

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ - Δ' ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ  
ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ  
ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ**

**ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΕΛΕΝΗ ΓΙΑΜΑΡΕΛΛΟΥ  
21/11/1997-31/08/2009**

**ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΠΕΤΡΙΚΚΟΣ  
01/09/2009 -**

**ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΤΩΝ  
ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΙΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΕΣ ΜΕΣΩ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ  
ΜΕΤΑΛΛΟ-β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΩΝ (MBLs) ΣΤΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΤΗΣ ΜΕΘ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟΥ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ. ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΙΑ ΤΥΧΟΝ  
ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝ MBLs ΜΕΤΑΞΥ  
ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΕΙΔΩΝ.**

**ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ ΚΟΡΑΤΖΑΝΗΣ  
ΙΑΤΡΟΣ ΠΑΘΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΑΘΗΝΑ 2013**

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΚΡΑΤΗ

ΟΜΝΥΜΙ ΔΡΟΜΩΝΑ ΙΝΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΗΡΙΟΝ ΚΑΙ ΥΑΕΙΑΝ ΚΑΙ  
ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΕΙΣΥΜΕΝΟΣ  
ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΩ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ  
ΤΟΥΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΣΔΕ ΗΨΑΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΧΑΝΤΑ  
ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΠΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ  
ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΣΗ ΧΡΗΣΙΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ  
ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΩΥΤΕΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΩΝ  
ΑΡΑΞΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΧΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΗΝ ΧΡΗΣΙΣΙ  
ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΣ ΠΑΡΑΡΡΕΛΙΨ ΤΕ  
ΚΑΙ ΑΚΡΟΝΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ ΑΡΑΞΗΣ ΜΕΘΙΣΙΟΣ ΜΕΛΕΩΣΗ  
ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΧΑΝΤΟΣ  
ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΜΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΣΦΙΣΜΕΝΟΙΣ  
ΝΟΜΩ ΙΝΤΑΙΚΩ ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΜΙ ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ  
ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ  
ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΕΠΙ ΑΝΑΨΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗΝ ΕΙΨΕΙΝ  
ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΜΙ ΛΙΤΡΘΕΙΣ  
ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ  
ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ  
ΑΨΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΡΑΨΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ  
ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΣΥΝΤΑΣ  
ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΙΑΤΗΣΙΝ ΑΝΘΡΩΣΙ ΠΡΗΨΙΟΣ ΤΗΣΔΕ ΕΣ  
ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΙΩ ΕΨΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ'  
ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΕΚΤΟΣ ΕΣΩ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΧΩΣΙΨ  
ΚΑΙ ΦΘΟΡΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΜΗΣ ΚΑΙ ΑΨΦΟΔΙΣΙΩΝ ΒΡΨΩΝ ΕΠΙ  
ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ ΒΑΡΥΘΕΩΝ ΤΕ  
ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ Α ΔΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ Η ΙΩΩ Η ΑΚΟΥΨΩ Η  
ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΗΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ Α ΜΗ ΧΨ  
ΠΟΤΕ ΕΚΜΑΛΕΨΘΑΙ ΕΨΩ ΣΨΨΟΜΑΙ ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ  
ΕΙΜΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΥΔΕ  
ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΩΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΨ ΕΡΑΥΨΑΣΘΑΙ  
ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΨΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ  
ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΑΕΙ ΧΨΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ  
ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ

Ημερομηνία αίτησης έναρξης Διδακτορικής Διατριβής:	10-03-2004
Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:	22-03-2004
Ημερομηνίας Κατάθεσης Θέματος και Πρωτοκόλλου:	03-07-2006
Ημερομηνία Κατάθεσης Πρώτης Έκθεσης Προόδου:	30-03-2007
Ημερομηνία Κατάθεσης Δεύτερης Έκθεσης Προόδου:	03-10-2007
Ημερομηνία Κατάθεσης Τρίτης Έκθεσης Προόδου:	25-01-2013
Ημερομηνία κατάθεσης Διδακτορικής Διατριβής:	25-01-2013

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

Ε. Γιαμαρέλλου	Καθηγήτρια Επιβλέπον μέλος ΔΕΠ
Κ. Κανελλακοπούλου	Καθηγήτρια
Γ. Δαΐκος	Αναπλ. Καθηγητής

**ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

Ε. Γιαμαρέλλου	Καθηγήτρια
Κ. Κανελλακοπούλου	Καθηγήτρια
Γ. Δαΐκος	Αναπλ.Καθηγητής
Λ. Τζουβελέκης	Αναπλ.Καθηγητής
Σ. Τσιόδρας	Επικ. Καθηγητής
Α. Αντωνιάδου	Επικ. Καθηγήτρια
Μ. Σουλή	Επικ. Καθηγήτρια

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΡΙΣΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:** 12/06/2013

**ΒΑΘΜΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:** ΑΡΙΣΤΑ

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Μ. Α. ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ

Στους σεβαστούς Καθηγητές μου

Στην οικογένεια μου

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

### **ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ**

### **ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΚΡΙΣΗ**

### **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

#### **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

##### **1.1. Ταξινόμηση Καρβαπενεμασών**

- 1.1.1. Καρβαπενεμάσες Μοριακής τάξης Α
- 1.1.2. Καρβαπενεμάσες Μοριακής τάξης Β (Μέταλλο-β-λακταμάσες)
- 1.1.3. Καρβαπενεμάσες Μοριακής τάξης D (β-λακταμάσες τύπου OXA)

##### **1.2. Ταξινόμηση των Μεταλλο-β-λακταμασών**

- 1.2.1. Χρωμοσωμικές μεταλλο-β-λακταμάσες
- 1.2.2. Μεταφερόμενες μεταλλο-β-λακταμάσες
  - 1.2.2.1. IMP-τύπου MBLs
  - 1.2.2.2. VIM-τύπου MBLs
  - 1.2.2.3. New Delhi Metallo (NDM) β- λακταμάσες
- 1.2.3. Γεωγραφική Κατανομή MBLs
  - 1.2.3.1. Ασία
  - 1.2.3.2. Ευρώπη
  - 1.2.3.3. Λοιπός κόσμος

##### **1.3. Μηχανισμός υδρόλυσης των MBL**

##### **1.4. Γενετικό περιβάλλον επίκτητων MBLs**

##### **1.5. Ανίχνευση καρβαπενεμασών**

- 1.5.1. Φαινοτυπικές δοκιμασίες για την ανίχνευση των MBLs
- 1.5.2. Ανίχνευση MBL με σπεκτροφωτομετρία

1.5.3. Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης MBLs

## **1.6. Αντιμικροβιακές ουσίες με δράση έναντι μικροοργανισμών που παράγουν MBL**

1.6.1 Β-λακτάμες

1.6.2 Άλλες αντιμικροβιακές ουσίες

1.6.2.1. Κολιστίνη

1.6.2.2. Τιγκεκυκλίνη

1.6.2.3. Αμινογλυκοσίδες

1.6.2.4. Φωσφομυκίνη

1.6.2.5. Άλλες ομάδες αντιμικροβιακών

1.6.3 Νεότερες Ουσίες

1.6.3.1 Σουλφακτάμες

1.6.3.2 Πλαζομισίνη

1.6.3.3 Αναστολείς της αμινοακυλο-tRNA συνθετάσης

1.6.3.4 Αναστολείς καρβαπενεμασών

1.6.3.5 1 - β-μεθυλκαρβαπενέμες

1.6.3.6 Σουλφόνες

1.6.3.7 Σουξινικά οξέα

1.6.3.8 Θειόλες

## **1.7. Έλεγχος Λοιμώξεων**

1.7.1 Κέντρα με σποραδική εμφάνιση ή πλήρη απουσία MBLs

1.7.2 Κέντρα με ενδημικά στελέχη που παράγουν MBLs ή με εν εξελίξει περιφερειακές εστίες.

## **2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1 Περίληψη πειραματικής διαδικασίας**

### **2.2 Χώρος και ασθενείς**

## **2.3 Μελέτη αποικισμού**

## **2.4 Βακτηριακά στελέχη**

## **2.5 Τυποποίηση και αντιμικροβιακή ευαισθησία**

2.5.1 Τυποποίηση βακτηριακών στελεχών

2.5.2 Έλεγχος αντιβιογράμματος κατά Kirby Bauer

2.5.3 Μέθοδος συνέργειας διπλού δίσκου (DDST)

2.5.4 Μέθοδος συνέργειας δίσκων EDTA-ιμιπενέμης

2.5.5 Προσδιορισμός ελάχιστων ανασταλτικών πυκνοτήτων (MIC)

## **2.6. Βακτηριακή σύζευξη**

## **2.7. Ανίχνευση παραγωγής β-λακταμασών με ισοηλεκτρική εστίαση (IEF)**

2.7.1. Παρασκευή εκχυλισμάτων

2.7.2. Ισοηλεκτρική εστίαση

## **2.8. Απομόνωση ολικού γενωμικού DNA**

## **2.9. Αντίδραση PCR**

2.9.1. Ανίχνευση και ταυτοποίηση του γονιδίου *bla<sub>VIM</sub>*

2.9.2. Μοριακή τυποποίηση βακτηριακών στελεχών

2.9.3. Ανίχνευση γονιδίων άλλων λακταμασών

2.9.4. Ανίχνευση και χαρακτηρισμός ιντεγκρονίων που φέρουν το *bla<sub>VIM</sub>*

## **2.10. Έλεγχος πλασμιδιακού περιεχομένου**

2.10.1. Παρασκευή ολικού DNA σε πλακίδια αγαρόζης

2.10.2. Πέψη με S1 νουκλεάση

2.10.3. Ηλεκτροφόρηση εναλλασσόμενου πεδίου (PFGE)

# **3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

## **3.1 Ασθενείς –Μικροοργανισμοί**

3.1.1 Ασθενείς

- 3.1.2 Συλλογή στελεχών
- 3.2 Μοριακή τυποποίηση βακτηριακών στελεχών
- 3.3 Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιμικροβιακά
- 3.4 Ανίχνευση και ταυτοποίηση του γονιδίου *bla<sub>VIM</sub>*
- 3.5 Αποτελέσματα βακτηριακής σύζευξης
- 3.6 Ανίχνευση παραγωγής β-λακταμασών με ισοηλεκτρική εστίαση (IEF)
- 3.7 Ανίχνευση και χαρακτηρισμός ιντεγκρονίων που φέρουν το *bla<sub>VIM</sub>*
- 3.8 Έλεγχος πλασμιδιακού περιεχομένου
- 3.9 Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

6 ΑΓΓΛΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ

7 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ



## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Επώνυμο	Κορατζάνης
Όνομα	Ευάγγελος
Ημερομηνία γέννησης	26-11-1975
Οικογενειακή κατάσταση	Έγγαμος, 2 τέκνα
Τηλέφωνο Επικοινωνίας	6973-696568
E-mail	<a href="mailto:vkoratzanis@yahoo.gr">vkoratzanis@yahoo.gr</a>
Ξένες γλώσσες	<ul style="list-style-type: none"><li>• Αγγλικά</li><li>• Γερμανικά</li><li>• Γαλλικά</li><li>• Ρουμάνικα</li></ul>
Πτυχίο Ιατρικής	Ιατρική Σχολή Παν/μίου Ιασίου Ρουμανίας Gr. T. Pora Νοέμβριος 2002, Λίαν Καλώς
2003-2004	Στρατιωτική θητεία Υγειονομικό Στρατός Ξηράς
2004-2005	Υπηρεσία Υπαίθρου, Γ.Ν.- Κ.Υ. Καρύστου
2005-2007	Επιστημονικός Συνεργάτης Δ' Παθολογικής Κλινικής Παν/μίου Αθηνών (Διευθύντρια Καθηγήτρια Ε. Γιαμαρέλλου).
Νοέμβριος 2007-Ιούνιος 2012	Ειδικευόμενος Παθολογίας, Δ' Παθολογική Κλινική Παν/μίου Αθηνών (Διευθύντρια Καθηγήτρια Ε. Γιαμαρέλλου 2004-2009, Διευθυντής Καθηγητής Γ. Πετρίκκος 2009- 2012 )
Επιστημονικές εργασίες - Διακρίσεις	<ul style="list-style-type: none"><li>• 10 ανακοινώσεις σε Ελληνικά συνέδρια</li><li>• 18 ανακοινώσεις σε Διεθνή συνέδρια</li><li>• 9 δημοσιεύσεις σε Διεθνή περιοδικά</li><li>• Γ' Βραβείο Βασικής Έρευνας 2005 Ιατρική Εταιρεία Αθηνών</li></ul>

## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΑ ΙΑΤΡΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

### ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΚΡΙΣΗ

- 1: Koratzanis E, Souli M, Galani I, Chryssouli Z, Armaganidis A, Giamarellou H. Epidemiology and molecular characterisation of metallo-β-lactamase-producing Enterobacteriaceae in a university hospital Intensive Care Unit in Greece. *Int J Antimicrob Agents*. 2011 Nov;38(5):390-7. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2011.06.014. Epub 2011 Aug 27. PubMed PMID: 21873034.
- 2: Georgopoulou AP, Savva A, Giamarellos-Bourboulis EJ, Georgitsi M, Raftogiannis M, Antonakos N, Apostolidou E, Carrer DP, Dimopoulos G, Economou A, Efthymiou G, Galanakis N, Galani L, Gargalianos P, Karaiskos I, Katsenos C, Kavatha D, Koratzanis E, Labropoulos P, Lada M, Nakos G, Paggalou E, Panoutsopoulos G, Paraschos M, Pavleas I, Pontikis K, Poulakou G, Prekates A, Sybardi S, Theodorakopoulou M, Trakatelli C, Tsiaoussis P, Gogos C, Giamarellou H, Armaganidis A, Meisner M; Hellenic Sepsis Study Group. Early changes of procalcitonin may advise about prognosis and appropriateness of antimicrobial therapy in sepsis. *J Crit Care*. 2011 Jun;26(3):331.e1-7. doi: 10.1016/j.jcrc.2010.07.012. Epub 2010 Sep 24. PubMed PMID: 20869839.
- 3: Panagiotopoulos T, Bonovas S, Danis K, Iliopoulos D, Dedoukou X, Pavli A, Smeti P, Mentis A, Kossivakis A, Melidou A, Diza E, Chatzidimitriou D, Koratzanis E, Michailides S, Passalidou E, Kollaras P, Nikolaides P, Tsiodras S. Cluster of new influenza A(H1N1) cases in travellers returning from Scotland to Greece - community transmission within the European Union? *Euro Surveill*. 2009 May 28;14(21). doi:pii: 19226. PubMed PMID: 19480814.
- 4: Papadomichelakis E, Kontopidou F, Antoniadou A, Poulakou G, Koratzanis E, Kopterides P, Mavrou I, Armaganidis A, Giamarellou H. Screening for resistant gram-negative microorganisms to guide empiric therapy of subsequent infection.

Intensive Care Med. 2008 Dec;34(12):2169-75. doi: 10.1007/s00134-008-1247-9. Epub 2008 Aug 19. PubMed PMID: 18712349.

5: Galani I, Kontopidou F, Souli M, Rekatsina PD, Koratzanis E, Deliolanis J, Giamarellou H. Colistin susceptibility testing by Etest and disk diffusion methods. *Int J Antimicrob Agents*. 2008 May;31(5):434-9. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.01.011. Epub 2008 Mar 6. PubMed PMID: 18328674.

6: Antoniadou A, Kontopidou F, Poulakou G, Koratzanis E, Galani I, Papadomichelakis E, Kopterides P, Souli M, Armaganidis A, Giamarellou H. Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: first report of a multiclonal cluster. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Apr;59(4):786-90. Epub 2007 Feb 16. PubMed PMID: 17307769.

7: Galani I, Souli M, Koratzanis E, Koratzanis G, Chryssouli Z, Giamarellou H. Emerging bacterial pathogens: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* and *Proteus mirabilis* clinical isolates harbouring the same transferable plasmid coding for metallo-beta-lactamase VIM-1 in Greece. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Mar;59(3):578-9. Epub 2007 Jan 25. PubMed PMID: 17255145.

8: Souli M, Kontopidou FV, Koratzanis E, Antoniadou A, Giannitsioti E, Evangelopoulou P, Kannavaki S, Giamarellou H. In vitro activity of tigecycline against multiple-drug-resistant, including pan-resistant, gram-negative and gram-positive clinical isolates from Greek hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Sep;50(9):3166-9. PubMed PMID: 16940120; PubMed Central PMCID: PMC1563514.

9: Galani I, Souli M, Koratzanis E, Chryssouli Z, Giamarellou H. Molecular characterization of an *Escherichia coli* clinical isolate that produces both metallo-beta-lactamase VIM-2 and extended-spectrum beta-lactamase GES-7: identification of the In8 integron carrying the blaVIM-2 gene. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Aug;58(2):432-3. Epub 2006 Jun 2. PubMed PMID: 16751200.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελετήθηκε η μοριακή επιδημιολογία των Εντεροβακτηριακών στελεχών που παράγουν μεταλλο-β-λακταμάσες (MBLs) της ομάδας των VIM που απομονώθηκαν στην αρχή της επιδημίας στην Μονάδα Εντατικής Θεραπείας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου «ΑΤΤΙΚΟΝ». Όλοι οι Gram-αρνητικοί μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν από τον Μάρτιο του 2004 έως τον Νοέμβριο του 2005 και παρήγαγαν MBL υποβλήθηκαν σε έλεγχο με PCR και μελέτη νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, μοριακή τυποποίηση με Rep-PCR, και χαρακτηρισμό του πλασμιδιακού DNA μετά από πέψη με S1 νουκλεάση. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα σύζευξης και ισοηλεκτρικής εστίασης για την ανίχνευση συνυπαρχουσών β-λακταμασών. Μεταξύ 23 ασθενών, 12 υπέστησαν μία ή περισσότερες κλινικές λοιμώξεις. Συνολικά μελετήθηκαν 82 στελέχη που αντιπροσώπευαν ένα στέλεχος από κάθε κλώνο, πηγή και ασθενή και περιελάμβαναν στελέχη *Klebsiella pneumoniae* (77), *Enterobacter cloacae* (2), *Citrobacter freundii* (1) και *Pseudomonas aeruginosa* (2). Μεταξύ των στελεχών *K. pneumoniae* παρατηρήθηκαν 10 διαφορετικοί κλώνοι. Τα πειράματα βακτηριακής σύζευξης ήταν επιτυχή στο 54.5% των στελεχών *K. pneumoniae* και ανιχνεύθηκαν 5 διαφορετικού μεγέθους πλασμίδια. Όλα τα στελέχη *K. pneumoniae* και *E. cloacae* μοιράζονταν το ίδιο ιντεγκρόνιο τάξεως 1 που εκτός του γονιδίου *bla<sub>VIM-1</sub>* έφεραν τις γονιδιακές κασέτες *aacA7*, *dhfrI* και *aadA1*. Το στέλεχος *C. freundii* έφερε ένα διαφορετικό ιντεγκρόνιο που περιελάμβανε τα γονίδια *bla<sub>VIM-1</sub>* και *aac(6')-IIIc*. και τα δύο στελέχη *P. aeruginosa* έφεραν το γονίδιο *bla<sub>VIM-2</sub>*. Δεν κατέστη δυνατό να αναγνωρίσουμε κάποιους κλώνους με ιδιαίτερη ικανότητα να προκαλούν κλινική λοίμωξη. Συμπερασματικά, στελέχη διαφορετικών κλώνων που παρήγαγαν MBL ήταν υπεύθυνα για τα πρώτα περιστατικά αποικισμού ή/και λοίμωξης στην ΜΕΘ. Ένα ιντεγκρόνιο, κοινό στα Ελληνικά νοσοκομεία, μεταφέρθηκε επιτυχώς μεταξύ μικροβιακών ειδών και κλώνων οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η επιδημία ήταν αποτέλεσμα κυρίως της επιτυχούς οριζόντιας μεταφοράς κινητών γενετικών δομών παρά αποτέλεσμα της οριζόντιας μεταφοράς ενός ή περισσότερων κλώνων.

## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αύξηση της αντοχής στα αντιμικροβιακά μεταξύ των Gram-αρνητικών βακτηριδίων αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα του πώς τα βακτήρια μπορούν να αποκτούν, να διατηρούν και να εκφράζουν νέες γενετικές πληροφορίες οι οποίες μπορούν να προσδίδουν αντοχή σε ένα ή περισσότερα αντιμικροβιακά. Το φαινόμενο της αντοχής μεταξύ των Gram-αρνητικών βακτηριδίων έχει λάβει τεράστιες διαστάσεις και η αναγκαιότητα ελέγχου της διασποράς τους είναι επιτακτική (Pool K., 2003).

Σε παγκόσμιο επίπεδο οι αναφορές αντοχής ποικίλουν, είναι όμως κοινή διαπίστωση η συνεχώς αυξανόμενη αντοχή στις κινολόνες και στις ευρέος φάσματος β-λακτάμες των Εντεροβακτηριακών, *Acinetobacter spp* και *Pseudomonas aeruginosa*, αφήνοντας πολύ λίγες θεραπευτικές επιλογές σε λοιμώξεις από τα παραπάνω παθογόνα (Maniati A. N., 2003; Neuhauser M. M., 2003). Η έλευση των καρβαπενεμών την δεκαετία του 80 προσέφερε μια νέα θεραπευτική επιλογή σε σοβαρές βακτηριακές λοιμώξεις. Τα τελευταία χρόνια η αντοχή και σ' αυτή την ομάδα αντιμικροβιακών αποκτά παγκόσμιο χαρακτήρα ιδίως για στελέχη *P. aeruginosa* αλλά και μεταξύ Εντεροβακτηριακών και *Acinetobacter spp*. Τα Gram-αρνητικά βακτήρια έχουν στην φαρέτρα τους μια πληθώρα μηχανισμών αντοχής, ενδογενών ή επίκτητων, με την βοήθεια των οποίων διαφεύγουν της δράσης των καρβαπενεμών και των λοιπών β-λακταμών. Οι συνήθεις τρόποι που επιτυγχάνεται αυτό είναι μέσω αναστολής της εισόδου του αντιμικροβιακού (πχ μετάλλαξη πρωτεϊνών εξωτάτης μεμβράνης, αντλίες ενεργητικής αποβολής-efflux pumps), υπερπαραγωγής τύπου AmpC λακταμασών και παραγωγής λακταμασών που υδρολύουν τις καρβαπενέμες (Frere J. M., 1995).

### 1.1. Ταξινόμηση Καρβαπενεμασών

Διάφορα σχήματα έχουν προταθεί κατά καιρούς για τη ταξινόμηση των β-λακταμασών. Τα πιο διαδεδομένα σήμερα σχήματα είναι δύο. Η ταξινόμηση κατά «Ambler» βασίζεται στη μοριακή δομή των ενζύμων, ενώ η ταξινόμηση κατά Bush & Jacoby βασίζεται στις βιοχημικές τους ιδιότητες, στην μοριακή τους δομή και στην αμινοξική τους αλληλουχία.

Όταν πρωτοεμφανίσθηκαν οι β-λακταμάσες και ξεκίνησε η μελέτη τους, οι μοριακές τεχνικές δεν αποτελούσαν κοινή πρακτική, οπότε μια νέα β-λακταμάση

υπόκειται σε βιοχημική ανάλυση απομονώνοντας την πρωτεΐνη και προσδιορίζοντας το ισοηλεκτρικό της σημείο. Στην συνέχεια πραγματοποιούνταν ενζυμικές μελέτες ώστε να προσδιοριστεί η υδρολυτική της ικανότητα καθώς και η δυνατότητα αναστολής της υδρολυτικής δράσης από γνωστούς αναστολείς (Richmond M. H. et al, 1973; Sykes R. B. et al, 1976). Η ικανότητα υδρόλυσης των β-λακταμικών ουσιών και η συμπεριφορά του ενζύμου παρουσία αναστολέων ήταν τα χαρακτηριστικά που επέτρεπαν την κατάταξη μιας νέας β-λακταμάσης. Με την πάροδο του χρόνου η διαδικασία αυτή της λειτουργικής κατάταξης εξελίχθηκε σε ένα ευρέως αποδεκτό σχήμα (ταξινόμηση κατά Bush & Jacoby) που χωρίζει τις καταγεγραμμένες β-λακταμάσες σε 3 κύριες λειτουργικές ομάδες (1 έως 3). Στην λειτουργική αυτή κατάταξη οι καρβαπενεμάσες απαντώνται κυρίως στις ομάδες 2f και 3 (Bush K. et al, 1995).

Η ταξινόμηση κατά «Ambler» βασίζεται στην ομολογία των αμινοξέων και διακρίνει τις β-λακταμάσες σε τέσσερις κύριες ομάδες A, B, C και D (Ambler R. P., 1980; Huoninen P. et al, 1988; Jaurin, B. et al, 1981), οι οποίες σε μεγάλο βαθμό μπορούν να αντιστοιχηθούν με το σχήμα λειτουργικής κατάταξης, στερούνται όμως πληροφοριών αναφορικά με την ενζυμική δράση των ενζύμων. Οι μοριακές ομάδες A, C, και D περιλαμβάνουν τις β-λακταμάσες με σερίνη στο ενεργό τους κέντρο, ενώ η μοριακή ομάδα B περιλαμβάνει όλα τα μεταλλοένζυμα με ψευδάργυρο στο ενεργό τους κέντρο. Καρβαπενεμάσες, δηλαδή β-λακταμάσες με καταλυτική δράση έναντι των καρβαπενεμών ανήκουν στις μοριακές ομάδες A, B και D.

### **1.1.1. Καρβαπενεμάσες Μοριακής τάξης A**

Οι καρβαπενεμάσες που ανήκουν στην μοριακή τάξη A ανήκουν στην λειτουργική ομάδα 2f και εμφανίζονται σποραδικά σε κλινικά στελέχη τα τελευταία 20 χρόνια (Medeiros A. A. et al, 1986). Έχουν εντοπιστεί σε στελέχη *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis* και *Klebsiella spp.* σαν μεμονωμένα στελέχη ή σε μικρές επιδημίες (Medeiros A. A. et al, 1986; Nordmann P. S. et al, 1993; Yang Y. et al, 1990; Rasheed et al. 2008; Tibbetts et al. 2008). Τα βακτήρια που παράγουν τα ένζυμα αυτά παρουσιάζουν μειωμένη ευαισθησία στην ιμιπενέμη, αλλά με τιμές MIC που κυμαίνονται από ήπια αυξημένες (0.5-1μg/ml) έως πολύ υψηλές. Για αυτό το λόγο μπορεί να μην ανιχνευθούν σε ένα σύνηθες τεστ ευαισθησίας.

Στην τάξη αυτή περιλαμβάνονται οι οικογένειες καρβαπενεμασών KPC (11 μέλη), SME (3 μέλη), NMC/IMI (3 μέλη), GES (4 μέλη) και οι SHV-38 και SFC-1. Ο υδρολυτικός τους μηχανισμός απαιτεί ενεργό κέντρο σερίνης στη θέση 70 στο σύστημα αρίθμησης κατά Ambler (Ambler R. P. et al, 1991). Έχουν την δυνατότητα να υδρολύουν ένα μεγάλο φάσμα β-λακταμών που περιλαμβάνει καρβαπενέμες, κεφαλοσπορίνες, πενικιλίνες και την αζτρεονάμη, ενώ αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ και την ταζομπακτάμη, κατατάσσοντας τα στην ομάδα 2f της λειτουργικής κατάταξης των β-λακταμασών.

Η οικογένεια των KPC περιλαμβάνει 11 μέλη (<http://www.lahey.org/studies> Ανανέωση 10 Ιανουαρίου, 2012) και αποτελεί την κυρίαρχη ομάδα καρβαπενεμασών της τάξης A με ενδημικές και ψευδό-ενδημικές τοπικές εστίες σε ΗΠΑ και Ισραήλ που σε κάποιες περιπτώσεις φαίνεται ότι έχουν κλωνική σχέση (Hirsch EB et al, 2010; Woodford N. et al, 2004; Leavitt A. et al, 2007; Navon-Venezia S. et al, 2010). Μεταξύ των περιοχών με μεγάλο επιπολασμό είναι και η επαρχία Zhejiang της Κίνας κάτι που πιθανώς αφορά και άλλες επαρχίες της χώρας για τις οποίες υπάρχει ανεπαρκές δίκτυο επιτήρησης της αντοχής στα αντιμικροβιακά (Qi Y., 2010; Wu Q. et al, 2010; Zhang R. et al, 2007). Τα τελευταία 3 χρόνια όλο και εντονότερο γίνεται το πρόβλημα στον ευρωπαϊκό χώρο και ιδιαίτερα στις μεσογειακές χώρες με κύριο εκπρόσωπο την Ελλάδα (Giakkouri et al, 2011). Μέχρι πρόσφατα οι KPC ανευρίσκονταν μόνο σε Εντεροβακτηριακά. Τον τελευταίο καιρό ανιχνεύθηκαν σε στελέχη *P. aeruginosa* από την Κολομβία (Villegas MV. et al, 2007) και ΗΠΑ (Poirel L. et al, 2010) καθώς επίσης και σε στελέχη *A.calcoaceticus–baumannii* στο Πουέρτο Ρίκο (Robledo IE. et al, 2010). Στην περίπτωση της *P. aeruginosa* από την Κολομβία το γονίδιο της KPC βρέθηκε στο χρωμόσωμα, ενώ σε στέλεχος από τις ΗΠΑ βρέθηκε σε μικρό πλασμίδιο (66 kb) το οποίο μπορούσε να συζευχθεί με εργαστηριακό στέλεχος *Escherichia coli*. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να αποτελεί προάγγελο περαιτέρω διασποράς του συγκεκριμένου πλασμιδίου σε Εντεροβακτηριακά (Villegas MV. et al, 2007).

