια της *K. pneumoniae* που της επιτρέπουν την προσκόλλησή της στους βλεννογόνους του ξενιστή (π.χ. ουρογεννητική/αναπνευστική/γαστρεντερική οδό) οδηγώντας, έτσι, στη δημιουργία της λοίμωξης. Η *K. pneumoniae* παράγει συνηθέστερα 2 είδη κροσσών,

τύπου 1 και τύπου 3. Οι κροσσοί τύπου 3 είναι αυτοί που έχουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία βιομεμβρανών (biofilm) στις επιφάνειες προσθετικών υλικών και καθετήρων¹⁶.

vi) Πρωτοπαθές πυογόνο απόστημα ήπατος

Αναφέρεται στο απόστημα ήπατος από *K. pneumoniae* που άρχισε να παρατηρείται σε εξωνοσοκομειακούς ασθενείς σε ασιατικές χώρες, κυρίως την Ταϊβάν¹⁷. Ο ορότυπος K1 αποτελεί το σημαντικότερο παράγοντα λοιμογονικότητας στο πυογόνο απόστημα ήπατος, ενώ τα περισσότερα κλινικά στελέχη *K. pneumoniae* είναι υπερβλεννώδη.

1.3 Κλινική σημασία

Η *K. pneumoniae* μπορεί να προκαλέσει ποικίλες λοιμώξεις στον άνθρωπο, όπως πνευμονία, ουρολοίμωξη, βακτηριαιμία, σήψη ή μηνιγγίτιδα. Τα κλασικά στελέχη του μικροβίου προκαλούν συνήθως σοβαρές ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις ή ουρολοιμώξεις, ενώ τα λεγόμενα «υπερ-λοιμογόνα» στελέχη προκαλούν λοιμώξεις σε κατά τα άλλα υγιή άτομα στην κοινότητα και έχουν συνδεθεί επίσης με τη δημιουργία του πυογόνου ηπατικού αποστήματος κυρίως σε περιοχές της νοτιοανατολικής Ασίας και την Ταϊβάν¹⁷.

Όσον αφορά τις λοιμώξεις από κλασικά στελέχη *K. pneumoniae*, η ουρολοίμωξη και η πνευμονία αποτελούν τους συχνότερους τύπους λοιμώξεων από το συγκεκριμένο παθογόνο. Πιο συγκεκριμένα, έχει υπολογιστεί ότι ο μικροοργανισμός αυτός είναι υπεύθυνος για περίπου 2-6% των περιστατικών νοσοκομειακής πνευμονίας και 4,3-7% της πνευμονίας της κοινότητας¹⁸. Επιπρόσθετα, η *K. pneumoniae* αποτελεί τη δεύτερη ή τρίτη κατά σειρά αιτία ουρολοίμωξης μετά το κολοβακτηρίδιο και προκαλείται από τη διασπορά μικροβίων προερχόμενα από τη γαστρεντερική οδό στις ουροφόρους οδούς¹⁹. Η πνευμονία που προκαλείται από *K. pneumoniae* διακρίνεται σε πνευμονία της κοινότητας και ενδονοσοκομειακή πνευμονία, με τη δεύτερη να είναι σαφώς συχνότερη από την πρώτη. Όπως όλες οι ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις, έτσι και η νοσοκομειακή πνευμονία ορίζεται ως η λοίμωξη που προκαλείται μετά από 48 ώρες νοσηλείας στο νοσοκομείο. Έχει υπολογιστεί ότι η *K. pneumoniae* είναι υπεύθυνη έως και 12% των περιστατικών νοσοκομειακής πνευμονίας^{20,21}.

Μία από τις σοβαρότερες επιπλοκές των λοιμώξεων από *K. pneumoniae* είναι η ανάπτυξη δευτεροπαθούς βακτηριαιμίας. Η *K. pneumoniae* αποτελεί ένα από τα συχνότερα αίτια βακτηριαιμιών, τόσο στην κοινότητα όσο και ενδονοσοκομειακά και

χαρακτηρίζεται από υψηλά ποσοστά θνητότητας τα οποία μπορεί να ξεπεράσει το 25% ακόμη και σε ασθενείς χωρίς πολυανθεκτική λοίμωξη^{20,21}. Παράγοντες κινδύνου οι οποίοι σχετίζονται με αυξημένη θνητότητα στις βακτηριαμίες από *K. pneumoniae* αποτελούν τα παρακάτω: διακομιδή στη μονάδα εντατικής θεραπείας, ηλικία ασθενούς πάνω από 65 ετών, υποκείμενη κακοήθεια, πνευμονία, μηχανική αναπνευστική υποστήριξη, ουροκαθετήρας, αλκοολισμός. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η αντοχή της *K. pneumoniae* στα αντιβιοτικά, καθώς έχει αποδειχθεί ότι ασθενείς με βακτηριαμία προκαλούμενη από πολυανθεκτική *K. pneumoniae* έχουν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη θνητότητα από ασθενείς με βακτηριαμία από ευαίσθητη στα αντιβιοτικά *K. pneumoniae*^{22,23}.

1.4 Αντοχή στις καρβαπενέμες

Οι καρβαπενέμες (π.χ. μεροπενέμη, ιμιπενέμη) είναι ευρέως φάσματος αντιβιοτικά τα οποία συστήνονται ως θεραπεία εκλογής σε λοιμώξεις από Εντεροβακτηριακά που παράγουν ευρέως φάσματος β-λακταμάσες (extended-spectrum beta-lactamases/ESBLs), ένζυμα τα οποία υδρολύουν τις ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες και τους αναστολείς β-λακταμασών (π.χ. αμπικιλλίνη/σουλμπακτάμη) αλλά δεν είναι δραστικά έναντι των καρβαπενεμών²⁴. Ωστόσο, η εμφάνιση των πρώτων στελεχών που παρήγαγαν καρβαπενεμάσες στα τέλη της δεκαετίας του '90²⁵ κατέστησε και αυτήν την κατηγορία αντιβιοτικών πολύ λιγότερο αποτελεσματική έναντι λοιμώξεων από Gram-αρνητικά Εντεροβακτηριακά.

Παρά την ονομασία τους, οι καρβαπενεμάσες υδρολύουν σχεδόν όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά και ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των β-λακταμασών. Οι β-λακταμάσες ταξινομούνται με βάση το αμινοξύ που περιέχουν στο ενεργό τους κέντρο στις εξής μοριακές κλάσεις κατά Ambler: A, B, C, D. Τα ένζυμα που ανήκουν στις κλάσεις A και D περιέχουν σερίνη στο ενεργό τους κέντρο, ενώ αυτά της κλάσης B ονομάζονται μεταλλο-β-λακταμάσες και περιέχουν στο ενεργό τους κέντρο ψευδάργυρο. Επίσης, η αντοχή στα αντιβιοτικά είναι πλασμιδιακού τύπου στις κλάσεις A, B και D και κυρίως χρωμοσωμικού τύπου στην κλάση C²⁶.

Στην κλάση A ανήκει η KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) καρβαπενεμάση, η οποία είναι και η πιο συχνή στην Ελλάδα τα τελευταία χρόνια. Η KPC καρβαπενεμάση υδρολύει τις πενικιλλίνες, κεφαλοσπορίνες, μονοβακτάμες και καρβαπενέμες, ενώ μπορεί να αναστέλλεται μερικώς από τους αναστολείς β-λακταμασών²⁶. Μάλιστα, τα

περισσότερα στελέχη που παράγουν KPC β-λακταμάση φέρουν επίσης πλασμίδια αντοχής στις φθοριοκινολόνες και τις αμινογλυκοσίδες. Μεταξύ των αμινογλυκοσιδών η γενταμυκίνη διατηρεί τα υψηλότερα ποσοστά δραστηριότητας έναντι των KPC στελεχών²⁷. Να σημειωθεί, επίσης, ότι στην κλάση A επίσης ανήκουν και οι ESBL β-λακταμάσες.

Στην κλάση B ανήκουν οι μεταλλο-β-λακταμάσες VIM, NDM-1 και IMP, χαρακτηριστικό των οποίων αποτελεί η αναστολή τους από τον χηλικό παράγοντα EDTA (ethylene diamine tetra-acetic acid) του ψευδαργύρου. Οι μεταλλο-β-λακταμάσες υδρολύουν τις πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, αναστολείς β-λακταμασών και καρβαπενέμες αλλά δεν είναι δραστικές εναντίον της αζτρεονάμης²⁶. Ωστόσο, καθώς τα περισσότερα στελέχη συμπαράγουν και ESBL β-λακταμάσες, η αζτρεονάμη καθίσταται επίσης αναποτελεσματική²⁶. Αξίζει να τονιστεί ότι τα περισσότερα στελέχη που παράγουν NDM-1 καρβαπενεμάσες συμπαράγουν και άλλα ένζυμα αντοχής που προσδίδουν αντοχή σε άλλες κλάσεις αντιβιοτικών, όπως για παράδειγμα στις αμινογλυκοσίδες και τις φθοριοκινολόνες²⁸. Κατά συνέπεια, τα περισσότερα στελέχη NDM-1 παραμένουν ευαίσθητα μόνο στην κολιμυκίνη και ορισμένες φορές στην τιγκεκυκλίνη ή/και τη φωσφομυκίνη^{28,29}.

Η κλάση C περιέχει τις AmpC β-λακταμάσες (κεφαλοσπορινάσες) οι οποίες υδρολύουν τις πενικιλίνες, 1^{ης}, 2^{ης} και 3^{ης} γενιάς κεφαλοσπορίνες, β-λακταμικά με αναστολείς β-λακταμασών και την αζτρεονάμη. Η κεφεπίμη (κεφαλοσπορίνη 4^{ης} γενιάς) συνήθως διατηρεί τη δραστηριότητά της έναντι των AmpC στελεχών.

Η κλάση D περιλαμβάνει τις OXA καρβαπενεμάσες ή αλλιώς οξακυλλινάσες εξαιτίας της ισχυρής υδρολυτικής τους ικανότητας έναντι της οξακυλλίνης²⁶. Χαρακτηρίζονται από ποικίλη δραστηριότητα έναντι των αντιβιοτικών, καθώς κάποια ένζυμα έχουν στενό υδρολυτικό φάσμα ενώ άλλα ευρύτερο με ισχυρή υδρολυτική ικανότητα έναντι των καρβαπενεμών. Οι OXA καρβαπενεμάσες δεν αναστέλλονται από τους αναστολείς β-λακταμικών και η πιο συχνή καρβαπενεμάση της κατηγορίας στην περιοχή της Μεσογείου είναι η OXA-48. Οι OXA καρβαπενεμάσες προσδίδουν αντοχή στις πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες 1^{ης}, 2^{ης}, 3^{ης}, και 4^{ης} γενιάς και καρβαπενέμες. Ωστόσο, σποραδικά οι κεφαλοσπορίνες 3^{ης} και 4^{ης} γενιάς μπορεί να διατηρούν κάποια δραστηριότητα.

Τέλος, σπανιότερα η αντοχή στις καρβαπενέμες μπορεί να οφείλεται σε άλλους μηχανισμούς εκτός από την παραγωγή καρβαπενεμασών. Για παράδειγμα, παραγωγή ESBL ή AmpC β-λακταμάσης σε συνδυασμό με απώλεια πορίνης (= πρωτεϊνικά κανάλια που επιτρέπουν την είσοδο των αντιβιοτικών στο βακτηριακό κύτταρο) από την εξωτερική μεμβράνη του μικροβίου μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα την αντοχή στις καρβαπενέμες²⁶. Επίσης, άλλοι μηχανισμοί αντοχής στις καρβαπενέμες αποτελούν οι αντλίες εκροής (efflux pumps) αντιβιοτικών.

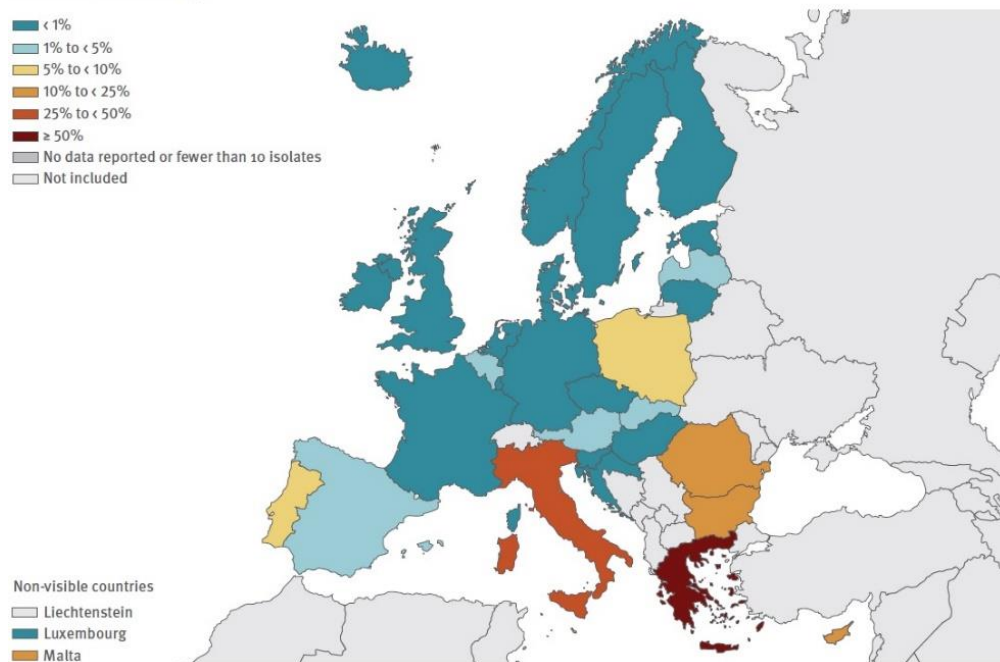
2. Βακτηριαμιά από *Klebsiella pneumoniae* που παράγει καρβαπενεμάσες

2.1 Επιδημιολογία

Το πρώτο στέλεχος KPC ανιχνεύθηκε στη Βόρεια Καρολίνα των ΗΠΑ το 1996², το πρώτο VIM στη Βερόνα της Ιταλίας το 1997³⁰, το πρώτο NDM-1 στην Ινδία το 2009³¹ και η πρώτη OXA-48 *K. pneumoniae* στην Τουρκία το 2001³². Τα στελέχη αυτά πολύ γρήγορα διασπάρθηκαν στον παγκόσμιο χάρτη και σε ορισμένες περιοχές, συμπεριλαμβανομένου και της Ελλάδας, έγιναν ενδημικά³³. Η διασπορά των στελεχών αυτών γίνεται μέσω κινητών μεταθετών στοιχείων, όπως πλασμίδια ιντεγκρόνια ή τρανσποζόνια, που φέρουν τα γονίδια αντοχής³⁴.

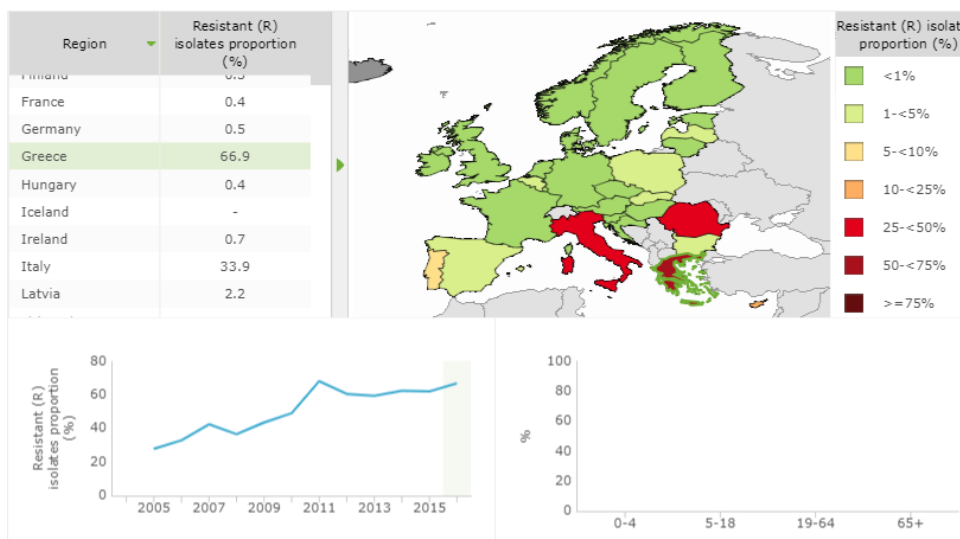
Σύμφωνα με τα πιο πρόσφατα δεδομένα “Surveillance of antimicrobial resistance in Europe” που δημοσίευσε το ECDC το 2017 η χώρα μας συγκαταλέγεται μεταξύ των χωρών με τον υψηλότερο επιπολασμό *K. pneumoniae* ανθεκτικής στις καρβαπενέμες όσον αφορά τα διεισδυτικά στελέχη³⁵. Στον παρακάτω χάρτη (Εικόνα 2) φαίνεται πως το ποσοστό των συγκεκριμένων ανθεκτικών στελεχών βρίσκεται πάνω από 50% στη χώρα μας.

Figure 3.11. *Klebsiella pneumoniae*. Percentage (%) of invasive isolates with resistance to carbapenems, by country, EU/EEA countries, 2017



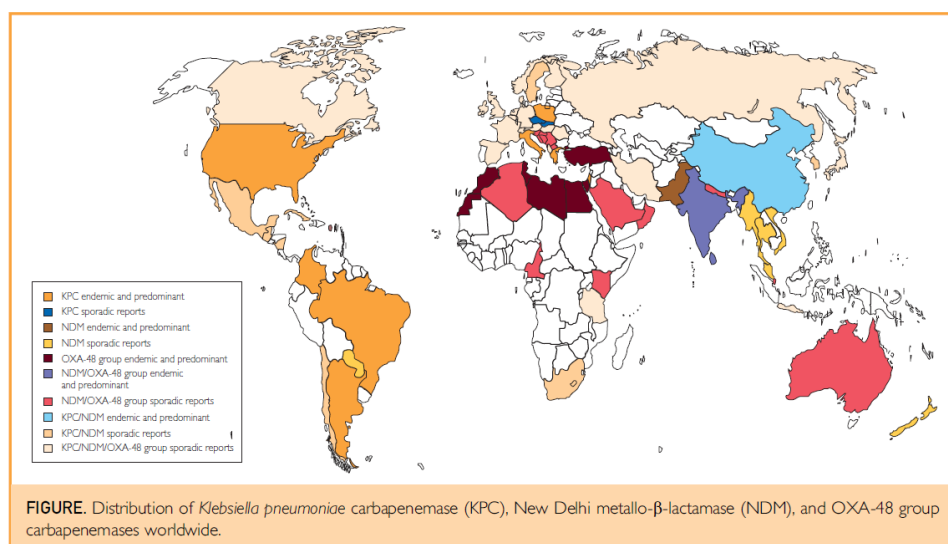
Εικόνα 2. Ποσοστό *K. pneumoniae* ανθεκτικής στις καρβαπενέμες (στελέχη αίματος) ανά χώρα, 2017

Επίσης, περίπου 67% των στελεχών *K. pneumoniae* από όλες τις εστίες λοιμώξεων ήταν ανθεκτικά στις καρβαπενέμες το 2016 καθιστώντας τη χώρα μας ενδημική για τα συγκεκριμένα μικρόβια, σύμφωνα με τον Άτλα Επιτήρησης Λοιμώξεων του ECDC (Εικόνα 3). Το ποσοστό αυτό ήταν το υψηλότερο μεταξύ των ευρωπαϊκών χωρών³⁶.



Εικόνα 3. Άτλας επιτήρησης λοιμώξεων του ECDC: ποσοστό *K. pneumoniae* ανθεκτικής στις καρβαπενέμες

Ο παρακάτω χάρτης (Εικόνα 4) από τη μελέτη των Vasoo και συνεργάτες²⁶ που απεικονίζει την παγκόσμια διασπορά των καρβαπενεμασών παρουσιάζει τη χώρα μας ως ενδημική για την *K. pneumoniae* τύπου KPC.



Εικόνα 4. Παγκόσμια διασπορά καρβαπενεμασών (KPC, NDM, OXA-48)

Έχουν μελετηθεί διάφοροι παράγοντες κινδύνου που έχουν συσχετισθεί με λοίμωξη με *K. pneumoniae* ανθεκτική στις καρβαπενέμες. Παρόλο που οι παράγοντες αυτοί δεν υπάρχουν πάντα πριν την εμφάνιση της λοίμωξης, ωστόσο η ύπαρξη έστω και ενός από αυτούς αυξάνει σημαντικά την πιθανότητα απόκτησης της λοίμωξης. Η προηγούμενη λήψη αντιβιοτικών ευρέως φάσματος (π.χ. κεφαλοσπορίνες/καρβαπενέμες) έχει αποδειχθεί ο σημαντικότερος παράγοντας κινδύνου για αποικισμό ή λοίμωξη από το συγκεκριμένο παθογόνο³⁷. Άλλοι παράγοντες κινδύνου αποτελούν η ανοσοκαταστολή (λόγω λήψης κορτικοστεροειδών ή άλλων ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων, μεταμόσχευσης, κακοήθειας, λοίμωξης με τον HIV), τραύμα, σακχαρώδης διαβήτης, μηχανικός αερισμός, παρουσία καθετήρων (ουροκαθετήρων ή φλεβικών), υψηλή συννοσηρότητα και κακή λειτουργική κατάσταση του οργανισμού³⁸⁻⁴¹.