Σε έλεγχο που πραγματοποιήθηκε στο Puerto Rico σε 274 πολυανθεκτικά στελέχη *A. calcoaceticus–baumannii* το 2009, 10 (3,4%) ήταν θετικά για KPC (Robledo IE. et al, 2010). Σε επτά από αυτά ανιχνεύθηκε η KPC-3, ενώ στα υπόλοιπα 3 βρέθηκαν η KPC-4, η KPC-2 και η KPC-10. Το εύρημα αυτό έρχεται σε αντιδιαστολή με ότι ισχύει στα Εντεροβακτηριακά ιδίως στον Ευρωπαϊκό χώρο όπου



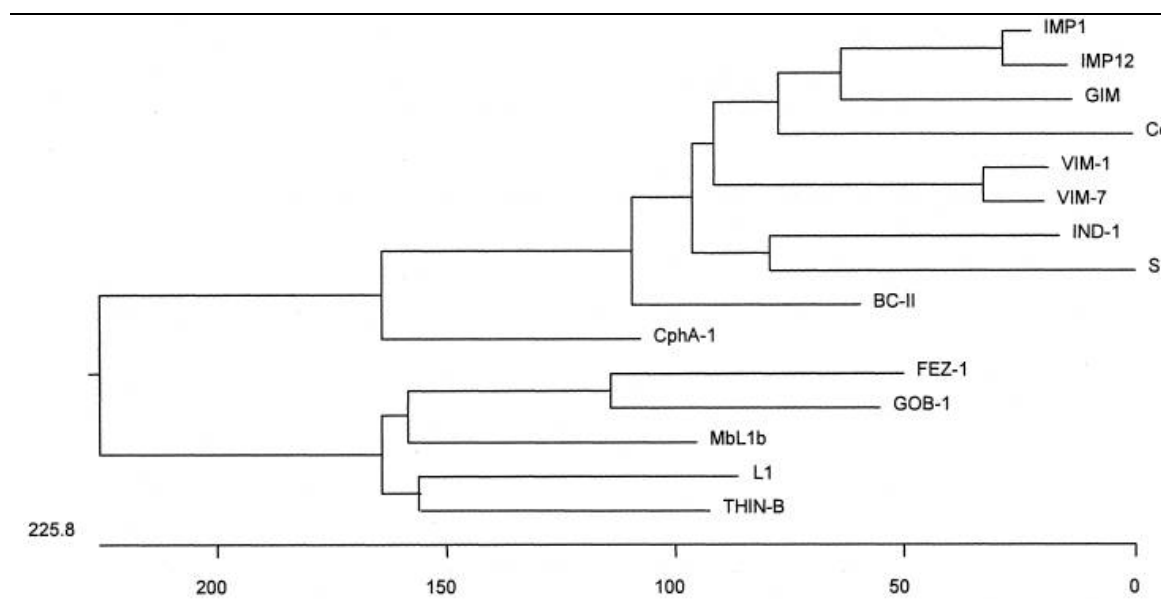
η KPC-2 είναι κυρίαρχη παραλλαγή. Η διασπορά του γονιδίου *bla*<sub>KPC</sub> πραγματοποιείται κύρια μέσω πλασμιδίου μεταφοράς που φέρει το τρανσποζόνιο *Tn4401* το οποίο είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με το γονίδιο της καρβαπενεμάσης, αν και σήμερα, άλλες αλληλουχίες εισδοχής (insertion elements) από άλλα τρανσποζόνια έχουν αλλάξει το γενετικό περιβάλλον των KPC (Gootz TD. et al, 2009; Shen P. et al, 2009). Η διασπορά των KPC στελεχών πέρα από τις ΗΠΑ φάνηκε να πραγματοποιήθηκε μέσω μετακίνησης ασθενών αποικισμένων με εντεροβακτηριακά στελέχη που παρήγαγαν KPC (Dortet L. et al, 2008).

### 1.1.2. Καρβαπενεμάσες Μοριακής τάξης Β (μέταλλο-β-λακταμάσες- MBLs)

Οι μέταλλο-β-λακταμάσες διαχωρίστηκαν επισήμως από τις β-λακταμάσες τύπου σερίνης το 1980, με την ταξινόμηση που προτάθηκε από τον Ambler (Ambler R. P., 1980). Λίγες MBLs είχαν μελετηθεί εκείνη την εποχή σε ικανό βαθμό ώστε να ενταχθούν σε αυτή την ταξινόμηση, με εξαίρεση ίσως τα ένζυμα L1 (από *Stenotrophomonas maltophilia*) και BCII (από *Bacillus cereus*). Το 1989 η Karen Bush κατέταξε τις MBLs σε ξεχωριστή ομάδα (ομάδα 3) σύμφωνα με τις λειτουργικές τους ιδιότητες (Bush K., 1989). Τα κύρια χαρακτηριστικά που ελήφθησαν υπόψη ήταν η υδρολυτική δράση στην ιμιπενέμη, η ευαισθησία στο EDTA, και η έλλειψη αναστολής από τους αναστολείς των β-λακταμασών τύπου σερίνης. Το σχήμα ταξινόμησης από την Karen Bush ανανεώθηκε το 1995, το 1997 και τελευταία το 2010 ενσωματώνοντας τον συνεχώς αυξανόμενο αριθμό ενζύμων της ομάδας 3 (Bush K. et al, 1995; Rasmussen B. A. et al, 1997; Bush K. et al, 2010).

Όλες οι MBLs υδρολύουν την ιμιπενέμη, αλλά η υδρολυτική τους ικανότητα διαφέρει σημαντικά και μπορεί να σχετίζεται με το επίπεδο αντοχής του βακτηρίου στις καρβαπενέμες (Massidda O. et al, 1991). Στο σχήμα λειτουργικής ταξινόμησης τα ένζυμα αυτά χωρίζονται σε υποομάδες. Τα ένζυμα της ομάδας 3a έχουν δράση ευρέως φάσματος, της 3b εμφανίζουν επιλεκτική δράση στις καρβαπενέμες, ενώ τα ένζυμα της ομάδας 3c έχουν φτωχή υδρολυτική δράση στις καρβαπενέμες σε σύγκριση με άλλες β-λακτάμες. Ωστόσο, αυτά τα ένζυμα διαθέτουν το χαρακτηριστικό γνώρισμα του να αναστέλλονται καθολικά από το EDTA και από άλλους χηλικούς παράγοντες δισθενών κατιόντων κάτι που αποτελεί σημαντική ιδιότητα και σχετίζεται με τον τρόπο δράσης τους.

**Εικόνα 1.** Φυλογενετικό δέντρο των χρωμοσωμικών MBLs.



Σε μοριακό επίπεδο, οι MBLs αποτελούν μια ανόμοια ομάδα πρωτεϊνών που δύσκολα μπορούν να ταξινομηθούν (Εικόνα 1). Έχουν γίνει προσπάθειες για την ταξινόμηση των ενζύμων της τάξεως B κατά Ambler σε υποομάδες βάσει της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και άλλων ιδιοτήτων (Rasmussen B. A. et al, 1997). Το φυλογενετικό δέντρο (Εικόνα 1) δηλώνει την σχέση των ενζύμων μεταξύ τους βάσει των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών. Το σκεπτικό για την τάξη B1 είναι ότι τα ένζυμα που την απαρτίζουν δεσμεύουν στο ενεργό κέντρο ψευδάργυρο με 3 ιστιδίνες και μία κυστεΐνη και περιλαμβάνουν τις μεταφερόμενες MBLs IMP, VIM, GIM, SPM-1 και NDM-1. Η τάξη B2 περιλαμβάνει τα ένζυμα που έχουν μια ασπαραγίνη αντί της ιστιδίνης στην πρώτη θέση του κύριου συμπλέγματος που δεσμεύει τον ψευδάργυρο, NXHXD, και προέρχονται από το ένζυμο SFH-1 των *Aeromonas* spp. και *Serratia fonticola*. Η MBL L1 είναι ο μόνος αντιπρόσωπος της τάξης B3, και το μοναδικό ένζυμο μεταξύ όλων των β-λακταμασών που λειτουργικά εμφανίζεται σαν τετραμερές (Quiroga M. I. et al, 2000).

### 1.1.3. Καρβαπενεμάσες Μοριακής τάξης D (β-λακταμάσες τύπου OXA)

Οι OXA-τύπου (από το “oxacillin-hydrolyzing”) β-λακταμάσες με υδρολυτική δράση στις καρβαπενέμες ανευρίσκονται συνήθως σε στελέχη *Acinetobacter* spp. Το επίπεδο της υδρολυτικής τους ικανότητας συγκρινόμενο με άλλες καρβαπενεμάσες (πχ MBLs) είναι μικρό και τα βακτήρια που παράγουν ένζυμο της ομάδας αυτής

χρειάζονται συνήθως και άλλους μηχανισμούς (πχ efflux pumps, μειωμένη διαπερατότητα) ώστε να ανέλθουν οι MICs στις καρβαπενέμες σε επίπεδα αντοχής. Σε ευρωπαϊκό επίπεδο η αντοχή στελεχών *Acinetobacter* spp στις καρβαπενέμες φαίνεται να οφείλεται περισσότερο σε επικράτηση συγκεκριμένων κλώνων και όχι σε διασπορά αντοχής μέσω μεταφοράς πλασμιδίων (Towner et al, 2008). Βάσει της ομολογίας των αμινοξέων χωρίζονται σε 9 ομάδες (Πίνακας 1). Οι ομάδες 1, 2 και 4 με κύριους εκπροσώπους αντίστοιχα τις OXA-23 (περιλαμβάνει OXA-27 και OXA-49), OXA-24 (περιλαμβάνει OXA-25, OXA-26 και OXA-40) και OXA-58 είναι αυτές με την μεγαλύτερη κλινική σημασία.

**Πίνακας 1.** Ομάδες καρβαπενεμασών της οικογένειας των OXA β-λακταμασών

<b>Ομάδα</b>	<b>Κύριος αντιπρόσωπος</b>	<b>Επιπρόσθετα μέλη OXA</b>	<b>Βιβλιογραφία</b>
1	OXA-23 (ARI-1)	OXA-27, OXA-49	225
2	OXA-24	OXA-25, OXA-26, OXA-40, OXA-72	225
3	OXA-51	OXA-64 έως OXA-71, OXA-75 έως OXA-78, OXA-83, OXA-84, OXA-86 έως OXA-89, OXA-91, OXA-92, OXA-94, OXA-95	213, 225
4	OXA-58	Κανένα	225
5	OXA-55	OXA-SHE	225
6	OXA-48	OXA-54, OXA-SAR2	225
7	OXA-50	OXA-50a έως OXA-50d, PoxB	225
8	OXA-60	OXA-60a έως OXA-60d	225
9	OXA-62	Κανένα	192

## 1.2. Ταξινόμηση Μεταλλο-β-λακταμασών

### 1.2.1. Χρωμοσωμικές μέταλλο-β-λακταμάσες

Στο περιβάλλον υπάρχουν βακτήρια τα οποία περιλαμβάνουν στο γενετικό τους υλικό MBLs. Μία άποψη για την ύπαρξη αυτών των βακτηρίων είναι ότι κάποια χρονική περίοδο τα βακτήρια εκτέθηκαν σε β-λακταμικά προϊόντα και εξωθήθηκαν στο να αποκτήσουν και να διατηρήσουν αυτά τα γονίδια και τα προϊόντα τους. Μία άλλη θεωρία υποστηρίζει ότι τα ένζυμα αυτά έχουν ρόλο στην φυσιολογική λειτουργία του βακτηρίου. Γεγονός όμως είναι ότι κάποια MBL γονιδίων είναι επαγωγίμο και η πλειοψηφία των βακτηρίων που τα εμπεριέχουν μπορούν να αναπτύξουν υψηλού επιπέδου αντοχή στις β-λακτάμες. Ευτυχώς οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι ευκαιριακά παθογόνοι και με εξαίρεση βακτήρια όπως η *S. maltophilia* και ο *B. anthracis*, σπάνια προκαλούν σοβαρές λοιμώξεις.

Βακτήρια που έχουν χρωμοσωμικά κωδικοποιούμενες MBLs είναι τα *B. cereus* (BCII) (Lim H. M. et al, 1988), *B. anthracis* (Chen Y. H. et al, 2003), *S. maltophilia* (L1) (Walsh T. R. et al, 1994), *A. hydrophila* (CphA) (Massidda O. et al, 1991), *Chryseobacterium meningosepticum* (BlaB ή GOB-1) (Rossolini G. M. et al, 1999), *C. indologenes* (IND-1) (Bellais S. et al, 2000), *Legionella gormannii* (FEZ-1) (Boschi L. et al, 2000), *Caulobacter crescentus* (Mbl1B) (Simm A. M. et al, 2001), *Myroides* spp. (TUS-1, MUS-1) (Mammeri H. et al, 2002), *Janthinobacterium lividium* (THIN-B) (Rossolini G. M. et al, 2001), *Flavobacterium johnsoniae* (JOHN-1) (Naas T. et al, 2003) και *S. fonticola* (SFH-1) (Saavedra M. J. et al, 2003) (Πίνακας 2).

Γενικά οι χρωμοσωμικές MBLs ενός συγκεκριμένου γένους ή είδους διαφέρουν λίγο η μια από την άλλη. Η πιο αξιοσημείωτη εξαίρεση αφορά τις MBLs του *C. meningosepticum*, όπου τα BlaB και GOB-τύπου ένζυμα διαφέρουν σημαντικά (11% ομολογία) και έχουν ταξινομηθεί σε δύο διαφορετικές υποομάδες (Πίνακας 2).

Σε κάποιες περιπτώσεις οι χρωμοσωμικές MBLs μπορούν να συνυπάρχουν στο γονιδίωμα κάποιων βακτηρίων μαζί με β-λακταμάσες τύπου σερίνης. Για παράδειγμα τόσο η *A. hydrophila* όσο και η *A. veronii* παράγουν τρεις β-λακταμάσες, μια πενικιλινάση, μια κεφαλοσπορινάση και μια MBL οι οποίες υπερεκφράζονται όταν επιλεχθούν υποπληθυσμοί με υψηλού επιπέδου αντοχή στις β-λακτάμες.

**Πίνακας 2.** Χρωμοσωμικές MBLs

Υποομάδα	Μικροοργανισμός	Όνομα ενζύμου	Βιβλιογραφία
B1	<i>Bacillus cereus</i>	BCII-5/B/6	83
		BCII-569/H	65
	<i>Bacillus anthracis</i>	Bla2	30
	Alkalophilic <i>Bacillus</i> spp.	Bce 170	65
	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	IND-1	10
		IND-2, 2a, 3, 4	13
		<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	BlaB
	BlaB2, BlaB3		188
	BlaB4-8		12
	<i>Chryseobacterium gleum</i>	CGB-1	12
	<i>Myroides odoratus</i>	TUS-1	89
	<i>Myroides odoratimimus</i>	MUS-1	89
	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	JOHN-1	103
	B2	<i>Aeromonas hydrophilia</i>	CphA
<i>Aeromonas veronii</i>			ImiS
<i>Serratia fonticola</i>		AsbM1	196
		SFH-1	149
B3	<i>Caulobacter crescentus</i>	Mb11B	161
		CAU-1	42
	<i>Janthinobacterium lividium</i>	THIN-B	146
	<i>Legionella gormanii</i>	FEZ-1	15
	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	GOB-1-7	13
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	L1a	178
		L1-BlaS	151
		L1c, L1d, L1e	7

Παρόμοιο φαινόμενο παρατηρείται και σε άλλα βακτήρια μεταξύ των οποίων η *S. maltophilia* της οποίας τα υψηλά επίπεδα αντοχής στις β-λακτάμες οφείλονται κατά πρώτο λόγο σε υπερέκφραση της MBL L1 και της χρωμοσωμικής L2 (Walsh T. R. et al, 1997).

Μία ομάδα MBL γονιδίων που συχνά περιγράφονται ως χρωμοσωμικά αλλά στην πραγματικότητα είναι μεταφερόμενα είναι αυτά που εμφανίζονται στο *Bacteroides* spp. Σε σύγκριση με άλλα αναερόβια βακτήρια το *Bacteroides* spp είναι σχετικά

ανθεκτικό στα β-λακταμικά αντιμικροβιακά κυρίως λόγω δυνητικής παραγωγής MBLs, των CfiA ή CcrA (Rasmussen B. A. et al, 1991; Thompson J. S. et al, 1990). Η CfiA χαρακτηρίστηκε γενετικά το 1990 και είναι μια από τις πιο καλά μελετημένες MBL κυρίως όσον αφορά τον καταλυτικό μηχανισμό και τις δομικές και λειτουργικές ιδιότητες της (Concha N. O. et al, 1996; Crowder M. W. et al, 1996; Wang Z. et al, 1998; Wang Z. et al, 1999). Η CfiA είναι συχνά ανενεργή και απαιτεί μια ακολουθία υποκατάστατο για την παροχή ενός κατάλληλου υποκινητή, εξωθώντας με αυτό τον τρόπο την έκφραση του δομικού γονιδίου.

Αλληλουχίες εισδοχής όπως οι IS942, IS1186, και IS4351, έχει βρεθεί ότι ενσωματώνονται μπροστά από το σημείο σύνδεσης του ριβοσώματος, παρέχοντας αυξημένες δυνατότητες μεταγραφής του γονιδίου *cfiA* (Podglajen I. et al, 1995; Yamazoe K. et al, 1999).

### **1.2.2 Μεταφερόμενες μεταλλο-β-λακταμάσες**

Στις αρχές της δεκαετίας του 1990 αναφέρθηκε για πρώτη φορά αντοχή Gram-αρνητικών μικροβίων από επίκτητες καρβαπενεμάσες (Watanabe et al, 1991; Ito et al, 1995). Ο επιπολασμός τους ήταν αρχικά αρκετά περιορισμένος. Σποραδικά κρούσματα ή μικρές εστίες αναφέρθηκαν στην Ιαπωνία και προκλήθηκαν από στελέχη *P. aeruginosa* και εντεροβακτηριακά που παρήγαγαν τύπου IMP μεταλλο-β-λακταμάσες (MBLs) (Senda et al, 1996; Senda et al, 1996).

Έκτοτε διαφορετικοί τύποι MBL έχουν αναφερθεί σε αρκετές χώρες από διάφορες ηπείρους (Rossolini, 2005; Walsh, 2005). Ωστόσο, η κλινική επίπτωση των Gram-αρνητικών παθογόνων που παράγουν καρβαπενεμάσες παρέμεινε, σε γενικές γραμμές, περιορισμένη μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 2000. Τελευταία, ο τομέας της έρευνας γύρω από τις καρβαπενεμάσες έχει βιώσει δραματικές αλλαγές όσον αφορά την ποικιλομορφία των ενζύμων και τα επιδημιολογικά μοντέλα. Η ομάδα των επίκτητων καρβαπενεμασών γίνεται όλο και μεγαλύτερη, συμπεριλαμβάνοντας πολλούς διαφορετικούς τύπους MBL (π.χ. IMP, VIM, SPM, GIM, SIM, KHM, AIM, NDM και DIM) και αλληλομόρφων παραλλαγών τους (Queenan & Bush, 2007; Walsh, 2008; Poirel et al, 2007). Στελέχη που παράγουν μερικά από αυτά τα ένζυμα έχουν εξαπλωθεί με ανησυχητικούς ρυθμούς σε ορισμένες περιοχές, φθάνοντας σε υψηλό επίπεδο ενδημικότητας.

#### 1.2.2.1. Ο τύπος Imipenemase (IMP)

Η πρώτη αναφορά MBL έγινε το 1990 σε στελέχη *P. aeruginosa* από την Ιαπωνία, και ακολουθήθηκε από μια σειρά IMP-1 θετικών εντεροβακτηριακών στα μέσα της δεκαετίας του 1990 (Osano E. et al, 1997). Παρά την πληθώρα διαφορετικών ενζύμων τύπου IMP (27 υπότυποι) που απομονώθηκαν μέχρι σήμερα τότε δεν κυριάρχησαν σε παγκόσμια κλίμακα και η παρουσία τους περιορίστηκε σε σποραδικά κρούσματα (Εικόνα 2). Η IMP-1 εξακολουθεί να παίζει σημαντικό ρόλο στο πρόβλημα της αντοχής στα αντιμικροβιακά στην Ιαπωνία, 20 χρόνια από την ανακάλυψή της (Ode T. et al, 2009). Η IMP-4 επικρατεί στην Κίνα (Chen L. R. et al 2009; Yang Q. et al, 2010) ενώ εντεροβακτηριακά και στελέχη *P. aeruginosa* με IMP-4 έχουν απομονωθεί επίσης στην Μεμβούρνη και το Σύνδνεϋ, κάτι που μπορεί να οφείλεται στο μεταναστευτικό κύμα από χώρες της νοτιοανατολικής Ασίας όπου το ένζυμο φαίνεται να ενδημεί (Espedido B. A. et al, 2008).

Όλα τα MBL γονίδια τύπου IMP βρέθηκαν ενσωματωμένα σε τάξεως 1 ή 3 ιντεγκρόνια, ωστόσο, υπάρχει μεγάλη συζήτηση στο εάν τα ιντεγκρόνια βρίσκονται σε πλασμίδια ή όχι, καθώς δεν υπάρχουν σχετικές πληροφορίες. Σύμφωνα με ορισμένες μελέτες τα ιντεγκρόνια που φέρουν τα γονίδια IMP φαίνεται να πλαισιώνονται από λειτουργικά *Tn21* και *Tn5051* τρανσποζόνια, τα οποία είναι σχεδόν βέβαιο ότι ευθύνονται για την διασπορά τους (Toleman M. A. et al, 2005).

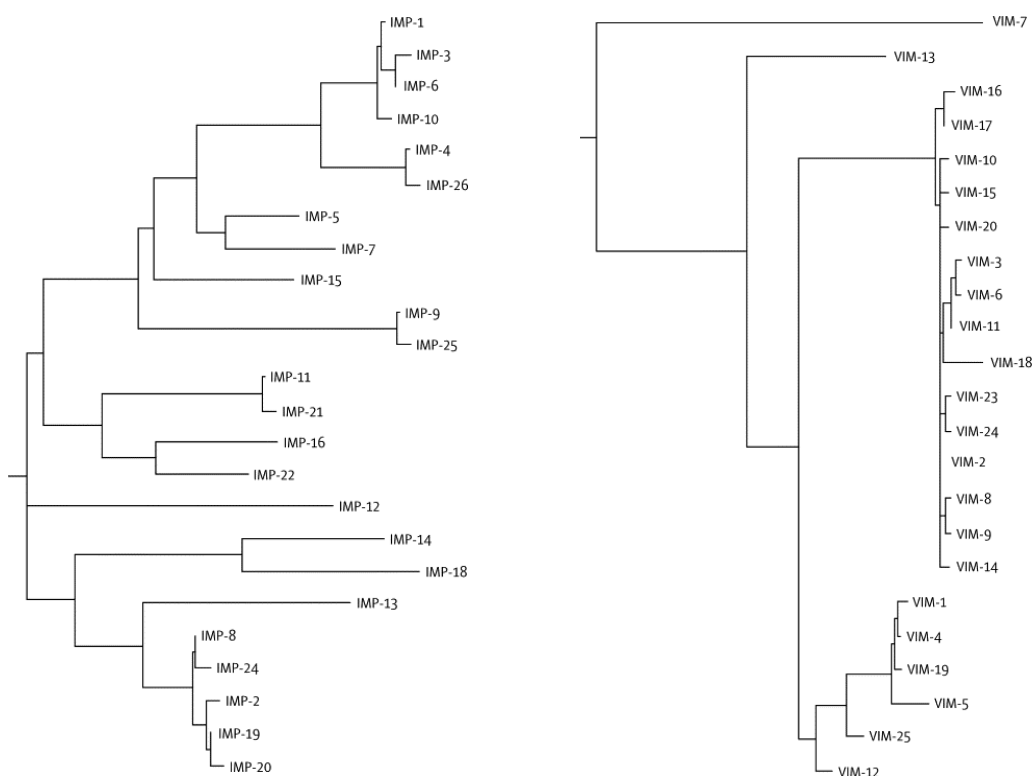
Τα IMP-τύπου ένζυμα παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για τις κεφαλοσπορίνες και τις καρβαπενέμες, αλλά έχουν μικρή δραστικότητα έναντι της τεμοσιλλίνης.

#### 1.2.2.2. Ο τύπος Veronese Imipenemase (VIM)

Τα VIM-τύπου ένζυμα ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά στην Ευρώπη στα τέλη του 1990s (Lauretti et al, 1999). Περισσότερα από 25 διαφορετικά VIM-τύπου ένζυμα είναι γνωστά που χωρίζονται με βάση την ομολογία τους σε τρεις υποομάδες (Εικόνα 2). Όπως και με τα IMP-τύπου ένζυμα, οι VIM έχουν καθορισμένη γεωγραφική κατανομή. Για λόγους που παραμένουν άγνωστοι, οι VIM-1 και VIM-2 έχουν επικρατήσει και τις συναντάμε και στις 5 ηπείρους (Εικόνα 3) (Walsh T. R. et al, 2005). Οι περισσότερες περιπτώσεις λοιμώξεων από VIM-2 αφορούν στελέχη *P. aeruginosa* που συχνά είναι το αίτιο νοσοκομειακών λοιμώξεων όπως πνευμονία του

αναπνευστήρα. Η VIM-2 είναι παρούσα σε στελέχη *P. aeruginosa* σε ασθενείς με κυστική ίνωση, σηματοδοτώντας την ταχεία κλωνική εξάπλωση και προκαλώντας σοβαρούς περιορισμούς στα μακροχρόνια θεραπευτικά σχήματα που απαιτούνται σε αυτούς τους ασθενείς (Cardoso O. et al, 2008).

**Εικόνα 2.** Δενδρόγραμμα



Από την πρώτη ανίχνευση της VIM-1 σε στέλεχος *P. aeruginosa* έχουν σήμερα προκύψει εντεροβακτηριακά στελέχη με VIM (Πίνακας 3) και αποτελούν σημαντικό πρόβλημα σε πολλές περιοχές. Οι VIM τύπου μεταλλο-β-λακταμάσες υδρολύουν τις κεφαλοσπορίνες, τις καρβαπενέμες και την τεμοσιλλίνη. Επιπλέον, τα



VIM-τύπου ένζυμα είναι μοναδικά ανάμεσα στις μεταλλο-β-λακταμάσες, επειδή έχουν την υψηλότερη συγγένεια για τις καρβαπενέμες (Docquier et al, 2003).

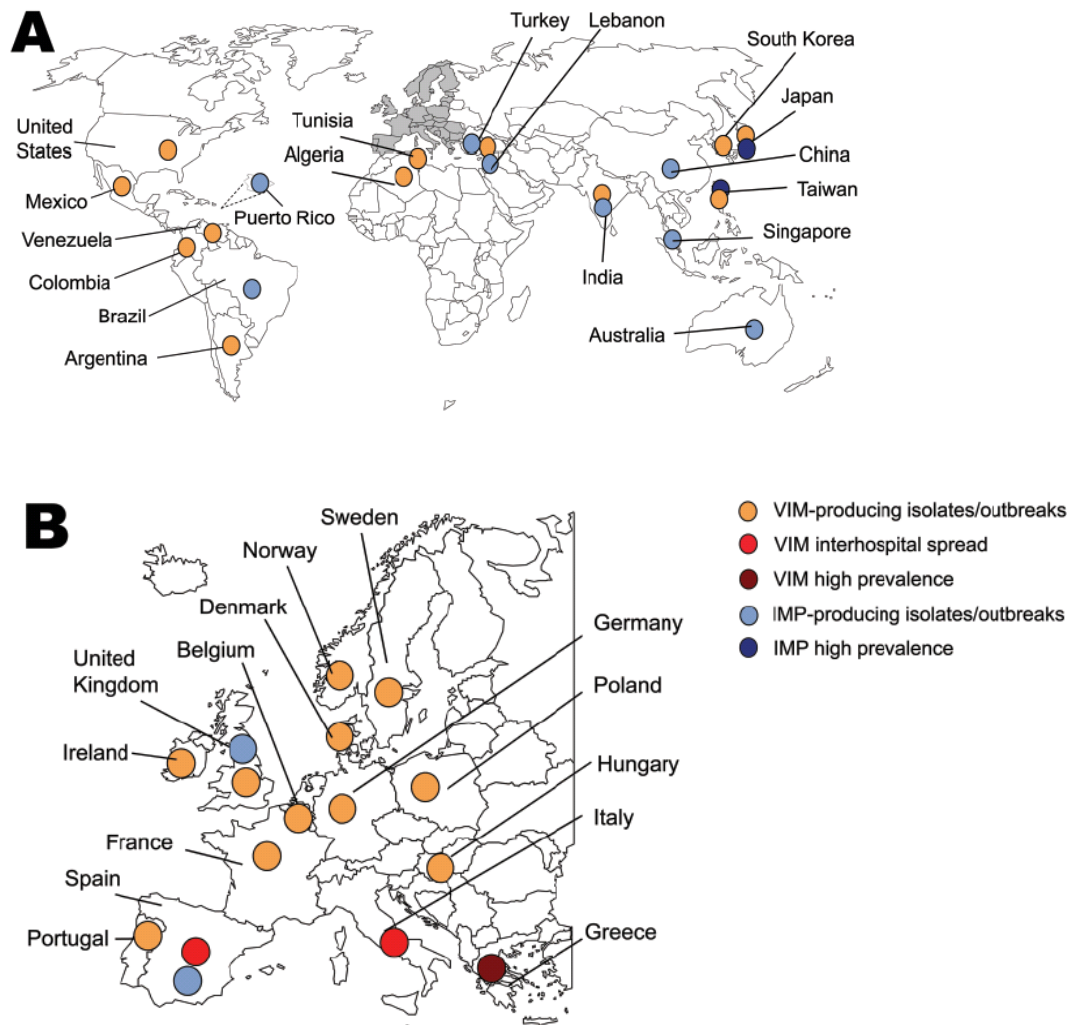
### 1.2.2.3. Ο τύπος New Delhi Metallo (NDM)

Η εμφάνιση αυτής της νέας MBL από την Ινδία και το Πακιστάν είναι ίσως η πιο ανησυχητική εξέλιξη από την εποχή που ο Φλέμινγκ το 1929 ανακάλυψε την πενικιλίνη. Όταν το 2008 ανακαλύφθηκε το γονίδιο *bla*<sub>NDM-1</sub>, λίγοι θα μπορούσαν να προβλέψουν το μέγεθος της εξάπλωσης και τον σημερινό επιπολασμό του (Yong D. et al 2009). Η μη-ορθολογική χρήση των αντιμικροβιακών (ιδιαίτερα στην κοινότητα), το ζεστό κλίμα, η μόλυνση των συστημάτων υδροδότησης και η έλλειψη πολιτικής αντιμετώπισης των νοσοκομειακών λοιμώξεων, αποτελούν παράγοντες που συνέβαλαν για την άνευ προηγουμένου εξάπλωση της NDM-1.

Το πλασμίδιο που φέρει το *bla*<sub>NDM-1</sub> φέρει επίσης γονίδια αντοχής έναντι των μακρολιδών, των αμινογλυκοσιδών, της ριφαμπικίνης, της σουλφομεθοξαζόλης και της αζτρεονάμης (που δεν υδρολύεται από την NDM-1) (Yong D. et al 2009). Αξιοσημείωτο είναι ότι σε αντίθεση με τις KPC και την OXA-48, τα στελέχη που κωδικοποιούν την NDM-1 εμφανίζουν υψηλές ελάχιστες ανασταλτικές πυκνότητες στις καρβαπενέμες.

Η NDM-1 ως επί το πλείστον ανιχνεύεται σε στελέχη *K. pneumoniae*, ωστόσο ανευρίσκεται σε ένα ευρύ φάσμα άλλων εντεροβακτηριακών (*Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* και *Providencia spp*) και πρόσφατα απομονώθηκε σε *A. baumannii*, ενδεικτικό της γενετικής επιδεξιότητας του πλασμιδίου που την φέρει. NDM-1-θετικά στελέχη έχουν πλέον βρεθεί στο Ηνωμένο Βασίλειο, στις ΗΠΑ, στον Καναδά, στην Αυστραλία, στην ηπειρωτική Ευρώπη, στην Ανατολική Ευρώπη, στη Μέση Ανατολή, στην Αφρική και σε πολλές χώρες της Νοτιοανατολικής Ασίας, σαν αποτέλεσμα τόσο της οικονομικής παγκοσμιοποίησης όσο και της γενετικής ευελιξίας του πλασμιδίου (Yong D. et al 2009; MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2010;59:750).

**Εικόνα 3.** Παγκόσμια (A) και Ευρωπαϊκή (B) κατανομή εντεροβακτηριακών στελεχών που παράγουν MBL τύπου VIM και IMP (Nordmann P. et al, 2011).



**Πίνακας 3.** Πρώτη αναφορά επίκτητης μεταλλο-β-λακταμάσης σε διάφορους μικροοργανισμούς. (Cornaglia G et al, 2011)

Microorganism		Microorganism	
<b>IMP-1</b>		(Continued from previous column)	
Japan	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <sup>7</sup>	<b>IMP-22</b>	
Japan	Enterobacteriaceae <sup>8</sup>	Austria	<i>P aeruginosa</i> <sup>29</sup>
Japan	<i>Acinetobacter baumannii</i> <sup>9</sup>	<b>IMP-24</b>	
Japan	<i>Acinetobacter xylosoxidans</i> <sup>10</sup>	Taiwan	Enterobacteriaceae <sup>30</sup>
<b>IMP-2</b>		<b>IMP-25</b>	
Italy	<i>A baumannii</i> <sup>11</sup>	China	<i>P aeruginosa</i> <sup>**</sup>
Japan	<i>P aeruginosa</i> <sup>10</sup>	<b>IMP-26</b>	
<b>IMP-3</b>		Singapore	<i>P aeruginosa</i> <sup>31</sup>
Japan	Enterobacteriaceae <sup>12</sup>	<b>VIM-1</b>	
<b>IMP-4</b>		Italy	<i>P aeruginosa</i> <sup>32</sup>
China	<i>A baumannii</i> <sup>13</sup>	France	Enterobacteriaceae <sup>33</sup>
China	Enterobacteriaceae <sup>14</sup>	Greece	<i>A baumannii</i> <sup>14</sup>
<b>IMP-5</b>		<b>VIM-2</b>	
Portugal	<i>A baumannii</i> <sup>15</sup>	France	<i>P aeruginosa</i> <sup>35</sup>
<b>IMP-6</b>		Korea	<i>A baumannii</i> <sup>36</sup>
Japan	Enterobacteriaceae <sup>16</sup>	Taiwan	Enterobacteriaceae <sup>37</sup>
Japan	<i>P aeruginosa</i> <sup>*</sup>	Greece	<i>A xylosoxidans</i> <sup>38</sup>
<b>IMP-7</b>		<b>VIM-3</b>	
Canada	<i>P aeruginosa</i> <sup>17</sup>	Taiwan	<i>P aeruginosa</i> <sup>39</sup>
<b>IMP-8</b>		Taiwan	<i>A baumannii</i> <sup>40</sup>
Taiwan	Enterobacteriaceae <sup>18</sup>	Taiwan	Enterobacteriaceae <sup>39</sup>
China	<i>A baumannii</i> <sup>19</sup>	<b>VIM-4</b>	
Portugal	<i>Pseudomonas mendocina</i> <sup>20</sup>	Greece	<i>P aeruginosa</i> <sup>40</sup>
<b>IMP-9</b>		Italy	Enterobacteriaceae <sup>41</sup>
China	<i>P aeruginosa</i> <sup>21</sup>	Hungary	<i>Aeromonas hydrophila</i> <sup>42</sup>
<b>IMP-10</b>		Greece	<i>A baumannii</i> <sup>43</sup>
Japan	<i>P aeruginosa</i> <sup>22</sup>	<b>VIM-5</b>	
Japan	<i>A xylosoxidans</i> <sup>22</sup>	Turkey	Enterobacteriaceae <sup>44</sup>
Japan	<i>A baumannii</i> <sup>†</sup>	Turkey	<i>P aeruginosa</i> <sup>45</sup>
<b>IMP-11</b>		<b>VIM-6</b>	
Japan	Enterobacteriaceae <sup>9</sup>	Singapore	<i>P putida</i> <sup>46</sup>
Japan	<i>P aeruginosa</i> <sup>‡</sup>	<b>VIM-7</b>	
<b>IMP-12</b>		USA	<i>P aeruginosa</i> <sup>47</sup>
Italy	<i>Pseudomonas putida</i> <sup>23</sup>	<b>VIM-8</b>	
<b>IMP-13</b>		Colombia	<i>P aeruginosa</i> <sup>48</sup>
Italy	<i>P aeruginosa</i> <sup>24</sup>	<b>VIM-9</b>	
<b>IMP-14</b>		UK	<i>P aeruginosa</i> <sup>49</sup>
Thailand	<i>P aeruginosa</i> <sup>§</sup>	<b>VIM-10</b>	
<b>IMP-15</b>		UK	<i>P aeruginosa</i> <sup>49</sup>
Mexico	<i>P aeruginosa</i> <sup>25</sup>	<b>VIM-11</b>	
<b>IMP-16</b>		Argentina	<i>P aeruginosa</i> <sup>50</sup>
Brazil	<i>P aeruginosa</i> <sup>26</sup>	Taiwan	<i>A baumannii</i> <sup>51</sup>
<b>IMP-18</b>		Taiwan	Enterobacteriaceae <sup>51</sup>
USA	<i>P aeruginosa</i> <sup>27</sup>	<b>VIM-12</b>	
<b>IMP-19</b>		Greece	Enterobacteriaceae <sup>52</sup>
France	<i>Aeromonas caviae</i> <sup>28</sup>	<b>VIM-13</b>	
<b>IMP-20</b>		Spain	<i>P aeruginosa</i> <sup>53</sup>
Japan	<i>P aeruginosa</i> <sup>¶</sup>	<b>VIM-14</b>	
<b>IMP-21</b>		Italy	<i>P aeruginosa</i> <sup>54</sup>
Japan	<i>P aeruginosa</i> <sup>  </sup>	<b>VIM-15</b>	
(Continues in next column)		Bulgaria	<i>P aeruginosa</i> <sup>55</sup>
		(Continues on next page)	

<b>Microorganism</b>	
(Continued from previous page)	
<b>VIM-16</b>	
Germany	<i>P aeruginosa</i> <sup>55</sup>
<b>VIM-17</b>	
Greece	<i>P aeruginosa</i> <sup>56</sup>
<b>VIM-18</b>	
India	<i>P aeruginosa</i> <sup>57</sup>
<b>VIM-19</b>	
Algeria	Enterobacteriaceae <sup>58</sup>
<b>VIM-20</b>	
Spain	<i>P aeruginosa</i> ††
<b>VIM-23</b>	
Mexico	Enterobacteriaceae‡‡
<b>VIM-24</b>	
Colombia	Enterobacteriaceae§§
<b>VIM-25</b>	
India	Enterobacteriaceae¶¶
<b>SPM-1</b>	
Brazil	<i>P aeruginosa</i> <sup>59</sup>
<b>GIM-1</b>	
Germany	<i>P aeruginosa</i> <sup>60</sup>
Germany	Enterobacteriaceae <sup>61</sup>
<b>SIM-1</b>	
Korea	<i>A baumannii</i> <sup>62</sup>
India	Enterobacteriaceae <sup>63</sup>
<b>AIM-1</b>	
Australia	<i>P aeruginosa</i> <sup>64</sup>
<b>KHM-1</b>	
Japan	Enterobacteriaceae <sup>65</sup>
<b>NDM-1</b>	
India	Enterobacteriaceae <sup>66</sup>
India	<i>A baumannii</i> <sup>67</sup>
<b>DIM-1</b>	
Netherlands	<i>Pseudomonas stutzeri</i> <sup>68</sup>

Οι περισσότερες περιπτώσεις NDM-1-θετικών στελεχών αφορούν ασθενείς που έχουν επισκεφθεί την Ινδία, ωστόσο, ιδιαίτερα ανησυχητικό είναι ότι πολλές από αυτές τις περιπτώσεις είναι από ασθενείς που επέλεξαν την μετακίνηση στο εξωτερικό για να έχουν φθηνές υπηρεσίες υγείας (κυρίως διορθωτικές χειρουργικές επεμβάσεις) (MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2010;59:750). Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η NDM-1 είναι η νέα CTX-M-15 και πολύ σύντομα θα επικρατήσει σε παγκόσμια κλίμακα. Με βάση τα πρόσφατα δεδομένα η NDM-1 είναι πιθανό να σφετεριστεί την εκπληκτική επιτυχία της CTX-M-15 με ακόμα χειρότερες συνέπειες καθώς το πλασμίδιο που μεταφέρει την NDM-1 μεταφέρει σημαντικά περισσότερα γονίδια αντοχής στα αντιμικροβιακά (Yong D. et al 2009).

### 1.2.3. Γεωγραφική κατανομή MBLs

#### 1.2.3.1. Ασία

Η πρώτη μεταλλο-β-λακταμάση που ανιχνεύθηκε ήταν η IMP-1 σε στελέχη *P. aeruginosa* και *Serratia marcescens* από την Ιαπωνία (Watanabe M. et al, 1991; Osano E. et al, 1994). Ακολούθησαν αναφορές από διάφορα κέντρα για παρουσία IMP-1 και σε άλλα εντεροβακτηριακά, *P. aeruginosa*, και άλλα μη-ζυμώντα βακτήρια (Jones R.N. et al, 2004; Shibata N. et al, 2003; Garza-Ramos U. et al, 2008). Η IMP-2 βρέθηκε σε *Acinetobacter spp* (Fukigai S. et al, 2007) και η IMP-7 σε *P. aeruginosa* (Kouda S. et al, 2007). Παραλλαγές των IMP που ανακαλύφθηκαν πρόσφατα ήταν η IMP-3 (Iyobe S. et al, 2000), η IMP-6 (Yano H. et al, 2001), η IMP-10 (GenBank αριθμός καταχώρησης AB074436) (Iyobe S. et al, 2002), και η IMP-11 (αριθμός καταχώρησης GenBank AB074437) (Jones R.N. et al, 2004). Τα ένζυμα τύπου VIM ταυτοποιήθηκαν αργότερα και η εξάπλωση τους είναι σαφώς μικρότερης κλίμακας. Μια νέα μεταλλο-β-λακταμάση, η KHM-1, βρέθηκε σε στέλεχος *C. freundii* (Sekiguchi J. et al, 2008).

Η VIM-2 ήταν η πρώτη μεταλλο-β-λακταμάση που βρέθηκε στην Κορέα, και γρήγορα μεταδόθηκε σε στελέχη *Pseudomonas spp* (Walsh T.R. et al, 2005), εντεροβακτηριακά (Walsh T.R. et al, 2005) και *Acinetobacter spp* (Yum J.H. et al, 2002). Ένα νέο γονίδιο, το *bla<sub>SIM-1</sub>*, βρέθηκε σε στελέχη *A. baumannii* (Lee K. et al, 2005) και διαπιστώθηκε επίσης συνύπαρξη του με *bla<sub>IMP-1</sub>* και *bla<sub>VIM-2</sub>* (Shibata N. et al, 2003; Lee K. et al, 2010). Είδη *Acinetobacter* και *P. aeruginosa* που εκφράζουν

ένζυμα τύπου IMP (IMP-1 και στα δύο ενώ IMP-6 στην τελευταία) έχουν κάνει την εμφάνισή τους σε ολόκληρη την χώρα (Nho S.O. et al, 2008; Ryou N.H. et al, 2009).

Η πρώτη μεταλλο-β-λακταμάση που αναφέρθηκε από την Κίνα είναι η IMP-4, που βρέθηκε σε στέλεχος *Citrobacter youngae* (Hawkey P.M. et al, 2001), σε τέσσερα μη-σχετιζόμενα στελέχη *Acinetobacter spp*, και στη συνέχεια σε *Klebsiella spp* (Chu Y.W. et al, 2001; Mendes R.E. et al, 2008). Η IMP-1 έχει αναφερθεί σε *P. aeruginosa* (Cheng X. et al, 2008) και στελέχη *Enterobacter* (Chen L.R. et al, 2009), ενώ η IMP-8 και η IMP-9 έχουν αναφερθεί σε *Acinetobacter spp* (Wang H. Et al, 2007) και *P. aeruginosa*, αντίστοιχα (Xiong J. et al, 2006). Η VIM-2 είναι η μόνη τύπου VIM μεταλλο-β-λακταμάση που έχει αναφερθεί σε στελέχη *P. aeruginosa* από διαφορετικά νοσοκομεία της Κίνας (Wang C. et al, 2006).

Οι IMP-1, VIM-2, και η παραλλαγή της VIM-3, βρέθηκαν όλες σε *Pseudomonas spp* στην πρώτη καταγραφή μεταλλο-β-λακταμασών στην Ταϊβάν (Yan J.J. et al, 2001). Οι VIM-2 και VIM-3 επίσης αναφέρθηκαν σε άλλα μη-ζυμώντα στελέχη, όπως VIM-3 σε *E. cloacae* (Lee M.F. et al, 2008). VIM-11 έχει βρεθεί σε εντεροβακτηριακά και μη-ζυμώντα (Lin Y.C. et al, 2010). Η IMP-1 έχει επανειλημμένα αναφερθεί σε κλινικά σημαντικά στελέχη *Acinetobacter spp* (Chiu C.H. et al, 2010). Η παραλλαγή της IMP-2, η IMP-8, έχει βρεθεί σε πολλά στελέχη εντεροβακτηριακών (Yan J.J. et al, 2010; Yan J.J. et al, 2002) και σε ένα στέλεχος *A. baumannii* (Lee M.F. et al, 2008). Η IMP-24 έχει περιγραφεί σε *S. marcescens* (Lee M.F. et al, 2008).

Η NDM-1 ανευρίσκεται πλέον ευρέως σε εντεροβακτηριακά από διάφορα κέντρα στην Ινδία, το Πακιστάν και το Μπαγκλαντές. Το ένζυμο έχει επίσης αναφερθεί σε *A. baumannii* (Rolain J.M. et al, 2010; Kumarasamy K. et al, 2010 a; Kumarasamy K. et al, 2010 b). Διάφοροι τύποι VIM (VIM-2, VIM-5, VIM-6, VIM-11, και η νέα VIM-18) είναι ιδιαίτερα διαδεδομένοι σε *Pseudomonas spp* (Castanheira M. et al, 2009). Η IMP φαίνεται να είναι η πιο κοινή μεταλλο-β-λακταμάση σε εντεροβακτηριακά και σε *A.baumannii* (Azim A. et al, 2010). Πρόσφατη μελέτη διαπίστωσε στελέχη *K. pneumoniae* και *Enterobacter aerogenes* που έφεραν το γονίδιο *bla<sub>SIM-1</sub>* να φέρουν επίσης είτε *bla<sub>IMP</sub>*, ή *bla<sub>VIM-1</sub>* (Dwivedi M. et al, 2009). Στη Μαλαισία, IMP-7 (Walsh T.R. et al, 2005) και IMP-4 (Hwa W.E. et al, 2009) βρέθηκαν σε *P. aeruginosa* και *A. baumannii*, αντίστοιχα. Κλινικά στελέχη

που συλλέχθηκαν τυχαία βρέθηκαν στη συνέχεια να εκφράζουν VIM-2 και VIM-11 (Khosravi Y. et al, 2010).

Στην Σιγκαπούρη, IMP-1 και VIM-6 έχουν βρεθεί σε *Pseudomonas fluorescens* και *Pseudomonas putida*, αντίστοιχα (Koh T.H. et al, 2004). Διάφορες μεταλλο-β-λακταμάσες (IMP-1, IMP-7, VIM-2, VIM-6, και IMP-26) βρέθηκαν σε *P. aeruginosa* (Walsh T.R. et al, 2005; Koh T.H. et al, 2010). Η IMP-4 έχει βρεθεί σε *A.baumannii* (Koh T.H. et al, 2007). Στη Μέση Ανατολή, *bla<sub>VIM</sub>* γονίδια εντοπίστηκαν σε *P. aeruginosa* που απομονώθηκαν από τη Σαουδική Αραβία (Al-Agamy M.H. et al, 2009) και το Ιραν (Khosravi A.D. et al, 2008). Η IMP-1 βρέθηκε στη Βηρυτό του Λιβάνου (Daoud Z. et al, 2008), και η NDM-1 έχει αναφερθεί σε στελέχη από το Ομάν (Poirel L. et al, 2010).

#### 1.2.3.2. Ευρώπη

Η Ιταλία ήταν η πρώτη ευρωπαϊκή χώρα που ανιχνεύθηκαν επίκτητες μεταλλο-β-λακταμάσες, και συγκεκριμένα η IMP-2 και η VIM-1 (Chu Y.W. et al, 2001; Cornaglia G. et al, 1999). Οι IMP-12 (Docquier J.D. et al, 2003), IMP-13 (Pagani L. et al, 2005) και VIM-14 (Mazzariol A. et al, 2010) απομονώθηκαν πρώτη φορά στην Ιταλία. Μικρές και μεγάλες εστίες έχουν έκτοτε αναφερθεί σε διάφορες περιοχές της χώρας, με τις VIM-1, VIM-2, και IMP-13 να είναι τα ένζυμα που επικρατούν (Cornaglia G. et al, 2007). Έχουν αναφερθεί επίσης περιπτώσεις *E.coli* που παράγουν NDM-1 (Struelens M.J. et al, 2010).

Τα τύπου VIM ένζυμα κυριαρχούν στην Ελλάδα, όπου VIM-1, VIM-2, και VIM-4 εξαπλώθηκαν ταχύτατα σε εντεροβακτηριακά (Miriagou V. et al, 2010), *P.aeruginosa* (Walsh T.R. et al, 2005; Pournaras S. et al, 2002) και άλλους μη ζυμώντες οργανισμούς (Tsakris A. et al, 2006; Sofianou D. Et al, 2005; Figueiredo S. et al, 2008). Έχουν επίσης αναφερθεί VIM-19 (Pournaras S. et al, 2010), VIM-12 (Pournaras S. et al, 2005), και VIM-17 (Siarkou V.I. et al, 2009).

Η VIM-5 αναφέρθηκε πρώτη φορά στην Τουρκία σε *P.aeruginosa* (Bahar G. et al, 2004) και σε εντεροβακτηριακά (Midilli K. et al, 2003). Στην Τουρκία, η VIM-1 ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά σε *K. pneumoniae* (Yildirim I. et al, 2007), και η VIM-2 σε *P. aeruginosa* (Yakupogullari Y. et al, 2008). Η IMP-1 έχει ανιχνευθεί σε *E.cloacae* και σε *P.aeruginosa* (Ozgumus O.B. et al, 2007).

Η πρώτη μεταλλο-β-λακταμάση που βρέθηκε στη Γαλλία ήταν η VIM-2 σε *P.aeruginosa*, η οποία απομονώθηκε στη Μασσαλία (Poirel L. et al, 2000). Το πρώτο τύπου IMP ένζυμο που ανιχνεύτηκε ήταν η νέα IMP-19, η οποία ήταν επίσης το πρώτο τύπου IMP ένζυμο σε στέλεχος *Aeromonas caviae* (Neuwirth C. et al, 2007). Η VIM-1 ήταν η πρώτη μεταλλο-β-λακταμάση που ανιχνεύθηκε σε *K.pneumoniae* (Lartigue M.F. et al, 2004), ενώ η IMP-1 επικράτησε σε στελέχη *E.aerogenes* (Biendo M. et al, 2008). Σε μελέτη εθνικής κλίμακας, από συλλογή στελεχών *P.aeruginosa*, βρέθηκαν μόνο τρεις VIM-2 και μια IMP-18, κάτι που δείχνει ότι ο επιπολασμός των μεταλλο-β-λακταμασών εξακολουθεί να είναι χαμηλός (Hocquet D. et al, 2010). Η NDM-1 και η VIM-4 έχουν εντοπιστεί σε στελέχη *C. freundii* από ασθενή που επέστρεψε από την Ινδία (Poirel L. et al, 2010).

Η πρώτη επίκτητη μεταλλο-β-λακταμάση που αναφέρθηκε από το Ηνωμένο Βασίλειο, πιθανότατα ένα παράγωγο της *bla<sub>IMP</sub>*, περιγράφηκε σε ένα εισαγόμενο από άλλη χώρα στέλεχος *A.baumannii* (Walsh T.R. et al, 2005). Στα πλαίσια προγράμματος επιτήρησης υπό την αιγίδα της Βρετανικής Εταιρείας Αντιμικροβιακής Χημειοθεραπείας ανιχνεύθηκε στέλεχος *P.aeruginosa* που έφερε το *bla<sub>VIM-2</sub>* (Miriagou V. et al, 2010). Δύο νέα ένζυμα, η VIM-9 και η VIM-10, βρέθηκαν σε στελέχη που προωθήθηκαν για περαιτέρω έλεγχο στο εθνικό εργαστήριο αναφοράς (Woodford N. et al, 2008). 37 στελέχη *E.coli* και *K.pneumoniae*, τα οποία ελέγχθηκαν στο ίδιο εργαστήριο αποδείχθηκαν θετικά για NDM-1. Σε όλες τις περιπτώσεις τα στελέχη προέρχονταν από ασθενείς που είτε ταξίδεψαν πρόσφατα σε Ινδία ή Πακιστάν, είτε συνδέονται με άλλο τρόπο με τις χώρες αυτές (Kumarasamy K.K. et al, 2010b). Έχουν αναφερθεί επίσης λοιμώξεις από στελέχη *A. baumannii* που παράγουν NDM-1 (Kumarasamy K.K. et al, 2010a). Αν και τα τύπου VIM ένζυμα γρήγορα εξαπλώθηκαν και στην Ισπανία (Pena C. et al, 2007), στα ισπανικά νοσοκομεία ο συνολικός επιπολασμός των στελεχών που παράγουν μεταλλο-β-λακταμάσες παραμένει σε χαμηλά επίπεδα. Δύο νέα ένζυμα τύπου VIM, τα VIM-13 (Juan C. et al, 2008) και VIM-20 (GeneBank ACV13198), έχουν περιγραφεί σε *P.aeruginosa*, και επίσης ανιχνεύθηκε το πρώτο στέλεχος *K.pneumoniae* που παράγει NDM-1 (Struelens M.J. et al, 2010).

Η IMP-5 σε στέλεχος *A.baumannii*, ήταν η πρώτη μεταλλο-β-λακταμάση που ανιχνεύθηκε στην Πορτογαλία (Da Silva G.J. et al, 2002). Η μόνη άλλη αναφορά γονιδίου *bla<sub>IMP</sub>* έγινε με την IMP-8 σε στέλεχος *Pseudomonas mendocina* (Santos C.



et al, 2010). Το 1995 απομονώθηκαν πολλά VIM-2 θετικά στελέχη *P.aeruginosa* (Walsh T.R. et al, 2005). Πολυανθεκτικές *P.aeruginosa* που παράγουν VIM-2 έχουν αναφερθεί στο Βέλγιο (Deplano A. et al, 2007). Εκεί περιγράφηκε πρόσφατα και η πρώτη θανατηφόρα έκβαση λοίμωξης από στέλεχος που παρήγαγε NDM-1 και αφορούσε ασθενή που στο παρελθόν είχε νοσηλευτεί στο Πακιστάν (Struelens M.J. et al, 2010). Μια δεύτερη περίπτωση εντεροβακτηριακού που παρήγαγε NDM-1 βρέθηκε σε ασθενή που νοσηλεύθηκε στο παρελθόν στο Μαυροβούνιο (Bogaerts P. et al, 2010).

Στις Κάτω Χώρες, μια νέα μεταλλο-β-λακταμάση, η DIM-1 βρέθηκε το 2009 σε ένα στέλεχος *Pseudomonas stutzeri* (Poirel L. et al, 2010 b). Έχει περιγραφεί επίσης η περίπτωση δύο ασθενών που είχαν ταξιδέψει στην Ινδία και είχαν αποικιστεί με δύο διαφορετικά στελέχη *K.pneumoniae* που παρήγαγαν NDM-1 (Leverstein-van Hall M.A. et al, 2010).

Στελέχη *P.aeruginosa* που παράγουν μεταλλο-β-λακταμάσες απομονώνονται όλο και περισσότερο συχνά στη Νορβηγία και τη Σουηδία, και τις περισσότερες φορές εισάγονται από άλλες χώρες. Συνήθως πρόκειται για ένζυμα τύπου VIM (δηλαδή VIM-2 και VIM-4), αλλά και IMP-14 (Samuelsen O. et al, 2010; Samuelsen O. et al, 2009). Η NDM-1 ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά σε έναν ασθενή που είχε επιστρέψει στη Σουηδία μετά την εισαγωγή του σε νοσοκομείο στο Νέο Δελχί (Yong D. et al, 2009) και έκτοτε έχει βρεθεί στη Νορβηγία (και πάλι σε ασθενείς που νοσηλεύονταν στην Ινδία) (Hammerun A.M. et al, 2010) και στη Δανία σε έναν ασθενή ο οποίος μεταφέρθηκε από ένα νοσοκομείο της Βοσνίας – Ερζεγοβίνης (Samuelsen O. et al, 2011).

Στη Γερμανία, η VIM-1 έχει ανιχνευθεί σε στελέχη *P.aeruginosa* (Valenza G. et al., 2010) και σε εντεροβακτηριακά (Weile J. et al, 2007). Η VIM-2 έχει επανειλημμένα ανιχνευθεί σε *P.aeruginosa* (Valenza G. et al, 2010), ενώ ένα στέλεχος που απομονώθηκε στα ούρα ασθενή από το Μόναχο, βρέθηκε να παράγει την νέα παραλλαγή της VIM-2, την VIM-16 (Schneider I. et al, 2008). Η GIM-1 βρέθηκε σε πέντε στελέχη *P.aeruginosa* από πέντε διαφορετικούς ασθενείς στο Ντίσελντορφ (Castanheira M. et al, 2004) και γενικότερα αναφέρεται υψηλός επιπολασμός του ενζύμου σε στελέχη *Pseudomonas spp* και σε εντεροβακτηριακά από την ίδια πόλη. Πρόσφατα έχουν αναφερθεί λοιμώξεις από εντεροβακτηριακά και *A.baumannii* που παράγουν NDM-1 (Struelens M.J. et al, 2010). Διάφοροι τύποι

μεταλλο-β-λακταμασών (IMP-13, IMP-22, και VIM-2) που παράγονται από στελέχη *P.aeruginosa*, και εντεροβακτηριακά με παραγωγή NDM-1 έχουν αναφερθεί από Αυστρία (Duljasz W. Et al, 2009; Struelens M.J. et al, 2010).

Η πρώτη μεταλλο-β-λακταμάση που απομονώθηκε στην Πολωνία ήταν η VIM-2 σε στέλεχος *P.aeruginosa* (Walsh T.R. et al, 2005), και έκτοτε έχει αναφερθεί από πολλά διαφορετικά κέντρα (Cornaglia G. et al, 2007). Η VIM-4 έγινε ενδημική σε στελέχη *P.aeruginosa* που προκάλεσαν λοιμώξεις σε παιδιά σε χειρουργικές πτέρυγες στην Poland (Walsh T.R. et al, 2005). Η IMP-7 έχει βρεθεί σε δύο στελέχη *P.aeruginosa* (Hrabák J. et al, 2011). Έχει αναφερθεί εξάπλωση στελεχών *A.baumannii* με ένζυμο τύπου VIM, καθώς και *K.pneumoniae* με παραγωγή μιας αταυτοποίητης μεταλλο-β-λακταμάσης (Wroblewska M.M. et al, 2007; Sekowska A. et al, 2010). Ο πρώτος τύπος μεταλλο-β-λακταμάσης που αναφέρθηκε από την Ουγγαρία ήταν μια VIM-4 (Libisch B. et al, 2004) που στην συνέχεια ανιχνεύθηκε σε ένα στέλεχος *A.hydrophila* (Libisch B. et al, 2008) και σε στελέχη *Klebsiella spp* (Kristóf K. et al, 2010). Έχουν περιγραφεί στελέχη *P.aeruginosa* που παράγουν είτε VIM-1 (Giske C.G. et al, 2006) ή VIM-2 (Miriagou V. et al, 2010). Στελέχη *P.aeruginosa* που παράγουν IMP-7 έχουν αναφερθεί από τη Σλοβακία (Ohlasova D. et al, 2007) και από την Τσεχία (Hrabák J. et al, 2009). Στα Βαλκάνια, η VIM-2 έχει βρεθεί σε στελέχη *P.aeruginosa* από τη Σερβία (Lepsanovic Z. et al, 2008) και την Κροατία (Bosnjak Z. et al, 2010) και η VIM-15, μια παραλλαγή της VIM-2, έχει απομονωθεί από *P.aeruginosa* στη Βουλγαρία (Schneider I. et al, 2008).