2.2 Εργαστηριακή διάγνωση

2.2.1 Ταυτοποίηση

Για την ταυτοποίηση της *K. pneumoniae* σε καλλιέργειες αίματος χρησιμοποιούνται σύγχρονα αυτοματοποιημένα συστήματα στο μικροβιολογικό εργαστήριο. Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα συστήματα είναι το Vitek 2 (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France), το MicroScan (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) και το Phoenix (Becton Dickinson Diagnostics, Sparks, MD, USA). Τα διαγνωστικά αυτά μηχανήματα ταυτοποιούν τα μικρόβια εξετάζοντας τα βιοχημικά χαρακτηριστικά τους. Ειδικότερα, τα πάνελ που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση περιέχουν πολλά «πηγαδάκια» (microwells), καθένα από τα οποία περιέχει διαφορετικό βιοχημικό υπόστρωμα για μία ξεχωριστή αντίδραση.

Το 2014 η χρήση της φασματομετρίας μάζας (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry - MALDI-TOF MS) έφερε «επανάσταση» στη Μικροβιολογία και κυρίως στις σοβαρές λοιμώξεις, καθώς με το MALDI-TOF MS (Vitek MS, bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) κατέστη εφικτή η ταυτοποίηση του αιτιοπαθογόνου μικροοργανισμού μέσα σε λιγότερο από μισή ώρα από την χρονική στιγμή που το καλλιέργημα γίνεται διαθέσιμο⁴². Με άλλα λόγια, ενώ τα προαναφερθέντα αυτοματοποιημένα συστήματα απαιτούν επιπλέον 18-24 ώρες επώαση του καλλιέργηματος για να δώσουν απάντηση, το MALDI-TOF MS δίνει την απάντηση της ταυτοποίησης του μικροοργανισμού από το καλλιέργημα σε μόλις μισή ώρα.

Τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκαν τεχνολογίες ακόμη πιο γρήγορης ταυτοποίησης μικροοργανισμών από ολικό αίμα. Τα συγκεκριμένα μηχανήματα έχουν τη δυνατότητα να ταυτοποιούν το μικρόβιο απευθείας από τη θετική φιάλη αιμοκαλλιέργειας χωρίς την ανάγκη ανάπτυξης αποικίας, με τη χρήση διαφόρων μεθόδων, όπως ο φθορίζων *in situ* υβριδισμός (PNA-FISH)⁴³ και η πολυπλεκτική (multiplex) αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction/PCR)⁴⁴. Μια άλλη μέθοδος η οποία έχει εγκριθεί πρόσφατα χρησιμοποιεί T2 μαγνητική τομογραφία για την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών⁴⁵.

2.2.2 Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

Διάφορες μέθοδοι ελέγχου ευαισθησίας στα αντιβιοτικά είναι διαθέσιμες για την *K. pneumoniae* και όλες απαιτούν την ανάπτυξη αποικίας για την πραγματοποίησή τους και άρα το πέρας 18-24 ωρών από την χρονική στιγμή που η αιμοκαλλιέργεια «χτύπησε» ως θετική στο αυτοματοποιημένο σύστημα επώασης και ανίχνευσης. Η μέθοδος διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών (disk diffusion κατά Kirby-Bauer) είναι η μόνη ποιοτική μέθοδος καθώς δεν προσδιορίζει την ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα (ΕΑΠ) των αντιβιοτικών και για αυτόν το λόγο θεωρείται η λιγότερο αξιόπιστη, ιδιαίτερα για ορισμένα αντιβιοτικά⁴⁶. Για την πραγματοποίησή της επιστρώνεται μικροβιακό εναιώρημα θολερότητας 0,5 της κλίμακας McFarland σε άγαρ Mueller-Hinton και στη συνέχεια το τρυβλίο επωάζεται στους 37 βαθμούς Κελσίου.

Για τον προσδιορισμό της ΕΑΠ μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι εξής δοκιμασίες:

α. μέθοδος μικρο-αραιώσεων αντιβιοτικών σε ζωμό (broth microdilution – π.χ. MicroScan, Phoenix, Thermo Scientific Sensititre), κατά την οποία χρησιμοποιείται μία πλάκα με μικρο-πηγαδάκια τα οποία περιέχουν διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις διάφορων αντιβιοτικών. Το εναιώρημα που τοποθετείται στα μικρο-πηγαδάκια θα πρέπει να έχει θολερότητα 0,5 της κλίμακας McFarland και η πλάκα επωάζεται για 18-24 ώρες στους 37 βαθμούς Κελσίου.

β. Vitek, το οποίο χρησιμοποιεί ειδικές «κασέτες» στις οποίες η ΕΑΠ προσδιορίζεται συγκρίνοντας την ανάπτυξη του εκάστοτε μικροβίου με την ανάπτυξη μικροβιακών στελεχών με γνωστές ΕΑΠ. Επίσης, το μικροβιακό εναιώρημα θα πρέπει να έχει θολερότητα 0,5 της κλίμακας McFarland.

γ. ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιβιοτικού (π.χ. E-test, Liofilchem), οι οποίες τοποθετούνται σε άγαρ Mueller-Hinton στο οποίο έχει πρώτα επιστρωθεί μικροβιακό εναιώρημα που έχει φτιαχτεί σε θρεπτικό ζωμό θολερότητας 0,5 της κλίμακας

McFarland. Στη συνέχεια το τρυβλίο επωάζεται για 18-24 ώρες στους 37 βαθμούς Κελσίου.

δ. μέθοδος αραιώσεων αντιβιοτικού σε άγαρ (agar dilution), η οποία, παρ' ό,τι μέθοδος αναφοράς, χρησιμοποιείται μόνο για ερευνητικούς σκοπούς εξαιτίας του ότι πρόκειται για αρκετά χρονοβόρα διαδικασία η οποία δε συμβαδίζει με τις αιτήσεις ενός κλινικού εργαστηρίου. Για τον προσδιορισμό της ΕΑΠ σε ένα αντιβιοτικό χρησιμοποιείται μια σειρά τρυβλίων, καθένα από τα οποία είναι εμποτισμένο με συγκεκριμένη συγκέντρωση του εξεταζόμενου αντιβιοτικού. Ένα ή περισσότερα στελέχη μπορούν να τοποθετηθούν στο κάθε τρυβλίο, αφού πρώτα έχουν παρασκευαστεί σε εναιώρημα θρεπτικού ζωμού θολερότητας 0,5 της κλίμακας McFarland. Τα τρυβλία επωάζονται για 18-24 ώρες στους 37 βαθμούς Κελσίου.

Τα στελέχη *K. pneumoniae* που είναι ανθεκτικά στις καρβαπενέμες είναι ανθεκτικά σε όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά και σχεδόν σε όλες τις αμινογλυκοσίδες και φθοριοκινολόνες. Επομένως, σε αυτά τα στελέχη ο προσδιορισμός της ΕΑΠ έχει νόημα μόνο στα αντιβιοτικά «τελευταίας γραμμής» (κολιμυκίνη, τιγκεκυκλίνη, φωσφομυκίνη), τις καρβαπενέμες καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με άλλα αντιβιοτικά όταν η ΕΑΠ είναι $\leq 4 \text{ mg/L}$ ⁴⁷, αλλά και τα νέα αντιβιοτικά (κεφταζιδίμη-αβιμπακτάμη, κεφτολοζάνη-ταζομπακτάμη, πλαζομυκίνη) τα οποία εμφανίζουν αποτελεσματική δραστηριότητα εναντίον αυτών των στελεχών. Από τα προαναφερθέντα αντιβιοτικά, προβλήματα έχουν παρατηρηθεί στον προσδιορισμό της ΕΑΠ στην κολιμυκίνη όσον αφορά τα Εντεροβακτηριακά. Αναλυτική αναφορά στο συγκεκριμένο θέμα γίνεται παρακάτω στην υποενότητα 4.3.

2.3 Θεραπεία

Η διαχείριση και θεραπεία της βακτηριαμίας από *K. pneumoniae* ανθεκτική στις καρβαπενέμες αποτελεί δύσκολη περίπτωση για τον κλινικό γιατρό, καθώς τα συγκεκριμένα βακτήρια είναι ανθεκτικά στα περισσότερα διαθέσιμα αντιβιοτικά και ταυτόχρονα οι πάσχοντες από αυτές τις λοιμώξεις έχουν υψηλή συν-νοσηρότητα και κακή γενική κλινική κατάσταση⁴⁸. Όπως προαναφέρθηκε, τα αντιβιοτικά που είναι αποτελεσματικά έναντι των συγκεκριμένων λοιμώξεων είναι ελάχιστα και μερικά από αυτά είναι δυνατό να έχουν σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες⁴⁹. Για παράδειγμα, η κολιμυκίνη έχει συνδεθεί με αυξημένη νεφροτοξικότητα⁴⁹, λόγος για τον οποίο η χρήση της είχε εγκαταλειφθεί για πολλά χρόνια πριν επανέλθει στην κλινική πράξη ελλείψει αποτελεσματικών εναλλακτικών θεραπευτικών επιλογών. Στο ίδιο πλαίσιο, σε κάποιες

περιπτώσεις που η γενταμυκίνη διατηρεί τη δραστικότητά της μεταξύ των αμινογλυκοσιδών επιλέγεται ως θεραπευτική επιλογή σε συνδυασμό με κάποιο άλλο αντιβιοτικό⁵⁰. Ωστόσο, οι αμινογλυκοσίδες μπορούν επίσης να οδηγήσουν σε νεφροτοξικότητα⁵¹.

Από την άλλη, έχουν εγερθεί σοβαρές ανησυχίες για την ασφάλεια της τιγκεκυκλίνης από τον FDA καθώς το συγκεκριμένο αντιβιοτικό έχει συσχετιστεί με υψηλή θνητότητα σε ορισμένες δημοσιευμένες μελέτες⁵²⁻⁵⁵. Το συγκεκριμένο αντιβιοτικό δίνεται εκτός των ενδείξεων στη θεραπεία της βακτηριαιμίας αφού δεν επιτυγχάνει υψηλά επίπεδα συγκέντρωσης στο αίμα των ασθενών⁵⁶, γι' αυτό και θα πρέπει να χορηγείται με ιδιαίτερη προσοχή και μόνο σε περιπτώσεις που δεν υπάρχει αποτελεσματική εναλλακτική θεραπευτική επιλογή. Αναφορικά με τη φωσφομυκίνη, αυτή θα πρέπει να χορηγείται μόνο σε συνδυασμό με άλλο αντιβιοτικό καθώς έχει αποδειχθεί ότι τα βακτήρια αναπτύσσουν ταχέως αντοχή στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό κατά τη διάρκεια της θεραπείας^{57,58}.

Στη βιβλιογραφία έχει συζητηθεί διεξοδικά εάν θα πρέπει να χορηγείται θεραπεία με ένα δραστικό αντιβιοτικό (μονοθεραπεία) ή συνδυασμός δύο ή και τριών αντιβιοτικών στους συγκεκριμένους ασθενείς^{50,59-61}. Η πλειονότητα των μελετών έχει δείξει ότι η συνδυαστική θεραπεία επιτυγχάνει καλύτερα θεραπευτικά αποτελέσματα από τη μονοθεραπεία⁵⁰. Πιο συγκεκριμένα, μια συστηματική ανασκόπηση έδειξε ότι σε περίπου 200 ασθενείς που νοσηλεύονταν στη ΜΕΘ με βακτηριαιμία από *K. pneumoniae* ανθεκτική στις καρβαπενέμες ο συνδυασμός αντιβιοτικών οδήγησε σε στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερη θνητότητα συγκριτικά με τη μονοθεραπεία⁵⁰.

Στους συνδυασμούς αντιβιοτικών όχι σπάνια συμπεριλαμβάνεται και μια καρβαπενέμη (συνηθέστερα μεροπενέμη), παρ' ό,τι ο μικροοργανισμός μπορεί να είναι ανθεκτικός στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Ο λόγος για αυτό έγκειται στο ότι όταν η ΕΑΠ είναι έως και 4 mg/L, υποστηρίζεται ότι η καρβαπενέμη μπορεί να είναι αποτελεσματική εάν χορηγηθεί σε συνδυασμό με κάποιο άλλο αντιβιοτικό⁴⁷.

Τα τελευταία χρόνια δύο νέα αντιβιοτικά έχουν πάρει έγκριση από τον FDA και τον European Medicines Agency (EMA) για τη θεραπεία λοιμώξεων από πολυανθεκτικά Εντεροβακτηριακά, συμπεριλαμβανομένου και της ανθεκτικής στις καρβαπενέμες *K. pneumoniae*. Πρόκειται για τις κεφταζιδίμη/αβιμπακτάμη και κεφτολοζάνη/ταζομπακτάμη οι οποίες είναι κεφαλοσπορίνες που περιέχουν αναστολείς

β-λακταμασών^{62,63}. Η πλαζομυκίνη είναι μια νέα αμινογλυκοσίδη η οποία έχει φανεί αποτελεσματική στην αντιμετώπιση λοιμώξεων από ανθεκτικά στις καρβαπενέμες Εντεροβακτηριακά^{64,65}. Ωστόσο, η χρήση της έχει εγκριθεί μόνο για τις ευαίσθητες λοιμώξεις του ουροποιητικού⁶⁵ και προς το παρόν το φάρμακο χορηγείται «εκτός ενδείξεων» στην αντιμετώπιση πολυανθεκτικών λοιμώξεων όταν δεν υπάρχουν αποτελεσματικά εναλλακτικά αντιβιοτικά. Επιπλέον, άλλα αντιμικροβιακά (όπως η σιδηροφόρα κεφαλοσπορίνη “cefiderocol”, μεροπενέμη/βαρμπομπακτάμη, αζτρεονάμη/αβιμπακτάμη, ιμιπενέμη/ρελεμπακτάμη, κεφταρολίνη/αβιμπακτάμη) βρίσκονται σε διαφορετικά στάδια κλινικών δοκιμών ώστε να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα και ασφάλειά τους στην αντιμετώπιση αυτών των λοιμώξεων^{66,67}.

3. Κολιμυκίνη

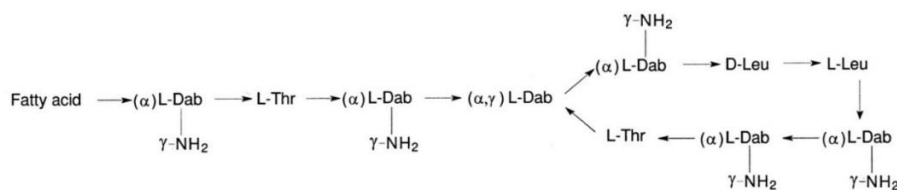
3.1 Εισαγωγικά - ιστορικά στοιχεία

Η κολιμυκίνη, επίσης γνωστή ως πολυμυξίνη Ε, είναι ένα αντιβιοτικό το οποίο παράγεται από ορισμένα στελέχη του βακτηρίου *Paenibacillus polymyxa*. Το αντιβιοτικό αυτό είναι ένα μίγμα των πολυπεπτιδίων κολιστίνης Α και κολιστίνης Β και ανήκει στην κατηγορία των πολυπεπτιδίων που ονομάζονται και πολυμυξίνες. Οι πολυμυξίνες (πολυμυξίνες Α-Ε) είναι μια ομάδα 5 αντιβιοτικών οι οποίες ανακαλύφθηκαν το 1947, αλλά από αυτές μόνο η πολυμυξίνη Β και Ε (κολιμυκίνη) χρησιμοποιήθηκαν στην κλινική πράξη. Ειδικότερα, η ομάδα αυτή αντιβιοτικών χορηγούνταν ευρέως για δεκαετίες υπό τη μορφή ωτικών και οφθαλμικών σκευασμάτων^{68,69}. Η κολιμυκίνη ανακαλύφθηκε το 1949 και χρησιμοποιήθηκε αρχικά στην Ευρώπη και την Ιαπωνία και λίγο αργότερα (1959) στις ΗΠΑ^{70,71}. Ωστόσο, η ενδοφλέβια χρήση των πολυμυξινών εγκαταλείφθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1980 εξαιτίας της προκαλούμενης νεφροτοξικότητας^{72,73}. Έτσι, η χορήγηση των συγκεκριμένων αντιβιοτικών περιορίστηκε για πάνω από 20 χρόνια σε ασθενείς, κυρίως με κυστική ίνωση, που έπασχαν από πολυανθεκτικές λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος^{74,75}.

Ωστόσο, η εμφάνιση και ταχεία εξάπλωση των πρώτων Gram-αρνητικών μικροοργανισμών που ήταν ανθεκτικοί σχεδόν σε όλες τις τάξεις των διαθέσιμων αντιβιοτικών στα τέλη της δεκαετίας του 1990 σε συνδυασμό με την έλλειψη νέων αποτελεσματικών αντιβιοτικών έφερε και πάλι στο προσκήνιο την κολιμυκίνη ως θεραπευτική επιλογή «τελευταίας γραμμής» έως και σήμερα⁷⁶.

3.2 Χημική δομή

Η κολιστίνη αποτελεί ένα κατιονικό πολυπεπτίδιο που αποτελείται από ένα κυκλικό επταπεπτίδιο, ένα γραμμικό τριπεπτίδιο και μία αλυσίδα λιπαρών οξέων η οποία συνδέεται στο Ν-τελικό άκρο του τριπεπτιδίου. Τα διάφορα αμινοξέα που συνθέτουν το πολυπεπτίδιο είναι η D-λευκίνη, L-θρεονίνη και το L-α- γ-διαμινοβουτυρικό οξύ. Η κολιστίνη Α και κολιστίνη Β είναι οι δύο βασικότερες μορφές του φαρμάκου και διαφέρουν μόνο ως προς το λιπαρό οξύ, το οποίο είναι το 6-μεθυλοοκτανοϊκό οξύ για την κολιστίνη Α και 6-μεθυλεπτανοϊκό οξύ για την κολιστίνη Β. Η χημική δομή της κολιστίνης Α και Β φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 5):



Εικόνα 5. Χημική δομή της κολιστίνης A και B

3.3 Μηχανισμός δράσης

Η κυτταρική μεμβράνη των βακτηριακών κυττάρων αποτελεί το βασικό στόχο δράσης της κολιμυκίνης και ο μηχανισμός δράσης της κολιμυκίνης έγκειται στην αλληλεπίδρασή της ως θετικά φορτισμένου μορίου με την αρνητικά φορτισμένη λιποπολυσακχαριδική (LPS) μεμβράνη του Gram-αρνητικού βακτηριακού κυττάρου. Ειδικότερα, η κολιμυκίνη προσδένεται στα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης του βακτηρίου έχοντας προηγουμένως εκτοπίσει, λόγω ισχυρότερης προσδετικής ικανότητας, τα ανιόντα ασβεστίου (Ca^{++}) και μαγνησίου (Mg^{++}) τα οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες σταθεροποιούν την κυτταρική μεμβράνη. Η πρόσδεση της κολιμυκίνης έχει σαν αποτέλεσμα τη διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης, την εκροή κυτταρικού περιεχομένου και τελικώς τον κυτταρικό θάνατο⁷⁷.

Εκτός από την κυτταρική μεμβράνη, ένας δευτερεύων στόχος δράσης της κολιμυκίνης στο βακτηριακό κύτταρο είναι η τύπου II NADH-κινόνη ρεδουκτάση, ένζυμο της αναπνευστικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στην εσωτερική μεμβράνη του βακτηρίου⁷⁸. Μάλιστα, ο συγκεκριμένος μηχανισμός της κολιμυκίνης φαίνεται να είναι δραστικός έναντι τόσο Gram-αρνητικών όσο και Gram-θετικών βακτηρίων.

Τέλος, πέρα από την άμεσα αντιβακτηριακή δραστικότητα, στην κολιμυκίνη αποδίδεται και αντι-ενδοτοξινική δραστικότητα εναντίον του λιπιδίου A της λιποπολυσακχαριδικής μεμβράνης. Το λιπίδιο A αποτελεί ενδοτοξίνη των Gram-αρνητικών βακτηρίων στην οποία προσδένεται η κολιμυκίνη και την αδρανοποιεί.

3.4 Αντιμικροβιακό φάσμα – Κλινικές ενδείξεις

Η κολιμυκίνη έχει ευρύ αντιμικροβιακό φάσμα έναντι των πιο συχνών Gram-αρνητικών βακτηριδίων, όπως: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. και *Haemophilus influenzae*. Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένα Gram-αρνητικά βακτηρίδια τα οποία είναι ενδογενώς ανθεκτικά στην κολιμυκίνη: *Proteus* spp., *Serratia marcescens*, *Providencia* spp., *Morganella morganii*, και *Burkholderia cepacia* complex.

Η κλινική χρήση της κολιμυκίνης στις μέρες μας αφορά αποκλειστικά τη θεραπεία σοβαρών πολυανθεκτικών λοιμώξεων από Gram-αρνητικά βακτηρίδια έναντι των οποίων δεν υπάρχουν άλλες κλινικά αποτελεσματικές θεραπείες, γεγονός που καθιστά την κολιμυκίνη «αντιβιοτικό τελευταίας γραμμής». Τέτοιες λοιμώξεις αποτελούν η βακτηριαιμία και η πνευμονία (νοσοκομειακή ή προκαλούμενη από τον αναπνευστήρα) που οφείλονται σε Εντεροβακτηριακά (π.χ. *K. pneumoniae*) που παράγουν καρβαπενεμάσες ή σε άλλα Gram-αρνητικά που δε ζυμώνουν τη λακτόζη (π.χ. *A. baumannii*, *P. aeruginosa*) και είναι ανθεκτικά στις περισσότερες κλάσεις αντιβιοτικών συμπεριλαμβανομένων των καρβαπενεμών⁶⁶.