Αναφορές για ασθενείς με NDM-1 που είτε έχουν νοσηλευθεί ή ταξιδέψει σε περιοχές όπως το Μαυροβούνιο και η Βοσνία-Ερζεγοβίνη, υποδεικνύουν ως πιθανή δεύτερη περιοχή ενδημικότητας, εκτός της ινδικής χερσονήσου, τα Βαλκάνια. Το *bla*<sub>VIM-2</sub> γονίδιο έχει ταυτοποιηθεί σε στέλεχος *P.aeruginosa* από την Ρωσία (Toleman M.A. et al, 2007). 11 στελέχη *P.aeruginosa*, τα οποία είχαν γενετικούς καθοριστικούς παράγοντες της ομάδας VIM, απομονώθηκαν σε χειρουργική πτέρυγα στην Μόσχα (Krapivina I.V. et al, 2007).

### 1.2.3.3. Λοιπός κόσμος

Στη Βραζιλία, η SPM-1 είναι ο κύρια μεταλλο-β-λακταμάση, ωστόσο συναντάμε επίσης στελέχη που φέρουν και άλλα μεταλλοένζυμα όπως η IMP-1 (σε εντεροβακτηριακά (Lincoran N. et al, 2005) και Gram-αρνητικά μη-ζυμώντα (Picão

R.C. et al, 2009)), η IMP-16, και η VIM-2 (και οι δύο σε *P.aeruginosa*) ( Mendes R.E. et al, 2004). Η SPM-1 ανακαλύφθηκε πρώτα σε ένα στέλεχος *P.aeruginosa* στο Σάο Πάολο (Toleman M.A. et al, 2002) και στη συνέχεια εξαπλώθηκε σε όλη τη χώρα. Η μόνη περίπτωση απομόνωσης μικροβίου με SPM-1 αναφέρθηκε σε ασθενή στην Ελβετία που είχε λάβει πρωτοβάθμια ιατρική φροντίδα στη Ρεσίφε της Βραζιλίας (Salabi A.E. et al, 2010).

Αναφορές από το υπόλοιπο της Νότιας Αμερικής είναι εκπληκτικά σπάνιες παρά τα υψηλά ποσοστά της αντίστασης καρβαπενέμες σε ολόκληρη την ήπειρο. Οι IMP-1 (σε *Acinetobacter spp*), IMP-13, και VIM-11 (και οι δύο σε *P.aeruginosa*) έχουν βρεθεί σε στελέχη στην Αργεντινή (Pasteran F. et al, 2005; Jones R.N. et al, 2005; Santella G. et al, 2010). Η VIM-2 έχει ανιχνευθεί στη Χιλή (*P.fluorescens*) και τη Βενεζουέλα (*P.aeruginosa*) (Jones R.N. et al, 2005). Κρούσματα από ανθεκτική στις καρβαπενέμες *P.aeruginosa* στο Κάλι της Κολομβίας οδήγησαν στην πρώτη αναφορά της VIM-8, ενώ και η VIM-2 ανιχνεύεται σε *P.aeruginosa* από διάφορες πόλεις της χώρας (Villegas M.V. et al, 2006). Οι μεταλλο-β-λακταμάσες είναι σπάνιες στις ΗΠΑ. Η πρώτη αναφορά αφορούσε στην VIM-7, μια φυλογενετικά ξεχωριστή παραλλαγή (Εικόνα 1) που εντοπίστηκε στο Τέξας σε στέλεχος *P.aeruginosa* (Toleman M.A. et al, 2004). Η πρώτη νοσοκομειακή εστία από VIM-2, καθώς και η πρώτη εμφάνιση μεταλλοενζύμου τύπου IMP στις ΗΠΑ, η IMP-18, αναφέρθηκαν σε στελέχη *P.aeruginosa* (Hanson N.D. et al, 2006). Στις αρχές του 2010, η NDM-1 (Centers for Disease Control and Prevention-CDC, 2010) και η VIM-1 (Lee M.F. et al, 2008) ανιχνεύθηκαν σε εντεροβακτηριακά.

Στον Καναδά, η πρώτη μεταλλο-β-λακταμάση που αναφέρθηκε ήταν η IMP-7, ένα νέο ένζυμο που βρέθηκε σε *P.aeruginosa* (Gibb A.P. et al, 2002). Ωστόσο, από τα ανθεκτικά στην ιμιπενέμη στελέχη *P.aeruginosa* που απομονώθηκαν στην Υγειονομική Περιφέρεια του Κάλγκαρι από το 2002 έως το 2004, το 43% παρήγαγε VIM-2, και μόνο το 2% παρήγαγε IMP-7 (Laupland K.B. et al, 2005; Pitout J.D. et al, 2005). Σε ασθενή που είχε πρόσφατα ταξιδέψει στην Ινδία απομονώθηκε στέλεχος *E. coli* που παρήγαγε NDM-1 (Mulvey M.R. et al, 2011). Οι IMP-15 (Garza-Ramos U. et al, 2008a) και IMP-18 (Garza-Ramos U. et al, 2008b) απομονώθηκαν σε κλινικά στελέχη από διαφορετικά ιδρύματα στο Μεξικό. Αναφέρθηκαν επίσης στελέχη *P.aeruginosa* στο ίδιο νοσοκομείο που παρήγαγαν είτε IMP-15 ή VIM-2 (Quinones-

Falconi F. et al, 2010). Η VIM-2 έχει επίσης βρεθεί σε δύο στελέχη *E. cloacae*, και σε ένα *Klebsiella oxytoca* (Morfin-Otero R. et al, 2009).

Η πρώτη και η πιο ευρέως διαδεδομένη μεταλλο-β-λακταμάση από την Αυστραλία είναι η IMP-4, η οποία εντοπίστηκε σε στέλεχη *P. aeruginosa* (Walsh T.R. et al, 2005) και εντεροβακτηριακά (Walsh T.R. et al, 2005; Cornaglia G. et al, 2007). Έχει επίσης ανιχνευθεί και η VIM-4 (Peleg A.Y. et al, 2006). Βρέθηκε η AIM-1 σε *P. aeruginosa* (Yong D. et al, 2007; Toleman M.A. et al, 2010) καθώς και η NDM-1 σε *E. coli* (Poirel L. et al, 2010c). Από την Τυνησία έχουν αναφερθεί η VIM-2 (σε *P. aeruginosa*) (Mansour W. et al, 2009) και η VIM-4 (σε *K. pneumoniae*) (Ktari S. et al, 2006). Μεταλλο-β-λακταμάσες έχουν ανιχνευθεί σε *A. baumannii*, αλλά ο τύπος του ενζύμου δεν έχει ταυτοποιηθεί (Othman A. et al, 2007). Πέντε διαφορετικά στελέχη εντεροβακτηριακών που απομονώθηκαν στο Αλγέρι της Αλγερίας, έφεραν μια νέα μεταλλο-β-λακταμάση, η οποία ονομάστηκε VIM-19, διαφέροντας από τη VIM-4 σε ένα μόνο αμινοξύ. Αυτό το εύρημα επιβεβαίωσε την εμφάνιση των VIM-4-like ενζύμων στα εντεροβακτηριακά από τις χώρες της Μεσογείου (Robin F. et al, 2010). Μια *P. aeruginosa* που παρήγαγε VIM-2 απομονώθηκε σε τουρίστα από την Ουγγαρία που αρχικά είχε νοσηλευθεί σε νοσοκομείο της Αιγύπτου (Szabó D. et al, 2008). Ομοίως, στέλεχος *P. aeruginosa* που έφερε VIM-2 απομονώθηκε σε ασθενή ο οποίος μεταφέρθηκε σε νοσοκομείο στη Νορβηγία μετά από παρατεταμένη νοσηλεία στη Γκάνα (Samuelsen O. et al, 2009). Τρεις κλωνικά σχετιζόμενες *P. aeruginosa* που παρήγαγαν VIM-2 προκάλεσαν ενδονοσοκομειακή επιδημία στην Κένυα. Στην ίδια χώρα καταγράφηκαν και τα πρώτα NDM-1 θετικά στελέχη της Αφρικής (Poirel L. et al, 2011).

### 1.3 Μηχανισμός υδρόλυσης των MBL

Τόσο οι MBLs όσο και οι β-λακταμάσες τύπου σερίνης επάγουν αντοχή στις β-λακτάμες διασπώντας το δεσμό αμιδίου του β-λακταμικού δακτυλίου. Ωστόσο ο τρόπος με τον οποίο οι δύο ομάδες ενζύμων το επιτυγχάνουν διαφέρει σημαντικά (Frere J. M. et al, 1995). Οι MBLs περιέχουν μια συγκεκριμένη σειρά αμινοξέων που ορίζουν την αρχιτεκτονική του ενεργού κέντρου και δεσμεύει τα ιόντα ψευδαργύρου. Τα ιόντα ψευδαργύρου δεσμεύουν με τη σειρά τους 2 μόρια νερού, απαραίτητα για να επιτευχθεί η υδρόλυση (Εικόνα 4) (Wang Z. et al, 1999). Το κύριο μοτίβο δέσμησης ψευδαργύρου είναι ιστιδίνη-X-ιστιδίνη-X-ασπαρτικό οξύ (HXHXD) και είναι κοινό

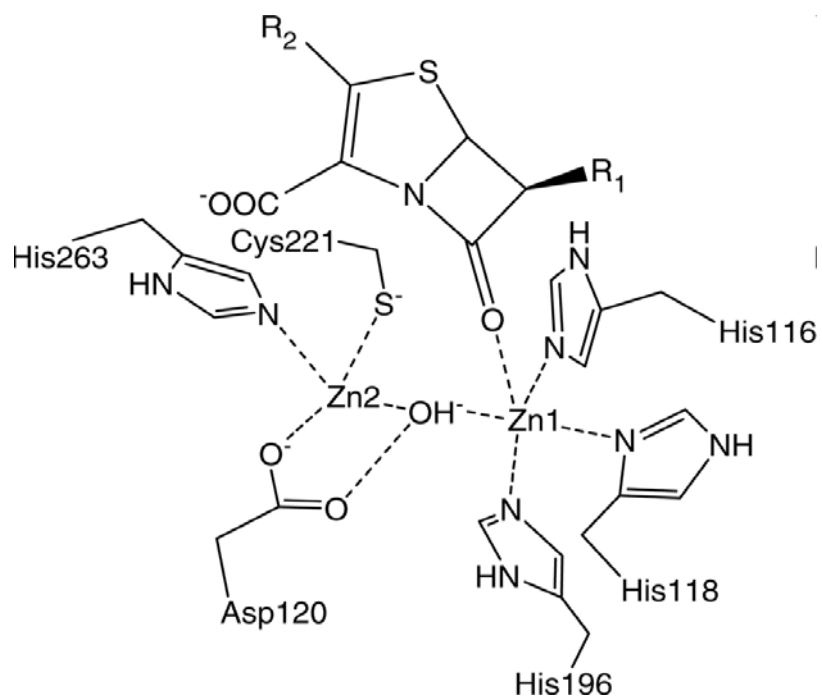
για όλες τις MBLs, εκτός από τα ένζυμα της υποομάδας B2 (Rasmussen B. A. et al, 1997).

Προτιμώμενο μέταλλο είναι ο ψευδάργυρος, και ενώ οι περισσότερες MBLs δεσμεύουν δύο ιόντα ψευδαργύρου στο ενεργό τους κέντρο, τα ένζυμα της υποομάδας B2 δεσμεύουν ένα ιόν ψευδαργύρου (Rasmussen B. A. et al, 1997). Σύμφωνα με τον προτεινόμενο μηχανισμό υδρόλυσης, το ενεργό κέντρο προσανατολίζει και πολώνει τον β-λακταμικό δεσμό διευκολύνοντας την υδρόλυση (McManus-Munoz et al, 1999; Spencer J. et al, 2001 a; Wang Z. et al, 1998). Ο μηχανισμός της υδρόλυσης των MBLs είναι περίπλοκος και ποικίλλει από τη μια MBL στην άλλη (Spencer J. et al, 2001b). Η μελέτη της κρυσταλλικής δομής των MBLs έχει προσφέρει ανεκτίμητες γνώσεις για τον μηχανισμό της καταλυτικής τους δράσης. Παρά το γεγονός ότι οι MBLs μπορεί να έχουν λιγότερο από 25% αμινοξική ομολογία, όλες φαίνεται ότι σχηματίζουν μία θηλιά που είναι ευέλικτη και πιστεύεται ότι είναι αυτή που διευκολύνει την δέσμευση και την υδρόλυση των β-λακταμικών ουσιών.

Σε αντίθεση με τις β-λακταμάσες τύπου σερίνης, οι MBLs διαθέτουν μια ευρεία ευμετάβλητη θήκη στο ενεργό κέντρο που μπορεί να φιλοξενήσει περισσότερα β-λακταμικά υποστρώματα, προάγοντας έτσι το ευρύ φάσμα δράσης τους. Επίσης, οι MBLs δεν επηρεάζονται από την δράση των αναστολέων της σερίνης, όπως το κλαβουλανικό οξύ και η σουλμπακτάμη (Page M. I., 1999; Page M. I., 2001). Είναι ενδιαφέρον πως καμία από τις MBLs δεν υδρολύει αποτελεσματικά την αζτρεονάμη. Μελέτες σε ζωικά μοντέλα με λοιμώξεις από στελέχη που παράγουν MBL έχουν δείξει αντικρουόμενα αποτελέσματα όσον αφορά στην κλινική αποτελεσματικότητα της αζτρεονάμης (Bellais S. et al, 2002; Souli et al, 2011).

Ο βαθμός συγγένειας ενζύμου - υποστρώματος αναφέρεται ως  $K_m$ , ενώ ο αριθμός μετατροπής ή αριθμός μορίων υποστρώματος που μεταβολίζονται είναι το  $k_{cat}$ . Ο λόγος  $k_{cat} / K_m$  είναι η φυσιολογική αποδοτικότητα του ενζύμου. Στον Πίνακα 4 φαίνονται οι τιμές των  $K_m$ ,  $k_{cat}$  και  $k_{cat} / K_m$  των MBLs GIM-1, IMP-1, VIM-1, VIM-2, και SPM-1 που προέρχονται από παρόμοιες πειραματικές συνθήκες.

**Εικόνα 4.** Προτεινόμενος μηχανισμός πρόσδεσης β-λακτάμης σε μεταλλο-β-λακταμάση της υποομάδας B1.



**Πίνακας 4.** Ενζυμική δραστηριότητα των GIM-1 (29), IMP-1 (78), VIM-1 (41), VIM-2 (41), και SPM-1 (102)

Antibiotic	GIM-1			IMP-1			VIM-1			VIM-2			SPM-1		
	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_m$ ( $\mu$ M)	$k_{cat}/K_m$ ( $\mu$ M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_m$ ( $\mu$ M)	$k_{cat}/K_m$ ( $\mu$ M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_m$ ( $\mu$ M)	$k_{cat}/K_m$ ( $\mu$ M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_m$ ( $\mu$ M)	$k_{cat}/K_m$ ( $\mu$ M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_m$ ( $\mu$ M)	$k_{cat}/K_m$ ( $\mu$ M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
Penicillin	6.6	46	0.14	320	520	0.62	29	841	0.034	55.8	49	1.14	108	38	2.8
Ampicillin	3.3	20	0.16	950	200	4.8	37	917	0.04				117	72	1.6
Carbenicillin	4.1	170	0.02	ND <sup>a</sup>	ND	0.02	167	75	2.2				74	814	0.09
Azlocillin	ND	ND	ND				1,525	123	12				53	147	0.35
Piperacillin	6.9	69	0.10	ND	ND	0.72	1,860	3,500	0.53	32.7	72	0.45	117	59	2
Ticarcillin	2.3	57	0.04	1.1	740	0.0015	452	1,117	0.41	31.7	46	0.69	ND	<0.35	ND
Nitrocefin	5.8	12	0.47	63	27	2.3	95	17	5.6				0.53	4	0.12
Cephalothin	16	22	0.72	48	21	2.4	281	53	5.3	56.2	44	1.28	43	4	11.7
Cefuroxime	5.9	7	0.80	8	37	0.22	324	42	7.7	12.1	22	0.55	37	4	8.8
Cefoxitin	8.3	206	0.04	16	8 <sup>b</sup>	2	26	131	0.2	3	24	0.12	8	2	4
Ceftazidime	18	31	0.58	8	44	0.18	60	794	0.076	89	98	0.90	28	46	0.6
Cefotaxime	1.1	4	0.24	1.3	4 <sup>b</sup>	0.35	169	247	0.68	27.5	32	0.86	16	9	1.9
Cefepime	17	431	0.04	7	11 <sup>b</sup>	0.66	549	145	3.8	4.7	184	0.03	18	18	1
Imipenem	27	287	0.09	46	39	1.2	2.0	1.5	1.3	9.9	10	0.99	33	37	1
Meropenem	2.7	25	0.11	50	10	0.12	13	48	0.27	1.4	5	0.28	63	281	0.22
Moxalactam	14	1,035	0.01	88	10 <sup>b</sup>	8.8				14.8	80	0.18	13	97	0.13
Aztreonam	ND	ND	ND	>0.01	>1,000	<1 × 10 <sup>-5</sup>	<0.01	>1,000	<1 × 10 <sup>-5</sup>	<0.5	ND	ND	ND	<0.3	ND
Clavulanic acid	ND	ND	ND										ND	>0.1	ND
Tazobactam	ND	ND	ND	>1,000	>3.98	0.0039	5.3	337	0.016				0.6	3	0.2

Τα στοιχεία στον Πίνακα 4 δείχνουν ότι ενώ αυτά τα ένζυμα μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά όσον αφορά στην δομή και την αρχιτεκτονική του ενεργού κέντρου, η ικανότητά τους να δεσμεύουν και να υδρολύουν τις β-λακτάμες ποικίλλει σημαντικά. Αξιοσημείωτο παράδειγμα είναι η διαφορά μεταξύ VIM-1 και VIM-2, δύο ένζυμα με παραπλήσια δομή. Για παράδειγμα, η VIM-2 τείνει να συνδέεται περισσότερο με τις β-λακτάμες από την VIM-1 και διαθέτει σημαντικά χαμηλότερες τιμές  $K_m$  για την βενζυλοπενικιλίνη, την αμπικιλίνη, την πιπερακιλλίνη, την μεξοσιλλίνη, την τικαρκιλλίνη, την κεφαλοθίνη, την κεφοξιτίνη, την κεφοταξίμη, την κεφταζιντίμη, την κεφπιρόμη, την μοξαλακτάμη, και την μεροπενέμη. Η πιο σημαντική εξαίρεση είναι η ιμιπενέμη όπου VIM-1 και VIM-2 έχουν τιμές  $K_m$  1,5  $\mu$ M και 10 $\mu$ M αντίστοιχα (Docquier J. D. et al, 2003). Η VIM-1, υδρολύει πιο αποτελεσματικά τις περισσότερες β-λακτάμες (πιπερακιλλίνη, αζλοκιλλίνη, τικαρκιλλίνη, κεφαλοριδίνη, κεφαλοθίνη, κεφουροξίμη, κεφοταξίμη, κεφταζιδίμη, κεφπιρόμη και μεροπενέμη) από την VIM-2. Και σε αυτή την περίπτωση η ιμιπενέμη αποτελεί εξαίρεση όπου η VIM-1 και η VIM-2 έχουν τιμές  $k_{cat}$  0.2/s και 34/s αντίστοιχα. Εικάζεται ότι αυτές οι διαφορές κινητικής οφείλονται σε αντικαταστάσεις αμινοξέων κοντά ή πάνω στον ενεργό σημείο, δηλαδή, ιστιδίνη / τυροσίνη στη θέση 224 και σερίνη / αργινίνη στη θέση 228 (Docquier J. D. et al, 2003).

Η SPM-1 έχει μεγαλύτερη υδρολυτική δράση στις περισσότερες β-λακτάμες και είναι γενικά πιο αποτελεσματικό ένζυμο (υψηλότερες τιμές  $k_{cat} / K_m$ ) από ότι η IMP-1 (Laraki N. et al, 1999) και η GIM-1 (Castanheira M. et al, 2004), με εξαίρεση τις αμπικιλίνη, μιπενέμη, και μοξαλακτάμη για την περίπτωση της IMP-1 (Πίνακας 4). Η SPM-1 συνδέεται περισσότερο με τις κεφαλοσπορίνες, ιδιαίτερα την κεφοξιτίνη, (χαμηλότερες τιμές  $K_m$ ) παρά τις πενικιλίνες και τις καρβαπενέμες. Η GIM-1 κατά κύριο λόγο λειτουργεί ως πενικιλινάση, με μέτρια δραστηριότητα έναντι των κεφαλοσπορινών και καρβαπενεμών, παρά το γεγονός ότι δεν δεσμεύει στενά τις περισσότερες β-λακτάμες με εξαιρέσεις τις μιπενέμη ( $K_m$  287  $\mu M$ ), κεφεπίμη ( $K_m$  431  $\mu M$ ) και μοξαλακτάμη ( $K_m$  1.035  $\mu M$ ).

Πολλά ερωτήματα εγείρουν οι διαφορές στην καταλυτική δράση των MBLs, που ενώ έχουν παρόμοια δομή παρουσιάζουν ετερογένεια στις δεσμευτικές και υδρολυτικές ιδιότητες έναντι των β-λακταμών. Μελέτες κινητικής έχουν προσπαθήσει να εξετάσουν τον καταλυτικό μηχανισμό των MBLs σε διάφορα β-λακταμικά υποστρώματα. Ωστόσο, οι περισσότερες από αυτές τις μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει ως χρωμογόνο υπόστρωμα την νιτροσεφίνη, η οποία έχει άτυπη συμπεριφορά για κάποια ένζυμα (Spencer J. et al, 2001). Επιπλέον, πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί σε MBLs όπως η BCII και η CcrA και όχι σε κλινικά σημαντικά ένζυμα (Bounaga S. et al, 1998; Melino S. et al, 1998; Spencer J. et al, 2003).

#### 1.4. Γενετικό περιβάλλον επίκτητων MBLs

Η εξάπλωση των MBLs θεωρείται ότι κατά κύριο λόγο οφείλεται στην τοπική κατανάλωση ευρέως φάσματος κεφαλοσπορινών και καρβαπενεμών (Lee K. et al, 2003; Lombardi G. et al, 2002). Τα περισσότερα αν όχι όλα τα γονίδια που κωδικοποιούν IMP, VIM, NDM και GES εντοπίζονται σε γονιδιακές κασέτες σε ιντεγκρόνια τάξης 1 (Castanheira M. et al, 2004; Lauretti L. et al, 1999; Poirel L. et al, 2001; Poirel L. et al, 2000; Senda K. et al, 1996; Yan J. J. et al, 2001), παρόλο που MBLs τύπου IMP ανευρίσκονται και σε ιντεγκρόνια τάξης 3 (Arakawa Y. et al, 1995; Collis C. M. et al, 2002). Τα ιντεγκρόνια είναι σε θέση να εξασφαλίζουν γονιδιακές κασέτες μέσω ενός ειδικού σημειακού ανασυνδυασμού μεταξύ δυο τμημάτων DNA, ένα στο ιντεγκρόνιο και ένα στην γονιδιακή κασέτα. Τα ιντεγκρόνια αποτελούνται από τρία τμήματα: την 5' διατηρημένη περιοχή (5'CS), την 3' διατηρημένη περιοχή (3'CS) και την μεταβλητή περιοχή. Η 5'CS περιοχή αποτελείται από το γονίδιο της



ιντεγκράσης (*intl*), το παρακείμενο σημείο ανασυνδυασμού (*attI*) και έναν υποκινητή (promoter) που διευκολύνει την έκφραση των γονιδιακών κασετών της μεταβλητής περιοχής. Η 3'CS περιοχή συχνά αποτελείται από ένα μερικώς διαγραμμένο *qac* γονίδιο (*qacEΔ1*) συνδεδεμένο με ένα *sul* γονίδιο τα οποία προσφέρουν αντίστοιχα αντοχή στα αντισηπτικά και τις σουλφοναμίδες.

Οι γονιδιακές κασέτες είναι μικρά τμήματα κυκλικού DNA, μεγέθους περίπου 1kb, που περιλαμβάνουν ένα μοναδικό γονίδιο μαζί με το σημείο ανασυνδυασμού που ονομάζεται στοιχείο 59 βάσεων (59-base element) (Bennett P. M. et al, 1999). Σε κάποιες Ευρωπαϊκές χώρες έχουν βρεθεί γονίδια *bla<sub>VIM</sub>* σε γονιδιακές κασέτες χωρίς το στοιχείο των 59 βάσεων (Pallecchi L. et al, 2001; Walsh T. R. et al, 2003). Στις περισσότερες περιπτώσεις αυτό αφορά γονίδια MBL και γονίδια *aacA4* τα οποία κωδικοποιούν αντοχή σε καναμυκίνη, νεομυκίνη, και στρεπτομυκίνη. Ως εκ τούτου τόσο οι αμινογλυκοσίδες όσο και οι β-λακτάμες επιλέγουν κλινικά στελέχη με αυτές τις «ενσωματωμένες γονιδιακές κασέτες» θέτοντας σε περαιτέρω κίνδυνο αυτές τις επιλογές αντιμικροβιακής θεραπείας (Walsh T. R. et al, 2003).

Οι γονιδιακές κασέτες που φέρουν γονίδια αντοχής στις β-λακτάμες και τις αμινογλυκοσίδες, ενώ μπορούν να μετακινούνται ελεύθερα από το ένα ιντεγκρόνιο στο άλλο, δεν έχουν τη δυνατότητα από μόνες τους να μετακινούνται από τον ένα μικροοργανισμό στον άλλο και χρειάζονται την βοήθεια άλλων γενετικών δομών όπως τα πλασμίδια και τα τρανσποζόνια (Bennett P. M. et al, 1999). Η πλειοψηφία των γονιδίων MBL βρίσκονται σε πλασμίδια μεγέθους μεταξύ 120 και 180 kb. Στις ΗΠΑ έχουν ανευρεθεί γονίδια *bla<sub>VIM-7</sub>* σε συζευκτικά πλασμίδια 24 kb (Toleman M. A. et al, 2004). Η *in vivo* μεταφορά μεγάλων εγγενών πλασμιδίων, που φέρουν γονίδια MBL, πιθανώς επηρεάζεται από την «δεκτικότητα» του βακτηρίου δέκτη, το μέγεθος και το γονιδιακό περιεχόμενο του πλασμιδίου. Μέχρι σήμερα λίγες πληροφορίες υπάρχουν σχετικά με τα υπόλοιπα γονίδια εκτός των MBL, που μεταφέρονται με αυτά τα πλασμίδια ή αν οι λειτουργίες που κωδικοποιούν βοηθούν ή επιβαρύνουν τον βακτηριακό τους ξενιστή.

Το γενετικό περιβάλλον των MBLs δεν αποτελεί μόνο μέτρο της πλαστικότητας τους, αλλά καθορίζει και το πώς οι μεταφερόμενες MBLs έχουν εξαπλωθεί σε παγκόσμια κλίμακα. Το 2003 έγινε η πρώτη αναφορά γονιδίου MBL (*bla<sub>IMP-13</sub>*) και του ιντεγκρονίου του σε τρανσποζόνια τύπου-Tn5051 σε στέλεχος *P. aeruginosa* στην Ιταλία (Toleman M. A. et al, 2003). Παρόμοια ήταν και η

ενσωμάτωση των *bla*<sub>IMP-13</sub> και *bla*<sub>VIM-2</sub> σε στελέχη *P. aeruginosa* από την Πολωνία. Επιπλέον, τα γονίδια *tnpR* του τρανσποζονίου και από τις δύο περιοχές είναι πανομοιότυπα, υποδεικνύοντας ότι το τρανσποζόνιο ήταν υπεύθυνο για την διασπορά των ιντεγκρονίων τάξεως 1, τα οποία στη συνέχεια παρείχαν τα διαφορετικά MBL γονίδια (Toleman M. A. et al, 2003). Τα στοιχεία αυτά επιβεβαιώνονται από το γεγονός ότι τα στελέχη *P. aeruginosa* είχαν διαφορετικά ηλεκτροφορητικά πρότυπα σε ηλεκτροφόρηση εναλλασσόμενου πεδίου και από το ότι δεν υπήρχαν ενδείξεις ύπαρξης πλασμιδίου. Μερικές από τις ιαπωνικές *bla*<sub>VIM-2</sub> πιστεύεται ότι βρίσκονται ενσωματωμένες σε τρανσποζόνια (Yatsuyanagi J. et al, 2004).

Δεν συνδέονται όλα τα MBL γονίδια με ιντεγκρόνια ή τρανσποζόνια. Το γενετικό περιβάλλον του *bla*<sub>SPM-1</sub> έχει αποδειχθεί ότι είναι μοναδικό, μοιάζοντας με γονίδια που σχετίζονται στενά με την *Salmonella enterica* ορότυπος Typhimurium και δεν σχετίζεται με ιντεγκρόνιο ή τρανσποζόνιο (Toleman M. A. et al, 2002). Το *bla*<sub>SPM-1</sub> και τα γύρω του γονίδια αποτελούν μέρος μιας μεταθετής γονιδιακής νησίδας παθογονικότητας και βρίσκονται σε ένα πλασμίδιο μεγέθους περίπου 180 Kb. Οι νησίδες παθογονικότητας της *Salmonella* έχουν συσχετιστεί με κοινές μεταθετές περιοχές που έχουν επίσης συσχετιστεί με άλλα μεταθετά στοιχεία που ονομάζονται περιοχές SXT. Οι περιοχές αυτές μπορούν να κινητοποιηθούν κάτω από βακτηριακό στρες. Έχει αποδειχθεί πρόσφατα, όταν στοιχεία αντοχής που συνδέονται με το SXT αυξήθηκαν 300 φορές όταν το βακτήριο ήταν εκτεθειμένο σε φθοριοκινολόνες (Beaber J. W. et al, 2004; Iwanaga M. et al, 2004). Περαιτέρω ανάλυση των στελεχών *P. aeruginosa* από την Βραζιλία έδειξε ότι το επόμενο τμήμα DNA περιείχε κοινές περιοχές ή στοιχεία CR, και συγκεκριμένα CR4 (Poirel L. et al, 2004). Σε σύγκριση με τα ιντεγκρόνια και τα τρανσποζόνια, πολύ λίγα είναι γνωστά για τα στοιχεία CR, ειδικά σε ότι αφορά το πώς διευκολύνουν την κινητοποίηση των γονιδίων αντοχής (Partridge S. R. et al, 2003).