3.5 Τοξικότητα – Ανεπιθύμητες ενέργειες

Όπως προαναφέρθηκε, η χρήση της κολιμυκίνης περιορίζεται σε σοβαρές λοιμώξεις όπου δεν υπάρχει εναλλακτική αποτελεσματική θεραπεία, κυρίως λόγω νεφροτοξικότητας σχετιζόμενης με το αντιβιοτικό. Η νεφρική βλάβη προκαλείται μέσω οξείας σωληναριακής νέκρωσης η οποία εκφράζεται μέσω αύξησης της ουρίας και της κρεατινίνης στον ορό του ασθενούς και επακόλουθης ελάττωσης της κάθαρσης κρεατινίνης^{76,79,80}. Η εκδήλωση νεφροτοξικότητας σχετίζεται με την παρουσία ορισμένων παραγόντων κινδύνου (π.χ. παχυσαρκία, σακχαρώδης διαβήτης, υπολευκωματιναιμία, συγχορήγηση άλλων επιβαρυντικών φαρμάκων) όπως επίσης και με τη δοσολογία του φαρμάκου και τη διάρκεια χορήγησής του⁸¹⁻⁸⁵. Επίσης, η επίπτωση της νεφροτοξικότητας που προκαλείται από την κολιμυκίνη δεν είναι εύκολο να προσδιοριστεί ακριβώς λόγω των πολλών και διαφορετικών ορισμών που χρησιμοποιούνται για την οξεία νεφρική βλάβη που προκαλείται από φάρμακα⁸⁶. Τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί μείωση της καταγραφείσας νεφροτοξικότητας που οφείλεται στην κολιμυκίνη, κυρίως λόγω της

χρήσης του σουλφομεθυλικού παραγώγου της αντί της θειϊκής κολιμυκίνης και της στενής παρακολούθησης της νεφρικής λειτουργίας των ασθενών αυτών⁸⁷.

Η χρήση κολιμυκίνης μπορεί, επίσης, να οδηγήσει σε νευροτοξικότητα και εκδήλωση μιας σειράς νευρολογικών συμπτωμάτων. Τέτοια συμπτώματα περιλαμβάνουν ζάλη, ίλιγγο, αδυναμία, σύγχυση, αταξία, παραισθησίες προσώπου και άκρων, διαταραχές λόγου, οπτικές διαταραχές ή ακόμη και νευρομυϊκό αποκλεισμό που μπορεί να οδηγήσει σε αναπνευστική ανεπάρκεια ή άπνοια⁷⁶. Σε γενικές γραμμές, τόσο η νεφροτοξικότητα όσο και η νευροτοξικότητα είναι δοσο-εξαρτώμενες και αναστρέψιμες μετά την απομάκρυνση της κολιμυκίνης⁷⁶. Τέλος, σε μικρή κλίμακα έχουν αναφερθεί διάφορες ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως αντιδράσεις υπερευαισθησίας, δερματικό εξάνθημα, κνησμός, γαστρεντερικές διαταραχές ή πυρετός.

3.6 Στατιστικά στοιχεία κατανάλωσης κολιμυκίνης στην Ελλάδα

Όπως προαναφέρθηκε, μέχρι πρόσφατα - η κεφταζιδίμη/αβιμπακτάμη εισήχθη στην κλινική πράξη στην Ελλάδα το 2018- η έλλειψη αποτελεσματικών εναλλακτικών αντιβιοτικών για τη θεραπεία λοιμώξεων από *K. pneumoniae* θετικής για την παραγωγή καρβαπενεμασών σε συνδυασμό με την πολύ υψηλή επίπτωση του συγκεκριμένου παθογόνου στα ελληνικά νοσοκομεία οδηγούσε στην υψηλή κατανάλωση κολιμυκίνης. Μελετώντας τα δεδομένα δημοσίευσε το ECDC (European Surveillance of Antimicrobial Consumption Network – ESAC-Net) το Νοέμβριο του 2017 στην Εικόνα 6 παρατηρούμε ότι η Ελλάδα διαχρονικά είναι η χώρα με την υψηλότερη κατανάλωση κολιμυκίνης στην Ευρωπαϊκή Ένωση και μάλιστα με αυξητική τάση⁸⁸. Πιο συγκεκριμένα, η κατανάλωση κολιμυκίνης από 0.0024 καθορισμένες ημερήσιες δόσεις (defined daily doses-DDDs) ανά 1.000 ασθενο-ημέρες (patient-days-PDs) το 2001 αυξήθηκε σε 0.0480 το 2008, 0.0949 το 2015 και 0.102 το 2016⁸⁹. Με άλλα λόγια, μέσα στα πρώτα χρόνια (2001-2008) που η κολιμυκίνη άρχισε να χορηγείται στην αντιμετώπιση των συγκεκριμένων λοιμώξεων, η χρήση της 20πλασιάστηκε, ενώ τα επόμενα χρόνια (2008-2015) η χρήση της διπλασιάστηκε.

2017_data_Table_D12_J01XB_polymyxins_trend_hospital_sector_sparklines.xlsx									
Country	2013	2014	2015	2016	2017	Trends in antimicrobial consumption, 2013-2017		Average annual change 2013-2017	Statistically significant trend
Lithuania	0	0	0	0	0			0	
Finland (a)	0	0	0	0	<0.001			0	
Norway	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000			<0.001	
Netherlands	0.003	0.002	0.003	0.002	0.001			<0.001	
Sweden	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001			<0.001	
Bulgaria	0	0	0.004	0.004	0.002			0.001	
France	0.008	0.008	0.007	0.007	0.004			<0.001	↓
Ireland	0.015	0.013	0.008	0.006	0.005			-0.003	↓
Luxembourg	0.006	0.003	0.005	0.005	0.005			<0.001	
Denmark	0.004	0.006	0.005	0.006	0.006			0.000	
Latvia	0.002	0.001	0.000	0.002	0.006			<0.001	
United Kingdom	0.005	0.006	0.006	0.006	0.006			0.00	
Slovenia	0.003	0.005	0.005	0.008	0.006			0.001	
Belgium	0.010	0.009	0.008	0.010	0.009			<0.001	
Hungary	0.006	0.007	0.008	0.010	0.010			0.001	↑
Estonia	0.001	0.002	0.003	0.005	0.010			0.002	↑
Malta	0.006	0.011	0.019	0.015	0.018			0.003	
Poland		0.001	0.020	0.034	0.023			NA	
Portugal (b)	0.020	0.019	0.022	0.022	0.023			0.001	↑
EU/EEA	0.012	0.012	0.015	0.016	0.024			0.002	
Croatia	0.003	0.019	0.018	0.017	0.026			0.004	
Italy	0.019	0.022	0.027	0.027	0.031			0.003	↑
Cyprus	0.023*	0.023*	0.023*	0.019*	0.032*			0.001	
Romania	0.026*	0.027*	0.034*	0.035*	0.034*			0.002	
Spain					0.105			NA	
Greece	0.084	0.095	0.095	0.102				NA	
Slovakia	0.023	0.025	0.025	0.026				NA	

Εικόνα 6. Κατανάλωση κολιμυκίνης στην Ευρώπη σύμφωνα με δεδομένα του European Surveillance of Antimicrobial Consumption Network – ESAC-Net

4. *Klebsiella pneumoniae* ανθεκτική στην κολιμυκίνη

4.1 Επιδημιολογία

Η αυξανόμενη χρήση κολιμυκίνης ήδη από τα τέλη της δεκαετίας του 1990 για την αντιμετώπιση λοιμώξεων από βακτήρια ανθεκτικά στις καρβαπενέμες οδήγησε στην εμφάνιση στελεχών ανθεκτικών στην κολιμυκίνη⁹⁰. Στην Ελλάδα το πρώτο στέλεχος *K. pneumoniae* ανθεκτικής στην κολιμυκίνη αναφέρθηκε απομονώθηκε το Μάιο του 2004 από ασθενή σε Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ) τριτοβάθμιου νοσοκομείου⁹¹. Παράγοντες κινδύνου για την απομόνωση Gram-αρνητικών βακτηρίων ανθεκτικών στην κολιμυκίνη αποτελούν η ηλικία, η διάρκεια νοσηλείας στη ΜΕΘ, η διάρκεια μηχανικής υποστήριξης της αναπνοής, η χρήση κολιμυκίνης, χειρουργικές επεμβάσεις, η χρήση μονοβακτάμης και κεφαλοσπορινών 3^{ης} γενιάς⁹². Μάλιστα, η χρήση κολιμυκίνης έχει βρεθεί ότι αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την απομόνωση Gram-αρνητικών βακτηρίων ανθεκτικών στην κολιμυκίνη⁹². Ελλείπει άλλων αποτελεσματικών αντιβιοτικών, οι λοιμώξεις αυτές χαρακτηρίζονται από υψηλά ποσοστά θνητότητας^{93,94}.

4.2 Μηχανισμοί αντοχής

Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί διάφοροι μηχανισμοί επίκτητης αντοχής της *K. pneumoniae* στην κολιμυκίνη, η συντριπτική πλειοψηφία των οποίων είναι χρωμοσωμικής αιτιολογίας⁹⁵. Ο πιο διαδεδομένος και καλύτερα μελετημένος μηχανισμός αντοχής μέχρι στιγμής αφορά την απενεργοποίηση του *mgrB* γονιδίου⁸. Ειδικότερα, η παρουσία κατιονικών πεπτιδίων, όπως είναι η κολιμυκίνη, ενεργοποιεί την κινάση-αισθητήρα (sensor kinase) *PhoQ* του *PhoPQ* συστήματος μεταγωγής σημάτων του μικροβίου – γνωστού και ως “two-component system” - κι αυτό στη συνέχεια ενεργοποιεί το ρυθμιστή απάντησης (response regulator) *PhoP* με φωσφορυλίωση. Ακολούθως, το *PhoP* ενεργοποιεί την έκφραση του *pmrHFIJKLM* οπερονίου το οποίο κωδικοποιεί ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση και τη μεταφορά της 4-αμινο-4-δεοξυ-L-αραβινόζης (L-Ara4N). Η προσκόλληση της L-Ara4N στο λιπίδιο A τροποποιεί τη λιποπολυσακχαριδική υπομονάδα της εξωτερικής μεμβράνης του μικροβίου μεταβάλλοντας το φορτίο της, κι έτσι ελαττώνεται η συνδεσιμότητα της κολιμυκίνης στο μικρόβιο με τελικό αποτέλεσμα την αντοχή του μικροβίου στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Το *mgrB* γονίδιο είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που ενισχύει αρνητικά με το *PhoPQ* σύστημα αναστέλλοντας τη δραστηριότητα της *PhoQ* κινάσης κι έπειτα τη φωσφορυλίωση του ρυθμιστή *PhoP*. Επομένως, η απενεργοποίηση του *mgrB* γονιδίου

ενισχύει θετικά το *PhoPQ* σύστημα και άρα την έκφραση του *pmrHFIJKLM* οπερονίου, με αποτέλεσμα την τροποποίηση της λιποπολυσακχαριδικής υπομονάδας της εξωτερικής μεμβράνης της *K. pneumoniae* από τα προϊόντα του οπερονίου και τελικά την αντοχή της *K. pneumoniae* στην κολιμυκίνη. Η απενεργοποίηση του *mgrB* γονιδίου έχει συσχετιστεί με ανάπτυξη αντοχής (επικήτητη αντοχή) στην κολιμυκίνη μετά από θεραπευτική έκθεση στο αντιβιοτικό⁸. Ένας άλλος μηχανισμός αντοχής χρωμοσωμικής αιτιολογίας που επίσης εμφανίζεται μετά από θεραπεία με κολιμυκίνη είναι η μεταβολή της κινάσης-αισθητήρα *pmrB* ενός άλλου “two-component” συστήματος μεταγωγής σημάτων, του *pmrA/pmrB*, το οποίο επίσης τροποποιεί τη λιποπολυσακχαριδική υπομονάδα της εξωτερικής μεμβράνης της *K. pneumoniae* προσδίδοντας αντοχή στην κολιμυκίνη⁹⁵.

Το 2016 απομονώθηκαν τα πρώτα στελέχη Εντεροβακτηριακών - κυρίως *E. coli* και δευτερευόντως *K. pneumoniae* - ανθεκτικών στην κολιμυκίνη λόγω αντοχής πλασμιδιακής αιτιολογίας. Πιο συγκεκριμένα, τα στελέχη απομονώθηκαν στην Κίνα από ανθρώπους αλλά και ζώα εκτροφής και το υπεύθυνο γονίδιο ονομάστηκε *mcr-1*⁹. Γενικά, η πλασμιδιακού τύπου αντοχή οφείλεται στη μεταφορά γονιδίων αντοχής σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά τα οποία φέρονται επάνω σε πλασμίδια. Τα πλασμίδια είναι δίκλωνα, κυκλικά μόρια DNA, που βρίσκονται σε πολλά βακτήρια. Τα πλασμίδια έχουν τη δυνατότητα να ανταλλάσσουν γενετικό υλικό τόσο μεταξύ τους όσο και με το κύριο μόριο του βακτηριακού DNA, καθώς και να μεταφέρονται από ένα βακτήριο σε άλλο. Με τον τρόπο αυτό μετασχηματίζουν το βακτήριο στο οποίο εισέρχονται και του προσδίδουν καινούργιες ιδιότητες. Συνεπώς, η πλασμιδιακού τύπου μικροβιακή αντοχή μεταφέρεται «οριζόντια», άρα εξαπλώνεται ταχύτερα από τη χρωμοσωμική και για το λόγο αυτό θεωρείται ακόμα πιο απειλητική για την αποτελεσματικότητα των αντιβιοτικών.

Ένα πολύ σημαντικό εύρημα των ερευνητών που ανίχνευσαν για πρώτη φορά την πλασμιδιακή αντοχή στην κολιμυκίνη είναι ότι το γονίδιο *mcr-1* βρέθηκε, εκτός από κλινικά δείγματα, και σε κρέας λιανικής πώλησης⁹. Το ανησυχητικό αυτό εύρημα επιβεβαίωσε τις επικίνδυνες για τη δημόσια υγεία συνέπειες που ενέχει η χορήγηση αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία.

4.3 Προσδιορισμός ΕΑΠ κολιμυκίνης

Ο προσδιορισμός της ΕΑΠ της κολιμυκίνης είναι μία από τις μεγαλύτερες «προκλήσεις» του μικροβιολογικού εργαστηρίου στον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιβιοτικά και αιτία συνιστούν οι ενδογενείς ιδιότητες του μορίου της κολιμυκίνης. Ειδικότερα, η κολιμυκίνη ως κατιονικό πεπτίδιο με υψηλό μοριακό βάρος δεν μπορεί να διαχυθεί εύκολα στο άγαρ. Αρκετές μελέτες έχουν συγκρίνει τις διαφορετικές μεθόδους προσδιορισμού της ΕΑΠ της κολιμυκίνης ως προς την ακρίβειά τους καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι οι ζώνες αναστολής που δημιουργούνται με τη μέθοδο διάχυσης δίσκων ή με τις ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης δεν είναι ακριβείς (χαμηλότερες τιμές ΕΑΠ → very major errors)^{96,97}. Τα ευρήματα των μελετών είναι διφορούμενα ως προς τα ποσοστά πολύ σημαντικών λαθών (very major errors) με το αυτοματοποιημένο σύστημα προσδιορισμού ευαισθησίας Vitek και για το λόγο αυτό, η συγκεκριμένη μέθοδος δεν προτείνεται^{98,99}. Αντίθετα, οι μέθοδοι αναφοράς αραιώσεων αντιβιοτικού σε άγαρ (agar dilution) και μικρο-αραιώσεων αντιβιοτικού σε ζωμό (broth microdilution) έχουν δείξει σταθερά αξιόπιστα αποτελέσματα στον προσδιορισμό της ΕΑΠ χωρίς την ανεύρεση πολύ σημαντικών λαθών¹⁰⁰. Ωστόσο, ο προσδιορισμός της ΕΑΠ με τη μέθοδο αραιώσεων αντιβιοτικού σε άγαρ είναι μια χρονοβόρα διαδικασία που δεν επιτρέπει την εφαρμογή της ως μεθόδου εκλογής για τον έλεγχο ευαισθησίας στην κολιμυκίνη σε ένα κλινικό εργαστήριο με μεγάλο αριθμό κλινικών δειγμάτων.

Το Μάρτιο του 2016 η Ευρωπαϊκή Επιτροπή για τον Έλεγχο Ευαισθησίας στα Αντιμικροβιακά (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST) εξέδωσε οδηγία σύμφωνα με την οποία η μόνη αποδεκτή μέθοδος ελέγχου ευαισθησίας της κολιμυκίνης αποτελεί η μέθοδος μικρο-αραιώσεων αντιβιοτικού σε ζωμό¹⁰¹. Τα μέχρι τότε δημοσιευμένα δεδομένα έδειξαν ότι η μέθοδος διάχυσης δίσκων και οι ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην περίπτωση της κολιμυκίνης λόγω αναξιόπιστων μετρήσεων της ΕΑΠ, ενώ τα δεδομένα δεν ήταν επαρκή για την εξαγωγή συμπερασμάτων αναφορικά με τη μέθοδο της αραιώσεων αντιβιοτικού σε άγαρ. Ενδιαφέροντα είναι τα ευρήματα πρόσφατης μελέτης που σύγκρινε διαφορετικές μεθόδους προσδιορισμού της ΕΑΠ κολιμυκίνης σε Gram-αρνητικά, συμπεριλαμβανομένης και *K. pneumoniae*, βακτηρίδια και έδειξε ότι η μέθοδος αραιώσεων αντιβιοτικού σε άγαρ παράγει εξίσου ή και περισσότερο αξιόπιστες τιμές ΕΑΠ από τη μέθοδο μικρο-αραιώσεων σε ζωμό¹⁰².

Μάλιστα, αξίζει να σημειωθεί ότι σύμφωνα με την οδηγία της EUCAST δεν πρέπει να προστίθεται ο παράγοντας polysorbate-80 (P-80) στην πλάκα μικρο-αραιώσεων¹⁰¹. Ο παράγοντας P-80, γνωστός και ως Tween-80, είχε προταθεί να προστίθεται στην πλάκα μικρο-αραιώσεων ώστε να αποφεύγεται η προσκόλληση της κολιμυκίνης στα τοιχώματα της πλάκας^{103,104}. Ωστόσο, νεότερα δεδομένα έδειξαν ότι ο παράγοντας P-80 μπορεί να δράσει συνεργιστικά με την κολιμυκίνη και να με αποτέλεσμα ψευδώς χαμηλότερες τιμές ΕΑΠ για την κολιμυκίνη¹⁰⁵.

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η διερεύνηση της εξέλιξης αντοχής της πολυανθεκτικής *K. pneumoniae* από το αίμα ασθενών στην κολιμυκίνη στο νοσοκομείο μας, της δυναμικής συσχέτισης ανάμεσα στην εξέλιξη της αντοχής στην κολιμυκίνη και τη χρήση του αντιβιοτικού και η καταγραφή της αντοχής των συγκεκριμένων μικροβιακών στελεχών σε άλλα αντιβιοτικά «τελευταίας γραμμής».

1. Υλικό

1.1 Τόπος και χρόνος διεξαγωγής της μελέτης

Πρόκειται για μια αναδρομική μελέτη η οποία περιλαμβάνει όλα τα μικροβιακά στελέχη *K. pneumoniae* με ελαττωμένη ευαισθησία στις καρβαπενέμες που απομονώθηκαν από το αίμα ασθενών με βακτηριαμία και νοσηλεύτηκαν Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Λαϊκό» το διάστημα από 1 Ιανουαρίου 2002 έως 30 Ιουνίου 2016. Το «Λαϊκό» είναι τριτοβάθμιο νοσοκομείο 568 κλινών με 7 πανεπιστημιακές κλινικές αλλά και κλινικές και τμήματα του ΕΣΥ. Η εκπόνηση της μελέτης εγκρίθηκε από την επιτροπή βιοηθικής και δεοντολογίας του νοσοκομείου.

1.2 Βακτηριακά στελέχη

Σύμφωνα με τις διαδικασίες του εργαστηρίου όλες οι θετικές αιμοκαλλιέργειες εμβολιάζονται απευθείας σε Mueller-Hinton άγαρ ώστε να υπάρχει διαθέσιμο ένα ενδεικτικό -αλλά όχι τελικό- αντιβιογράμμα με τη μέθοδο Kirby-Bauer μέσα σε 18-24 ώρες από τη θετικοποίηση της αιμοκαλλιέργειας. Στη μελέτη μας συμπεριλάβαμε όλα τα στελέχη *K. pneumoniae* που απομονώθηκαν το προαναφερθέν χρονικό διάστημα και είχαν διάμετρο ζώνης αναστολής στην ιμπενέμη ίση ή μικρότερη από 23 χιλιοστά (≤ 23 mm) σύμφωνα με το πληροφοριακό σύστημα του εργαστηρίου (Laboratory Informational System). Στους ασθενείς που απομονώθηκε *K. pneumoniae* σε περισσότερες από μία αιμοκαλλιέργειες σε διάστημα 30 ημερών, μόνο το πρώτο στέλεχος συμπεριλήφθηκε στη μελέτη.

Οι αιμοκαλλιέργειες που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη είχαν επωαστεί στο αυτοματοποιημένο σύστημα BacT/ALERT® (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) και μετά τη θετικοποίησή τους πραγματοποιήθηκε άμεση χρώση κατά Gram και εμβολιασμός του κλινικού δείγματος στα στερεά θρεπτικά υλικά αιματούχο και MacConkey άγαρ. Η

ταυτοποίηση των μικροβίων όπως και ο προσδιορισμός της ΕΑΠ στα αντιβιοτικά στο κλινικό εργαστήριο είχε πραγματοποιηθεί με το αυτοματοποιημένο σύστημα MicroScan autoSCAN-4 system (Beckman Coulter, Nyon, Switzerland). Το MicroScan προσδιορίζει τις ΕΑΠ με τη μέθοδο μικρο-αραιώσεων αντιβιοτικών σε ζωμό.