### **1.5. Ανίχνευση Καρβαπενεμασών**

Η ανίχνευση των μικροοργανισμών που παράγουν καρβαπενεμάσες αποτελεί για το μικροβιολογικό εργαστήριο ζήτημα υψίστης σημασίας για την επιλογή του κατάλληλου αντιμικροβιακού θεραπευτικού σχήματος και για την εφαρμογή μέτρων επιδημιολογικής επιτήρησης. Η ανίχνευση των στελεχών αυτών παρουσιάζει

ορισμένες δυσκολίες, δεδομένου ότι δεν μπορεί να βασίζεται απλά στο προφίλ αντοχής, αλλά και λόγω της έλλειψης τυποποιημένης μεθοδολογίας.

Η παραγωγή μιας καρβαπενεμάσης προσδίδει ένα συγκεκριμένο φαινότυπο αντοχής στις β-λακτάμες, ανάλογα με την βακτηριακό είδος, το επίπεδο έκφρασης του γονιδίου, τον τύπο του ενζύμου, και την παρουσία και άλλων μηχανισμών αντοχής όπως η μείωση της διαπερατότητας, παρουσία αντλιών εκροής (efflux pumps), συνύπαρξη άλλων β-λακταμασών (Queenan A.M. et al, 2007; Landman D. et al, 2009). Η ανεύρεση υψηλής MIC (ή μειωμένης ζώνης αναστολής με έλεγχο διάχυσης δίσκου) μίας καρβαπενέμης πρέπει να εγείρει την υποψία ύπαρξης καρβαπενεμάσης υποδεικνύοντας την αναγκαιότητα για περαιτέρω έλεγχο με τις κατάλληλες μεθόδους ελέγχου. Ωστόσο, παρουσία καρβαπενεμάσης, οι MICs στις καρβαπενέμες μπορεί να κυμαίνονται σε ευρύ φάσμα τιμών, ακόμα και εντός του εύρους ευαισθησίας, όπως ορίζεται από τα τρέχοντα κλινικά όρια της CLSI ή της EUCAST (Πίνακας 5).

Χαμηλά επίπεδα αντοχής στις καρβαπενέμες έχουν συχνά παρατηρηθεί σε εντεροβακτηριακά που παράγουν καρβαπενεμάσες διαφορετικών τύπων (Πίνακας 6) (Loli A. et al, 2006; Smith Moland E. et al, 2003; Tato M. et al, 2007) αλλά και στελέχη *Acinetobacter spp.* (Ikonomidis A. et al, 2008) και *P. aeruginosa* που παράγουν MBLs (Martins A.F. et al, 2007). Για την επιλογή των υποψηφίων για παραγωγή καρβαπενεμάσης στελεχών που πρέπει να ελεγχθούν περαιτέρω πρέπει να ληφθούν υπόψη παράμετροι όπως οι γνωστές MICs στις καρβαπενέμες σε κάθε είδος βακτηρίου και για κάθε διαφορετικό ένζυμο, οι MICs των wild-type μικροοργανισμών καθώς και κάποια ειδικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά αντοχής από ποικίλους μηχανισμούς.

Στην περίπτωση στελεχών *Pseudomonas spp.* και *Acinetobacter spp.* έχει διατυπωθεί η άποψη ότι περαιτέρω πρέπει να διερευνούνται στελέχη που είναι ανθεκτικά στις καρβαπενέμες (ιμιπενέμη και / ή μεροπενέμη) και ανθεκτικά είτε στην Τικαρκιλίνη, Τικαρκιλίνη-κλαβουλανικό ή κεφταζιδίμη (Cornaglia G. et al, 2007). Η παραπάνω πρόταση φαίνεται να είναι κατάλληλη για την περίπτωση των MBLs και θα μπορούσε επίσης να επεκταθεί και σε άλλες καρβαπενεμάσες, παρά τα διαφορετικά όρια ευαισθησίας που προτείνονται από διαφορετικούς οργανισμούς.

Για παράδειγμα, οι κατευθυντήριες οδηγίες της EUCAST και της CLSI ορίζουν ως ανθεκτικά στην μιπενέμη στελέχη *A. baumannii* με MICs  $\geq 4$  mg / L ή  $\geq 8$  mg / L, αντίστοιχα, και ως ανθεκτικά στην μεροπενέμη στελέχη *A. baumannii* και *P. aeruginosa* με MICs της  $\geq 4$  mg / L ή  $\geq 8$  mg / L, αντίστοιχα (Πίνακας 5). Η ταυτόχρονη εξέταση πρόσθετων φαινοτυπικών χαρακτηριστικών θα μπορούσε να βοηθήσει στην ανίχνευση των οργανισμών που παράγουν καρβαπενεμάσες. Ανεξάρτητα από τα πραγματικά επίπεδα αντοχής στις καρβαπενέμες, η ύπαρξη μίας καρβαπενεμάσης επηρεάζει την ευαισθησία σε μια ευρεία ποικιλία β-λακταμικών αντιμικροβιακών. Ένα στέλεχος που κωδικοποιεί MBL αναμένεται να παρουσιάζει αντοχή στις πενικιλίνες και σε όλες τις κεφαλοσπορίνες όπως κεφταζιντίμη, κεφοταξίμη και κεφτριαξόνη (Queenan A.M. et al, 2007).

Ο προσδιορισμός των MICs σε στέλεχος MBL θετικό σε πολλές περιπτώσεις αποδεικνύεται προβληματικός. Έχουν υπάρξει μελέτες που ανέφεραν σχετικά χαμηλή αναπαραγωγικότητα για το μεγαλύτερο μέρος των συμβατικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται, καθώς και αντιφατικά αποτελέσματα μεταξύ των μεθόδων (Giakkouri P. et al, 2005; Bratu S. et al, 2005; Tenover F.C. et al, 2006). Εν μέρει τα προβλήματα αυτά μπορούν να αποδοθούν στο ισχυρό φαινόμενο ενοφθαλμισμού (inoculum effect) ή στα χαμηλά επίπεδα αντοχής στις καρβαπενέμες που μπορεί να προσδίδουν τα ένζυμα, ιδίως σε εντεροβακτηριακά.

Για τους λόγους αυτούς, μεγάλη προσοχή πρέπει να δίδεται στην διαδικασία ενοφθαλμισμού των βακτηρίων, ιδίως στην περίπτωση των αυτόματων αναλυτών (Giakkouri P. et al, 2005; Tenover F.C. et al, 2006). Προβληματική επίσης έχει αποδειχθεί σε κάποιες περιπτώσεις η χρήση μεθόδων κλιμακωτής διάχυσης όπως το Etest (Tenover F.C. et al, 2006; Samuelsen O. et al, 2008; Pitout J.D. et al, 2005). Οι μέθοδοι μικροδιάλυσης σε ζωμό και διάχυσης δίσκου θεωρούνται οι πιο αξιόπιστες και ακριβείς για την ανίχνευση αντοχής από MBLs.

### **1.5.1. Φαινοτυπικές δοκιμασίες για την ανίχνευση των MBLs**

Μια σειρά απλών φαινοτυπικών δοκιμασιών, οι περισσότερες από τις οποίες χρησιμοποιούν δίσκους διάχυσης, έχουν περιγραφεί και αξιολογηθεί για την ανίχνευση οργανισμών που παράγουν MBLs. Η μέθοδος clover leaf (ή τροποποιημένη δοκιμή Hodge - MHT) έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς ως γενική φαινοτυπική μέθοδος για την ανίχνευση των καρβαπενεμασών (CLSI, 2009; Lee K. et

al, 2001), και είναι η μόνη μέθοδος ανίχνευσης που συνιστάται έως σήμερα από την CLSI (CLSI, 2009).

Η μέθοδος βασίζεται στην αδρανοποίηση μιας καρβαπενέμης είτε από ολόκληρα κύτταρα ή εκχύλισμα κυττάρων από τον μικροοργανισμό που παράγει καρβαπενεμάση, η οποία επιτρέπει σε ένα ευαίσθητο στέλεχος να αναπτυχθεί προς την κατεύθυνση ενός δίσκου καρβαπενέμης, κατά μήκος της ταινίας που έχει εμβολιασθεί το στέλεχος δοκιμής ή το εκχύλισμα αυτού. Η δοκιμασία αυτή ανιχνεύει καρβαπενεμάση, αλλά δεν παρέχει πληροφορίες σχετικά με τον τύπο της.

Επιπλέον, υπάρχουν αναφορές ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, ως επί το πλείστον από CTX-M-θετικά στελέχη με μειωμένη διαπερατότητα εξωτάτης μεμβράνης, καθιστώντας έτσι την μέθοδο προβληματική, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις καρβαπενεμασών που παράγουν χαμηλά επίπεδα αντοχής στις καρβαπενέμες, όπως στα MBL-θετικά εντεροβακτηριακά (Pasteran F. et al, 2009). Στην περίπτωση των MBLs, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η προσθήκη θειικού ψευδαργύρου μπορεί να βελτιώσει την απόδοση του MHT (Lee K. et al, 2003).

Πολλές μέθοδοι που βασίζονται σε κάποια χημική ουσία – αναστολέα έχουν αναπτυχθεί για την ακριβή ανίχνευση των στελεχών που παράγουν MBL. Αυτές στηρίζονται στην συνέργεια μεταξύ των αναστολέων-MBL, όπως το EDTA (Lee K. et al, 2001; Yong D. et al, 2002), το EDTA με 1,10-φαινανθρολίνη (Migliavacca R. et al, 2002), ενώσεις θειόλης (2 - μερκαπτοπροπιονικό οξύ ή νατριούχο θειογλυκολικό οξύ) (Lee K. et al, 2003; Arakawa Y. Et al, 2000) και διπικολινικό οξύ (Kimura S. et al, 2005) και καρβαπενέμες (ιμιπενέμη και / ή μεροπενέμη) και / ή οξυιμίνο-κεφαλοσπορίνη (κεφταζιδίμη) ως δείκτης β-λακταμικών ουσιών. Οι δοκιμασίες αυτές βασίζονται στην ανάγκη των μεταλλοενζύμων για τα ιόντα ψευδαργύρου, και να χρησιμοποιούν χηλικές ενώσεις για την αναστολή της υδρόλυσης της β-λακτάμης. Σήμερα έχουν αξιολογηθεί και χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι συνέργειας με EDTA (διάχυσης με δίσκο ή αραιώσης σε ζωμό) (Lee K. et al, 2001; Lee K. et al, 2003; Yong D. et al, 2002; Migliavacca R. et al, 2002).

Η δοκιμασία συνέργειας διπλού δίσκου (double-disk synergy test - DDST) και η δοκιμασία συνδυασμένων δίσκων, χρησιμοποιώντας διαφορετική ποσότητα EDTA και, στην περίπτωση του DDST, διαφορετικές αποστάσεις μεταξύ των δίσκων, παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία, ακόμη και με στελέχη με χαμηλά επίπεδα αντοχής

στις καρβαπενέμες. Έχει προταθεί συμπλήρωση ποσότητας ψευδαργύρου στο θρεπτικό υλικό καλλιέργειας, έτσι ώστε να αυξηθεί η ευαισθησία της μεθόδου (Giakkouri P. et al, 2008), αλλά η τροποποίηση αυτή δεν έχει πλήρως αξιολογηθεί.

Η μέθοδος του Etest – MBL βασίζεται επίσης στη συνέργεια μεταξύ EDTA και ιμιπενέμης έχει καλή ευαισθησία και ειδικότητα για την ανίχνευση MBL που παράγουν στελέχη *P. aeruginosa* (Walsh T.R. et al, 2002), αν και επανειλημμένα έχει επισημανθεί ότι η ειδικότητά της μπορεί να ζημιωθεί, μεταξύ άλλων, από πιθανή ενδογενή δραστηριότητα του EDTA (Samuelsen O. et al, 2008; Chu Y.W. et al, 2005; Ratkai C. et al, 2009).

**Πίνακας 5.** Κλινικά όρια ευαισθησίας στις καρβαπενέμες

	Όρια CLSI				Όρια EUCAST	
	M100-S19, 2009		M100-S22, 2012		MIC (μg/ml)	Δίσκος (mm)
	MIC (μg/ml)	Δίσκος (mm)	MIC (μg/ml)	Δίσκος (mm)		
<i>Enterobacteriaceae</i>						
Ερταπενέμη	≤2-≥8	≥19- ≤15	≤0.5-≥2	≥22- ≤18	≤0.5->1	≥25- <22
Ιμιπενέμη	≤4-≥16	≥16- ≤13	≤1-≥4	≥23- ≤19	≤2->8	≥21- <15
Μεροπενέμη	≤4-≥16	≥16- ≤13	≤1-≥4	≥23- ≤19	≤2->8	≥22- <16
Ντοριπενέμη	-	-	≤1-≥4	≥23- ≤19	≤1->4	≥24- <18
<i>Pseudomonas spp</i>						
Ερταπενέμη	-	-	-	-	-	-
Ιμιπενέμη	≤4-≥16	≥16- ≤13	≤2-≥8	≥19- ≤15	≤4->8	≥20- <17
Μεροπενέμη	≤4-≥16	≥16- ≤13	≤2-≥8	≥19- ≤15	≤2->8	≥24- <18
Ντοριπενέμη	-	-	≤2-≥8	≥19- ≤15	≤1->4	≥22- <17
<i>Acinetobacter spp</i>						
Ερταπενέμη	-	-	-	-	-	-
Ιμιπενέμη	≤4-≥16	≥16- ≤13	≤4-≥16	≥16- ≤13	≤2->8	≥23- <17
Μεροπενέμη	≤4-≥16	≥16- ≤13	≤4-≥16	≥16- ≤13	≤2->8	≥21- <15
Ντοριπενέμη	-	-	-	-	≤1->4	≥21- <15

**Πίνακας 6.** Εύρος MICs στις καρβαπενέμες κλινικών Εντεροβακτηριακών στελεχών με καρβαπενεμάση

	MIC (mg/L)		
	Ιμιπενέμη	Μεροπενέμη	Ερταπενέμη
KPC	0.5 to >32	0.5 to >32	0.5 to >32
IMP/VIM/NDM	0.5 to >32	0.5 to >64	0.38 to >32
OXA-48/OXA-181	0.25 to 64	0.38 to 64	0.38 to >32

Υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν αποτυχίες των μεθόδων συνέργειας με EDTA στην ανίχνευση MBL σε στελέχη *A. baumannii* (Ikonomidis A. et al, 2008; Loli A. et al, 2008; Picao R.C. et al, 2008) και έχει προταθεί η χρήση δοκιμασιών που χρησιμοποιούν ενώσεις θειόλης, ως περισσότερο αποτελεσματικές (Lee K. et al, 2003). Ψευδώς θετικά αποτελέσματα σε στελέχη *A. baumannii* έχουν αναφερθεί παρουσία καρβαπενεμασών ομάδας D (Segal H. et al, 2005). Το Etest – MBL έχει κριθεί ακατάλληλο για την ανίχνευση MBL σε εντεροβακτηριακά με χαμηλές MICs στην ιμιπενέμη ( $\leq 4\text{mg/L}$ ), ωστόσο αναμένεται βελτιωμένη έκδοση που φαίνεται να αντιμετωπίζει το συγκεκριμένο πρόβλημα (19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2009, Abstract O252.).

Παρά τις καλές επιδόσεις των δοκιμασιών αναστολής για την ανίχνευση των MBLs πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι οι αναστολείς MBL δρουν στην πράξη μη-ειδικά και επηρεάζουν άλλες δομές και διαδικασίες (π.χ. διαπερατότητα εξωτάτης μεμβράνης σε *P. aeruginosa*) (Chu Y.W. et al, 2005).

### 1.5.2. Ανίχνευση MBL με σπεκτροφωτομετρία

Η μέτρηση της υδρόλυσης των καρβαπενεμών με σπεκτροφωτομετρία είναι η μέθοδος αναφοράς για την ανίχνευση της παραγωγής καρβαπενεμάσης. Η υδρόλυση της καρβαπενέμης παρουσία ή απουσία αναστολέων (π.χ EDTA), δίδει περαιτέρω πληροφορίες όσον αφορά στον τύπο του ενζύμου. Οι τεχνικές αυτές πραγματοποιούνται σε εργαστήρια αναφοράς.

### 1.5.3. Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης MBLs

Οι μοριακές μέθοδοι όπως η απλή και η πολλαπλή PCR, η PCR σε πραγματικό χρόνο (real-time), ο υβριδισμός DNA και η μελέτη της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing) αποτελούν ακριβείς αλλά ταυτόχρονα και απαιτητικές μεθόδους σε κόστος, εξοπλισμό, τεχνογνωσία και χρησιμοποιούνται σε ερευνητικά εργαστήρια και σε εργαστήρια αναφοράς. Στις μέρες μας η χρήση PCR πραγματοποιείται σαν εξέταση ρουτίνας, ώστε να υπερκεραστούν προβλήματα της φαινοτυπικής διάγνωσης. Εκτός από “in house” μεθόδους, κυκλοφορούν τα τελευταία χρόνια κιτ PCR και υβριδισμού για μια σειρά από μεταλλοένζυμα (18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2008, Abstract P2000; 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2009, Abstract P1054).

## 1.6 Αντιμικροβιακές ουσίες με δράση έναντι μικροοργανισμών που παράγουν MBL

### 1.6.1 Β-λακτάμες

Αντιμικροβιακές ουσίες μεταξύ των β-λακταμών που διατηρούν in vitro δραστηριότητα υπό προϋποθέσεις έναντι των μεταλλο-β-λακταμασών είναι η αζτρεονάμη (επί απουσίας ESBL) και οι καρβαπενέμες. Δεδομένα που επιβεβαιώνουν την κλινική αποτελεσματικότητα αυτών των αντιβιοτικών προέρχονται από θεραπεία πειραματικών λοιμώξεων. Οι Δαϊκος και συν. μελέτησαν τη δράση δύο δοσολογικών σχημάτων ιμιπενέμης (30 και 60 mg/kg κάθε 2 h) κατά στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν VIM-1 σε ουδετεροπενικούς αρουραίους με λοίμωξη μαλακών μορίων (Daikos GL et al, 2007). Τα πειραματόζωα μολύνθηκαν με τρία VIM-1-θετικά στελέχη (με MIC ιμιπενέμης 2, 4, και 32 μg/ml, αντίστοιχα) και με ένα κλινικό στέλεχος ‘άγριου τύπου’ (MIC ιμιπενέμης 0.125 μg/ml), που δεν παρήγαγε καμία ευρέως φάσματος β-λακταμάση. Η βακτηριοκτόνος δράση ήταν εντονότατη κατά των ευαίσθητων στελεχών, που δεν παρήγαγαν VIM-1, ενδιάμεση κατά των ‘ευαίσθητων’ στελεχών που παρήγαγαν VIM-1 (MIC ιμιπενέμης 2 και 4 μg/ml), και ελάχιστη κατά των ανθεκτικών στελεχών VIM-1 (MIC ιμιπενέμης 32 μg/ml). Ωστόσο, η χορήγηση



υψηλότερων δόσεων ιμιπενέμης (60 mg/kg κάθε 2 h) πέτυχε μια έκθεση στο φάρμακο περίπου 40% του χρόνου πάνω από την MIC ( $T > MIC$ ) και εντονότερη δραστηριότητα κατά όλων των στελεχών που παράγουν VIM-1, συμπεριλαμβανομένων και των ανθεκτικών. Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώθηκαν και από τη μελέτη των Σουλί και συν. (Souli et al, 2011) στην οποία οι καρβαπενέμες (ιμιπενέμη, μεροπενέμη και ερταπενέμη) φάνηκαν αποτελεσματικές στη θεραπεία πειραματικού ενδοκοιλιακού αποστήματος σε κονίκλους από ευαίσθητο στις καρβαπενέμες στέλεχος *E.coli* που παράγει VIM-1 αν και η θεραπεία με αζτρεονάμη έδειξε τα καλύτερα κλινικά και μικροβιολογικά αποτελέσματα.

Εν τούτοις η κλινική αποτελεσματικότητα της αζτρεονάμης κατά των Εντεροβακτηριακών που παράγουν μέταλλο-β-λακταμάσες δεν έχει επαρκώς μελετηθεί επί του παρόντος ενώ η μονοθεραπεία με καρβαπενέμη δεν απεδείχθη ότι είναι μια αξιόπιστη θεραπευτική επιλογή στην κλινική πράξη. Σε συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας που αφορά βακτηριαμίες από *K.pneumoniae* με καρβαπενεμάση (Daikos GL et al, 2012), η μονοθεραπεία με καρβαπενέμες είχε επιτυχές κλινικό αποτέλεσμα στο 68.4% των περιπτώσεων. Αυτό το ποσοστό ήταν υψηλότερο σε σχέση με αυτό που επιτεύχθηκε με τη μονοθεραπεία με κολιστίνη ή με τιγκεκυκλίνη, ωστόσο δεν ήταν σημαντικά διαφορετικό από τη θεραπεία με «ακατάλληλο» φάρμακο. Η μονοθεραπεία με καρβαπενέμες για τη θεραπεία των λοιμώξεων αυτών δεν συστήνεται.

## **1.6.2 Άλλες αντιμικροβιακές ουσίες**

Πολύ συχνά τα στελέχη που παράγουν μέταλλο-β-λακταμάσες έχουν πρόσθετα γονίδια στα ίδια ή σε διαφορετικά πλασμίδια, που προσδίδουν αντοχή στις αμινογλυκοσίδες, τις νεότερες κινολόνες, την τριμεθοπρίμη/ σουλφαμεθοξαζόλη, τις τετρακυκλίνες και άλλες ομάδες αντιμικροβιακών, αφήνοντας πολύ λίγες διαθέσιμες θεραπευτικές επιλογές. Τα αντιβιοτικά που αναμένεται να μην έχουν διασταυρούμενη αντοχή με τις β-λακτάμες και πιθανώς παραμένουν δραστικά έναντι των στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες είναι τα ακόλουθα:

### 1.6.2.1 Κολιστίνη

Η εμφάνιση πολυανθεκτικών Gram-αρνητικών οδήγησε στην αναβίωση των πολυμυξινών, μιας παλιάς κατηγορίας αντιβιοτικών κυκλικών πολυπεπτιδίων, που

ανακαλύφθηκαν το 1947. Η ομάδα αποτελείται από τις πολυμυξίνες A-E, μεταξύ των οποίων μόνο η πολυμυξίνη B και η πολυμυξίνη E (κολιστίνη) βρίσκονται σήμερα σε κλινική χρήση. Η κολιστίνη είναι δραστική *in vitro* έναντι των Εντεροβακτηριακών (συμπεριλαμβανομένων και των στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες) και των πολυανθεκτικών στελεχών *P. aeruginosa* και *Acinetobacter*. Μελέτες *in vitro* υποδεικνύουν, ότι η κολιστίνη διατηρεί δραστικότητα κατά των στελεχών, που παράγουν καρβαπενεμάση με ελάχιστες ανασταλτικές πυκνότητες (MIC) γενικά  $\leq 1 \text{ mg/L}$ . Μεταξύ 66 στελεχών που παρήγαγαν καρβαπενεμάσες που απομονώθηκαν στο Ηνωμένο Βασίλειο, το 92.4% ήταν ευαίσθητο στην κολιστίνη (Livermore D.M. et al, 2011) και σε μια συλλογή πολυανθεκτικών στελεχών *K.pneumoniae* που απομονώθηκαν από την Ελλάδα, τα ποσοστά ευαισθησίας στην κολιστίνη ήταν 84.7% (Souli M et al, 2006). Παρ'όλα αυτά η κλινική αποτελεσματικότητα της μονοθεραπείας με κολιστίνη κατά των σοβαρών λοιμώξεων, που προκαλούν τα στελέχη που παράγουν καρβαπενεμάσες παραμένει απρόσμενα χαμηλή. Σε πρόσφατη συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας η οποία συμπεριέλαβε τις δημοσιευμένες περιπτώσεις βακτηριαιμίας από στελέχη *K.pneumoniae* που παρήγαγαν καρβαπενεμάσες, μεταξύ 432 ασθενών οι 98 έλαβαν μονοθεραπεία με κολιστίνη και από αυτούς η έκβαση στο 45,9% χαρακτηρίστηκε ως αποτυχία. Επιπλέον στην ίδια μελέτη, η μονοθεραπεία με κολιστίνη δεν ήταν σημαντικά διαφορετική από τη θεραπεία με «ακατάλληλο» φάρμακο (Daikos GL et al, 2012). Σε ανάλογο συμπέρασμα είχαν καταλήξει οι Hirsch and Tam, που έκαναν ανασκόπηση σε 15 μελέτες και συνολικά 55 ασθενείς που έπασχαν από λοίμωξη με στελέχη *K.pneumoniae* που παρήγαγαν KPC (Hirsch EB et al, 2010). Πολλοί παράγοντες μπορεί να συμβάλλουν στη φτωχή κλινική αποτελεσματικότητα της κολιστίνης. Τα συνήθη δοσολογικά σχήματα της κολιστίνης δεν επιτυγχάνουν συγκεντρώσεις στον ορό, οι οποίες να είναι επαρκείς για τη θεραπεία λοιμώξεων, που οφείλονται σε παθογόνα με MIC μεγαλύτερες από 0.5 mg/L. Εξάλλου, με τα καθιερωμένα δοσολογικά σχήματα, η συγκέντρωση σε σταθερή κατάσταση της κολιστίνης επιτυγχάνεται εντός δύο έως τριών ημερών. Αυτή η καθυστέρηση, που πιθανώς επηρεάζει αρνητικά την έκβαση του ασθενούς, μπορεί να ξεπεραστεί χορηγώντας μια δόση φόρτισης του φαρμάκου. Αρκετά σημαντικά χαρακτηριστικά της κολιστίνης, όπως η σχετικά μακρά ημίσεια ζωή, η εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση βακτηριοκτόνος δράση της *in vitro*, όπως και η πιθανή επαγωγή της προσαρμοστικής αντοχής (adaptive resistance) (Plachouras D et al, 2009; Daikos GL et al, 2010),

καθιστούν σαφώς επιτακτική τη χορήγηση μιας δόσης εφόδου, που ακολουθείται από μεγαλύτερες δόσεις συντήρησης σε μεγαλύτερα μεσοδιαστήματα (Garonzik SM et al, 2011). Ένα άλλο ανησυχητικό ζήτημα είναι η αυξανόμενη αντοχή στην κολιστίνη, που αναφέρθηκε από το 2007 στην Ελλάδα (Antoniadou A et al, 2007) και προσφάτως αναδεικνύεται και σε άλλα μέρη του κόσμου (Suh J.Y. et al, 2010; Τόθη Ά et al, 2010; Mezzatesta ML et al, 2011; Marchaim D et al, 2011) και σχετίζεται με την παρατεταμένη χρήση της (Matthaiou DK et al, 2008).

#### 1.6.2.2 Τιγεκυκλίνη

Η τιγεκυκλίνη είναι ένα ενδοφλέβιο αντιμικροβιακό ανάλογο της μινोकυκλίνης, πολλά υποσχόμενο ως μονοθεραπεία για ασθενείς με σοβαρές πολυμικροβιακές λοιμώξεις, συμπεριλαμβανομένων των πολυανθεκτικών μικροοργανισμών. Το φάσμα της περιλαμβάνει εκτός από τα πολυανθεκτικά στελέχη *A. baumannii*, τα Εντεροβακτηριακά που παράγουν ESBLs, KPC και VIM. Η τιγεκυκλίνη ήταν δραστική έναντι του συνόλου των 104 στελεχών Εντεροβακτηριακών, που παρήγαγαν καρβαπενεμάσες και συλλέχθηκαν από το 2000 έως το 2005 στα πλαίσια μιας πολυκεντρικής μελέτης (Castanheira M et al, 2008). Ωστόσο έχει αναφερθεί πρόσφατα σε πολλά μέρη του κόσμου, μια αύξηση του ποσοστού αντοχής στη τιγεκυκλίνη μεταξύ των στελεχών *Enterobacter* και *Klebsiella*. Οι Livermore και συνεργάτες ανέφεραν ένα ποσοστό ευαισθησίας της τάξεως του 44% μεταξύ 66 σύγχρονων στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάση (Livermore DM et al, 2011).

Το 2010, η Αμερικανική Υπηρεσία Διαχείρισης Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration-FDA) εξέδωσε οδηγία, κατά της χρήσης της σε σοβαρές λοιμώξεις (FDA Drug Safety Communication: Increased Risk of Death with Tygacil (Tigecycline) Compared to Other Antibiotics Used to Treat Similar Infections.[<http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm224370.htm>]). Πρόσφατη μετα-ανάλυση έδειξε ότι η θεραπεία με τιγεκυκλίνη πιθανώς να συνδέεται με αυξημένη θνητότητα ειδικά στις σοβαρές λοιμώξεις συμπεριλαμβανομένων των βακτηριαμίων και πνευμονιών που σχετίζονται με αναπνευστήρα. Και οι δύο αυτές λοιμώξεις παραμένουν εκτός των εγκεκριμένων ενδείξεων του φαρμάκου (Yahav D et al, 2011). Η περιορισμένη θεραπευτική αποτελεσματικότητα στις αιματογενείς λοιμώξεις, από στελέχη *Klebsiella* που παράγουν καρβαπενεμάσες θα πρέπει μάλλον να αποδοθεί στη βακτηριοστατική δράση του φαρμάκου και στο προβληματικό

φαρμακοκινητικό και φαρμακοδυναμικό προφίλ του. Με το καθιερωμένο δοσολογικό σχήμα της τιγκεκυκλίνης (50mg δύο φορές ημερησίως) οι μέγιστες συγκεντρώσεις του φαρμάκου στον ορό είναι συνήθως χαμηλές και δεν ξεπερνούν το 1mg/L (Agwuh KN et al, 2006).