Σύμφωνα με τις διαδικασίες του κλινικού εργαστηρίου, τα μικροβιακά στελέχη των θετικών αιμοκαλλιιεργειών αποθηκεύτηκαν σε ειδικά φιαλίδια (cryovials) που περιείχαν αποβουτυρωμένο γάλα (skim milk) και φυλάχθηκαν σε βαθιά κατάψυξη (-70°C). Για την εκτέλεση των εργαστηριακών πειραμάτων της μελέτης μας όλα τα μικρόβια αποψύχθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, απευθείας ανακαλλιιεργήθηκαν σε MacConkey άγαρ και θειογλυκολικό ζωμό και επώαστηκαν στους 37°C για 24-48 ώρες.

2. Μέθοδοι

2.1 Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά «τελευταίας γραμμής»

Για τον προσδιορισμό της ΕΑΠ της κολιμυκίνης, της πολυμυξίνης Β και της φωσφομυκίνης χρησιμοποιήθηκε η πρότυπη μέθοδος των αραιώσεων αντιβιοτικού σε άγαρ σύμφωνα με τις οδηγίες του οργανισμού CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)¹⁰⁶. Η μέθοδος αυτή θεωρείται η πρότυπη στον έλεγχο ευαισθησίας αντιβιοτικών και είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη στην έρευνα καθώς δίνει τη δυνατότητα ελέγχου και σύγκρισης πολλών διαφορετικών αντιβιοτικών¹⁰⁷. Επιπλέον, δίνει τη δυνατότητα ελέγχου ευαισθησίας μέχρι και 30 διαφορετικών μικροβίων ταυτόχρονα και είναι πολύ πιο οικονομική από τη μέθοδο μικρο-αραιώσεων σε ζωμό και τις ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης¹⁰⁷. Ωστόσο, η μέθοδος αραιώσεων αντιβιοτικών σε άγαρ δεν χρησιμοποιείται στα κλινικά εργαστήρια διότι πρόκειται για αρκετά χρονοβόρα διαδικασία.

Για την εκτέλεση των πειραμάτων παρασκευάστηκαν τρυβλία Mueller-Hinton άγαρ με ενσωματωμένη κολιμυκίνη [colistin sulfate salt (C4461; Sigma-Aldrich, St Louis MO)], πολυμυξίνη Β [polymyxin B sulfate salt (P4932; Sigma-Aldrich)] και φωσφομυκίνη [fosfomycin disodium salt (P5396; Sigma-Aldrich) supplemented with 25 mg/L d -glucose-6-phosphate sodium salt (G7879; Sigma-Aldrich)] σε 15 αραιώσεις από 0,016 έως και 256 mg/L για κάθε μία από τις χημικές ουσίες. Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν εναιωρήματα των στελεχών σε συγκέντρωση 0,5 της κλίμακας McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ cfu/ml) σε ζωμό Mueller-Hinton. Ο ενοφθαλμισμός στα τρυβλία με το αντιβιοτικό πραγματοποιήθηκε με την χρήση ενός πολλαπλού ενοφθαλμιστή (multiple replicator) με ακίδες 5 μ l. Τα τρυβλία επώαστηκαν για 24 ώρες σε θερμοκρασία 37° C έως την ανάγνωσή τους και τον προσδιορισμό της ΕΑΠ στα αντιβιοτικά.

Για τον υπολογισμό της ΕΑΠ της μεροπενέμης και της τιγκεκυκλίνης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των ταινιών διαβαθμισμένης συγκέντρωσης (MIC Test Strips) (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italy) εύρους 0,016 – 256 mg/L. Ο ενοφθαλμισμός έγινε σε τρυβλία Mueller-Hinton, ακολούθησε επώαση για 18 ώρες σε θερμοκρασία 37° C έως την ανάγνωσή τους και τον προσδιορισμό της ΕΑΠ στα αντιβιοτικά.

Τα στελέχη *Escherichia coli* ATCC 25922 και *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο ποιότητας. Τα όρια ευαισθησίας της EUCAST (v6.0)

χρησιμοποιήθηκαν για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων¹⁰⁸. Τα όρια ευαισθησίας της κολιμυκίνης χρησιμοποιήθηκαν και στην περίπτωση της πολυμυξίνης Β καθώς δεν υπάρχουν όρια ευαισθησίας για το συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Λόγω των συστάσεων που ανακοίνωσε η EUCAST μετά το πέρας των πειραμάτων μας σχετικά με τη μέθοδο μικρο-αραιώσεων αντιβιοτικών σε ζωμό ως προτιμώμενης μεθόδου για τον προσδιορισμό της ΕΑΠ κολιμυκίνης¹⁰¹, όλα τα στελέχη με ΕΑΠ κολιμυκίνης 1, 2, 4 και 8 mg/L ελέγχθηκαν περαιτέρω με τη μέθοδο μικρο-αραιώσεων αντιβιοτικών σε ζωμό για επιβεβαίωση των ευρημάτων της μεθόδου αραιώσεων αντιβιοτικού σε άγαρ.

2.2 Ανίχνευση γονιδίων παραγωγής καρβαπενεμάσης με πολυπλεκτική (multiplex) PCR

Όσα στελέχη *K. pneumoniae* παρουσίασαν ΕΑΠ μεροπενέμης $\geq 0,5$ mg/L με την ταινία διαβαθμισμένης συγκέντρωσης ελέγχθηκαν με πολυπλεκτική PCR για την παρουσία γονιδίων καρβαπενεμάσης (*bla_{KPC}*, *bla_{VIM}*, *bla_{NDM-1}* και *bla_{OXA-48}*). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

Εξαγωγή DNA (DNA extraction)

Οι βακτηριακές αποικίες, οι οποίες βρίσκονταν σε 500 μ L διπλά απεσταγμένου νερού (double-distilled H₂O), υποβλήθηκαν σε βρασμό στους 100° C και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν σε επιτάχυνση 17.300g για 5 λεπτά ώστε να ληφθεί το υπερκείμενο που περιείχε το DNA.

Multiplex PCR

Οι αντιδράσεις PCR για την ανίχνευση των KPC, VIM, NDM-1, OXA-48 και 16s γονιδίων ενδιαφέροντος πραγματοποιήθηκαν σε βαθμιδωτό κυκλοποιητή (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Germany) χρησιμοποιώντας τη Multiplex KAPPA2G-Taq DNA πολυμεράση (Kappa Biosystems) η οποία περιεχόταν σε 2x μίγμα αντίδρασης (reaction mix), 0.2 μ M από κάθε εκκινητή (ευθύ και αντίστροφο - forward and reverse), σε θερμοκρασία υβριδισμού στους 63° C. Οι εκκινητές των γονιδίων ενδιαφέροντος (KPC, VIM, NDM-1, OXA-48 και 16s) επιλέχθηκαν όπως περιγράφηκε στη βιβλιογραφία^{107,109,110}. Η ενίσχυση της 18s RNA υπομονάδας χρησιμοποιήθηκε σαν θετικός μάρτυρας. Τα ενισχυμένα προϊόντα των KPC (900 ζεύγη βάσεων - bp), VIM (247 bp), NDM-1 (600 bp), OXA-48 (700 bp) και 16s (500 bp) επιβεβαιώθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης (2%) δύο φορές.

2.3 Διαχρονική εξέλιξη της αντοχής της κολιμυκίνης κατά τη χρονική περίοδο της μελέτης: στατιστική προσέγγιση με ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης

Για να μελετήσουμε την τάση της αντοχής της κολιμυκίνης στο νοσοκομείο μας κατά τη χρονική περίοδο 2002-2016 εφαρμόσαμε την στατιστική ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης (linear regression analysis). Η στατιστική ανάλυση έγινε με το στατιστικό πακέτο IBM SPSS Statistics v.23 (IBM Corp., Armonk, NY).

Η γραμμική παλινδρόμηση είναι μια προσέγγιση για τη μοντελοποίηση της σχέσης μεταξύ μιας εξαρτημένης μεταβλητής και μίας ή περισσότερων ανεξάρτητων μεταβλητών. Στη μελέτη μας η αντοχή στην κολιμυκίνη είναι η εξαρτημένη μεταβλητή (y) και ο χρόνος είναι η ανεξάρτητη μεταβλητή (x). Η παλινδρόμηση εκφράζει την εξάρτηση της μεταβλητής y από την ανεξάρτητη x με μορφή ευθείας γραμμής με τη χρήση της μαθηματικής εξίσωσης $y = ax + b$, όπου a και b είναι οι άγνωστοι συντελεστές παλινδρόμησης και η σταθερά a είναι ο συντελεστής κλίσης της ευθείας. Το κριτήριο που καθορίζει πόσο καλά η ευθεία προσαρμόζει/εξηγεί τα δεδομένα είναι ο συντελεστής προσδιορισμού R^2 , ο οποίος μετρά το ποσοστό απόκλισης της εξαρτημένης μεταβλητής το οποίο μπορεί να εξηγηθεί από την παλινδρόμηση. Η τιμή του R^2 κυμαίνεται από 0 (κανένα ποσοστό προσαρμοστικότητας) έως 1 (άριστη προσαρμοστικότητα) που σημαίνει ότι όσο αυξάνει η τιμή του συντελεστή τόσο καλύτερη προσαρμογή δίνει η εξίσωση. Στη μελέτη μας μια τάση με $R^2 > 0,3$ και $p\text{-value} < 0,5$ ορίστηκε ως στατιστικά σημαντική.

2.4 Διερεύνηση δυναμικής συσχέτισης μεταξύ αντοχής στην κολιμυκίνη και χρήσης του αντιβιοτικού με τη χρήση της στατιστικής μεθόδου ανάλυσης χρονοσειρών

Η στατιστική μέθοδος ανάλυσης χρονοσειρών επιλέχθηκε ώστε να διερευνήσουμε πιθανή συσχέτιση μεταξύ της αντοχής στην κολιμυκίνη και χρήσης του αντιβιοτικού στην κλινική πράξη. Εν συντομία, χρονοσειρά ονομάζεται μια σειρά από παρατηρήσεις σε χρονική σειρά με ίσα συνήθως χρονικά διαστήματα μεταξύ τους και στόχος της ανάλυσης χρονοσειρών είναι η διερεύνηση της διαχρονικής συμπεριφοράς των τιμών της χρονοσειράς. Επιπρόσθετα, η μέθοδος αυτή δίνει τη δυνατότητα πρόβλεψης των μελλοντικών τιμών μιας μεταβλητής με βάση την προηγούμενη συμπεριφορά της.

Η στατιστική ανάλυση έγινε με το στατιστικό πακέτο IBM SPSS Statistics v.23 (IBM Corp., Armonk, NY).

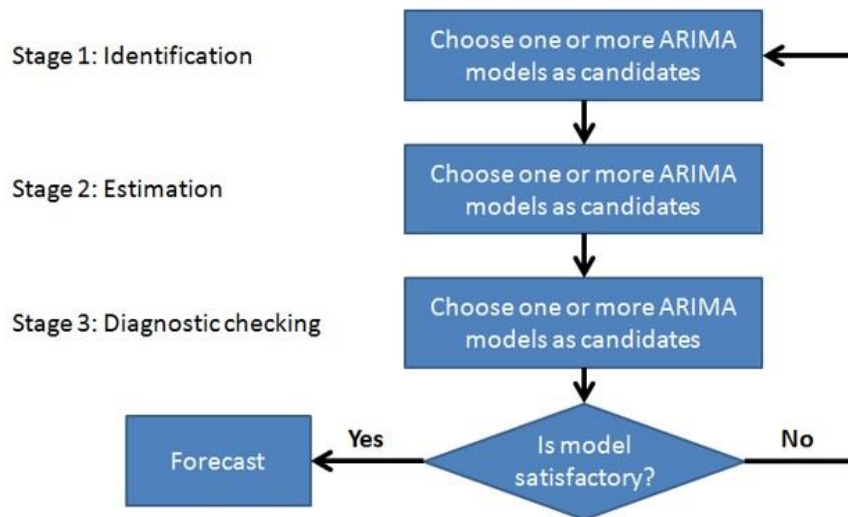
Διαδικασία μοντελοποίησης

Για την υλοποίηση της συγκεκριμένης στατιστικής ανάλυσης συμπεριλάβαμε όλα τα στελέχη *K. pneumoniae* που ήταν θετικά για την παραγωγή καρβαπενεμάσης κατά την χρονική περίοδο της μελέτης (Ιανουάριος 2002-Ιούνιος 2016).

- Μοντελοποίηση κατά Box-Jenkins: Αυτοπαλινδρομούμενο Μοντέλο Κινούμενου Μέσου (Autoregressive Integrated Moving Average – ARIMA)

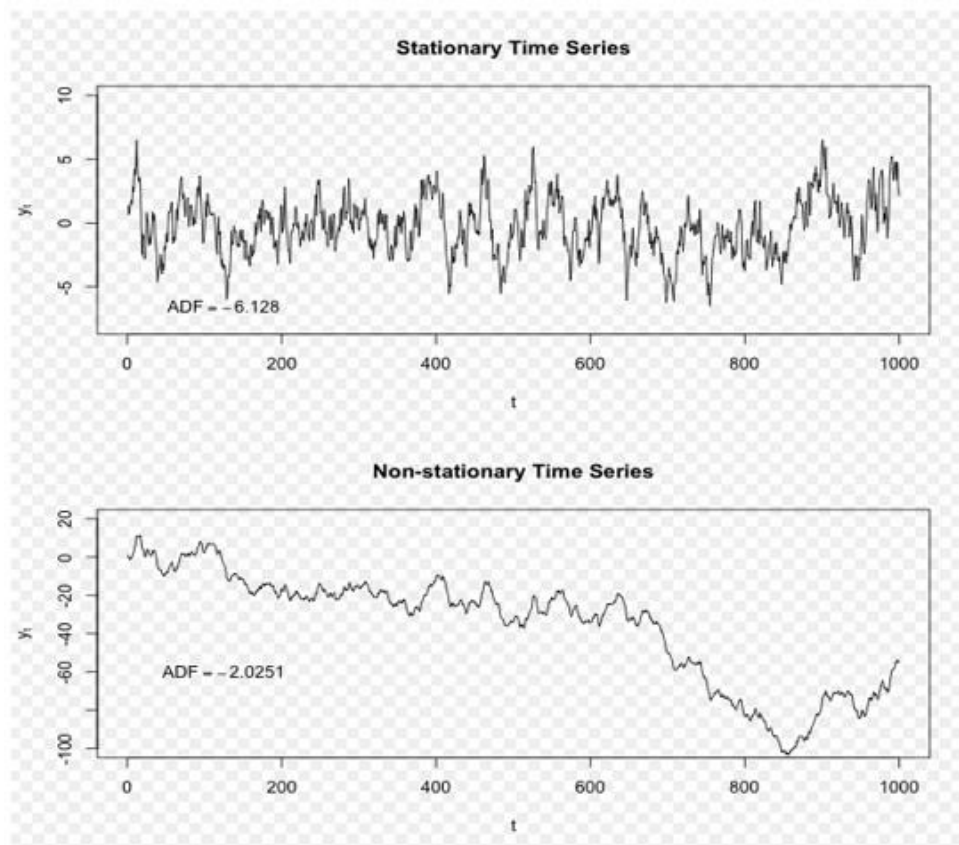
Χρησιμοποιήσαμε τη μοντελοποίηση κατά Box-Jenkins¹¹¹ για να δημιουργήσουμε τις επιμέρους χρονοσειρές της αντοχής στην κολιμυκίνη και της χρήσης κολιμυκίνης. Επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε την επίπτωση της αντοχής αντί του ποσοστού της στην ανάλυσή μας καθώς έχει βρεθεί ότι η χρήση ποσοστών μπορεί να οδηγήσει σε παραπλανητικά συμπεράσματα¹¹². Η επίπτωση αντοχής στην κολιμυκίνη υπολογίστηκε ως ο αριθμός των ανθεκτικών στελεχών *K. pneumoniae* στην κολιμυκίνη ανά 10.000 ασθενο-ημέρες. Τα δεδομένα του φαρμακείου αναφορικά με τη χρήση κολιμυκίνης μετατράπηκαν σε καθορισμένες ημερήσιες δόσεις (Defined Daily Doses - DDDs) και εκφράστηκαν σε DDDs/100 ασθενο-ημέρες. Η χρονοσειρά της αντοχής (output variable) και αυτή της χρήσης (input variable) υπολογισμένες σε τρίμηνα (quarters) μοντελοποιήθηκαν με τη χρήση της μεθόδου που προτάθηκε από τους Box και Jenkins^{111,113}. Η συμπεριφορά της αντοχής στην κολιμυκίνη και της χρήσης της κολιμυκίνης στο χρόνο μελετήθηκε λαμβάνοντας υπ' όψιν τις προηγούμενες τιμές και τάσεις της κάθε μεταβλητής καθώς επίσης και τις απότομες μεταβολές και διαταράξεις (moving average/MA terms) της στο πρόσφατο παρελθόν.

Γενικά, η στρατηγική δημιουργίας ενός μοντέλου ARIMA βασίζεται σε έναν επαναληπτικό κύκλο τριών βημάτων: 1. εύρεση του κατάλληλου μοντέλου (model identification), 2. εκτίμηση του μοντέλου (model estimation) και 3. διαγνωστικοί έλεγχοι για την επάρκεια του μοντέλου (diagnostic checking)¹¹¹. Τα βήματα αυτά αποτυπώνονται στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 7):



Εικόνα 7. Three-stage Box and Jenkins procedure

Αρχικά, κατασκευάστηκε το μοντέλο ARIMA από τις επιμέρους χρονοσειρές και εφαρμόστηκε διαφόριση (differencing) όπου ήταν απαραίτητο ώστε να επιτευχθεί στασιμότητα (stationarity). Γενικά, στάσιμη (stationary) χρονοσειρά είναι αυτή της οποίας οι ιδιότητες δεν εξαρτώνται από τον χρόνο που η σειρά παρατηρείται και οι διακυμάνσεις της δε διαφοροποιούνται με τον χρόνο. Ως εκ τούτου, οι στάσιμες χρονοσειρές – όπως αυτές του λευκού θορύβου (white noise) - φαίνονται ίδιες σε όλα τα χρονικά σημεία και το πρότυπό τους δεν μπορεί να προβλεφθεί μακροπρόθεσμα. Το χρονοδιάγραμμα των στάσιμων χρονοσειρών είναι αδρά οριζόντιο (κυκλική συμπεριφορά είναι πιθανή) με σταθερή μεταβλητότητα. Αντίθετα, χρονοσειρές με τάσεις ή εποχικότητα δεν είναι στάσιμες, αφού η τάση και η εποχικότητα θα επηρεάσουν την τιμή της χρονοσειράς σε διαφορετικά χρονικά σημεία. Η διαφορά στάσιμων και μη στάσιμων χρονοσειρών απεικονίζεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 8):



Εικόνα 8. Διαφορά στάσιμων (stationary) και μη στάσιμων (non-stationary) χρονοσειρών

Στη συνέχεια, η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης (autocorrelation function - ACF) και μερικής αυτοσυσχέτισης (partial autocorrelation function - PACF) των χρονοσειρών ελέγχθηκαν για την εύρεση της αυτοπαλινδρομούμενης συμπεριφοράς (autoregressive/AR behavior), της συμπεριφοράς κινούμενου μέσου (moving average/MA behavior) ή μικτής συμπεριφοράς (mixed behavior/ARMA). Τυπικά, τα μοντέλα ARIMA αναφέρονται με τον παρακάτω συμβολισμό $ARIMA(p, d, q)$, όπου:

p είναι η τάξη του αυτοπαλίνδρου μοντέλου, σχετιζόμενο με προηγούμενες τιμές της μεταβλητής ενδιαφέροντος.

d είναι η τάξη της μη εποχικής διαφορίσης για την επίτευξη της στασιμότητας.

q είναι η τάξη του κινητού μέσου όρου μοντέλου, σχετιζόμενο με τις απότομες μεταβολές στο εγγύς παρελθόν.

Οι παράμετροι του μοντέλου που ταυτοποιήθηκε εκτιμήθηκαν με την χρήση μη υποθετικών ελαχίστων τετραγώνων (unconditional least squares) ή με συναρτήσεις

πιθανοτήτων (likelihood functions). Η καταλληλότητα του μοντέλου εκτιμήθηκε με βάση το κριτήριο Μπεϋζιανής πληροφορίας (Bayesian Information Criterion - BIC) κι επίσης υπολογίστηκε ο συντελεστής προσδιορισμού R^2 (το ποσοστό μεταβλητότητας της παρατηρούμενης χρονοσειράς που εξηγείται από το μοντέλο). Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν διαγνωστικοί έλεγχοι με στόχο να διαπιστωθεί εάν το επιλεγθέν μοντέλο αντιπροσωπεύει επαρκώς τη δεδομένη χρονοσειρά. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήσαμε δύο διαγνωστικούς ελέγχους: 1. την ύπαρξη ή όχι στατιστικής σημασίας των παραμέτρων και 2. αν τα υπόλοιπα -residuals- των συναρτήσεων ACF και PACF αντιστοιχούσαν σε λευκό θόρυβο. Τέλος, με το μοντέλο ARIMA προβλέφθηκε βραχυπρόθεσμα η αντοχή της κολιμυκίνης μόνο με την χρήση των παρελθοντικών δεδομένων της αντοχής.