Επιπλέον, στην ανασκόπηση των Δαΐκου και συνεργατών που αναφέρθηκε ανωτέρω, η τιγκεκυκλίνη ως μονοθεραπεία ήταν απογοητευτική με ένα ποσοστό αποτυχίας 47.2% και δεν ήταν ανώτερη μιας μη δραστικής θεραπείας (Daikos GL et al, 2012).

Αυτά τα στοιχεία συστήνουν ξεκάθαρα την αποφυγή της μονοθεραπείας με τιγκεκυκλίνη σε λοιμώξεις από στελέχη που παράγουν καρβαπενεμάση. Οι κλινικοί ιατροί θα πρέπει να υιοθετήσουν μια προσεκτική προσέγγιση στη χρήση της τιγκεκυκλίνης εντός των εγκεκριμένων κλινικών ενδείξεων.

#### 1.6.2.3 Αμινογλυκοσίδες

Σε ορισμένες γεωγραφικές περιοχές συμπεριλαμβανομένης της Ελλάδας, η γενταμικίνη παραμένει η πιο δραστική αμινογλυκοσίδη in vitro κατά των Εντεροβακτηριακών που παράγουν καρβαπενεμάσες. Παρ' όλα αυτά, η μονοθεραπεία είχε χαμηλά ποσοστά κλινικής αποτελεσματικότητας, που έφταναν στο 62.5% των ασθενών με βακτηριαμία σύμφωνα με την ανασκόπηση των Δαΐκου και συνεργατών (Daikos GL et al, 2012) ενώ δεν μείωσε τη θνητότητα των βακτηριαμιών από KPC-θετική *K.pneumoniae* στην ανασκόπηση των Tumbarello και συνεργατών (Tumbarello M et al, 2012).

#### 1.6.2.4 Φωσφομυκίνη

Η φωσφομυκίνη, ένα ξεχασμένο αντιβιοτικό που αναστέλλει τη σύνθεση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος, ανακαλύφθηκε πριν 40 περίπου χρόνια και διαθέτει μια υποσχόμενη δράση in vitro κατά των στελεχών *K. pneumoniae*, που είναι ανθεκτικά στις καρβαπενέμες (Falagas ME et al, 2010). Μεταξύ των 66 στελεχών που παρήγαγαν καρβαπενεμάση από το Ηνωμένο Βασίλειο, το 51.5% ήταν ευαίσθητα στη φωσφομυκίνη (Livermore DM et al, 2011), ενώ σε μια συλλογή από 24 στελέχη που παρήγαγαν μέταλλο-β-λακταμάση και από 79 στελέχη που παρήγαγαν καρβαπενεμάσες από την Ελλάδα, 83.3% και 94.9% αντίστοιχα ήταν ευαίσθητα (Falagas ME et al, 2010). Σε προοπτική κλινική μελέτη η φωσφομυκίνη δόθηκε ενδοφλεβίως σε 2-4 gr κάθε 6 ώρες για 14±5.6 ημέρες, σε συνδυασμό με άλλα

αντιβιοτικά σε 11 ενήλικες ασθενείς ΜΕΘ με λοιμώξεις από *K. pneumoniae* ανθεκτικών στην καρβαπενέμη (Michalopoulos A et al, 2010). Όλοι οι ασθενείς είχαν θετική μικροβιολογική και κλινική έκβαση με συνολική θνητότητα 18.2%. Δεν αναφέρθηκαν ανεπιθύμητες ενέργειες. Η περιορισμένη κλινική εμπειρία με τη φωσφομυκίνη κάνουν επιτακτική την ανάγκη διενέργειας καλά οργανωμένων κλινικών μελετών για την αποτελεσματικότητα της σε λοιμώξεις από στελέχη που παράγουν καρβαπενεμάση. Θα πρέπει να τονιστεί ωστόσο ότι η μονοθεραπεία με φωσφομυκίνη είναι απαγορευτική εξαιτίας της ταχείας ανάπτυξης αντοχής κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Επί του παρόντος τα καταλληλότερα δοσολογικά σχήματα είναι άγνωστα, αλλά υπάρχουν κάποια δεδομένα in vitro που υποδεικνύουν ότι η συνέργεια με τις καρβαπενέμες θα πρέπει να αναμένεται στο 30-78% και με την κολιστίνη ή την τιγκεκυκλίνη στο 35% για τα στελέχη *K.pneumoniae*, που παράγουν ΚΡC. Επιπροσθέτως, οι συνδυασμοί φωσφομυκίνης με μεροπενέμη, κολιστίνη ή γενταμικίνη φαίνεται ότι αποτρέπουν την ανάπτυξη αντοχής στη φωσφομυκίνη (Souli M et al, 2011).

#### 1.6.2.5. Άλλες ομάδες αντιμικροβιακών

Δεδομένα in vitro δείχνουν ότι άλλοι παράγοντες όπως νεότερες κινολόνες, χλωραμφενικόλη ή τεμοσιλλίνη διατηρούν in vitro δραστηριότητα έναντι κάποιων στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες. Σε στελέχη από το Ηνωμένο Βασίλειο τα ποσοστά ευαισθησίας αυτών των αντιμικροβιακών αναφέρθηκαν στο 20%, 24% και 4.5% αντίστοιχα (Livermore DM et al, 2010), ωστόσο, λείπει η κλινική εμπειρία με τους ανωτέρω παράγοντες. Τα μόνα δημοσιευμένα δεδομένα περιλαμβάνουν μια αναφορά από επιδημία σε νοσοκομείο στην Αυστραλία, όπου τα περισσότερα Εντεροβακτηριακά που παρήγαγαν IMP-4, ήταν ευαίσθητα στις κινολόνες, ενώ τέσσερις ασθενείς που μολύνθηκαν από *K. pneumoniae*, *S. marcescens* και *E. cloacae* με καρβαπενεμάση θεραπεύτηκαν επιτυχώς με κινολόνη (Peleg Anton Y et al, 2010).

#### **1.6.3 Νεότερες ουσίες**

Η έλλειψη νέων αντιμικροβιακών ουσιών, δραστικών ενάντια σε πολυανθεκτικά gram-αρνητικά παθογόνα είναι αποτέλεσμα κυρίως των δυσκολιών και κατά συνέπεια του μεγάλου κόστους που έχει η διαδικασία ανάπτυξης και

κυκλοφορίας των ουσιών αυτών. Ωστόσο η παραγωγή μιας σειράς από νέα προϊόντα βρίσκεται σε εξέλιξη.

#### 1.6.3.1 Σουλφακτάμες.

Αποτελούν μια ξεχωριστή σειρά μονοκυκλικών β-λακταμών (το tigemonam είναι το πρώτο μέλος) και εμφανίζουν ισχυρή δραστικότητα έναντι των εντεροβακτηριακών. Επιπλέον, όπως και άλλες συναφείς δομικά μονοκυκλικές ενώσεις, όπως η αζτρεονάμη, είναι σχεδόν ανεπηρέαστες από την υδρολυτική δράση των MBLs. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει μια νέα ομάδα σιδηροφόρων (siderophore-coupled) σουλφακταμών που εκπροσωπείται από το BAL30072 (Page M. G. et al, 2010). Τα συνδεδεμένα σιδηροφόρα ενισχύουν τη δράση τους σε βάρος των μικροβίων που παράγουν MBL διευκολύνοντας το ποσοστό εισόδου μέσω της εξωτάτης μεμβράνης, ακόμη και σε στελέχη με ελαττωματική διαπερατότητα (Page M. G. et al, 2009). Πειράματα σε ζώα υποστηρίζουν περαιτέρω τις θεραπευτικές δυνατότητες της BAL30072 κατά των εντεροβακτηριακών που παράγουν MBLs (Miriagou V. et al, 2010).

#### 1.6.3.2 Πλαζομισίνη

Η πλαζομισίνη είναι ένα παράγωγο της σισομισίνης με υποκατάσταση στις θέσεις 1 και 6 (α υδροξυαμινοβουτυρικό οξύ και υδροξυαιθυλο ομάδα, αντίστοιχα). Αυτό το αντιμικροβιακό αντιστέκεται στα ένζυμα που τροποποιούν τις αμινογλυκοσίδες και εμφανίζει ισχυρή βακτηριοκτόνο δράση κατά πολλών πολυανθεκτικών μικροβίων (Livermore, D. M. et al, 2011; Galani et al, 2012).

#### 1.6.3.3 Αναστολείς της αμινοακυλο-tRNA συνθετάσης.

Έως πρόσφατα, αυτή η κατηγορία φαρμάκων περιλάμβανε μόνο την μουπιροσίνη. Η ανάπτυξη των νέων αναστολέων αμινοακυλο-tRNA συνθετάσης που περιέχουν βόρον, προστεθεί σε αυτήν την κατηγορία ενώσεων χαρακτηριστικά φαρμακοκινητικής κατάλληλα για συστηματική χρήση και δραστικότητα κατά των Gram-αρνητικών. Μια πολλά υποσχόμενη ουσία, η GSK2251052, αναστέλλοντας την leucyl-tRNA συνθετάση, είναι αποτελεσματική ενάντια σε μικρόβια που παράγουν καρβαπενεμάσες (Alley D., 2011).

#### 1.6.3.4 Αναστολείς καρβαπενεμασών.

Παρά τις προσπάθειες σχεδόν τριών δεκαετιών για την ανάπτυξη αναστολέων των β-λακταμασών, μόνο τρεις, το κλαβουλανικό οξύ, η ταζομπακτάμη, και η σουλμπακτάμη, χρησιμοποιούνται σε κλινικό επίπεδο. Ένας αριθμός νέων αναστολέων β-λακταμασών είναι υπό αξιολόγηση. Η πλειοψηφία των ενώσεων είναι επί του παρόντος παράγωγα β-λακτάμης, ωστόσο μελετάται και ένας αριθμός μη-β-λακταμικών ουσιών που παρουσιάζουν επίσης σημαντική ανασταλτική δράση. Οι παρακάτω ουσίες φαίνεται να έχουν δράση έναντι των MBLs.

#### 1.6.3.5 1 - β-μεθυλκαρβαπενέμες.

Προέκυψαν από αντικαταστάσεις στον πυρήνα καρβαπενεμών που περιέχουν μια μεθυλική ομάδα στη θέση C-1 (τον ίδιο πυρήνα όπως στη δοριπενέμη). Ενδιαφέροντα μέλη της ομάδας είναι οι ενώσεις J-110, 411 και J-111, 225 που αναστέλλουν τις τάξεις A και C β-λακταμάσες όπως και τις τύπου IMP MBLs σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Nagano R. et al, 1999; Nagano R. et al, 2000).

#### 1.6.3.6 Σουλφόνες.

Ενώσεις με υποκατάσταση μερκαπτομεθυλίου στην θέση C-6 παρουσιάζουν ισχυρή ανασταλτική δράση κατά των MBLs (Buynak J. D. et al, 2004).

#### 1.6.3.7 Σουξινικά οξέα.

(Μη β-λακτάμες). Διάφορα παράγωγα σουξινικού οξέως [2, 3 - (S, S)-σουξινικά οξέα] παρουσιάζουν ισχυρή ανασταλτική δράση κατά του τύπου τύπου IMP MBLs (Moloughney J. G. et al, 2005).

#### 1.6.3.8 Θειόλες.

(Μη β-λακτάμες). Οι θειολικές ενώσεις, όπως το θειομανδελικό οξύ, θεωρούνται αποτελεσματικοί αναστολείς των MBLs ιδιαίτερα των τύπων VIM και IMP. Δρουν μέσω της γεφύρωσης των ιόντων ψευδαργύρου από το ενεργό κέντρο, εκτοπίζοντας έτσι το καταλυτικό μόριο του νερού (Lienard, B. M. et al, 2008; Yamaguchi Y. et al, 2007).

#### 1.6.4 Σύγχρονες απόψεις για τη θεραπεία λοιμώξεων από στελέχη που παράγουν MBL

Η σύγχρονη προσέγγιση στη θεραπεία των δυσίατων αυτών λοιμώξεων διαμορφώνεται από δεδομένα που προέρχονται κυρίως από προοπτικές ή αναδρομικές μελέτες παρατήρησης και στηρίζεται στη χρήση συνδυασμών αντιβιοτικών. Από την προοπτική μελέτη των Δαΐκου και συνεργατών (Daikos GL et al, 2009) φάνηκε ότι η μονοθεραπεία (συμπεριλαμβανομένων των καρβαπενεμών) για την αντιμετώπιση της βακτηριαιμίας από στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν VIM-1, είχε ως αποτέλεσμα ποσοστό θνητότητας παραπλήσιο αυτού, που παρατηρήθηκε σε ασθενείς, που έλαβαν ακατάλληλη θεραπεία (μη-δραστικό φάρμακο) (27% έναντι 27.8%), ενώ η χαμηλότερη θνητότητα παρατηρήθηκε στην ομάδα των ασθενών, που έλαβαν δύο δραστικά φάρμακα, ένα από τα οποία θα μπορούσε να είναι μία καρβαπενέμη (8.3%). Πρόσφατη συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας από τον Δαΐκο και συνεργάτες (Daikos GL et al, 2012) επιβεβαίωσε ότι ο συνδυασμός ήταν ανώτερος της μονοθεραπείας ( $p=0.02$ ,  $OR=1.97$ ,  $95\%CI=1.13-3.40$ ) και της ‘ακατάλληλης’ θεραπείας ( $p=0.006$ ,  $OR=2.8$ ,  $95\%CI=1.4-5.7$ ) και τα σχήματα που περιελάμβαναν καρβαπενέμη ήταν σημαντικά πιο αποτελεσματικά απ’ότι τα σχήματα χωρίς καρβαπενέμη ( $p=0.01$ ,  $OR=1.97$ ,  $95\%CI=1.13-3.40$ ). Αυτά τα ευρήματα υποστηρίζονται και από άλλες πρόσφατες αναφορές (Qureshi ZA et al, 2012; Mouloudi E et al, 2010). Επιπλέον, οι Tumbarello και συνεργάτες, ανέφεραν ακόμα καλύτερα κλινικά αποτελέσματα με τη χρήση τριών παραγόντων συμπεριλαμβανομένων των καρβαπενεμών για τη θεραπεία λοιμώξεων από στελέχη που παράγουν KPC (Tumbarello M et al, 2012). Με αυτά τα δεδομένα, οι Δαΐκος και συνεργάτες πρότειναν ένα θεραπευτικό αλγόριθμο, όπου για τα στελέχη με MIC καρβαπενεμών  $\leq 4\mu\text{g/ml}$ , θα πρέπει να προτιμάται ένας συνδυασμός καρβαπενέμης μαζί με ένα άλλο δραστικό αντιμικροβιακό, ενώ σε MIC  $> 4\mu\text{g/ml}$  θα πρέπει να χρησιμοποιείται συνδυασμός που περιλαμβάνει δύο άλλους δραστικούς αντιμικροβιακούς παράγοντες (Daikos GL et al, 2012).



## 1.7. Έλεγχος Λοιμώξεων

Η εμπειρία από διάφορες χώρες, κυρίως την Ελλάδα (Buzala G. et al, 2011) και το Ισραήλ (Cuzon G. et al, 2010), έδειξαν ότι η μετάδοση των Gram αρνητικών μικροβίων που παράγουν καρβαπενεμάσες αποτελώντας σοβαρή απειλή για το σύστημα υγείας κάθε χώρας. Η έλλειψη σωστής και έγκαιρης αντιμετώπισης είναι συχνό φαινόμενο.

Τα προτεινόμενα μέτρα ελέγχου διαφέρουν σημαντικά μεταξύ περιοχών με σποραδική εμφάνιση ή πλήρη απουσία πολυανθεκτικών Gram-αρνητικών μικροβίων και των χωρών με συνεχή κρούσματα ή ενδημικά πολυανθεκτικά Gram-αρνητικά στελέχη. Το προτεινόμενο σχέδιο ελέγχου έχει γενικό χαρακτήρα, και μπορεί να εφαρμοσθεί στη περίπτωση οποιουδήποτε απειλητικού πολυανθεκτικού βακτηρίου που σχετίζεται με υψηλά ποσοστά θανάτων, και που έχει υψηλή δυναμική για εξάπλωση σε μονάδες υγειονομικής περίθαλψης και στη συνέχεια περαιτέρω στην κοινότητα.

Η λογική του σχεδίου είναι ότι η έγκαιρη ανίχνευση και παρέμβαση είναι πολύ πιο πιθανό να ματαιώσει μια επικείμενη επιδημία. Απαιτείται ένα σχέδιο ετοιμότητας και εξασφάλισης πόρων το οποίο, μακροπρόθεσμα, θα είναι πολύ λιγότερο δαπανηρό από την αντιμετώπιση μιας επιδημίας. Όταν η ενδημικότητα έχει εγκατασταθεί, απαιτείται μια περιφερειακά συντονισμένη προσπάθεια για τη συγκράτηση της επιδημίας.

### 1.7.1. Κέντρα με σποραδική εμφάνιση ή πλήρη απουσία MBLs

Ο αποτελεσματικός έλεγχος των MBLs επιβάλλει την ανάπτυξη ενός σχεδίου ετοιμότητας, διαμορφωμένο ειδικά για κάθε μονάδα υγειονομικής περίθαλψης, έτσι ώστε να καταστεί δυνατή η ταχεία εφαρμογή του όταν ανιχνευθεί και επιβεβαιωθεί μικροβιολογικά το πρώτο περιστατικό. Ο στόχος των μέτρων ελέγχου των λοιμώξεων σε αυτά τα κέντρα θα πρέπει να είναι πλήρης εξάλειψη, σύμφωνα με την κλασική στρατηγική «αναζήτησε και κατάστρεψε» η οποία βασίζεται σε έννοιες που έχουν ήδη περιγραφεί (Daikos, G. L. et al, 2007; Daikos, G. L. et al, 2011). Ωστόσο, η προσέγγιση αυτή πρέπει να προσαρμόζεται στην τοπική επιδημιολογία των MBLs.

Η αξιόπιστη ανίχνευση του πρώτου κρούσματος σε μια δεδομένη περιοχή ή νοσοκομείο είναι ζωτικής σημασίας για την έγκαιρη υλοποίηση των παρεμβάσεων. Η μικροβιολογική ανίχνευση αποτελεί σε πολλές περιπτώσεις πρόκληση (Bulik, C. C. Et al, 2011). Όλα τα μικροβιολογικά εργαστήρια θα πρέπει να έχουν στη διάθεση τους μια εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδο ανίχνευσης. Αν αυτό το κρίσιμο βήμα αγνοηθεί, η ανίχνευση των στελεχών που παράγουν MBLs θα καθυστερήσει, οδηγώντας σε εστίες που είναι δύσκολο να αντιμετωπισθούν, όπως έχει ήδη περιγραφεί σε πολλές χώρες (Wendt et al., 19th Society of Healthcare Epidemiology of America Scientific Meeting, 2009, Abstract 365). Ένα εργαστήριο αναφοράς πρέπει να παρέχει εφεδρική υποστήριξη, με ταχεία επιβεβαίωση των ύποπτων περιπτώσεων στελεχών που παράγουν MBLs.

Σε όλη την Ευρώπη, πρέπει να καθιερωθούν ενεργητικές πολιτικές ελέγχου, καθορίζοντας ποιοι ασθενείς διατρέχουν υψηλό κίνδυνο αποικισμού ή λοίμωξης από στελέχη που παράγουν MBLs. Αυτή τη στιγμή, αυτοί οι παράγοντες κινδύνου αφορούν κυρίως προηγούμενες επαφές με ιατρικές μονάδες, όπως νοσοκομεία, μονάδες τεχνητού νεφρού, ή μονάδες μακροχρόνιας φροντίδας (Daikos, G. L. et al, 2007) - με γνωστά συνεχή κρούσματα στελεχών που παράγουν MBLs. Σε αυτούς τους ασθενείς, η προληπτική απομόνωση, ενώ αναμένονται οι καλλιέργειες αποικισμού θεωρείται επιβεβλημένη.

Η κύρια πηγή του ελέγχου επιτήρησης είναι τα κόπρανα ή το ορθικό επίχρισμα. Η μελέτη φοριών από άλλα σημεία του σώματος (π.χ. ρώθωνες, δέρμα) δεν φαίνεται να έχει καλύτερα αποτελέσματα. Σε ασθενείς με μόνιμες συσκευές (π.χ. ουροκαθετήρες, συσκευές παροχέτευσης), πρέπει να λαμβάνονται δείγματα και από τις εν λόγω περιοχές. Επιχρίσματα δέρματος, ούρα και πτύελα θα μπορούσαν επίσης να ελέγχονται σε ορισμένες ομάδες ασθενών, π.χ. ασθενείς με χρόνιες πληγές, μόνιμους ουροκαθετήρες, ενδοτραχειακούς σωλήνες.

Ένα σχέδιο δράσης για την ταχεία εφαρμογή των μέτρων ελέγχου των λοιμώξεων πρέπει να περιλαμβάνει όλα τα στοιχεία που παρατίθενται στον Πίνακα 7. Μέτρα απομόνωσης πρέπει να εφαρμοστούν, αν και σε πολλές περιπτώσεις η απλή απομόνωση επαφής δεν ήταν αρκετή για να σταματήσει τοπικές εστίες (Schechner V, TASMIC Cre Ομίλου, 48η και 46η ICAAC IDSA, 2008, Περίληψη K-3508) (Daikos G. L. et al, 2010), και χρειάστηκε cohorting των ασθενών με ειδικό αποκλειστικό προσωπικό. Πρέπει να παρέχεται μακροχρόνια παρακολούθηση και να γίνεται

έγκαιρη ειδοποίηση των υπευθύνων επί επανεισαγωγής ασθενών που είναι αποικισμένοι με μικροοργανισμούς με MBL. Βάσει των σημερινών δεδομένων δεν υπάρχει καμία ισχυρή ένδειξη υπέρ της χρήσης τοπικής ή συστηματικής αντιμικροβιακής θεραπείας με σκοπό την εκρίζωση του αποικισμού από πολυανθεκτικούς μικροοργανισμούς.

### **1.7.2. Κέντρα με ενδημικά στελέχη που παράγουν MBLs ή με εν εξελίξει περιφεριακές εστίες**

Όταν ο επιπολασμός των πολυανθεκτικών στελεχών λάβει μεγάλες διαστάσεις σε μια συγκεκριμένη περιοχή ή χώρα, τα αυστηρά μέτρα ελέγχου μπορούν να γίνουν πιο δύσκαμπτα και με μεγαλύτερο κόστος. Ωστόσο, λόγω των τεράστιων προβλημάτων δημόσιας υγείας που συνδέονται με την μετάδοση των μικροοργανισμών αυτών, η εφαρμογή αυστηρών μέτρων φαίνεται δικαιολογημένη, ακόμη και για περιοχές με εν εξελίξει εστίες ή εγκατεστημένη ενδημία.

Αυτά τα μέτρα ελέγχου θα πρέπει να επιδιώξουν τον μέγιστο περιορισμό των στελεχών που παράγουν MBLs, και πρέπει να περιλαμβάνουν μια πολύπλευρη προσέγγιση με διαφορετικές συνιστώσες, όπως συνοψίζονται στον Πίνακα 8. Κρίσιμη για ένα επιτυχημένο πρόγραμμα ελέγχου των μικροβίων αυτών είναι η ύπαρξη μιας εθνικής ομάδας εργασίας που θα συντονίζεται και θα υποστηρίζεται από την κεντρική αρχή δημόσιας υγείας με αρμοδιότητα στον έλεγχο των νοσοκομειακών λοιμώξεων. Οι στόχοι αυτής της ομάδας εργασίας είναι πολύπλευροι και περιλαμβάνουν υψίστης προτεραιότητας πεδία δράσης όπως αναφέρονται στον Πίνακα 9.

Σε τοπικό επίπεδο, είναι αναγκαία η ισχυρή δέσμευση από την πλευρά της διοίκησης των νοσοκομείων για τη διασφάλιση της επιτυχίας των προαναφερθέντων μέτρων περιορισμού, με την παροχή λογιστικής και οικονομικής υποστήριξης σε στενή συνεργασία με την εθνική ομάδα εργασίας. Είναι σημαντικό, τα μέτρα ελέγχου των λοιμώξεων να προσαρμόζονται στις τοπικές συνθήκες και τις συγκεκριμένους πτέρυγες του νοσοκομείου, λαμβάνοντας υπόψη τον επιπολασμό και την επίπτωση του αποικισμού και των λοιμώξεων από μικροοργανισμούς που παράγουν MBLs. Κατάρτιση και λεπτομερείς πληροφορίες πρέπει να παρέχονται στο αρμόδιο νοσηλευτικό προσωπικό. Οι κλινικοί γιατροί πρέπει να συνειδητοποιήσουν το πρόβλημα και να συμμετέχουν ενεργά στη διαδικασία, έτσι ώστε συνήθεις

δραστηριότητες περιθάλψης να διευθετούνται χωρίς να διακυβεύονται τα μέτρα ελέγχου των λοιμώξεων.

Η στενή συνεργασία με το μικροβιολογικό εργαστήριο είναι ζωτικής σημασίας, δεδομένης της ανάγκης για πολύ ειδική και ευαίσθητη ανίχνευση στελεχών που παράγουν MBLs, τόσο από κλινικά δείγματα όσο και από δείγματα επιδημιολογικού ελέγχου, αλλά και για την ταχεία αναφορά των αποτελεσμάτων. Μετά από μια αρχική φάση αναχαίτισης, κάθε νέο ενδονοσοκομειακό κρούσμα πρέπει να διερευνηθεί σε βάθος. Προκειμένου να αναγνωρισθούν γνωστοί φορείς MBL και να επιτευχθεί μακροπρόθεσμα η συγκράτηση της εξάπλωσης των MBL-θετικών στελεχών, πρέπει να επισημαίνεται η επανεισαγωγή τους μέσω ειδοποιήσεων που βασίζονται σε ηλεκτρονικά αρχεία ή άλλων σημάνσεων. Τυπική διαδικασία πρέπει να αποτελεί η σχετική πληροφόρηση σε περίπτωση μεταφοράς ασθενών μεταξύ ιδρυμάτων.

**Πίνακας 7.** Προτεινόμενο σχέδιο δράσης για την ταχεία εφαρμογή των μέτρων ελέγχου των λοιμώξεων σε χώρους με σποραδική εμφάνιση ή πλήρη απουσία Gram-αρνητικών που παράγουν καρβαπενεμάσες

---

- Εξέταση όλων των ασθενών σε επαφή με γνωστή πηγή
  - Επιδημιολογική έρευνα με ανάλυση των βαθύτερων αιτίων στις περιπτώσεις των νοσοκομειακών διασταυρούμενων περιπτώσεων μετάδοσης με περισσότερα από δύο δευτερεύοντα περιστατικά
  - Μέτρα για ενημέρωση του προσωπικού και της διοίκησης του νοσοκομείου
  - Αυστηρός έλεγχος των λοιμώξεων με στόχο την αναχαίτιση της μετάδοσης και την τελική εξάλειψη των νοσοκομειακών πολυανθεκτικών στελεχών
  - Ο συντονισμός και η εποπτεία από τις αρχές δημόσιας υγείας
- 

Τέλος, αξίζει να υπογραμμίζει ο ρόλος των γηροκομείων ως πιθανές δεξαμενές μικροοργανισμών που παράγουν MBLs ( Endimiani A. et al, 2009) Παρά το γεγονός

ότι τα δεδομένα εξακολουθούν να είναι λιγοστά, τα ιδρύματα αυτά είναι πιθανό να αντιπροσωπεύουν για τις καρβαπενεμάσες το ίδιο πρόβλημα που έχει επισημανθεί πρόσφατα για τις ESBLs (Rooney P.J. et al, 2009). Άμεση είναι η ανάγκη διεξαγωγής μελετών για την αξιολόγηση των παραγόντων κινδύνου και του επιπολασμού του αποικισμού με στελέχη που παράγουν MBLs.

**Πίνακας 8.** Προτεινόμενα μέτρα ελέγχου για τις χώρες με ενδημικά στελέχη που παράγουν MBLs ή με εν εξελίξει περιφερειακές εστίες

---

#### **Σε εθνικό επίπεδο**

- Δημιουργία μιας εθνικής ομάδας εργασίας, που υποστηρίζεται από το Υπουργείο Υγείας
  - Κατευθυντήριες γραμμές για την απομόνωση των φορέων σε όλα τα νοσοκομεία
  - Μηνιαίες εκθέσεις προόδου σχετικά με τον έλεγχο των MBL-θετικών στελεχών στα ενδιαφερόμενα ιδρύματα
  - Αξιολόγηση των ενδιαφερομένων νοσοκομείων και εντοπισμός των προβληματικών περιοχών από μια Υπηρεσία Δημόσιας Υγείας με αρμοδιότητα στον έλεγχο των λοιμώξεων
- 

#### **Σε επίπεδο νοσοκομείων**

- Ο φυσικός διαχωρισμός των φορέων από τους μη-φορείς
  - Αφοσιωμένο- αποκλειστικό προσωπικό
  - Ενεργητική επιτήρηση των ασθενών υψηλού κινδύνου
  - Εκπαίδευση και μέτρα ώστε να διατηρηθούν το προσωπικό και η διοίκηση του νοσοκομείου ενημερωμένα
  - Συνεχής επιτήρηση MBL-θετικών στελεχών με προοπτική συλλογή δεδομένων και καθημερινή καταγραφή των φορέων MBL
-

**Πίνακας 9.** Οι εθνικοί οργανισμοί και τα πεδία δράσης τους σε χώρες με ενδημικά στελέχη που παράγουν MBLs ή με εν εξελίξει περιφερειακές εστίες

---

#### **Εθνική ομάδα εργασίας**

- Χάραξης πολιτικής και επικοινωνία με τις διοικήσεις νοσοκομείων
  - Ανάπτυξη αυστηρών και λεπτομερών κατευθυντήριων γραμμών ελέγχου των στελεχών που παράγουν MBLs
  - Προετοιμασία συγκεκριμένων στρατηγικών παρέμβασης
  - Επίβλεψη των μέτρων ελέγχου και προετοιμασία των διορθωτικών ενεργειών στις περιπτώσεις εν εξελίξει εστιών σε ιδρύματα χωρίς επαρκή προληπτικά μέτρα
  - Ενεργητική επιτήρηση με ταχείες απαντήσεις σε περιφερειακό επίπεδο και σε εθνικό επίπεδο
- 

#### **Εργαστήρια αναφοράς**

- Επιβεβαίωση των ύποπτων περιπτώσεων στελεχών που παράγουν MBLs
  - Αξιολόγηση της μοριακής επιδημιολογίας και της κλωνικότητας
  - Ανίχνευση νέων μηχανισμών αντοχής
  - Ανάπτυξη εργαστηριακών εγχειριδίων με περιγραφές των κατάλληλων μεθόδων
  - Διασφάλιση της ποιότητας των εργαστηρίων κλινικής μικροβιολογίας
-

## **2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1 Περίληψη πειραματικής διαδικασίας**

Μελετήσαμε την επιδημιολογία των Εντεροβακτηριακών που παράγουν VIM καρβαπενεμάση στην αρχή της επιδημίας στην Μονάδα Εντατικής Θεραπείας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου «Αττικόν».

Κατά τη διάρκεια της μελέτης εισήχθησαν στη ΜΕΘ 240 ασθενείς, με μέσο όρο διάρκειας νοσηλείας 13,5 ημέρες. Σε όλους τους ασθενείς έγινε έλεγχος αποικισμού για ανθεκτικά στελέχη με καλλιέργειες από το ορθό, τον στοματοφάρυγγα (ή των βρογχικών εκκρίσεων για τους διασωληνωμένους), καλλιέργειες ούρων και υγρών από σημεία παροχέτευσης κατά την εισαγωγή τους και μια φορά την εβδομάδα. Επίσης σε περίπτωση αφαίρεσης κεντρικού καθετήρα το άκρο του καλλιεργείτο ημιποσοτικά .

Από τα 1345 Gram-αρνητικά στελέχη που απομονώθηκαν, 348 παρουσίασαν θετικό τεστ συνέργειας δίσκων Ιμιπενέμης-EDTA. Όλα ελέγχθηκαν με PCR για την ύπαρξη του γονιδίου *bla<sub>VIM</sub>* και τυποποιήθηκαν επιδημιολογικά με REP-PCR.

Από τους 23 ασθενείς που συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη, οι 12 αντιμετώπισαν μια ή περισσότερες λοιμώξεις από στέλεχος που παρήγαγε καρβαπενεμάση, ενώ οι υπόλοιποι ήταν απλά αποικισμένοι. Ογδόντα δύο στελέχη που αντιπροσώπευαν ένα στέλεχος από κάθε κλώνο, πηγή και ασθενή μελετήθηκαν περαιτέρω. Συνολικά μελετήθηκαν 77 στελέχη *Klebsiella pneumoniae*, δύο στελέχη *Enterobacter cloacae*, ένα στέλεχος *Citrobacter freundii* και δύο στελέχη *Pseudomonas aeruginosa*. Στα στελέχη αυτά έγινε νουκλεοτιδική αλληλούχιση του *bla<sub>VIM</sub>* γονιδίου και ελέγχθηκαν τα πλασμίδια τα οποία έφεραν. Έγιναν πειράματα βακτηριακής σύζευξης και ισοηλεκτρικής εστίασης για να ανιχνευθούν οι β-λακταμάσες που συνυπήρχαν με την καρβαπενεμάση VIM.

Κλινικά και επιδημιολογικά δεδομένα ελήφθησαν από το ιατρικό τους αρχείο. Για την διάγνωση του είδους της λοίμωξης ή του αποικισμού χρησιμοποιήθηκαν τα κριτήρια των Horan et al. (Horan T.C. et al, 2008). Βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από επιχρίσματα ορθού θεωρήθηκαν σε όλες τις περιπτώσεις αποικισμός.

## 2.2 Χώρος και ασθενείς

Η μελέτη έλαβε χώρα στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «ΑΤΤΙΚΟΝ» από τον Μάρτιο του 2004 έως τον Οκτώβριο του 2005. Η Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ) του νοσοκομείου ξεκίνησε την λειτουργία της τον Νοέμβριο του 2003. Κατά την διάρκεια της μελέτης το νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ περιελάμβανε 320 κλίνες, 6 από αυτές αφορούσαν κλίνες γενικής ΜΕΘ και εισήχθησαν σ' αυτή 240 ασθενείς, με μέσο όρο διάρκειας νοσηλείας 13,5 ημέρες.

## 2.3 Μελέτη αποικισμού

Σε όλους τους ασθενείς που εισάγονταν στην ΜΕΘ γινόταν έλεγχος αποικισμού για ανθεκτικά μικροβιακά στελέχη με καλλιέργειες από το ορθό, τον ρινοφάρυγγα (ή των βρογχικών εκκρίσεων για τους διασωληνωμένους), με καλλιέργειες ούρων και υγρών από σημεία παροχέτευσης κατά την εισαγωγή τους και μια φορά την εβδομάδα. Στην περίπτωση αφαίρεσης κεντρικού καθετήρα το άκρο του λαμβανόταν με άσηπτες συνθήκες και στη συνέχεια καλλιεργείτο ημιποσοτικά. Τα δείγματα καλλιεργούνται σε εκλεκτικά θρεπτικά υλικά που περιείχαν McConkey άγαρ με καθορισμένες συγκεντρώσεις αντιβιοτικών (κεφουροξίμη 5μg/ml, κεφταζιντίμη 5μg/ml, κεφοταξίμη 0.5μg/ml, ιμιπενέμη 4μg/ml, πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη 128/4μg/ml, με ένα αντιβιοτικό ανά τρυβλίο). Ακολουθούσε τυποποίηση, έλεγχος ευαισθησίας και φαινοτυπικά τεστ.

## 2.4 Βακτηριακά στελέχη

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν όλα τα Gram αρνητικά παθογόνα στελέχη, όπως επίσης και στελέχη αποικισμού από κάθε ασθενή με θετικό έλεγχο συνέργιας δίσκων Ιμιπενέμης-EDTA. Ένα στέλεχος από κάθε κλώνο, προέλευση και ασθενή συμπεριλήφθηκαν στην τελική ανάλυση.

Στην μελέτη χρησιμοποιήθηκαν επίσης τα εργαστηριακά στελέχη:

- i. Το στέλεχος *E. coli* RC85 R- K12, Rif<sup>R</sup> (ανθεκτικό στη ριφαμπικίνη) χρησιμοποιήθηκε σαν στέλεχος δέκτης στα πειράματα σύζευξης.
- ii. Το πρότυπο στέλεχος *E. coli* ATCC25922 χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα ελέγχου ευαισθησιών.



- iii. Το πρότυπο στέλεχος *P.aeruginosa* ATCC27853 χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα ελέγχου ευαισθησιών.

## **2.5 Τυποποίηση και αντιμικροβιακή ευαισθησία**

### **2.5.1 Τυποποίηση βακτηριακών στελεχών**

Η τυποποίηση των βακτηριακών στελεχών έγινε με το σύστημα API ID32GN και ID32E (Bio Merieux, Marcy-l-Etoile, France) το οποίο προσδιορίζει το είδος κάθε βακτηρίου με βάση τις βιοχημικές του ιδιότητες. Το σύστημα API ID32 προσδιορίζει 32 διαφορετικές βιοχημικές ιδιότητες. Τα αντιδραστήρια τα οποία βρίσκονται αφυδατωμένα εμβολιάζονται με εναιώρημα κυττάρων του υπό εξέταση μικροοργανισμού. Επωάζονται στους 37°C για 16h και στη συνέχεια καταγράφονται οι αλλαγές χρώματος. Η ανάγνωση του αποτελέσματος και η τελική τυποποίηση του μικροοργανισμού έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας με βάση τον αλγόριθμο που παρέχει.

### **2.5.2 Έλεγχος αντιβιογράμματος κατά Kirby Bauer**

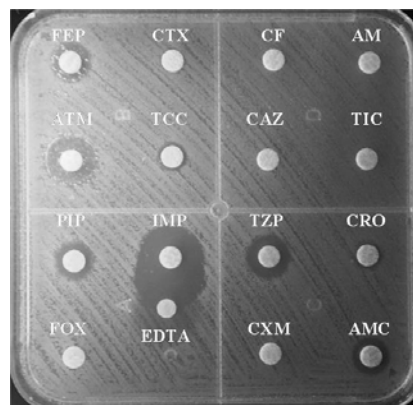
Η μελέτη της ευαισθησίας στα αντιμικροβιακά πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο διάχυσης σε δίσκο σε άγαρ Mueller- Hinton II (MH) (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA). Τα στελέχη ελέγχθηκαν περαιτέρω με την μέθοδο συνέργιας διπλού δίσκου (DDST) για την ύπαρξη ευρέος φάσματος β-λακταμασών σύμφωνα με τις οδηγίες της CLSI (CLSI; 2009), ενώ ως φαινοτυπική μέθοδος ανίχνευσης παραγωγής MBL χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος συνέργιας δίσκων αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέως (EDTA)-Ιμιπενέμης (Εικόνα 5) (Lee K. et al, 2001).

### **2.5.3 Μέθοδος συνέργιας διπλού δίσκου (DDST)**

Τα υπό δοκιμή στελέχη εμβολιάστηκαν σε ζωμό Mueller-Hinton σε θολερότητα ισοδύναμη με 0,5 McFarland και ενοφθαλμίστηκαν σε τρυβλία Mueller-

### **Εικόνα 5.**

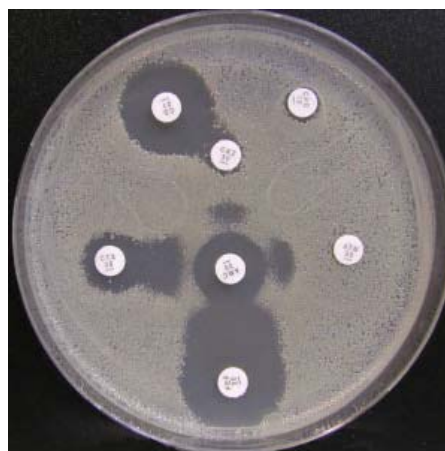
Αντιβιογράμμα β-λακταμικών αντιβιοτικών



Hinton άγαρ όπου τοποθετήθηκαν δίσκοι κεφοταξίμης (CTX), κεφταζιντίμης (CAZ), αζτρεονάμης (ATM), ή κεφεπίμης (FEP) (30μg το καθένα) σε απόσταση 20 mm (από κέντρο σε κέντρο) από ένα δίσκο που περιέχει αμοξυκιλίνη/κλαβουλανικό (AMC) (10μg). Θεωρούμε ότι η δοκιμασία είναι θετική για παρουσία ESBL όταν η ζώνη αναστολής της κεφαλοσπορίνης ή της ATM επεκταθεί παρουσία της AMC (Εικόνα 6). Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων έγινε μετά από επώαση σε πλάκες άγαρ στους 37 ° C για 18 ώρες.

### **Εικόνα 6.**

Έλεγχος συνέργιας διπλού δίσκου (DDST) για ανίχνευση ESBL



### **2.5.4 Μέθοδος συνέργιας δίσκων EDTA-Ιμιπενέμης**

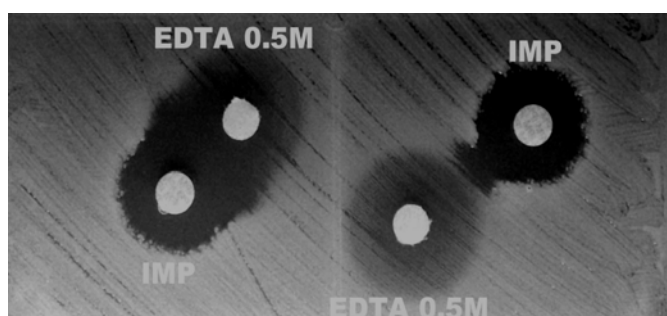
Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με Arakawa et al, 2000 και Lee et al, 2001 με ελαφρές τροποποιήσεις. Τα υπό δοκιμή στελέχη εμβολιάστηκαν σε ζωμό Mueller-Hinton σε θολρότητα ισοδύναμη με 0,5 McFarland και ενοφθαλμίστηκαν σε τρυβλία Mueller-Hinton άγαρ. Ένας δίσκος με 10 μg ιμιπενέμης (IMP) (Becton Dickinson) τοποθετήθηκε πάνω στο τρυβλίο, και ένας κενός δίσκος διηθητικού

χαρτιού (χάρτινο φίλτρο Whatman II, με διάμετρο 6 mm), τοποθετήθηκε σε απόσταση 10 mm (από άκρη σε άκρη). Δέκα μικρόλιτρα διαλύματος EDTA 0,5 M (~1900 mg disodium salt, dihydrate) προστέθηκαν στο κενό δίσκο. Μετά από ολονύκτια επώαση, η παρουσία οποιαδήποτε συνέργιας στη ζώνη αναστολής ερμηνεύθηκε ως θετική (Εικόνα 7).

---

### **Εικόνα 7.**

Έλεγχος συνέργιας δίσκων Ιμιπενέμης (IMP) και EDTA.



---

### **2.5.5 Προσδιορισμός ελάχιστων ανασταλτικών πυκνοτήτων**

Οι ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (MICs) στην ιμιπενέμη, μεροπενέμη, ντοριπενέμη, τιγκεκυκλίνη και κολιστίνη προσδιορίστηκαν με E-test (AB BIODISK, Solna, Sweden), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, ενώ για τις κεφταζιντίμη, αζτρεονάμη, κεφοταξίμη, κεφτριαξόνη, κεφεπίμη, πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη, κοτριμοξαζόλη, σιπροφλοξασίνη, αμικασίνη, τομπραμυκίνη και γενταμικίνη οι MICs προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της μικροδιάλυσης σε ζωμό Mueller- Hinton (Εικόνα 8) ( Lee et al, 2001). Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων για τα εντεροβακτηριακά έγινε σύμφωνα με τα όρια ευαισθησίας που προτείνονται από την CLSI (CLSI, 2012), με εξαίρεση την κολιστίνη και την τιγκεκυκλίνη για τα οποία χρησιμοποιήθηκαν τα όρια της EUCAST (τιγκεκυκλίνη  $S \leq 1$  mg/L και  $R > 2$  mg/L, κολιστίνη  $S \leq 2$  mg/L και  $R > 2$  (EUCAST; [www.eucast.org](http://www.eucast.org)). Για την *P. aeruginosa* χρησιμοποιήθηκαν τα όρια που προτείνονται από την CLSI (CLSI, 2012).

---

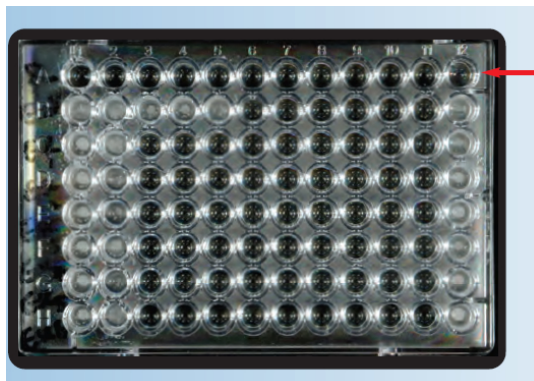
## **Εικόνα 8.** Προσδιορισμός ελάχιστων ανασταλτικών συγκεντρώσεων (MICs)

---

Μέθοδος E-test



Μέθοδος μικροδιάλυσης σε ζωμό



### **2.6 Βακτηριακή σύζευξη**

Η μέθοδος της βακτηριακής σύζευξης χρησιμοποιήθηκε για την μεταφορά πλασμιδίων από τα κλινικά στελέχη σε εργαστηριακό στέλεχος δέκτη για την διερεύνηση της ικανότητας τους να αυτομεταβιβάζονται καθώς και για τον έλεγχο των γονιδίων που εδράζονται σε αυτά. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται από τους Rice et al, 1996. Πειράματα σύζευξης πραγματοποιήθηκαν με τουλάχιστον ένα στέλεχος από κάθε κλώνο Α, Β, Γ, Δ, Ε, Ζ, Η, και Θ. Το ανθεκτικό στη ριφαμπικίνη (Rif<sup>R</sup>) *E. coli* RC85 R- K12 χρησιμοποιήθηκε σαν στέλεχος δέκτης. Αναλυτικά:

- i. Σε 4,5ml ζωμού BHI εμβολιάστηκαν 500μl ολονύκτιου καλλιεργήματος του στελέχους δέκτη (*E. coli* RC85 R- K12).
- ii. Σε 4,95ml ζωμού BHI εμβολιάστηκαν 50μl ολονύκτιου καλλιεργήματος του στελέχους δότη (κλινικό στέλεχος *K.pneumoniae*).
- iii. Σε 4,45ml ζωμού BHI εμβολιάστηκαν 500μl ολονύκτιου καλλιεργήματος του στελέχους δέκτη και 50μl ολονύκτιου καλλιεργήματος του στελέχους δότη.
- iv. Επώαση των καλλιεργημάτων για 6h στους 37<sup>0</sup>C.
- v. Διαδοχικές αραιώσεις 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup> των εναιωρημάτων σε φυσιολογικό ορό.

- vi. Εμβολιασμός 100μl από κάθε εναιώρημα σε τρυβλία McConkey τα οποία περιείχαν ριφαμπικίνη (128 mg/mL) και κεφταζιντίμη (16 mg/mL).
- vii. Επώαση των τρυβλίων στους 37<sup>0</sup>C για 18h.

Οι συχνότητες μεταφοράς εκφράστηκαν ως το κλάσμα του αριθμού των αποικιών στις οποίες έχει επιτευχθεί η σύζευξη προς τον αριθμό των δεκτών.

## **2.7. Ανίχνευση παραγωγής β-λακταμασών με ισοηλεκτρική εστίαση (IEF)**

### **2.7.1. Παρασκευή εκχυλισμάτων**

Τα εκχυλίσματα β-λακταμάσης των μητρικών στελεχών και των μετασυσζευγμένων *E. coli* παρασκευάστηκαν μετά από εξεργασία των βακτηριακών κυττάρων με υπερήχους. Μία αποικία εμβολιάσθηκε σε 5ml θρεπτικού ζωμού TSB και επώαστηκε ολονύκτια στους 37<sup>0</sup>C. 0,5ml από την ολονύκτια καλλιέργεια εμβολιάσθηκαν σε 10 ml ζωμό TSB και επώαστηκαν για 5-6 ώρες υπό συνεχή ανάδευση στους 37<sup>0</sup> C ώστε να προκύψει καλλιέργεια ημιλογαριθμικής φάσης ανάπτυξης. Τα βακτηριακά κύτταρα κατακρημνίστηκαν με φυγοκέντρηση στα 8,000xg για 15 λεπτά. Ακολούθησε αναδιάλυση των ιζημάτων και εκ νέου φυγοκέντρηση στις συνθήκες που περιγράφηκαν πιο πάνω. Το βακτηριακό ίζημα υπερηχήθηκε σε παγόλουτρο μέχρι να διαυγάσει (συνολικά για 2 λεπτά). Ακολούθησε υπερφυγοκέντρηση των υπερηχημένων κυτταρικών αιωρημάτων σε υπερφυγόκεντρο σε 39,500xg για 45 λεπτά προκειμένου να κατακρημνιστούν τα κυτταρικά ράκη. Το υπερκείμενο ενζυμικό παρασκεύασμα φυλάχτηκε στους -20<sup>0</sup> C.

### **2.7.2. Ισοηλεκτρική εστίαση**

Ο προσδιορισμός του ισοηλεκτρικού σημείου έγινε με τη μέθοδο της ισοηλεκτρικής εστίασης όπως περιγράφεται από τους Matthew και συν. (Rice L.B. et al, 1996). Η ισοηλεκτρική εστίαση πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα PhastGel polyacrylamide (pH, 3-9; Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) χρησιμοποιώντας το PhastSystem instrument (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Η εμφάνιση των ζωνών β-λακταμασών στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης έγινε με χρώση νιτροσεφίνης (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England). Τα ισοηλεκτρικά σημεία (pIs) προσδιορίστηκαν συγκριτικά με γνωστά pIs β-λακταμασών (Πίνακας 10).

	<b>Λακταμάσες</b>	<b>pIs</b>
<b>Πίνακας 10.</b> Πρότυπες β-λακταμάσες με γνωστά ισοηλεκτρικά σημεία	TEM-1	5.4
	TEM-2	5.6
	TEM-3	6.3
	TEM-4	5.9
	TEM-26	5.6
	TEM-28	6.1
	SHV-1	7.6
	SHV-2	7.7
	SHV-5	8.2

## 2.8. Απομόνωση ολικού γενωμικού DNA

Για την απομόνωση ολικού γενωμικού DNA χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Nucleospin Tissue της Macherey-Nagel σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας.

## 2.9. Αντίδραση PCR

Οι PCR αντιδράσεις έγιναν σύμφωνα με τους Πίνακα 11. Σε κάθε αντίδραση PCR ταυτόχρονα με τα υπό εξέταση DNA τοποθετούνταν δύο δείγματα μάρτυρες, ένας θετικός και ένας αρνητικός στον οποίο το DNA είχε αντικατασταθεί με νερό. Τα ενισχυμένα τμήματα του DNA στην συνέχεια υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

**Πίνακας 11.** PCR για την ανίχνευση γονιδίων β-λακταμασών ή αλληλουχιών REP

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
DNA	5 μl
Primer-F 10μM	2,5μl
Primer-R 10μM	2,5μl
ThermoPol Buffer 10X (με MgCl <sub>2</sub> )	2,5μl
dNTPs 200 μM (each)	2,5μl
H <sub>2</sub> O	9,75μl
Taq polymerase 5U/μl	0,25 μl

### 2.9.1 Ανίχνευση και ταυτοποίηση του γονιδίου *bla*<sub>VIM</sub>

Η PCR για την ανίχνευση του γονιδίου *bla*<sub>VIM</sub> έγινε με τη χρήση των εναρκτήριων ολιγονουκλεοτιδικών αλληλουχιών:

Primer-F (VIMB): 5'-ATG GTG TTT GGT CGC ATA TC-3'

Primer-R (VIMF): 5'-TGG GCC ATT CAG CCA GA TC-3'

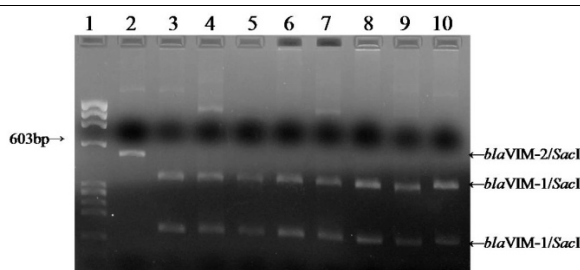
και σύμφωνα με τις συνθήκες που περιγράφονται στον Πίνακα 12.

**Πίνακας 12.** Συνθήκες PCR για την ανίχνευση του *bla*<sub>VIM</sub>

Αρχική αποδιάταξη στους 94 <sup>0</sup> C	5 min	
Αποδιάταξη 94 <sup>0</sup> C	1 min	35 κύκλοι
Πρόσδεση 56 <sup>0</sup> C	1 min	
Επιμύκησηση 72 <sup>0</sup> C	3 min	
Τελική επιμήκυνση στους 72 <sup>0</sup> C	7 min	
Αναμενόμενο PCR προϊόν: 509bp		

Το PCR προϊόν στη συνέχεια υποβλήθηκε σε πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση *Sac*I. Η χρήση της *Sac*I, διαφοροποιεί την ομάδα του *bla*<sub>VIM-1</sub> (*bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>VIM-4</sub>, *bla*<sub>VIM-5</sub>) από αυτήν του *bla*<sub>VIM-2</sub> (*bla*<sub>VIM-2</sub>, *bla*<sub>VIM-3</sub>, *bla*<sub>VIM-6</sub>, *bla*<sub>VIM-8</sub>, *bla*<sub>VIM-9</sub>, *bla*<sub>VIM-10</sub>) μια και η θέση πέψης της *Sac*I βρίσκεται στη θέση 515 μόνο των γονιδίων της ομάδας του *bla*<sub>VIM-1</sub> (Εικόνα 9).

**Εικόνα 9.** PCR-RFLP ανάλυση του *bla*<sub>VIM</sub>



## 2.9.2 Μοριακή τυποποίηση βακτηριακών στελεχών

Η μοριακή τυποποίηση πραγματοποιήθηκε με REP-PCR η οποία αποτελεί μια τεχνική βασισμένη στην PCR, χρησιμοποιεί κατάλληλους ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές και βασίζεται στις επαναλαμβανόμενες εξωγονιδιακές παλίνδρομες αλληλουχίες του DNA. Η REP-PCR έγινε σύμφωνα με τον Πίνακα 11 και τη χρήση των εναρκτήριων ολιγονουκλεοτιδικών αλληλουχιών:

Primer-F (REP-1): 5'-III GCG CCG ICA TCA GGC-3'

Primer-R (REP-2): 5'-ACG TCT TAT CAG GCC TAC-3'

και σύμφωνα με τις συνθήκες που περιγράφονται στον Πίνακα 13.

**Πίνακας 13.** Συνθήκες PCR για Μοριακή Τυποποίηση

Αρχική αποδιάταξη στους 95 <sup>0</sup> C	7min	
Αποδιάταξη 90 <sup>0</sup> C	30sec	30 κύκλοι
Πρόσδεση 40 <sup>0</sup> C	1 min	
Επιμύκηση 65 <sup>0</sup> C	8 min	
Τελική επιμήκυνση στους 65 <sup>0</sup> C	16 min	
Αναμενόμενο PCR προϊόν: Διάφορες ζώνες		

Τα ενισχυμένα τμήματα του DNA στην συνέχεια υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5%. Οι ζώνες της ηλεκτροφόρησης, μεγέθους μικρότερου των 6.6Kb, από το κάθε στέλεχος συγκρίθηκαν οπτικά μεταξύ τους. Θεωρήθηκαν διαφορετικά τα στελέχη εκείνα που το ηλεκτροφορητικό τους πρότυπο διέφερε σε περισσότερες από μια ζώνες, ανεξάρτητα από την ένταση των ζωνών.

## 2.9.3 Ανίχνευση γονιδίων άλλων β-λακταμασών

Η ανίχνευση των γονιδίων άλλων β-λακταμασών που έφεραν τα αρχικά καθώς και τα μετασυζευγμένα στελέχη έγινε με PCR σύμφωνα με τον πίνακα 11 και τη χρήση κατάλληλων εναρκτήριων ολιγονουκλεοτιδικών αλληλουχιών και συνθηκών που φαίνονται στον πίνακα 14.



**Πίνακας 14.** Primers και συνθήκες PCR για ανίχνευση γονιδίων β-λακταμασών

Γονίδιο	Primer (5'→3')	Θερμοκρασία πρόσδεσης (°C)	PCR προϊόν (bp)	Βιβλιογραφία
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	CGCTTTGCGATGTGCAG ACCGCGATATCGTTGGT	54	550	Bonnet et al, 2001
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	ATGCGTTATATTCGCCTGTG GTTAGCGTTGCCAGTGCTCG	60	865	Yuan M. et al, 2000
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	CATTCAAATATGTATCCGCTCATG CATCCATAGTTGCCTGACTCCCC	56	880	Speldooren et al, 1998
<i>bla</i> <sub>OXA</sub>	TCAACTTTCAAGATCGCA GTGTGTTTAGAATGGTGA	49	609	Speldooren et al, 1998

#### 2.9.4 Ανίχνευση και χαρακτηρισμός ιντεγκρονίων που φέρουν το *bla*<sub>VIM</sub>

Η ανίχνευση των ιντεγκρονίων και ο προσδιορισμός της σχέσης τους με το γονίδιο *bla*<sub>VIM</sub> έγινε με PCR. Σε κάθε μικροβιακό στέλεχος, στο οποίο ανιχνεύθηκε το *bla*<sub>VIM</sub> εφαρμόστηκαν αρχικά 2 διαφορετικές αντιδράσεις PCR για την ανίχνευση ιντεγκρονίου τάξης 1 και το συσχετισμό του με το γονίδιο *bla*<sub>VIM</sub>. Οι PCR βασίστηκαν στο συνδυασμό εκκινητών από τις σταθερές περιοχές του ιντεγκρονίου και εκκινητών που ενισχύουν γονίδιο *bla*<sub>VIM</sub>.

Πιο συγκεκριμένα για την πρώτη PCR χρησιμοποιήθηκε εκκινητής από την 5' σταθερή περιοχή του ιντεγκρονίου (Int-F: 5'-CGTTCACATACAGAAGCTG-3') και ο VIMF, ενώ για την δεύτερη χρησιμοποιήθηκε ο VIMB και εκκινητής από την 3' σταθερή περιοχή του ιντεγκρονίου (3'-CS: 5'-AAGCAGACTTGACCTGA-3'). Στη συνέχεια έγινε πλήρης χαρτογράφηση του ιντεγκρονίου με PCR και χρήση των εκκινητών του πίνακα 15.

**Πίνακας 15.** Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην χαρτογράφηση των ιντεγκρονίων

Γονίδιο	Ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία (5' □ 3')	PCR προϊόν (bp)
<i>bla<sub>VIM</sub></i>	ATGGTGTTTGGTCGCATATCG GGCCATTCAGCCAGATC	509
<i>IntI1</i>	CGTTCATACAGAAGCTG AAGCAGACTTGACCTGA	μεταβλητό
<i>aadA1</i>	GTGGATGGCGGCCTGAAGCC ATTGCCCAGTCGGCAGCG	527
<i>dhfr1</i>	TGGAGTTATCG GGAATGGC GTTAGAGGCGAAGTCTTGGG	404

Τα ενισχυμένα τμήματα DNA καθαρίστηκαν χρησιμοποιώντας το NucleoSpin Extract kit (Machery-Nagel GmbH, Dueren, Germany) και στη συνέχεια έγινε ανάγνωση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και στις δύο έλικες από την Eurofins MWG (Ebersberg, Germany). Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τις διαθέσιμες γονιδιακές αλληλουχίες της GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

## 2.10. Προσδιορισμός μεγέθους πλασμιδίων

Το μέγεθος των πλασμιδίων προσδιορίστηκε στα συζευγμένα στελέχη (ή στα αυθεντικά στελέχη όταν δεν πραγματοποιήθηκε σύζευξη) σύμφωνα με την τεχνική που περιγράφηκε από τους Barton et al. (Barton B.M. et al, 1995).