- Μοντελοποίηση με Γραμμική Συνάρτηση Μεταφοράς (Linear Transfer Function – LTF)

Η συνάρτηση μεταφοράς επιτρέπει τη μοντελοποίηση της συσχέτισης μεταξύ μιας χρονοσειράς εξόδου (output series) και μίας ή περισσότερων χρονοσειρών εισόδου (input series). Στη μελέτη μας η αντοχή στην κολιμυκίνη αποτελεί την χρονοσειρά εξόδου και η χρήση κολιμυκίνης την χρονοσειρά εισόδου. Χρησιμοποιήσαμε τη γραμμική συνάρτηση μεταφοράς για να ποσοτικοποιήσουμε τη δυναμική συσχέτιση ανάμεσα στην επίπτωση της αντοχής στην κολιμυκίνη και την χρήση του συγκεκριμένου αντιβιοτικού, λαμβάνοντας υπ' όψιν πιθανή καθυστέρηση στην εμφάνιση της επίδρασης¹¹⁴. Ειδικότερα, η μέθοδος LTF συνίσταται στα εξής με χρονική σειρά: 1. στη δημιουργία ενός μοντέλου με ένα λογικό αριθμό χρονικών υστερήσεων (lags) για τη μεταβλητή εισόδου χρησιμοποιώντας έναν αυτοπαλινδρομούμενο όρο τάξης 1 (AR1), 2. στην απαλοιφή των μη σημαντικών όρων και την εύρεση ενός μοντέλου ARIMA για το τμήμα του μοντέλου που δεν εξηγείται (π.χ. διαταράξεις) και 3. στην εκτίμηση των παραμέτρων και την εκτέλεση των διαγνωστικών ελέγχων.

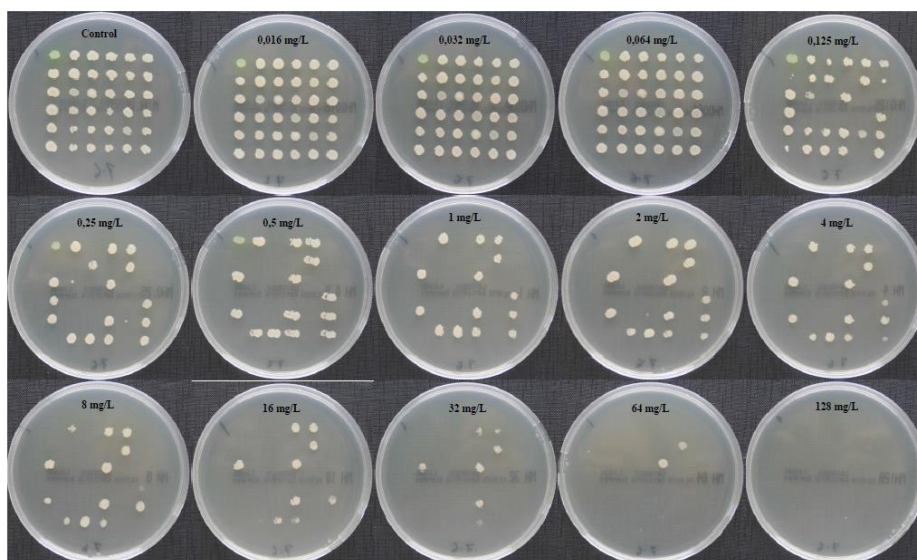
Τέλος, με βάση το μοντέλο LTF προβλέψαμε βραχυπρόθεσμα την πορεία της αντοχής στην κολιμυκίνη λαμβάνοντας υπ' όψιν την χρήση της κολιμυκίνης στο νοσοκομείο μας. Στο σημείο αυτό να επισημάνουμε ότι τόσο η μεθοδολογία ARIMA όσο και η LTF έχουν περιγραφεί λεπτομερώς σε προηγούμενες δημοσιευμένες μελέτες ως προς την χρήση τους για τη στατιστική διερεύνηση της συσχέτισης μεταξύ αντοχής και χρήσης των αντιβιοτικών^{113,115,116}.

3. Αποτελέσματα

3.1 Ευαισθησίες του μικροβιακού πληθυσμού σε κολιμυκίνη, πολυμυξίνη Β, φωσφομυκίνη, μεροπενέμη και τιγκεκυκλίνη

Συνολικά 394 στελέχη *K. pneumoniae* από αίμα ασθενών που νοσηλεύτηκαν στο νοσοκομείο μας κατά την χρονική περίοδο της μελέτης παρουσίασαν ζώνη αναστολής στην ιμιπενέμη ≤ 23 mm. Από αυτά, 320 στελέχη (81,2%) παρουσίασαν ΕΑΠ στη μεροπενέμη $\geq 0,5$ mg/L και ελέγχθηκαν για την παραγωγή καρβαπενεμάσης. Τελικά, 313 από τα 320 στελέχη βρέθηκαν θετικά για την παραγωγή τουλάχιστον μίας καρβαπενεμάσης με τη μέθοδο της πολυπλεκτικής PCR και ονομάστηκαν CP-Kp (carbapenemase-producing *K. pneumoniae*).

Παρακάτω παρατίθεται εικόνα από τα εργαστηριακά πειράματα για τον προσδιορισμό της ΕΑΠ σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά (κολιμυκίνη, πολυμυξίνη Β, φωσφομυκίνη) με τη μέθοδο αραιώσεων αντιβιοτικού σε άγαρ (agar dilution). Στη συγκεκριμένη εικόνα (Εικόνα 9) τα τρυβλία περιείχαν κολιμυκίνη.

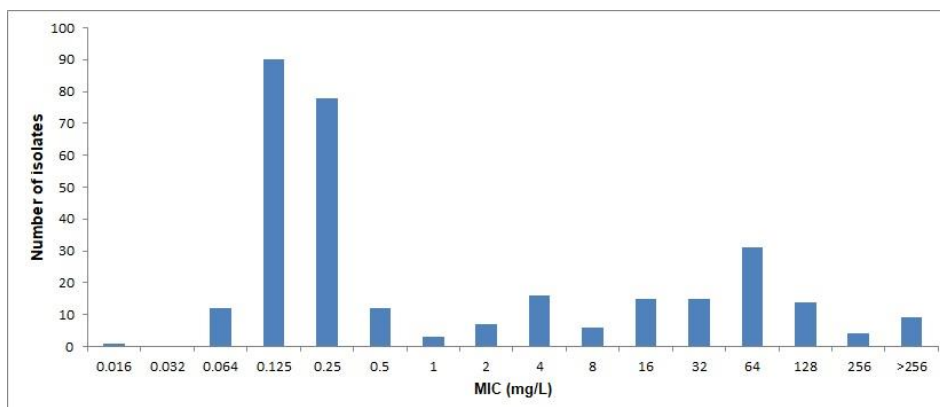


Εικόνα 9. Προσδιορισμός ΕΑΠ με τη μέθοδο αραιώσεων αντιβιοτικών (agar dilution)

Από τα 313 CP-Kp στελέχη, τα 197 (62,9%) ήταν ανθεκτικά στη μεροπενέμη (ΕΑΠ >8 mg/L), τα 79 (25,2%) είχαν ΕΑΠ στη μεροπενέμη που κυμαινόταν στο εύρος 4–8 mg/L και τα 37 (11,8%) ήταν ευαίσθητα (ΕΑΠ ≤ 2 mg/L). Όσον αφορά τα υπόλοιπα αντιβιοτικά που ελέγχθηκαν, 35,1% (110/313) ήταν ανθεκτικά στην κολιμυκίνη, 30% (94/313) στη φωσφομυκίνη και 5,4% (17/313) στην τιγκεκυκλίνη. Η πολυμυξίνη Β παρουσίασε το ίδιο

προφίλ ευαισθησίας με την κολιμυκίνη με τις τιμές της ΕΑΠ των δύο αντιβιοτικών να διαφέρουν μόνο κατά μία ή δύο αραιώσεις και χωρίς διαφορά στην κατηγοριοποίηση των αποτελεσμάτων ως ευαίσθητα/ανθεκτικά. Δύο στελέχη ήταν ανθεκτικά και στα 5 αντιβιοτικά που ελέγχθηκαν.

Όσα στελέχη είχαν ΕΑΠ στην κολιμυκίνη 1, 2, 4 and 8 mg/L με τη μέθοδο agar dilution ελέγχθηκαν περαιτέρω και με broth microdilution. Βρέθηκε ότι οι τιμές της ΕΑΠ μεταξύ των δύο μεθόδων διέφεραν μόνο κατά μία αραιώση ή καθόλου με αποτέλεσμα η ερμηνεία των αποτελεσμάτων ως ευαίσθητα ή ανθεκτικά να είναι ίδια και με τις δύο μεθόδους. Στο παρακάτω ραβδόγραμμα (Εικόνα 10) απεικονίζεται η κατανομή των ΕΑΠ όλων των στελεχών στην κολιμυκίνη. Επίσης, στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται πιο αναλυτικά τα αποτελέσματα του ελέγχου ευαισθησίας στα αντιβιοτικά «τελευταίας γραμμής».



Εικόνα 10. Κατανομή των ΕΑΠ όλων των στελεχών στην κολιμυκίνη

Πίνακας 1. Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας στα αντιβιοτικά «τελευταίας γραμμής»

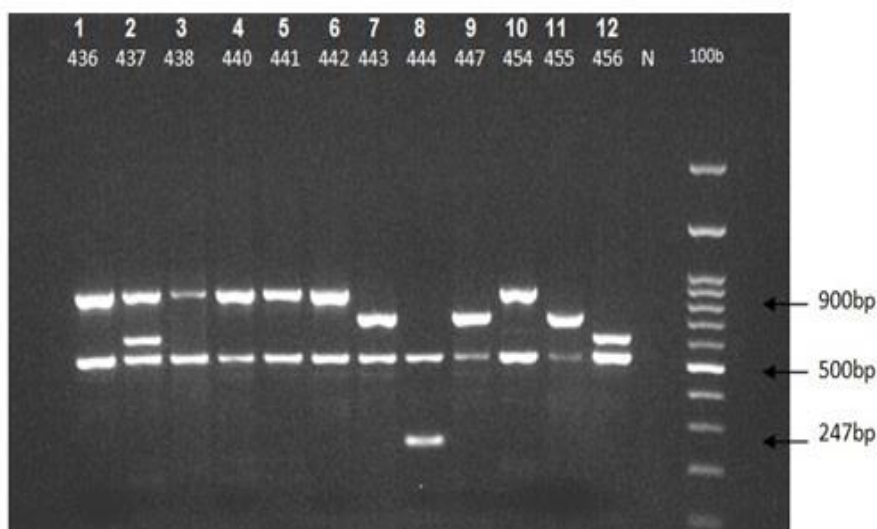
Αντιβιοτικό	Αντοχή (%)	Ενδιάμεση ευαισθησία (%)	Ευαισθησία (%)	Όρια ΕΑΠ (mg/L)	ΕΑΠ ₅₀ (mg/L)	ΕΑΠ ₉₀ (mg/L)
Μεροπενέμη	62,9	25,2	11,8	0,125 - >32	>32	>32
Κολιμυκίνη	35,1	–	34,6	0,016 - >256	0,25	64
Φωσφομυκίνη	30,0	–	70,0	1 - > 256	32	128
Τιγκεκυκλίνη	5,4	13,1	81,5	0,25 - 32	1	2

3.2 Γονίδια παραγωγής καρβαπενεμασών

Από τα 313 στελέχη που περιείχαν γονίδια που κωδικοποιούσαν καρβαπενεμάσες, 198 (63,3%) ήταν KPC, 89 (28,4%) ήταν VIM, 17 (5,4%) ήταν NDM-1 και 4 (1,3%) ήταν OXA-48. Πέντε στελέχη έφεραν περισσότερα από ένα γονίδια αντοχής (3 στελέχη είχαν KPC και VIM, 1 KPC και NDM-1 και 1 VIM και NDM-1). Το ποσοστό αντοχής στην κολιμυκίνη ήταν 37,2% στα KPC(+) και 35,2% στα VIM(+) στελέχη (διαφορά μη στατιστικώς σημαντική). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα δύο στελέχη που ήταν ανθεκτικά και στα 5 αντιβιοτικά παρήγαν KPC καρβαπενεμάση, ενώ και τα 4 στελέχη που περιείχαν OXA-48 ήταν ανθεκτικά στην κολιμυκίνη.

Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 11) παρατίθεται ως παράδειγμα η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πολυπλεκτικής PCR στη γέλη αгарόζης για 12 από τα στελέχη που ελέγχθηκαν. Τα αποτελέσματα είναι τα ακόλουθα:

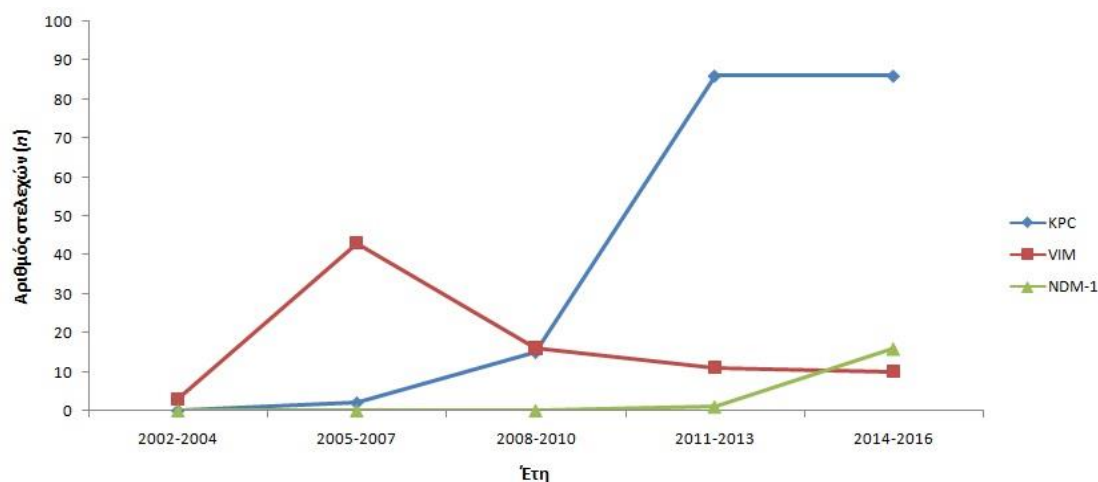
Στήλη 1: *bla*_{KPC} Στήλη 2: *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM-1} Στήλη 3: *bla*_{KPC} Στήλη 4: *bla*_{KPC} Στήλη 5: *bla*_{KPC}
Στήλη 6: *bla*_{KPC} Στήλη 7: *bla*_{OXA-48} Στήλη 8: *bla*_{VIM} Στήλη 9: *bla*_{OXA-48} Στήλη 10: *bla*_{KPC} Στήλη
11: *bla*_{OXA-48} Στήλη 12: *bla*_{NDM-1}



Εικόνα 11. Προϊόντα ηλεκτροφόρησης της πολυπλεκτικής PCR

Η εξέλιξη των διαφόρων γονιδίων αντοχής στις καρβαπενέμες στη 15-ετία 2002-2016 στο νοσοκομείο μας απεικονίζεται στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 12). Παρατηρούμε ότι στελέχη *K. pneumoniae* θετικά για την παραγωγή καρβαπενεμασών εμφανίστηκαν για πρώτη φορά το 2002. Τα συγκεκριμένα στελέχη ανήκαν στην κατηγορία των VIM, καθώς οι VIM καρβαπενεμάσες ήταν οι πρώτες που εμφανίστηκαν στην Ελλάδα. Το πρώτο

KPC στέλεχος φαίνεται να εμφανίστηκε στο νοσοκομείο μας το 2007 και έκτοτε τα KPC επικράτησαν έναντι των VIM, γεγονός που ισχύει μέχρι και σήμερα. Το 2013 εμφανίστηκε το πρώτο NDM-1 στέλεχος και έκτοτε κάθε χρόνο απομονώνεται σταθερά ένας αριθμός στελεχών με το συγκεκριμένο μηχανισμό αντοχής, χωρίς όμως ευρεία εξάπλωση όπως στην περίπτωση των KPC και VIM. Τέλος, το 2015 εμφανίστηκε το πρώτο OXA-48 στέλεχος και κατά τη διάρκεια της μελέτης μας απομονώθηκαν συνολικά 4 OXA-48.



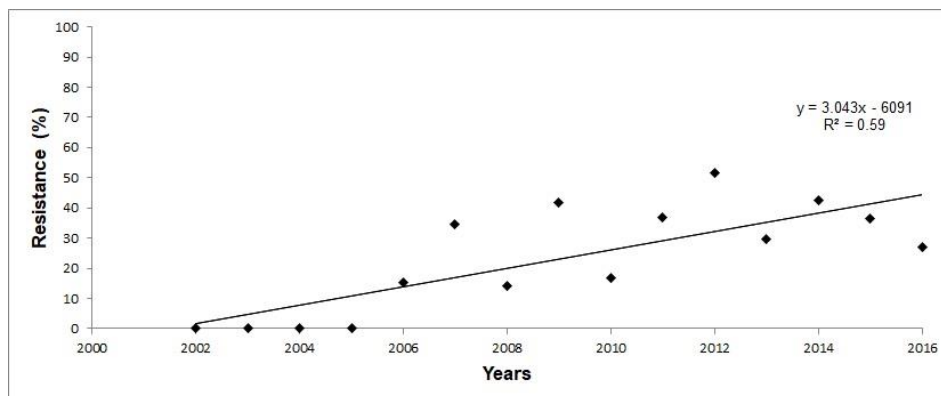
Εικόνα 12. Η εξέλιξη των διαφόρων γονιδίων αντοχής στις καρβαπενέμες την περίοδο 2002-2016 στο νοσοκομείο μας

3.3 Διαχρονική εξέλιξη της αντοχής της κολιμυκίνης

Το πρώτο στέλεχος *K. pneumoniae* ανθεκτικό στην κολιμυκίνη εμφανίστηκε στο νοσοκομείο μας το 2006. Χωρίζοντας την χρονική περίοδο της μελέτης σε δύο υπο-περιόδους, βρήκαμε ότι το ποσοστό αντοχής στην κολιμυκίνη ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερο την περίοδο 2011-2016 συγκριτικά με το ποσοστό την περίοδο 2006-2010 [38,7% (86/222) vs. 26,4% (24/91); $p = 0,03$]. Στη συνέχεια, εφαρμόσαμε την ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης (linear regression analysis) για να μελετήσουμε την τάση της αντοχής στην κολιμυκίνη στην 15-ετία. Η ανάλυση έδειξε ότι η αντοχή στην κολιμυκίνη παρουσίασε στατιστικώς σημαντική αυξητική τάση στον χρόνο, από 0% το 2002 σε 26,9% το 2016 [$R^2 = 0,5$, $p < 0,01$; point estimate of coefficient, 2,97, 95% confidence interval (CI) 1,20–4,75; standard error of the slope coefficient, 0,82]. Επιπλέον, παρατηρήθηκε αυξητική τάση στον χρόνο στην χρήση της κολιμυκίνης ($R^2 = 0,54$, $p < 0,01$; point estimate of coefficient, 0,66, 95% CI 0,49–0,82; standard error of the

slope coefficient, 0,08), από 0,2 DDDs/100 ασθενo-ημέρες το πρώτο τρίμηνο του 2002 σε 7,10 DDDs/100 ασθενο-ημέρες το δεύτερο τρίμηνο του 2016.

Στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 13) απεικονίζεται η γραμμή τάσης της αντοχής στην κολιμυκίνη κατά την χρονική περίοδο της μελέτης μας η οποία περιγράφεται από την εξίσωση $y = 3,043x - 6091$.



Εικόνα 13. Γραμμή τάσης της αντοχής στην κολιμυκίνη κατά την χρονική περίοδο της μελέτης

3.4 Αντοχή στην κολιμυκίνη και χρήση του αντιβιοτικού με τη χρήση της στατιστικής μεθόδου ανάλυσης χρονοσειρών

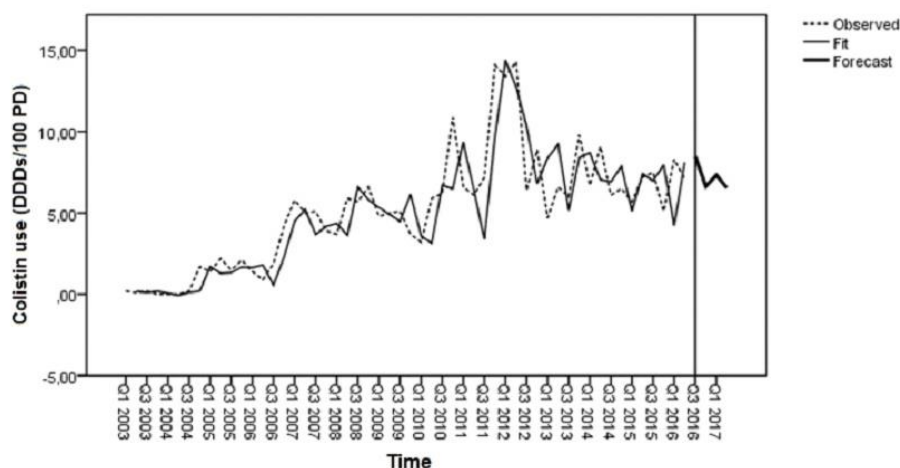
3.4.1 Κατασκευή χρονοσειράς αντοχής στην κολιμυκίνη

Η συνολική επίπτωση της ανθεκτικής στην κολιμυκίνη *K. pneumoniae* υπολογίστηκε ότι ήταν 0,37 στελέχη ανά 10.000 ασθενο-ημέρες και η μέση χρήση κολιμυκίνης ανά τρίμηνο ήταν 5,14 DDDs/100 ασθενο-ημέρες. Αρχικά, χρησιμοποιώντας τη μεθοδολογία των Box και Jenkins βρήκαμε ένα μοντέλο ARIMA(1, 0, 0) με έναν σημαντικό όρο αυτοπαλινδρομούμενου μοντέλου τάξης (lag) 1 (τρίμηνα) για την αντοχή στην κολιμυκίνη. Από τα διαγράμματα των υπολοίπων των συναρτήσεων ACF και PACF, επαληθεύσαμε ότι τα υπόλοιπα αντιστοιχούσαν σε «λευκό θόρυβο». Ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2) ήταν 0,52 και το κανονικοποιημένο BIC ήταν -2.115. Η προβλεφθείσα επίπτωση της αντοχής στην κολιμυκίνη για τα επόμενα 5 τρίμηνα (Q3 2016 – Q3 2017) υπολογίστηκε ότι θα ήταν 0,93, 0,80, 0,70, 0,63 και 0,58, αντίστοιχα.

3.4.2 Κατασκευή χρονοσειράς χρήσης κολιμυκίνης

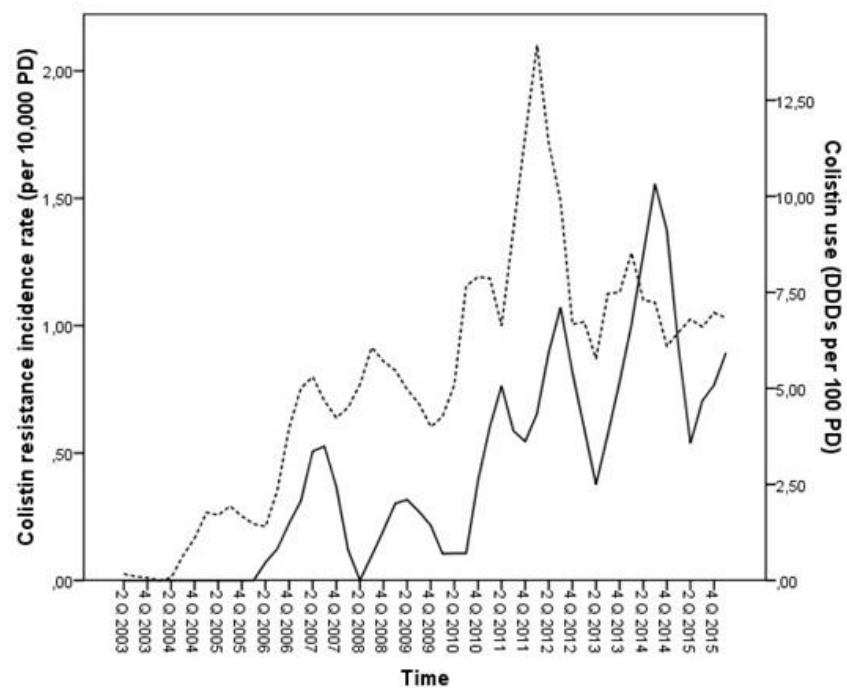
Στη συνέχεια, και πάλι με τη μέθοδο των Box και Jenkins βρήκαμε ένα μοντέλο ARIMA(3, 1, 0) για την χρήση της κολιμυκίνης με μία μη εποχική διαφόριση για την

επίτευξη στασιμότητας, έναν σημαντικό όρο αυτοπαλινδρομούμενου μοντέλου τάξης 3 και καμία σταθερά. Από τα διαγράμματα των υπολοίπων των συναρτήσεων ACF και PACF, επαληθεύσαμε και πάλι ότι τα υπόλοιπα αντιστοιχούσαν σε «λευκό θόρυβο». Στο παρακάτω σχήμα (Εικόνα 14) απεικονίζεται η παρατηρούμενη (observed) και προβλεφθείσα (predicted) χρήση της κολιμυκίνης από το μοντέλο ARIMA εκφρασμένη σε καθορισμένες ημερήσιες δόσεις ανά 100 ασθενο-ημέρες.



Εικόνα 14. Παρατηρούμενη (observed) και προβλεφθείσα (predicted) χρήση της κολιμυκίνης από το μοντέλο ARIMA

Τα εξομαλυμένα (smoothed) δεδομένα της χρονοσειράς της αντοχής (συνεχόμενη γραμμή) και της χρήσης κολιμυκίνης (διακεκομμένη γραμμή) χρησιμοποιώντας μετατροπή κινητού μέσου όρου (MA) τριών τριμήνων απεικονίζονται στο παρακάτω σχήμα (Εικόνα 15).



Εικόνα 15. Εξομαλυμένα (smoothed) δεδομένα της χρονοσειράς της αντοχής (συνεχόμενη γραμμή) και της χρήσης κολιμυκίνης (διακεκομμένη γραμμή)

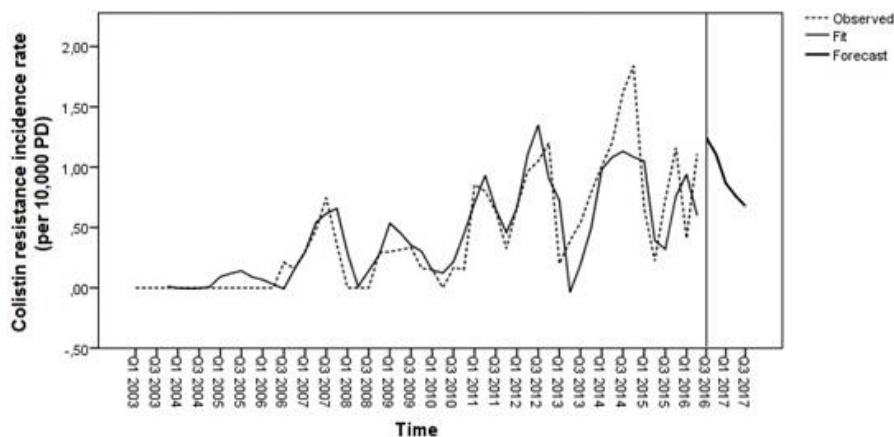
3.4.3 Αποτελέσματα του μοντέλου γραμμικής συνάρτησης μεταφοράς

Για να διερευνήσουμε πιθανή συσχέτιση μεταξύ της αντοχής στην κολιμυκίνη και της χρήσης του αντιβιοτικού κατασκευάσαμε το μοντέλο συνάρτησης μεταφοράς. Ο έλεγχος των συναρτήσεων ACF και PACF έδειξε καλή προσαρμογή του μοντέλου με έναν όρο αυτοπαλινδρομούμενου μοντέλου τάξης 1. Από τα διαγράμματα των υπολοίπων των συναρτήσεων ACF και PACF, επαληθεύσαμε και πάλι ότι τα υπόλοιπα αντιστοιχούσαν σε «λευκό θόρυβο». Ο συντελεστής προσδιορισμού R^2 λαμβάνοντας υπόψη την χρήση της κολιμυκίνης υπολογίστηκε 0,69 και το κανονικοποιημένο BIC – 2.346. Το μοντέλο συνάρτησης μεταφοράς που χρησιμοποιήθηκε περιγράφεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$R(t) = 0,528 R(t-1) + 0,05 U(t-1) + e(t)$$

Η συγκεκριμένη εξίσωση υποδηλώνει ότι η επίπτωση της αντοχής στην κολιμυκίνη σε ένα συγκεκριμένο τρίμηνο $[R(t)]$ είναι συνάρτηση της επίπτωσης της αντοχής 1 τρίμηνο πριν $[R(t-1)]$, της χρήσης κολιμυκίνης 1 τρίμηνο πριν $[U(t-1)]$ και της επίδρασης άλλων παραγόντων που δεν εξηγούνται από το μοντέλο $[e(t)]$.

Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται όλες οι παράμετροι που ελέγχθηκαν για τα μοντέλα ARIMA και LTF. Για να προβλέψουμε την αντοχή στην κολιμυκίνη τα επόμενα 5 συνεχόμενα τρίμηνα στο νοσοκομείο μας με το μοντέλο LTF, ήταν απαραίτητη η προβλεφθείσα χρήση κολιμυκίνης για το ίδιο χρονικό διάστημα. Τελικά, η προβλεφθείσα επίπτωση της αντοχής στην κολιμυκίνη για το χρονικό διάστημα των επόμενων 5 τριμήνων Q3 2016 – Q3 2017 υπολογίστηκε 0,92, 0,83, 0,67, 0,61 και 0,55 αντιστοίχως για το κάθε τρίμηνο. Στο παρακάτω σχήμα (Εικόνα 16) απεικονίζεται η επίπτωση της παρατηρούμενης (observed) και της προβλεφθείσας (predicted) από το μοντέλο ARIMA αντοχής στην κολιμυκίνη ανά 10.000 ασθενο-ημέρες χρησιμοποιώντας το μοντέλο LTF.



Εικόνα 16. Επίπτωση της παρατηρούμενης (observed) και της προβλεφθείσας (predicted) αντοχής στην κολιμυκίνη από το μοντέλο LTF

Πίνακας 2. Ανθεκτική στην κολιμυκίνη CP-Kp και χρήση κολιμυκίνης: μοντέλα ARIMA και συνάρτησης μεταφοράς

Term	Parameter (SE)	T-ratio	p-value
------	----------------	---------	---------

(a) Μοντέλο ARIMA model για την επίπτωση της ανθεκτικής στην κολιμυκίνη *K. pneumoniae*

Constant	0.430 (0.158)	2.723	0.009
----------	---------------	-------	-------

AR1	0.736 (0.096)	7.637	0.000
-----	---------------	-------	-------

(b) Μοντέλο ARIMA για την χρήση κολιμυκίνης (one non-seasonal difference)

AR3	-0.574 (0.116)	-4.949	0.000
-----	----------------	--------	-------

(c) Μοντέλο συνάρτησης μεταφοράς για την επίπτωση της ανθεκτικής στην κολιμυκίνη *K. pneumoniae* λαμβάνοντας υπόψη την χρήση κολιμυκίνης

AR1	0.528 (0.126)	4.181	0.000
-----	---------------	-------	-------

ULAG1*	0.050 (0.007)	7.027	0.000
--------	---------------	-------	-------

CP-Kp: carbapenemase-producing *K. pneumoniae*, SE: standard error

*Ο όρος ULAG1 (αριθμητής) αντιπροσωπεύει την χρήση κολιμυκίνης (U) το προηγούμενο τρίμηνο.

3.4.4 Ανάλυση χρονοσειρών και γραμμική συνάρτηση μεταφοράς χρησιμοποιώντας ποσοστά αντοχής (αντί επίπτωσης)

Αρχικά, στις αναλύσεις μας χρησιμοποιήσαμε ποσοστά αντοχής ανά τρίμηνο αντί της επίπτωσής της και εν συντομία θα παραθέσουμε και αυτά τα ευρήματα. Το μέσο τριμηνιαίο ποσοστό αντοχής στην κολιμυκίνη ήταν 34.6% και η μέση τριμηνιαία κατανάλωση κολιμυκίνης ήταν 5.14 DDDs/ασθενο-ημέρες. Αρχικά, βρήκαμε ένα μοντέλο ARIMA(3, 1, 1) με μία μη εποχική διαφόριση για την επίτευξη στασιμότητας, έναν σημαντικό όρο αυτοπαλινδρομούμενου μοντέλου τάξης 3 και έναν σημαντικό όρο κινούμενου μέσου τάξης 1 για την αντοχή στην κολιμυκίνη. Από τα διαγράμματα των υπολοίπων των συναρτήσεων ACF και PACF, επαληθεύσαμε ότι τα υπόλοιπα αντιστοιχούσαν σε «λευκό θόρυβο». Το R^2 υπολογίστηκε 0,47. Η προβλεφθείσα επίπτωση της αντοχής στην κολιμυκίνη για τα επόμενα 5 τρίμηνα (Q3 2016 – Q3 2017) υπολογίστηκε ότι θα ήταν 45%, 64%, 62%, και 67%, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, με την ίδια μέθοδο των Box και Jenkins βρήκαμε ένα μοντέλο ARIMA(3, 1, 0) για την χρήση κολιμυκίνης με μία μη εποχική διαφόριση, έναν σημαντικό όρο αυτοπαλινδρομούμενου μοντέλου τάξης 3 και καμία σταθερά. Επαληθεύσαμε ξανά ότι τα υπόλοιπα των συναρτήσεων ACF και PACF αντιστοιχούσαν σε «λευκό θόρυβο».

Για να διερευνήσουμε πιθανή συσχέτιση μεταξύ των δύο μεταβλητών (αντοχή και χρήση κολιμυκίνης) κατασκευάσαμε το μοντέλο LTF. Ο έλεγχος των συναρτήσεων ACF και PACF έδειξε καλή προσαρμογή του μοντέλου με δύο αυτοπαλινδρομούμενου μοντέλου τάξης 2 και 3 και μία μη εποχική διαφόριση. Στη συνέχεια επαληθεύσαμε και πάλι ότι τα υπόλοιπα των συναρτήσεων ACF και PACF αντιστοιχούσαν σε «λευκό θόρυβο». Ο συντελεστής προσδιορισμού R^2 λαμβάνοντας υπόψη την χρήση της κολιμυκίνης υπολογίστηκε 0,53. Το μοντέλο συνάρτησης μεταφοράς που χρησιμοποιήθηκε περιγράφεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$R(t) = 0,007 + 0,294 R(t-2) - 0,32 R(t-3) + 0,04 U(t-1).$$

Η συγκεκριμένη εξίσωση υποδηλώνει ότι το ποσοστό της αντοχής στην κολιμυκίνη σε ένα συγκεκριμένο τρίμηνο $[R(t)]$ είναι συνάρτηση του ποσοστού της αντοχής 2 και 3 τρίμηνα πριν $[[R(t-2)]$ και $[R(t-3)]]$ και της χρήσης κολιμυκίνης 1 τρίμηνο πριν $[U(t-1)]$.

Η προβλεφθείσα χρήση κολιμυκίνης τα επόμενα 4 συνεχόμενα τρίμηνα στο νοσοκομείο μας ήταν απαραίτητη ώστε να προβλέψουμε την αντοχή στην κολιμυκίνη με

το μοντέλο LTF για το ίδιο χρονικό διάστημα. Τελικά, η προβλεφθείσα επίπτωση της αντοχής στην κολιμυκίνη για το χρονικό διάστημα των επόμενων 4 τριμήνων Q3 2016 – Q2 2017 υπολογίστηκε 46%, 62%, 56% και 61% αντιστοίχως για το κάθε τρίμηνο.

III. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι λοιμώξεις από πολυανθεκτική *K. pneumoniae* που παράγει καρβαπενεμάσες τύπου KPC θεωρούνται ενδημικές στη χώρα μας^{26,28}. Μάλιστα, η υψηλή αποδοτέα θνητότητα αυτών των λοιμώξεων²² καθιστά τη μελέτη τους αναγκαία. Η παρούσα διατριβή πραγματεύεται την εξέλιξη της αντοχής της *K. pneumoniae* που παράγει καρβαπενεμάσες στην κολιμυκίνη με σκοπό την κατανόηση των αιτιών εμφάνισης της αντοχής και άρα, την καλύτερη αντιμετώπιση του μείζονος αυτού προβλήματος. Η κολιμυκίνη είναι ένα παλιό αντιβιοτικό του οποίου η χρήση είχε σχεδόν εγκαταλειφθεί τις τελευταίες δεκαετίες λόγω της υψηλής επίπτωσης ανεπιθύμητων ενεργειών¹¹⁷. Το φάρμακο επανήλθε στο προσκήνιο της θεραπείας πολυανθεκτικών λοιμώξεων από Gram-αρνητικά βακτηρίδια, συμπεριλαμβανομένου και της *K. pneumoniae*, από τις αρχές της δεκαετίας του 2000 διότι διατηρεί υψηλή δραστηριότητα έναντι αυτών των μικροοργανισμών και συγχρόνως οι αποτελεσματικές εναλλακτικές θεραπευτικές επιλογές ήταν εξαιρετικά περιορισμένες⁷⁶.

Τα στελέχη *K. pneumoniae* που μελετήθηκαν απομονώθηκαν από ασθενείς με βακτηριαμία που νοσηλεύτηκαν στο Λαϊκό νοσοκομείο από το 2002 έως και το πρώτο εξάμηνο του 2016. Συνολικά, 313 στελέχη *K. pneumoniae* θετικά ως προς την παραγωγή καρβαπενεμασών απομονώθηκαν κατά τη 15-ετή περίοδο και συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη. Από τον έλεγχο ευαισθησίας με πρότυπες μεθόδους που πραγματοποιήσαμε στα πιο συχνά χορηγούμενα αντιβιοτικά «τελευταίας γραμμής» βρήκαμε ότι από τα στελέχη που παρήγαν καρβαπενεμάση περίπου το 88% ήταν ανθεκτικά ή ενδιάμεσης ευαισθησίας στη μεροπενέμη, 35% ανθεκτικά στην κολιμυκίνη, 30% ανθεκτικά στη φωσφομυκίνη και περίπου 5,5% ανθεκτικά στην τιγκεκυκλίνη. Το ποσοστό αντοχής στην πολυμυξίνη Β - εφαρμόζοντας τα όρια ευαισθησίας της κολιμυκίνης - ήταν ταυτόσημο με αυτό της κολιμυκίνης. Σύμφωνα με τα ευρήματα της πολυπλεκτικής PCR, περίπου 63% των στελεχών ήταν KPC, 28% VIM, 5,5% NDM-1, 1,5% OXA-48, ενώ πέντε στελέχη έφεραν περισσότερα από ένα γονίδια αντοχής. Έτσι, η μελέτη μας επιβεβαίωσε την κυριαρχία των KPC στελεχών αλλά το πιο ενδιαφέρον εύρημα στο συγκεκριμένο σκέλος της ανάλυσης είναι ότι πάνω από το 1/3 των στελεχών *K. pneumoniae* που προέρχονταν από βακτηριαμιές ήταν ανθεκτικά στην κολιμυκίνη, ένα αντιβιοτικό που μέχρι πρότινος διατηρούσε πολύ υψηλά ποσοστά ευαισθησίας. Σε μια άλλη 10-ετή (2005-2014) μελέτη επιτήρησης από τη χώρα μας τα KPC στελέχη αποτελούσαν το 80% των *K. pneumoniae* θετικών για καρβαπενεμάση και τα VIM το 17%, ενώ το ποσοστό αντοχής στην κολιμυκίνη ήταν 23%¹¹⁸.

Για να μελετήσουμε την πορεία της αντοχής στην κολιμυκίνη στον χρόνο εφαρμόσαμε την στατιστική μεθοδολογία της ανάλυσης γραμμικής παλινδρόμησης, η οποία έδειξε ότι υπήρχε στατιστικώς σημαντική ($p < 0,05$) αυξητική τάση της αντοχής στην κολιμυκίνη κατά τη 15-ετή διάρκεια της παρούσας μελέτης. Ακολούθως, διερευνήσαμε την πιθανή συσχέτιση ανάμεσα στην χρήση κολιμυκίνης και στην ανάπτυξη αντοχής στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό, το οποίο αποτελούσε και τον κύριο σκοπό της μελέτης μας. Για να μελετήσουμε αυτή τη συσχέτιση χρησιμοποιήσαμε διαχρονικά δεδομένα του νοσοκομείου και τα αναλύσαμε με τη μεθοδολογία της ανάλυσης χρονοσειρών. Με τη συγκεκριμένη τεχνική μοντελοποίησης μπορέσαμε να προβλέψουμε την επίδραση που θα έχει η αύξηση της χρήσης κολιμυκίνης στην αντοχή στην κολιμυκίνη στελεχών CP-Kp από βακτηριαίμιες αλλά και να προσδιορίσουμε το χρονικό διάστημα που απαιτείται από την αύξηση της χρήσης μέχρι την επακόλουθη αύξηση της αντοχής. Ειδικότερα, βρήκαμε ότι αύξηση της χρήσης της κολιμυκίνης κατά 1 DDD/100 ασθενο-ημέρες σχετίστηκε με αύξηση στην επίπτωση της αντοχής στην κολιμυκίνη κατά 0,05. Μάλιστα, αξίζει να σημειωθεί ότι αυτή η αύξηση της αντοχής λόγω της επίδρασης της χρήσης απαιτεί διάστημα (delay) 3 μηνών μέχρις ότου εμφανιστεί. Στην πράξη, η μελέτη μας έδειξε ότι η χρήση 1.500 MU (εκατομμύρια μονάδες) στο νοσοκομείο μας σε διάστημα 3 μηνών ή η θεραπεία περίπου 17 ασθενών για 10 ημέρες με δόση 9 MU ημερησίως θα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της επίπτωσης της αντοχής στην κολιμυκίνη κατά 5%.

Τα ευρήματά μας βρίσκονται σε συμφωνία, όσον αφορά το εύρος της επίδρασης της χρήσης του αντιβιοτικού ή την χρονοκαθυστέρηση μεταξύ χρήσης και εμφάνισης της αντοχής, με τα ευρήματα προηγούμενων μελετών που χρησιμοποίησαν την ίδια μεθοδολογία της ανάλυσης χρονοσειρών, όμως για συσχετισμούς μεταξύ άλλων αντιβιοτικών και μικροβίων^{113,116,119-122}. Πιο συγκεκριμένα, με τη συγκεκριμένη μεθοδολογία αποδείχθηκε δυναμική συσχέτιση ανάμεσα στην χρήση κεφταζιδίμης και ανθεκτικών στην κεφταζιδίμη Gram-αρνητικών βακτηριδίων, στην χρήση ιμιπενέμης και εμφάνιση *P. aeruginosa* ανθεκτικής στην ιμιπενέμη¹¹⁶, όπως επίσης ανάμεσα σε διάφορα αντιβιοτικά (γλυκοπεπτίδια, φθοριοκινολόνες, ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες και συνδυασμούς β-λακταμικών με αναστολείς β-λακταμασών) και την εμφάνιση ανθεκτικών στη βανκομυκίνη εντεροκόκκων¹¹⁵.

Όπως προαναφέραμε, αρχικά πραγματοποιήσαμε την ανάλυση χρονοσειρών έχοντας τα δεδομένα της αντοχής εκφρασμένα σε ποσοστά. Ωστόσο, μια δημοσιευμένη μελέτη σε έγκριτο περιοδικό πρότεινε ότι οι μελέτες που διερευνούν την αντιμικροβιακή

αντοχή δε θα πρέπει να παρουσιάζουν την αντοχή σε ποσοστά, διότι με αυτόν τον τρόπο ενδέχεται να εξαχθούν εσφαλμένα συμπεράσματα¹¹². Χρησιμοποιώντας ποσοστά ενδέχεται να βρεθεί ότι η αντοχή αυξήθηκε, ενώ στην πραγματικότητα μπορεί να μην υπάρχει αύξηση του αριθμού των ανθεκτικών μικροβίων αλλά μόνο του ποσοστού τους. Από την άλλη πλευρά, η χρήση της επίπτωσης της αντοχής αντί του ποσοστού εξαλείφει την πιθανότητα τέτοιων σφαλμάτων και διασφαλίζει την εξαγωγή εγκυρότερων αποτελεσμάτων και συμπερασμάτων. Για το λόγο αυτό, επανεκτελέσαμε την ανάλυση με την αντοχή εκφρασμένη ως μέση επίπτωση ανά τρίμηνο. Είναι αξιοσημείωτο ότι τόσο με το ποσοστό αντοχής όσο και με την επίπτωση αντοχής η στατιστική ανάλυση έδειξε την ύπαρξη δυναμικής συσχέτισης ανάμεσα στην χρήση κολιμυκίνης και την αντοχή στο αντιβιοτικό. Ωστόσο, το R^2 του μοντέλου LTF που αφορά την εξέλιξη της αντοχής σε συνάρτηση με την χρήση κολιμυκίνης ήταν πολύ μεγαλύτερο όταν χρησιμοποιήθηκε η επίπτωση της αντοχής αντί του ποσοστού της (0,69 αντί 0,53) κι επίσης, η αύξηση που παρατηρήθηκε στο R^2 όταν στο μοντέλο εισήχθη η χρήση κολιμυκίνης ήταν πολύ μεγαλύτερη με την χρήση της επίπτωσης αντοχής παρά με το ποσοστό (0,53 από 0,47 και 0,69 από 0,52 αντίστοιχα). Ένας άλλος λόγος ο οποίος αποδεικνύει ότι η χρήση της επίπτωσης της αντοχής είναι σωστότερη συγκριτικά με το ποσοστό αντοχής είναι ότι στην πρώτη περίπτωση αποδείξαμε μαθηματικά ότι εκτός από την κατανάλωση του αντιβιοτικού, και άλλοι παράγοντες [οι οποίοι εκπροσωπούνται από τον παράγοντα $e(t)$ στην εξίσωσή μας] συμβάλλουν στην εμφάνιση της αντοχής στην κολιμυκίνη.

Για να προβλέψουμε την αντοχή στην κολιμυκίνη χρησιμοποιήσαμε τις τιμές των προηγούμενων διακυμάνσεων της αντοχής και της χρήσης κολιμυκίνης. Έτσι, το R^2 (0,52) της αντοχής που υπολογίστηκε από το μοντέλο ARIMA model υποδηλώνει ότι το 52% της διακύμανσης της αντοχής εξηγείται από προηγούμενες τιμές της αντοχής και τις απότομες μεταβολές της στο εγγύς παρελθόν. Όταν εκτός από την αντοχή προστέθηκε και η χρήση της κολιμυκίνης στο μοντέλο, το R^2 αυξήθηκε στο 0,69, γεγονός το οποίο εξηγεί ένα επιπλέον 17% (0,69–0,52) της διακύμανσης της αντοχής το οποίο μπορεί να αποδοθεί στην χρήση του αντιβιοτικού. Κατά συνέπεια, μπορούμε να υποθέσουμε ότι ένα μέρος της αντοχής στην κολιμυκίνη που παρατηρείται σε μια δεδομένη χρονική στιγμή στο παρελθόν θα μπορούσε να αποδοθεί στη σωρευτική επίδραση της χρήσης της κολιμυκίνης το προηγούμενο χρονικό διάστημα. Το R^2 0,69 υποδηλώνει ότι το μοντέλο συνάρτησης μεταφοράς το οποίο λαμβάνει υπόψη την χρήση κολιμυκίνης εξηγεί ένα αρκετά υψηλό ποσοστό (69%) της διακύμανσης της αντοχής στην κολιμυκίνη στο νοσοκομείο μας.

Αν και γενικότερα η πίεση επιλογής ανθεκτικών στελεχών (antimicrobial selection pressure) θεωρείται σημαντικός διαμορφωτής της αντιμικροβιακής αντοχής, η σχέση μεταξύ έκθεσης στην κολιμυκίνη και ανάπτυξης αντοχής σε αυτήν δεν έχει αποδειχθεί. Μελετώντας τη βιβλιογραφία βρήκαμε διάφορες μελέτες που διερεύννησαν με πιο απλές μεθοδολογίες, όπως η πολυπαραγοντική ανάλυση, αν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ χρήσης και αντοχής στην κολιμυκίνη. Ειδικότερα, μια αναδρομική μελέτη περιστατικών από το Ισραήλ έδειξε ότι αν και η χρήση της κολιμυκίνης αυξήθηκε 9 φορές σε διάρκεια 10 ετών (2004-2014), αυτό δεν σχετίστηκε με επακόλουθη αύξηση της αντοχής στην κολιμυκίνη σε ασθενείς που έλαβαν έστω και 1 δόση του συγκεκριμένου αντιβιοτικού¹²³. Ωστόσο, στη συγκεκριμένη μελέτη οι παθογόνοι μικροοργανισμοί ήταν διάφορα Gram-αρνητικά βακτηρίδια, τα κλινικά δείγματα δεν περιορίζονταν στις αιμοκαλλιέργειες και τα στελέχη του αίματος είχαν υψηλή ευαισθησία την κολιμυκίνη. Ομοίως, μια άλλη μελέτη ασθενών-μαρτύρων δεν ανέδειξε συσχέτιση μεταξύ προηγούμενης χορήγησης κολιμυκίνης και ανάπτυξης αντοχής στο αντιβιοτικό, αλλά ο αριθμός των ασθενών ήταν μικρός (4 ασθενείς με μικρόβιο ανθεκτικό στην κολιμυκίνη και 8 ασθενείς με ευαίσθητο στην κολιμυκίνη) και η μελέτη δεν περιείχε μικρόβια μόνο από το αίμα αλλά και από άλλες πηγές λοιμώξεων καθώς και μικρόβια που τελικά ήταν αποικιστές και όχι αιτία λοίμωξης¹²⁴. Σε αντίθεση με τις προηγούμενες, μια άλλη μελέτη ασθενών-μαρτύρων έδειξε ισχυρή και ανεξάρτητη συσχέτιση μεταξύ χρήσης κολιμυκίνης και αντοχής στο αντιβιοτικό⁹². Στην εν λόγω μελέτη εκτός από *K. pneumoniae* και άλλα Gram-αρνητικά βακτηρίδια είχαν συμπεριληφθεί. Επιπλέον, υπάρχουν αρκετές αναφορές ότι ο κύριος παράγοντας που συμβάλλει στην ανάπτυξη αντοχής στην κολιμυκίνη είναι η μη σωστή χρήση του φαρμάκου, όπως για παράδειγμα η μη βέλτιστη δοσολογία ή η παρατεταμένη θεραπεία^{125,126}. Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφέρουμε μια πρόσφατη επιδημία *K. pneumoniae* ανθεκτικής στην κολιμυκίνη το οποίο αποδόθηκε στη διασπορά ενός μεμονωμένου κλώνου *mgrB* του επικρατούς κλώνου ST512 ο οποίος παρήγαγε KPC-3 και είχε υποστεί μετάλλαξη μέσω απαλοιφής¹²⁷. Οι συγγραφείς της μελέτης υπέθεσαν ότι η συγκεκριμένη επιδημία πυροδοτήθηκε από έναν ανθεκτικό μεταλλαγμένο κλώνο οποίος είχε «επιλεχθεί» από την πίεση που ασκούσε η αυξημένη χρήση κολιμυκίνης.

Λαμβάνοντας υπόψη και τα ευρήματα κάποιων από τις προαναφερθείσες μελέτες, είναι προφανές ότι εκτός από την έκθεση στην κολιμυκίνη, και άλλοι παράγοντες συμβάλλουν στην ανάπτυξη αντοχής στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Αυτό το συμπέρασμα βρίσκεται σε απόλυτη συμφωνία με το εύρημα της μελέτης μας ότι το 69% της διακύμανσης της αντοχής στην κολιμυκίνη εξηγείται από τις προηγούμενες τιμές της αντοχής στην κολιμυκίνη και από την χρήση του αντιβιοτικού, ενώ το υπόλοιπο 31% - το οποίο

αντιπροσωπεύεται από τον παράγοντα $e(t)$ στην εξίσωση της συνάρτησης μεταφοράς – εξηγείται από άλλους παράγοντες που δεν λήφθηκαν υπόψη στην ανάλυσή μας. Παραδείγματα τέτοιων παραγόντων θα μπορούσαν να είναι ελλιπείς πρακτικές ελέγχου λοιμώξεων, διασπορά ανθεκτικών κλώνων, οριζόντια μεταφορά γονιδίων και εισαγωγή ασθενών στο νοσοκομείο οι οποίοι είναι ήδη αποικισμένοι με ανθεκτικά στελέχη^{125,127,128}. Ως εκ τούτου, για να περιορίσουμε την εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών και τη διασπορά τους στο νοσοκομείο, η εφαρμογή μιας δέσμης μέτρων η οποία θα περιλαμβάνει αυστηρή διαχείριση αντιβιοτικών (antibiotic stewardship) και ένα ενισχυμένο πρόγραμμα ελέγχου λοιμώξεων.

Το κύριο πλεονέκτημα της μαθηματικής μοντελοποίησης που εφαρμόσαμε στην παρούσα μελέτη είναι ότι λαμβάνει υπόψη στη συσχέτιση αντοχής-χρήσης την επίδραση του χρόνου, εξασφαλίζοντας ότι η πιθανή αιτία (η χρήση της κολιμυκίνης) προηγείται του αποτελέσματος (εμφάνιση αντοχής στην κολιμυκίνη)¹²⁹. Επιπρόσθετα, αναλύει τη συμπεριφορά μιας μεταβλητής, εν προκειμένω της αντοχής στην κολιμυκίνη, σαν συνάρτηση των προηγούμενων τιμών της, των τάσεων της και των απότομων μεταβολών της στο εγγύς παρελθόν. Στην παρούσα μελέτη συμπεριλάβαμε 58 επαναλαμβανόμενες παρατηρήσεις σε ίσα χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια μιας περιόδου 14,5 ετών, το οποίο είναι κοντά στον ιδεατό αριθμό παρατηρήσεων που απαιτούνται για την εξαγωγή έγκυρων αποτελεσμάτων από τέτοιου είδους μαθηματικά μοντέλα¹³⁰.

Σε αυτό το σημείο οφείλουμε να αναφέρουμε ορισμένους περιορισμούς που αφορούν την παρούσα μελέτη και θα πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων μας. Πρώτον, συμπεριλάβαμε μόνο στελέχη που απομονώθηκαν από το αίμα και όχι και από άλλα κλινικά δείγματα και μόνο CP-Kp, γεγονός το οποίο ενδέχεται να εισήγαγε στην ανάλυση μεροληψία/σφάλμα επιλογής (selection bias). Ωστόσο, η επιλογή της CP-Kp ως ενδεικτικού (index) παθογόνου μικροοργανισμού είναι σωστή και αποδεκτή για τους ακόλουθους λόγους: (i) τα στελέχη που απομονώνονται από το αίμα αντικατοπτρίζουν το μοτίβο της αντιμικροβιακής αντοχής στελεχών που απομονώνονται από άλλες πηγές λοιμώξεων και (ii) η κολιμυκίνη αποτελεί την τον ακρογωνιαίο λίθο της θεραπείας λοιμώξεων που προκαλούνται από CP-Kp. Δεύτερον, στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε τη συσχέτιση ανάμεσα στην κατανάλωση ενός αντιβιοτικού και την αντοχή στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό σε επίπεδο νοσοκομείου όσον αφορά τα δεδομένα (aggregate hospital data) που χρησιμοποιήσαμε και όχι σε επίπεδο ασθενούς (individual patient level). Σύμφωνα με ορισμένους ερευνητές, οι μελέτες αυτού του είδους ενδέχεται να μην αναδείξουν υπαρκτές

διαφορές να οδηγήσουν στην εξαγωγή εσφαλμένων συμπερασμάτων^{131,132}. Πάντως, παρά αυτούς τους περιορισμούς, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης εξακολουθούν να είναι ισχυρά καθώς βοηθούν σημαντικά στην ερμηνεία του προβλήματος της αντιμικροβιακής αντοχής. Κι αυτό, διότι το πρόβλημα της αντοχής είναι οικολογικό και η μεθοδολογία την οποία ακολουθήσαμε στη μελέτη μας προσφέρει το πλεονέκτημα ότι μπορούμε να εξετάσουμε τη συνολική επίδραση της έκθεσης στα αντιβιοτικά και άρα, να εξαγάγουμε άμεσα συμπεράσματα για την επίδραση στους ασθενείς που λαμβάνουν αντιβιοτικά αλλά και έμμεσα συμπεράσματα για τους ασθενείς που δε λαμβάνουν¹²⁹. Τέλος, οφείλουμε να αναφέρουμε ότι η ΕΑΠ της κολιμυκίνης στα πειράματά μας προσδιορίστηκε με τη μέθοδο των αραιώσεων αντιβιοτικού σε άγαρ, ενώ η αρμόδια επιτροπή EUCAST ανακοίνωσε - μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων μας - ότι συστήνει τη μέθοδο μικρο-αραιώσεων αντιβιοτικού σε ζωμό ως μέθοδο αναφοράς για την κολιμυκίνη¹⁰¹. Ωστόσο, για να περιορίσουμε την πιθανότητα λάθους στην κατηγοριοποίηση ενός στελέχους ως ευαίσθητου ή ανθεκτικού, ελέγξαμε περαιτέρω με τη μέθοδο μικρο-αραιώσεων σε ζωμό όλα τα στελέχη που παρουσίασαν με τη μέθοδο αραιώσεων αντιβιοτικού σε άγαρ ΕΑΠ κολιμυκίνης 1, 2, 4 και 8 mg/L. Το γεγονός ότι δε διαπιστώθηκαν καθόλου διαφορές στην κατηγοριοποίηση «ευαίσθητα/ανθεκτικά» των στελεχών ενισχύει ακόμη περισσότερο την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων μας γενικότερα.

Συνοψίζοντας, στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε την αλληλεπίδραση μεταξύ της κατανάλωσης κολιμυκίνης και της αντοχής σε αυτήν μελετώντας στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάσες από ασθενείς με βακτηριαιμία που νοσηλεύτηκαν σε ένα τριτοβάθμιο νοσοκομείο και χρησιμοποιώντας το στατιστικό εργαλείο της ανάλυσης χρονοσειρών. Τα αποτελέσματα των αναλύσεών μας αποδεικνύουν μαθηματικά ότι υπάρχει σημαντική και μάλιστα δυναμική συσχέτιση στον χρόνο ανάμεσα στην χρήση κολιμυκίνης και στην αντοχή σε αυτή. Βέβαια, εκτός από την κατανάλωση κολιμυκίνης, και άλλοι παράγοντες φαίνεται να διαδραματίζουν ρόλο στην ανάπτυξη αντοχής στο φάρμακο στο νοσοκομείο μας, ωστόσο η μελέτη αυτών των παραγόντων δεν αποτελούσε αντικείμενο της παρούσας μελέτης. Τα ευρήματά μας μπορούν και πρέπει να αποτελέσουν το σημείο εκκίνησης για την εφαρμογή αυστηρών μέτρων με σκοπό την ελάττωση της αντοχής στην κολιμυκίνη στο νοσοκομείο μας. Τέτοια μέτρα αποτελούν τα εξής: ακόμη πιο αυστηρή υγιεινή των χεριών, καλλιέργειες επιτήρησης και διαχωρισμός (cohorting) των ασθενών με βάση τα ανθεκτικά μικρόβια από τα οποία νοσούν ή είναι αποικισμένοι, αυστηρή διαχείριση (stewardship) στην χορήγηση της κολιμυκίνης. Κατόπιν της εφαρμογής αυτών των μέτρων και της τήρησής τους για αρκετό χρονικό διάστημα, θα ήταν χρήσιμο να πραγματοποιηθεί εκ νέου έρευνα σχετικά

με την επίδραση των μέτρων στην αντοχή στην κολιμυκίνη. Η υλοποίηση μιας τέτοιας μελέτης είναι εφικτή και πάλι με την χρήση της στατιστικής και συγκεκριμένα της ανάλυσης διακοπτόμενων (interrupted) χρονοσειρών¹³³.

IV. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Συμπεριλάβαμε και μελετήσαμε 313 στελέχη *K. pneumoniae* θετικά ως προς την παραγωγή καρβαπενεμασών τα οποία απομονώθηκαν κατά τη 15-ετή περίοδο 2002-2016 από το αίμα ασθενών που νοσηλεύτηκαν στο Λαϊκό νοσοκομείο.
2. Το 88% των στελεχών ήταν ανθεκτικά ή ενδιάμεσης ευαισθησίας στη μεροπενέμη, 35% ανθεκτικά στην κολιμυκίνη, 30% ανθεκτικά στη φωσφομυκίνη και περίπου 5,5% ανθεκτικά στην τιγκεκυκλίνη. Το ποσοστό αντοχής στην πολυμυξίνη Β ήταν ταυτόσημο με αυτό της κολιμυκίνης.
3. Το 63% των στελεχών ήταν KPC και 28% ήταν VIM. Το υπόλοιπο ποσοστό αποτελούνταν από στελέχη NDM-1 ή OXA-48 και λίγα με περισσότερα από ένα γονίδια αντοχής.
4. Η αντοχή στην κολιμυκίνη παρουσίασε στατιστικώς σημαντική αυξητική τάση στον χρόνο, από 0% το 2002 σε 26,9% το 2016 [$R^2 = 0,5$, $p < 0,01$; point estimate of coefficient, 2,97, 95% confidence interval (CI) 1,20–4,75; standard error of the slope coefficient, 0,82].
5. Η χρήση της κολιμυκίνης παρουσίασε στατιστικώς σημαντική αυξητική τάση στον χρόνο, από 0,2 DDDs/100 ασθενο-ημέρες το πρώτο τρίμηνο του 2002 σε 7,10 DDDs/100 ασθενο-ημέρες το δεύτερο τρίμηνο του 2016 ($R^2 = 0,54$, $p < 0,01$; point estimate of coefficient, 0,66, 95% CI 0,49–0,82; standard error of the slope coefficient, 0,08).
6. Το 69% της διακύμανσης της αντοχής στην κολιμυκίνη εξηγείται από τις προηγούμενες τιμές της αντοχής στην κολιμυκίνη και από την χρήση του αντιβιοτικού, ενώ το υπόλοιπο 31% εξηγείται από άλλους παράγοντες που δεν λήφθηκαν υπόψη στην ανάλυσή μας.
7. Αύξηση της χρήσης της κολιμυκίνης κατά 1 DDD/100 ασθενο-ημέρες σχετίστηκε με αύξηση στην επίπτωση της αντοχής στην κολιμυκίνη κατά 0,05. Αυτή η αύξηση της αντοχής λόγω της επίδρασης της χρήσης απαιτεί διάστημα (delay) 3 μηνών μέχρις ότου εμφανιστεί.
8. Στην πράξη, η μελέτη μας έδειξε ότι η χρήση 1.500 MU (εκατομμύρια μονάδες) στο νοσοκομείο μας σε διάστημα 3 μηνών ή η θεραπεία περίπου 17 ασθενών για 10 ημέρες με δόση 9 MU ημερησίως θα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της επίπτωσης της αντοχής στην κολιμυκίνη κατά 5%.

9. Τα ευρήματά μας μπορούν και πρέπει να αποτελέσουν το σημείο εκκίνησης για την εφαρμογή αυστηρών μέτρων με σκοπό την ελάττωση της αντοχής στην κολιμυκίνη στο νοσοκομείο μας.

V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ενημερωτικό δελτίο ΚΕΕΛΠΝΟ, Μικροβιακή αντοχή, Δεκέμβριος 2014.
2. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1151-61.
3. Giakkoupi P, Xanthaki A, Kanelopoulou M, et al. VIM-1 Metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greek hospitals. *J Clin Microbiol* 2003;41:3893-6.
4. Tsakris A, Kristo I, Poulou A, Markou F, Ikonomidis A, Pournaras S. First occurrence of KPC-2-possessing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek hospital and recommendation for detection with boronic acid disc tests. *J Antimicrob Chemother* 2008;62:1257-60.
5. Giakkoupi P, Tryfinopoulou K, Kontopidou F, et al. Emergence of NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;77:382-4.
6. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Technical Report. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe. Interim results from the European survey on carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) project 2013. URL: <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrob\\ial-resistance-carbapenemase-producing-bacteria-europe.pdf>.
7. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial resistance interactive database: European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). URL: http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/map_reports.aspx.
8. Cannatelli A, D'Andrea MM, Giani T, et al. In vivo emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP mgrB regulator. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:5521-6.
9. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 2016;16:161-8.
10. Nassif X, Fournier JM, Arondel J, Sansonetti PJ. Muroid phenotype of *Klebsiella pneumoniae* is a plasmid-encoded virulence factor. *Infect Immun* 1989;57:546-52.
11. Liao CH, Huang YT, Lai CC, et al. *Klebsiella pneumoniae* bacteremia and capsular serotypes, Taiwan. *Emerg Infect Dis* 2011;17:1113-5.

12. Yu WL, Ko WC, Cheng KC, Lee CC, Lai CC, Chuang YC. Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;62:1-6.
13. Wooldridge KG, Williams PH. Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 1993;12:325-48.
14. Krewulak KD, Vogel HJ. Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochim Biophys Acta* 2008;1778:1781-804.
15. Shon AS, Bajwa RP, Russo TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence* 2013;4:107-18.
16. Murphy CN, Clegg S. *Klebsiella pneumoniae* and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation. *Future Microbiol* 2012;7:991-1002.
17. Jun JB. *Klebsiella pneumoniae* Liver Abscess. *Infect Chemother* 2018;50:210-8.
18. Linhares I, Raposo T, Rodrigues A, Almeida A. Frequency and antimicrobial resistance patterns of bacteria implicated in community urinary tract infections: a ten-year surveillance study (2000-2009). *BMC Infect Dis* 2013;13:19.
19. Echols RM, Tosiello RL, Haverstock DC, Tice AD. Demographic, clinical, and treatment parameters influencing the outcome of acute cystitis. *Clin Infect Dis* 1999;29:113-9.
20. Jones RN. Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia. *Clin Infect Dis* 2010;51 Suppl 1:S81-7.
21. Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol Biol Rev* 2016;80:629-61.
22. Falagas ME, Tansarli GS, Karageorgopoulos DE, Vardakas KZ. Deaths attributable to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. *Emerg Infect Dis* 2014;20:1170-5.
23. Marra AR, Wey SB, Castelo A, et al. Nosocomial bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae*: impact of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) production on clinical outcome in a hospital with high ESBL prevalence. *BMC Infect Dis* 2006;6:24.
24. Vardakas KZ, Tansarli GS, Rafailidis PI, Falagas ME. Carbapenems versus alternative antibiotics for the treatment of bacteraemia due to Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:2793-803.
25. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005;18:306-25.
26. Vasoo S, Barreto JN, Tosh PK. Emerging issues in gram-negative bacterial resistance: an update for the practicing clinician. *Mayo Clin Proc* 2015;90:395-403.

27. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis* 2013;13:785-96.
28. Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, Livermore DM. The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol* 2011;19:588-95.
29. Livermore DM, Warner M, Mushtaq S, Doumith M, Zhang J, Woodford N. What remains against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. *Int J Antimicrob Agents* 2011;37:415-9.
30. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, et al. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1584-90.
31. Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:5046-54.
32. Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:15-22.
33. TECHNICAL REPORT. Carbapenemase-producing bacteria in Europe. Interim results from the European survey on carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) project 2013. Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-carbapenemase-producing-bacteria-europe.pdf>.
34. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:440-58, table of contents.
35. SURVEILLANCE REPORT. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2017. Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/AMR-surveillance-EARS-Net-2017.pdf>.
36. Data from the ECDC Surveillance Atlas - Antimicrobial resistance. Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance/surveillance-and-disease-data/data-ecdc>.
37. Papadimitriou-Olivgeris M, Fligou F, Bartzavali C, et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection in critically ill patients: risk factors and predictors of mortality. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017;36:1125-31.

38. Fang L, Lu X, Xu H, et al. Epidemiology and risk factors for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae colonisation and infections: case-controlled study from an academic medical center in a southern area of China. *Pathog Dis* 2019;77.
39. Kang JS, Yi J, Ko MK, Lee SO, Lee JE, Kim KH. Prevalence and Risk Factors of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae Acquisition in an Emergency Intensive Care Unit in a Tertiary Hospital in Korea: a Case-Control Study. *J Korean Med Sci* 2019;34:e140.
40. Marimuthu K, Ng OT, Chong BPZ, et al. Antecedent Carbapenem Exposure as a Risk Factor for Non-Carbapenemase-Producing Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae and Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2019;63.
41. Nicolas-Chanoine MH, Vigan M, Laouenan C, Robert J, Group EcS. Risk factors for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections: a French case-control study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2019;38:383-93.
42. Successful Validation and Clearance of MALDI-ToF MS for Microorganism Identification. Proteomics in the Clinic Public Workshop June 13, 2014. U.S. Food and Drug Administration. Available at: <https://www.fda.gov/media/88809/download>.
43. Klingspor L, Lindback E, Ullberg M, Ozenci V. Seven years of clinical experience with the Yeast Traffic Light PNA FISH: Assay performance and possible implications on antifungal therapy. *Mycoses* 2018;61:179-85.
44. Donner LM, Campbell WS, Lyden E, Van Schooneveld TC. Assessment of Rapid-Blood-Culture-Identification Result Interpretation and Antibiotic Prescribing Practices. *J Clin Microbiol* 2017;55:1496-507.
45. Nguyen MH, Clancy CJ, Pascual AW, et al. Performance of the T2Bacteria Panel for Diagnosing Bloodstream Infections: A Diagnostic Accuracy Study. *Ann Intern Med* 2019;170:845-52.
46. Rechenchoski DZ, Dambrozio AML, Vivan ACP, et al. Antimicrobial activity evaluation and comparison of methods of susceptibility for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Enterobacter* spp. isolates. *Braz J Microbiol* 2017;48:509-14.
47. Daikos GL, Markogiannakis A. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: (when) might we still consider treating with carbapenems? *Clin Microbiol Infect* 2011;17:1135-41.
48. Iacchini S, Sabbatucci M, Gagliotti C, et al. Bloodstream infections due to carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Italy: results from nationwide surveillance, 2014 to 2017. *Euro Surveill* 2019;24.

49. Spapen H, Jacobs R, Van Gorp V, Troubleyn J, Honore PM. Renal and neurological side effects of colistin in critically ill patients. *Ann Intensive Care* 2011;1:14.
50. Falagas ME, Lourida P, Poulikakos P, Rafailidis PI, Tansarli GS. Antibiotic treatment of infections due to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: systematic evaluation of the available evidence. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:654-63.
51. Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM. Aminoglycosides: nephrotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1003-12.
52. Cai Y, Wang R, Liang B, Bai N, Liu Y. Systematic review and meta-analysis of the effectiveness and safety of tigecycline for treatment of infectious disease. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:1162-72.
53. FDA Drug Safety Communication: Increased risk of death with Tygacil (tigecycline) compared to other antibiotics used to treat similar infections. Safety Announcement [09-01-2010]. Available at: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-drug-safety-communication-increased-risk-death-tygacil-tigecycline-compared-other-antibiotics>.
54. Tasina E, Haidich AB, Kokkali S, Arvanitidou M. Efficacy and safety of tigecycline for the treatment of infectious diseases: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2011;11:834-44.
55. Yahav D, Lador A, Paul M, Leibovici L. Efficacy and safety of tigecycline: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:1963-71.
56. Rodvold KA, Gotfried MH, Cwik M, Korth-Bradley JM, Dukart G, Ellis-Grosse EJ. Serum, tissue and body fluid concentrations of tigecycline after a single 100 mg dose. *J Antimicrob Chemother* 2006;58:1221-9.
57. Diep JK, Sharma R, Ellis-Grosse EJ, Abboud CS, Rao GG. Evaluation of Activity and Emergence of Resistance of Polymyxin B and ZTI-01 (Fosfomycin for Injection) against KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2018;62.
58. Falagas ME, Vouloumanou EK, Samonis G, Vardakas KZ. Fosfomycin. *Clin Microbiol Rev* 2016;29:321-47.
59. Falagas ME, Karageorgopoulos DE, Nordmann P. Therapeutic options for infections with Enterobacteriaceae producing carbapenem-hydrolyzing enzymes. *Future Microbiol* 2011;6:653-66.
60. Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, et al. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clin Infect Dis* 2012;55:943-50.

61. Tzouveleakis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev* 2012;25:682-707.
62. Shirley M. Ceftazidime-Avibactam: A Review in the Treatment of Serious Gram-Negative Bacterial Infections. *Drugs* 2018;78:675-92.
63. Sorbera M, Chung E, Ho CW, Marzella N. Ceftolozane/Tazobactam: a new option in the treatment of complicated gram-negative infections. *P T* 2014;39:825-32.
64. McKinnell JA, Dwyer JP, Talbot GH, et al. Plazomicin for Infections Caused by Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *N Engl J Med* 2019;380:791-3.
65. Shaeer KM, Zmarlicka MT, Chahine EB, Piccicacco N, Cho JC. Plazomicin: A Next-Generation Aminoglycoside. *Pharmacotherapy* 2019;39:77-93.
66. Fritzenwanker M, Imirzalioglu C, Herold S, Wagenlehner FM, Zimmer KP, Chakraborty T. Treatment Options for Carbapenem- Resistant Gram-Negative Infections. *Dtsch Arztebl Int* 2018;115:345-52.
67. Voulgaris GL, Voulgari ML, Falagas ME. Developments on antibiotics for multidrug resistant bacterial Gram-negative infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2019;17:387-401.
68. Akajagbor DS, Wilson SL, Shere-Wolfe KD, Dakum P, Charurat ME, Gilliam BL. Higher incidence of acute kidney injury with intravenous colistimethate sodium compared with polymyxin B in critically ill patients at a tertiary care medical center. *Clin Infect Dis* 2013;57:1300-3.
69. al-Khayyat AA, Aronson AL. Pharmacologic and toxicologic studies with the polymyxins. II. Comparative pharmacologic studies of the sulfate and methanesulfonate salts of polymyxin B and colistin in dogs. *Chemotherapy* 1973;19:82-97.
70. Al-Aloul M, Miller H, Alapati S, Stockton PA, Ledson MJ, Walshaw MJ. Renal impairment in cystic fibrosis patients due to repeated intravenous aminoglycoside use. *Pediatr Pulmonol* 2005;39:15-20.
71. Aydemir H, Akduman D, Piskin N, et al. Colistin vs. the combination of colistin and rifampicin for the treatment of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia. *Epidemiol Infect* 2013;141:1214-22.
72. Bargiacchi O, Rossati A, Car P, et al. Intrathecal/intraventricular colistin in external ventricular device-related infections by multi-drug resistant Gram negative bacteria: case reports and review. *Infection* 2014;42:801-9.
73. Barnett M, Bushby SR, Wilkinson S. Sodium Sulphomethyl Derivatives of Polymyxins. *Br J Pharmacol Chemother* 1964;23:552-74.

74. Bengoechea JA, Skurnik M. Temperature-regulated efflux pump/potassium antiporter system mediates resistance to cationic antimicrobial peptides in *Yersinia*. *Mol Microbiol* 2000;37:67-80.
75. Bercot B, Poirel L, Dortet L, Nordmann P. In vitro evaluation of antibiotic synergy for NDM-1-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:2295-7.
76. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis* 2005;40:1333-41.
77. Hancock RE, Chapple DS. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1317-23.
78. Deris ZZ, Akter J, Sivanesan S, et al. A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity. *J Antibiot (Tokyo)* 2014;67:147-51.
79. Polymyxins. Authors: Matthew E. Falagas, M.D., M.Sc, D.Sc, and Konstantinos Z. Vardakas, M.D., Ph.D. *Antimicrobe*. Available at: <http://www.antimicrobe.org/d05.asp>.
80. Falagas ME, Rafailidis PI. Nephrotoxicity of colistin: new insight into an old antibiotic. *Clin Infect Dis* 2009;48:1729-31.
81. Deryke CA, Crawford AJ, Uddin N, Wallace MR. Colistin dosing and nephrotoxicity in a large community teaching hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:4503-5.
82. Gauthier TP, Wolowich WR, Reddy A, Cano E, Abbo L, Smith LB. Incidence and predictors of nephrotoxicity associated with intravenous colistin in overweight and obese patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:2392-6.
83. Kim J, Lee KH, Yoo S, Pai H. Clinical characteristics and risk factors of colistin-induced nephrotoxicity. *Int J Antimicrob Agents* 2009;34:434-8.
84. Kwon JA, Lee JE, Huh W, et al. Predictors of acute kidney injury associated with intravenous colistin treatment. *Int J Antimicrob Agents* 2010;35:473-7.
85. Pogue JM, Lee J, Marchaim D, et al. Incidence of and risk factors for colistin-associated nephrotoxicity in a large academic health system. *Clin Infect Dis* 2011;53:879-84.
86. Gai Z, Samodelov SL, Kullak-Ublick GA, Visentin M. Molecular Mechanisms of Colistin-Induced Nephrotoxicity. *Molecules* 2019;24.
87. Bergen PJ, Li J, Rayner CR, Nation RL. Colistin methanesulfonate is an inactive prodrug of colistin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:1953-8.
88. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial consumption. Surveillance and disease data. Antimicrobial consumption database. Trend by country. Stockholm: ECDC. Available at:

<http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobialresistance-and-consumption/antimicrobial-consumption/esacnet-database/Pages/trend-consumption-by-country.aspx>.

89. Galani I, Karaiskos I, Karantani I, et al. Epidemiology and resistance phenotypes of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece, 2014 to 2016. *Euro Surveill* 2018;23.
90. Castanheira M, Sader HS, Deshpande LM, Fritsche TR, Jones RN. Antimicrobial activities of tigecycline and other broad-spectrum antimicrobials tested against serine carbapenemase- and metallo-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:570-3.
91. Antoniadou A, Kontopidou F, Poulakou G, et al. Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: first report of a multiclonal cluster. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:786-90.
92. Matthaiou DK, Michalopoulos A, Rafailidis PI, et al. Risk factors associated with the isolation of colistin-resistant gram-negative bacteria: a matched case-control study. *Crit Care Med* 2008;36:807-11.
93. Falcone M, Russo A, Iacovelli A, et al. Predictors of outcome in ICU patients with septic shock caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect* 2016;22:444-50.
94. Machuca I, Gutierrez-Gutierrez B, Gracia-Ahufinger I, et al. Mortality Associated with Bacteremia Due to Colistin-Resistant *Klebsiella pneumoniae* with High-Level Meropenem Resistance: Importance of Combination Therapy without Colistin and Carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61.
95. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol* 2014;5:643.
96. Gales AC, Reis AO, Jones RN. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. *J Clin Microbiol* 2001;39:183-90.
97. Lo-Ten-Foe JR, de Smet AM, Diederens BM, Kluytmans JA, van Keulen PH. Comparative evaluation of the VITEK 2, disk diffusion, etest, broth microdilution, and agar dilution susceptibility testing methods for colistin in clinical isolates, including heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:3726-30.

98. Chew KL, La MV, Lin RTP, Teo JWP. Colistin and Polymyxin B Susceptibility Testing for Carbapenem-Resistant and mcr-Positive Enterobacteriaceae: Comparison of Sensititre, MicroScan, Vitek 2, and Etest with Broth Microdilution. *J Clin Microbiol* 2017;55:2609-16.
99. Girardello R, Cury AP, Franco MRG, et al. Colistin susceptibility testing and Vitek-2: is it really useless? *Diagn Microbiol Infect Dis* 2018;91:309-11.
100. Hindler JA, Humphries RM. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant Gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 2013;51:1678-84.
101. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. March 2016. Available at: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf.
102. Turlej-Rogacka A, Xavier BB, Janssens L, et al. Evaluation of colistin stability in agar and comparison of four methods for MIC testing of colistin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2018;37:345-53.
103. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard—ninth edition, M07-A9. Wayne, PA: CLSI; 2012a.
104. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 22nd informational supplement (M100-S22). Wayne, PA: CLSI; 2012b.
105. Humphries RM. Susceptibility testing of the polymyxins: where are we now? *Pharmacotherapy* 2015;35:22-7.
106. Clinical and Laboratory Standards Institute. M07-A10: methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. 10th edition. Wayne, PA: CLSI; 2015 .
107. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal* 2016;6:71-9.
108. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0. Available at: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/2016.
109. Giakkoupi P, Papagiannitsis CC, Miriagou V, et al. An update of the evolving epidemic of blaKPC-2-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009-10). *J Antimicrob Chemother* 2011;66:1510-3.

110. Psichogiou M, Tassios PT, Avlami A, et al. Ongoing epidemic of blaVIM-1-positive *Klebsiella pneumoniae* in Athens, Greece: a prospective survey. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:59-63.
111. Box GE, Jenkins GM. Time series analysis: forecasting and control. San Francisco, CA: Holden-Day 1970 .
112. Schwaber MJ, De-Medina T, Carmeli Y. Epidemiological interpretation of antibiotic resistance studies - what are we missing? *Nat Rev Microbiol* 2004;2:979-83.
113. Monnet DL, Lopez-Lozano JM. Relationship between antibiotic consumption and resistance in European hospitals. *Med Mal Infect* 2005;35 Suppl 2:S127-8.
114. Pankratz A. Forecasting with dynamic regression models. New York: Wiley; 1991.
115. Kritsotakis EI, Christidou A, Roubelaki M, Tselentis Y, Gikas A. The dynamic relationship between antibiotic use and the incidence of vancomycin-resistant *Enterococcus*: time-series modelling of 7-year surveillance data in a tertiary-care hospital. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:747-54.
116. Lopez-Lozano JM, Monnet DL, Yague A, et al. Modelling and forecasting antimicrobial resistance and its dynamic relationship to antimicrobial use: a time series analysis. *Int J Antimicrob Agents* 2000;14:21-31.
117. Falagas ME, Rizos M, Bliziotis IA, Rellos K, Kasiakou SK, Michalopoulos A. Toxicity after prolonged (more than four weeks) administration of intravenous colistin. *BMC Infect Dis* 2005;5:1.
118. Spyropoulou A, Papadimitriou-Olivgeris M, Bartzavali C, et al. A ten-year surveillance study of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary care Greek university hospital: predominance of KPC- over VIM- or NDM-producing isolates. *J Med Microbiol* 2016;65:240-6.
119. Carmeli Y, Lidji SK, Shabtai E, Navon-Venezia S, Schwaber MJ. The effects of group 1 versus group 2 carbapenems on imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: an ecological study. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;70:367-72.
120. Mahamat A, MacKenzie FM, Brooker K, Monnet DL, Daures JP, Gould IM. Impact of infection control interventions and antibiotic use on hospital MRSA: a multivariate interrupted time-series analysis. *Int J Antimicrob Agents* 2007;30:169-76.
121. Zou YM, Ma Y, Liu JH, et al. Trends and correlation of antibacterial usage and bacterial resistance: time series analysis for antibacterial stewardship in a Chinese teaching hospital (2009-2013). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015;34:795-803.

122. Monnet DL, MacKenzie FM, Lopez-Lozano JM, et al. Antimicrobial drug use and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Aberdeen, 1996-2000. *Emerg Infect Dis* 2004;10:1432-41.
123. Katz DE, Marchaim D, Assous MV, Yinnon A, Wiener-Well Y, Ben-Chetrit E. Ten years with colistin: a retrospective case series. *Int J Clin Pract* 2016;70:706-11.
124. Zarkotou O, Pournaras S, Voulgari E, et al. Risk factors and outcomes associated with acquisition of colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: a matched case-control study. *J Clin Microbiol* 2010;48:2271-4.
125. Ah YM, Kim AJ, Lee JY. Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents* 2014;44:8-15.
126. Kontopidou F, Plachouras D, Papadomichelakis E, et al. Colonization and infection by colistin-resistant Gram-negative bacteria in a cohort of critically ill patients. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:E9-E11.
127. Giani T, Arena F, Vaggelli G, et al. Large Nosocomial Outbreak of Colistin-Resistant, Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Traced to Clonal Expansion of an mgrB Deletion Mutant. *J Clin Microbiol* 2015;53:3341-4.
128. Sympsa V, Psychogiou M, Bouzala GA, 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.
129. Schechner V, Temkin E, Harbarth S, Carmeli Y, Schwaber MJ. Epidemiological interpretation of studies examining the effect of antibiotic usage on resistance. *Clin Microbiol Rev* 2013;26:289-307.
130. Monnet DL, Lopez-Lozano JM, Campillos P, Burgos A, Yague A, Gonzalo N. Making sense of antimicrobial use and resistance surveillance data: application of ARIMA and transfer function models. *Clin Microbiol Infect* 2001;7 Suppl 5:29-36.
131. Donnan PT, Wei L, Steinke DT, et al. Presence of bacteriuria caused by trimethoprim resistant bacteria in patients prescribed antibiotics: multilevel model with practice and individual patient data. *BMJ* 2004;328:1297.
132. Harbarth S, Harris AD, Carmeli Y, Samore MH. Parallel analysis of individual and aggregated data on antibiotic exposure and resistance in gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis* 2001;33:1462-8.
133. Willemsen I, Cooper B, van Buitenen C, Winters M, Andriess G, Kluytmans J. Improving quinolone use in hospitals by using a bundle of interventions in an interrupted time series analysis. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:3763-9.