### 2.10.1. Παρασκευή ολικού DNA σε πλακίδια αγαρόζης

5ml ζωμού Luria Broth εμβολιάστηκαν με μία αποικία από ολονύκτιο καλλιέργημα του υπό έλεγχο στελέχους και επώαστηκαν στους 37<sup>0</sup> C για όλη τη νύχτα. Στη συνέχεια 2ml από το καλλιέργημα μεταφέρθηκαν σε φυγοκεντρικό σωλήνα και προστέθηκαν 5ml παγωμένου διαλύματος Pett IV[0.01mM Tris-HCl (pH

8), 1 M NaCl]. Φυγοκεντρήθηκαν για 10min στις 8000rpm στους 4°C και τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 500μl διάλυμα Pett IV. Προστέθηκαν 500μl “incert” αγαρόζης (1,3%) και διαμοιράστηκαν στις ειδικές θήκες δημιουργίας των πλακιδίων αγαρόζης plugs. Τα πλακίδια στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε κρυοφιαλίδιο χωρητικότητας 1.8ml και προστέθηκαν 1.5ml διάλυμα λύσης [6mM Tris-HCl (pH 7.6), 1M NaCl, 100mM EDTA (pH 7.5), 0.5% Brij-58, 0.2% Na-deoxycolate, 0.5% Na lauryl sarcosine) στο οποίο προστέθηκαν 3μl RNase A (10mg/ml) και 30μl λυσοζύμης (50mg/ml) και επώαστηκαν με ανάδευση στους 37°C για 12-16h. Το διάλυμα λύσης αντικαταστάθηκε από 1.5 ml διαλύματος ESP [0.5 M EDTA (pH 8.0), 1% Na lauryl sarcosine, 2 mg/ml proteinase K) και ακολούθησε επώαση με ανάδευση στους 50°C για 24h. Τα πλακίδια της αγαρόζης με το καθαρό πλέον DNA, φυλάσσονταν στους 4°C.

### **2.10.2. Πέψη με S1 νουκλεάση**

Ένα plug εκπλύθηκε με 5ml διαλύματος TE [10mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 ml EDTA (pH 7.6)] 5 φορές από 30min, 30min, 1h, 2h και overnight με ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια επώαστηκε σε 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος που περιείχε 1U S1 nuclease (Promega, Southampton, UK) για 45min στους 37°C. Ακολούθησε διακοπή της πέψης με διάλυμα ESP.

### **2.10.3. Ηλεκτροφόρηση εναλλασσόμενου πεδίου (PFGE)**

Η ηλεκτροφόρηση εναλλασσόμενου πεδίου έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 1.2% (σε 0.5XTBE), στα 200V και στους 10°C. Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης είναι ώσεις 45sec για 14h και 25sec για 6h. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση ήταν η Gene Navigator System (GE Healthcare Bio-Sciences, Sweden). Η χρώση του πηκτώματος έγινε με εμποτισμό σε διάλυμα βρωμιούχου εθιδίου 1μg/ml σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.

Κάθε ζώνη θεωρήθηκε ένα ευθύγραμμο πλασμίδιο του οποίου το μέγεθος υπολογίστηκε σε σύγκριση με γνωστού μοριακού βάρους ζώνες (Lambda και Yeast Chromosome PFG markers -New England Biolabs, Boston, MA, USA).

## **1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### **3.1. Ασθενείς –Μικροοργανισμοί**

#### **3.1.1. Ασθενείς**

Την χρονική περίοδο της μελέτης (Μάρτιος 2004 - Νοέμβριος 2005) νοσηλεύτηκαν στη ΜΕΘ του Νοσοκομείου «Αττικών» 240 ασθενείς, με μέση διάρκεια νοσηλείας 13,5 μέρες. Με τις καλλιέργειες που λαμβάνονταν επί κλινικής ένδειξης ή/και επιτήρησης της μικροβιακής αντοχής ανιχνεύθηκαν 23 ασθενείς οι οποίοι είτε ήταν μόνο αποικισμένοι (11) είτε είχαν λοίμωξη (12) από Εντεροβακτηριακό στέλεχος που παρήγαγε MBL. Η επίπτωση των στελεχών που παρήγαγαν MBL κατά την περίοδο αυτή ήταν 9,6 στελέχη ανά 100 εισαγωγές.

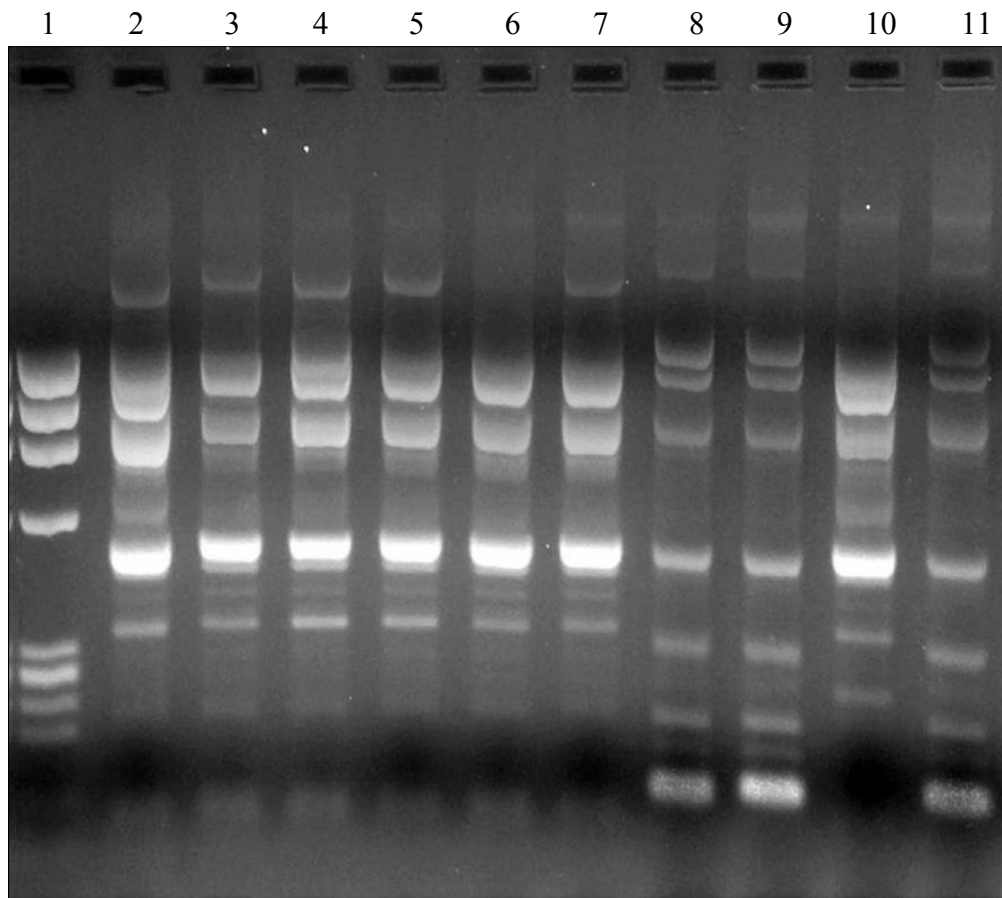
#### **3.1.2. Συλλογή στελεχών**

Συνολικά απομονώθηκαν από 23ασθενείς 82 Gram-αρνητικά στελέχη που αντιπροσώπευαν ένα στέλεχος από κάθε κλώνο, πηγή και ασθενή τα οποία παρήγαγαν καρμπαπενεμάση τύπου MBL. Τα παραπάνω μικρόβια περιλαμβάνουν στελέχη *Klebsiella pneumoniae* (77), *Enterobacter cloacae* (2), *Pseudomonas aeruginosa* (2) και *Citrobacter freundii* (1). Ο αριθμός αυτός αντιστοιχεί σε μέσο όρο 3,6 μικροοργανισμών ανά ασθενή με εύρος 1-7 μικροοργανισμούς ανά ασθενή.

### **3.2. Μοριακή τυποποίηση βακτηριακών στελεχών**

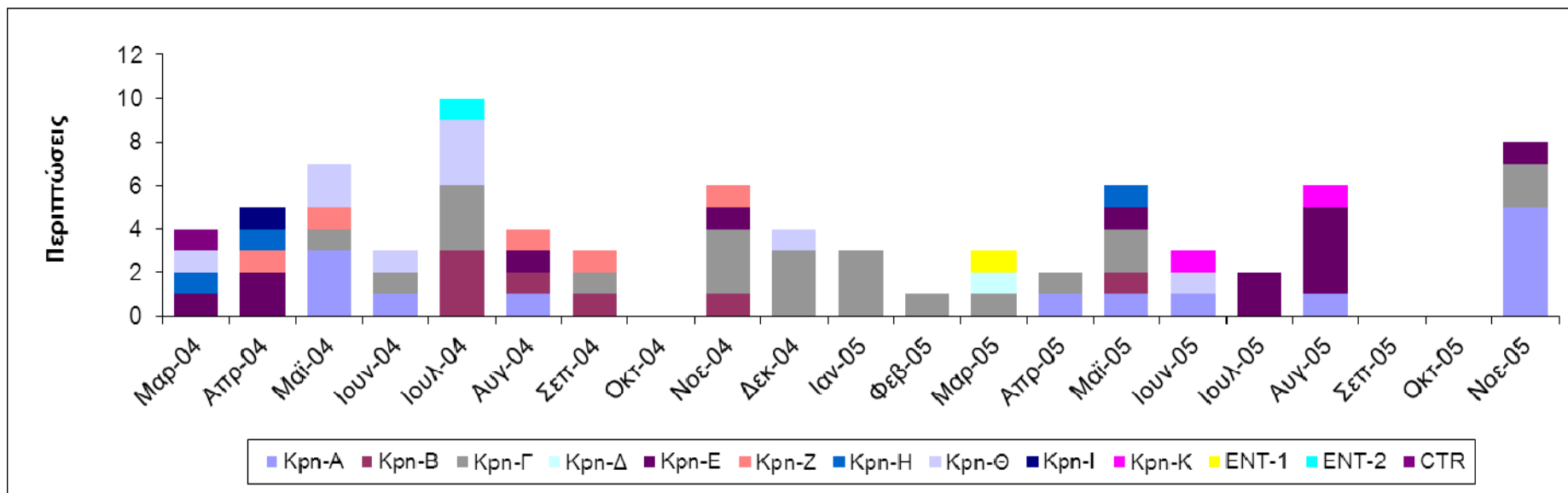
Ο μοριακός έλεγχος με REP-PCR ανέδειξε δέκα διαφορετικούς κλώνους *K. pneumoniae* (Πίνακας 16, Εικόνα 10) που χαρακτηρίστηκαν με γράμματα της λατινικής αλφαβήτου από Α έως Κ. Από αυτούς επικρατούν τρεις κλώνοι (Α, Γ και Ε) με 14 (18.2%), 22 (28.6%) και 13 (16.9%) στελέχη αντίστοιχα. Μεταξύ των στελεχών *E.cloacae* και *P.aeruginosa* εντοπίστηκαν δύο γενετικά διακριτοί κλώνοι. Η επιδημική καμπύλη με όλους τους διακριτούς γενετικούς κλώνους παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.

**Εικόνα 10.** Επιδημιολογική τυποποίηση στελεχών *K.pneumoniae* με REP-PCR



Σειρά 1 : ΦX DNA / HaeIII  
Σειρές 2-11 : Στελέχη *K.pneumoniae*

**Σχήμα 1.** Επιδημική καμπύλη. Κάθε διακριτός κλώνος συμβολίζεται με διαφορετικό χρώμα.



**Πίνακας 16. Κλινική σημασία, επιδημιολογικά και γενετικά χαρακτηριστικά των MBL-παραγωγών στελεχών από 23 ασθενείς της μελέτης**

Ασθενής	Ημερομηνία (εισαγωγής-εξόδου ή θανάτου)	Είδη	Κλώνος	Πηγή (αριθμός στελεχών)	Κλινική σημασία
1	17/06/05-31/10/05	<i>K.pneumoniae</i>	Ε	Αίμα (1)	Βακτηριαμία από ΚΦΚ
				Κεντρικός φλεβικός καθετήρας (1)	
				Βρογχικές εκκρίσεις (1)	
				Κόπρανα (3)	
			Θ	Κόπρανα (1)	Φορεία
Κ	Αίμα (1)	Πρωτοπαθής Βακτηριαμία			
	Κόπρανα (1)	Φορεία			
2	8/4/04-13/5/04	<i>K.pneumoniae</i>	Γ	Κόπρανα (1)	Φορεία
			Ε	Πύον (1)	Λοίμωξη χειρουργικού πεδίου
3	19/11/04-29/12/04	<i>K.pneumoniae</i>	Γ	Κόπρανα (2)	Φορεία
				Παροχέτευση (1)	Φορεία
4	10/11/04-16/11/04	<i>K.pneumoniae</i>	Ε	Αίμα (1)	Πρωτοπαθής Βακτηριαμία
				Κόπρανα (1)	Φορεία
5	11/3/04-12/5/04	<i>K.pneumoniae</i>	A	Πύον (1)	Λοίμωξη μαλακών μορίων
			Ε	Κόπρανα (1)	Φορεία
				Κεντρικός φλεβικός καθετήρας (1)	Φορεία
			Η	Πύον (1)	Λοίμωξη μαλακών μορίων
Θ	Βρογχικές εκκρίσεις (1)	Πνευμονία σχετιζόμενη με αναπνευστήρα			
	6	6/4/04-10/5/04	<i>K.pneumoniae</i>	A	Αίμα (1)
Θ				Βρογχικές εκκρίσεις (1)	Πνευμονία σχετιζόμενη με αναπνευστήρα
7	23/6/04-29/7/04	<i>K.pneumoniae</i>	B	Παροχέτευση (1)	Φορεία
8	26/2/05-1/6/05	<i>K.pneumoniae</i>	A	Βρογχικές εκκρίσεις (1)	Φορεία
				Κόπρανα (1)	Φορεία
			B	Κόπρανα (1)	Φορεία
		Δ	Κόπρανα (2)	Φορεία	
		<i>E.cloacae</i>	1	Κόπρανα (2)	Φορεία
<i>P.aeruginosa</i>	*	Βρογχικές εκκρίσεις (1)	Πνευμονία σχετιζόμενη με αναπνευστήρα		

Ασθενής	Ημερομηνία (εισαγωγής-εξόδου ή θανάτου)	Είδη	Κλώνος	Πηγή (αριθμός στελεχών)	Κλινική σημασία	
9	20/12/04-8/2/05	<i>K.pneumoniae</i>	Γ	Κόπρανα (1)	Φορεία	
10	23/8/04-7/2/05	<i>K.pneumoniae</i>	Α	Αίμα (1)	Βακτηριαμία από ΚΦΚ	
				Κεντρικός φλεβικός καθετήρας (1)		
				Βρογχικές εκκρίσεις (1)		Φορεία
			B	Κόπρανα (1)	Φορεία	
			Γ	Κόπρανα (2)	Φορεία	
Z	Βρογχικές εκκρίσεις (2)	Φορεία				
Z	Κεντρικός φλεβικός καθετήρας (1)	Φορεία				
11	6/10/04-2/11/04	<i>K.pneumoniae</i>	Γ	Κόπρανα (2)	Φορεία	
12	18/6/04-22/7/04	<i>K.pneumoniae</i>	B	Κόπρανα (1)	Φορεία	
				Γ	Αίμα (1)	Πρωτοπαθής Βακτηριαμία
				Κόπρανα (1)	Φορεία	
13	5/4/04-24/5/04	<i>K.pneumoniae</i>	Z	Αίμα (1)	Πρωτοπαθής Βακτηριαμία	
				Θ	Κόπρανα (1)	Φορεία
				I	Κεντρικός φλεβικός καθετήρας (1)	Φορεία
14	9/11/04-17/1 /05	<i>K.pneumoniae</i>	Γ	Αίμα (1)	Βακτηριαμία από ΚΦΚ	
				Κεντρικός φλεβικός καθετήρας (1)		
				Παροχέτευση (1)		Φορεία
				Κόπρανα (1)	Φορεία	
			Θ	Κόπρανα (1)	Φορεία	
15	13/5/05-27/8/05	<i>K.pneumoniae</i>	A	Ούρα (1)	Φορεία	
			E	Κόπρανα (3)	Φορεία	
			Βρογχικές εκκρίσεις (2)	Φορεία		
		<i>E.cloacae</i>	2	Κόπρανα (1)	Φορεία	
<i>P.aeruginosa</i>	*	Ούρα (1)	Φορεία			
16	5/8/04-10/11/04	<i>K.pneumoniae</i>	A	Βρογχικές εκκρίσεις (2)	Φορεία	
			Γ	Κόπρανα (2)	Φορεία	
17	9/3/04-17/6/04	<i>K.pneumoniae</i>	E	Κόπρανα (1)	Φορεία	
			Z	Κεντρικός φλεβικός καθετήρας (1)	Φορεία	
			H	Κόπρανα (1)	Φορεία	
		<i>C.freundii</i>		Κόπρανα (1)	Φορεία	



Ασθενής	Ημερομηνία (εισαγωγής-εξόδου ή θανάτου)	Είδη	Κλώνος	Πηγή (αριθμός στελεχών)	Κλινική σημασία
18	20/5/04-28/9/04	<i>K.pneumoniae</i>	A	Ούρα (1)	Φορεία
			B	Πύον (2) Κόπρανα (1)	Λοίμωξη μαλακών μορίων Φορεία
			Z	Κεντρικός φλεβικός καθετήρας (1)	Φορεία
19	3/6/04-22/10/04	<i>K.pneumoniae</i>	B	Ούρα (1)	Φορεία
			Γ	Βρογχικές εκκρίσεις (1) Κόπρανα (1)	Φορεία Φορεία
20	19/2/05-22/6/05	<i>K.pneumoniae</i>	A	Βρογχικές εκκρίσεις (1) Κόπρανα (1)	Φορεία Φορεία
21	14/4/04-3/8/04	<i>K.pneumoniae</i>	Γ	Κόπρανα (1)	Φορεία
			E	Ούρα (1)	Φορεία
			Θ	Αίμα (1) Κεντρικός φλεβικός καθετήρας (1)	Βακτηριαμία από ΚΦΚ
				Βρογχικές εκκρίσεις (1) Κόπρανα (1)	Φορεία Φορεία
22	22/10/04-7/12/04	<i>K.pneumoniae</i>	A	Ούρα (1) Κόπρανα (1)	Φορεία Φορεία
			Γ	Αίμα (2) Ούρα (1)	Δευτεροπαθής Βακτηριαμία Φορεία
			Z	Βρογχικές εκκρίσεις (1)	Πνευμονία σχετιζόμενη με αναπνευστήρα
23	21/3/05-8/6/05	<i>K.pneumoniae</i>	Γ	Βρογχικές εκκρίσεις (1) Ούρα (2)	Πνευμονία σχετιζόμενη με αναπνευστήρα Φορεία
				Κόπρανα (2)	Φορεία
			H	Ούρα (1)	Φορεία

### 3.3. Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

Οι ευαισθησίες στα αντιμικροβιακά των εντεροβακτηριακών (80) που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη φαίνονται στον Πίνακα 17. Οι MICs στις καρβαπενέμες κυμαίνονταν από 0,5 έως > 32μg/ml για την ιμιπενέμη και από  $\leq 0,125$  έως >32μg/ml για την μεροπενέμη και την ντοριπενέμη. Όλα τα στελέχη της μελέτης ήταν ανθεκτικά στις ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες, πενικιλίνες με αναστολείς και τη σιπροφλοξασίνη. Ευαισθησία στην αζτρεονάμη παρατηρήθηκε στο 15,8% των στελεχών. Η γενταμικίνη ήταν η πιο δραστική ουσία με 89,6% των στελεχών να είναι ευαίσθητα (MIC για το 50% και 90% των στελεχών 2 και 8 μg/ml, αντίστοιχα) και ακολουθείται από την κολιστίνη με 66,2% των στελεχών να είναι ευαίσθητα (MIC για το 50% και 90% των στελεχών 2 και >32 μg/ml, αντίστοιχα). Η τιγκεκυκλίνη έδειξε δραστηριότητα έναντι του 62,3% των στελεχών (MIC για το 50% και 90% των στελεχών 1 και 3 μg/ml, αντίστοιχα). Τα δύο στελέχη *P.aeruginosa* ήταν ιδιαίτερα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες (MIC > 32μg/ml) και ήταν επίσης ανθεκτικά σε όλα τα αντιμικροβιακά που μελετήθηκαν εκτός της κολιστίνης στην οποία το ένα μόνο στέλεχος ήταν ευαίσθητο. Σύμφωνα με το νέα όρια της CLSI που είναι διαθέσιμα από το 2010 για τα εντεροβακτηριακά το ποσοστό ευαισθησίας στις ντοριπενέμη, ιμιπενέμη και μεροπενέμη ήταν 6,6%, 10,4% και 3,9%, αντίστοιχα ενώ το ποσοστό ευαισθησίας στην αζτρεονάμη παρέμεινε αμετάβλητο (15,8%) (CLSI, 2012).

### 3.4. Ανίχνευση και ταυτοποίηση του γονιδίου *bla<sub>VIM</sub>*

Σε όλα τα στελέχη που παρήγαγαν MBL βρέθηκε με μέθοδο PCR το γονίδιο *bla<sub>VIM</sub>*. Όλα τα εντεροβακτηριακά έφεραν το γονίδιο *bla<sub>VIM-1</sub>*, όπως φάνηκε μετά από την πέψη του PCR «προϊόντος» με την περιοριστική ενδονουκλεάση *SacI*, ενώ τα στελέχη *P. aeruginosa* έφεραν το *bla<sub>VIM-2</sub>* (Εικόνα 11). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν με ανάγνωση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing).

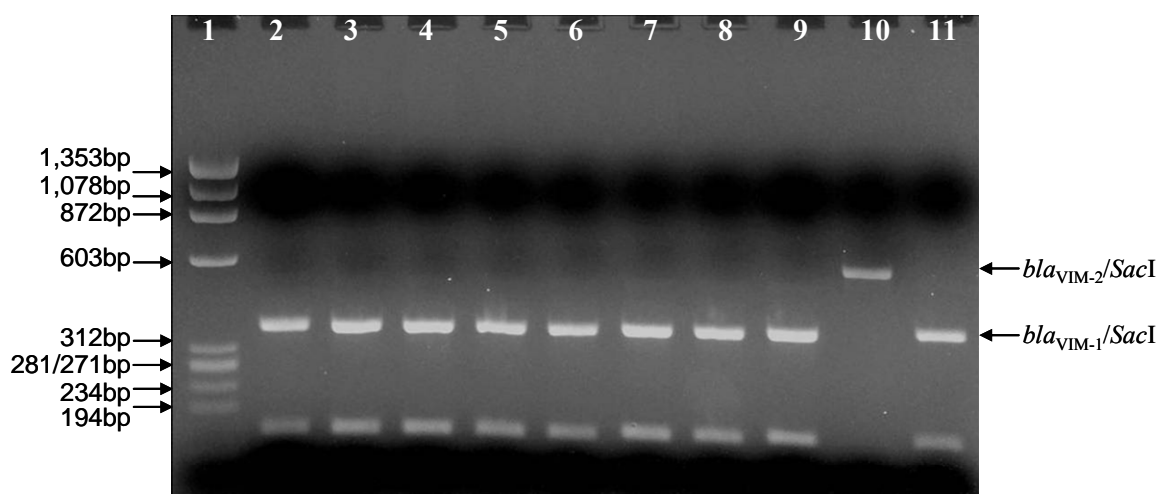
**Πίνακας 17.** Ευαισθησίες Εντεροβακτηριακών που παράγαν MBL, ταξινομημένα σύμφωνα με το είδος και τον κλώνο, που καθορίστηκε από την REP-PCR (CLSI, 2012)

Στελέχη (ανά κλώνο)	Αριθμός στελεχών	Φαινότυπος ESBL (%)	IMP <sup>a</sup>	MER <sup>a</sup>	DOR <sup>a</sup>	ATM	AMK	GEN	TIG <sup>a</sup>	COL <sup>a</sup>
Εύρος MIC (μg/ml) (Ευαισθησία, %)										
Kpn-A	14	11 (78,6)	1->32 (7,1)	2->32 (0)	4->32 (0)	≤0,125->32 (21,4)	8-32 (71,4)	0,5->32 (92,9)	0,25-4 (21,4)	1->32 (50)
Kpn-B	7	6 (85,7)	4->32 (0)	8->32 (0)	4->32 (0)	0,5->32 (16,7)	8-32 (83,3)	1-4 (100)	0,5-2 (66,7)	0,125->32 (66,7)
Kpn-Γ	22	18 (81,8)	1->32 (4,5)	≤0,125->32 (4,5)	≤0,125->32 (4,5)	≤0,125->32 (18,2)	8->32 (52,4)	0,5->32 (85,7)	0,38-4 (47,6)	0,125->32 (66,7)
Kpn-Δ	1	1	32	>32	>32	>32	16	2	2	8
Kpn-E	13	12 (92,3)	2->32 (0)	1->32 (7,7)	0,125->32 (7,7)	≤0,125->32 (7,7)	16->32 (23,1)	1->32 (76,9)	0,38->256 (76,9)	0,5->32 (76,9)
Kpn-Z	5	4 (80)	0,5-8 (60)	1-32 (20)	≤0,125-16 (20)	1->32 (80)	8-16 (100)	0,5-2 (100)	0,5-6 (80)	0,125->32 (60)
Kpn-H	3	3 (100)	2->32 (0)	2->32 (0)	4->32 (0)	>32 (33,3)	16->32 (33,3)	2->32 (33,3)	0,125-1 (100)	0,125->32 (33,3)
Kpn-Θ	9	9 (100)	1->32 (11,1)	4->32 (11,1)	2->32 (11,1)	>32 (0)	8-32 (88,9)	0,5-4 (100)	0,25-1 (100)	0,125->32 (77,8)
Kpn-I	1	1	0,5	8	16	>32	16	1	1	2
Kpn-K	2	0 (0)	8-16 (0)	2-8 (0)	2-16 (0)	≤0,125 (100)	4 (100)	1 (100)	0,25-0,38 (100)	0,5-4
Ecl-1	1	0	8	>32	8	>32	8	1	3	0,125
Ecl-2	1	0	8	8	1,5	>32	>32	4	0,5	0,125
Cfr	1	0	1	4	1	32	16	1	1	0,25
Total	80		0,5->32 (10)	0,125->32 (3,8)	≤0,125->32 (6,3)	≤0,125->32 (15,8)	4->32 (63,6)	0,5->32 (89,6)	0,125->256 (62,3)	0,125->32 (66,2)
MIC <sub>50</sub> /MIC <sub>90</sub>	80		16/>32	>32/>32	32/>32	>32/>32	16/32	2/8	1/3	2/>32

Kpn, *K.pneumoniae*; Ecl, *E.cloacae*; Cfr, *C.freundii*; ESBL, Ευρέως φάσματος β-λακταμάση; IMP, ιμιπενέμη; MER, μεροπενέμη; DOR, ντοριπενέμη; ATM, αζτρεονάμη; AMK, αμικασίνη; GEN, γενταμικίνη; TIG, τιγεκυκλίνη; COL, κολιστίνη.

<sup>a</sup> MIC που καθορίστηκε με E-test

**Εικόνα 11.** Πέψη του *bla*<sub>VIM</sub> PCR προϊόντος με *Sac*I περιοριστική ενδονουκλεάση για τον διαχωρισμό του *bla*<sub>VIM-1</sub> και του *bla*<sub>VIM-2</sub>.



- Σειρά 1 : ΦΧ DNA/HaeIII  
Σειρές 2-9 : *bla*<sub>VIM</sub> PCR προϊόντα από DNA στελεχών *K. pneumoniae* μετά από πέψη με *Sac*I περιοριστική ενδονουκλεάση.  
Σειρά 10 : *bla*<sub>VIM</sub> PCR προϊόντα από DNA στελέχους *P. aeruginosa* μετά από πέψη με *Sac*I περιοριστική ενδονουκλεάση.  
Σειρά 11 : *bla*<sub>VIM</sub> PCR προϊόντα από DNA στελέχους *E. cloacae* μετά από πέψη με *Sac*I περιοριστική ενδονουκλεάση.

### 3.5. Αποτελέσματα βακτηριακής σύζευξης

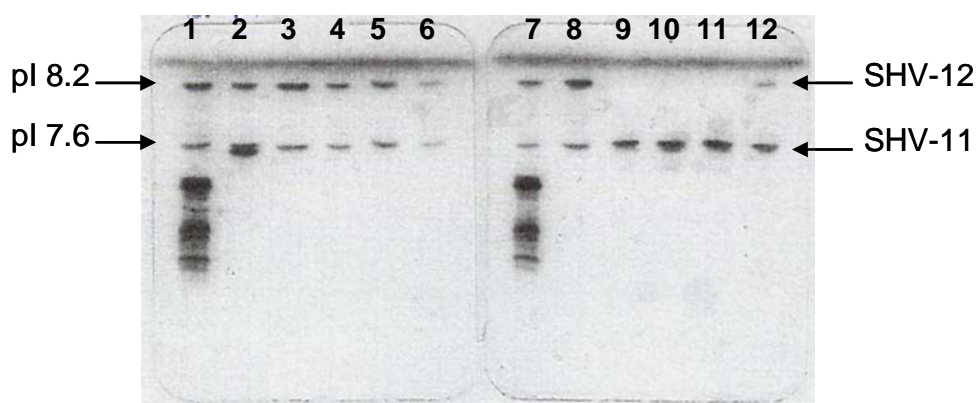
Στα πειράματα σύζευξης χρησιμοποιήθηκε τουλάχιστον ένα στέλεχος από κάθε κύριο τύπο κλώνων. Το γονίδιο *bla*<sub>VIM-1</sub> μεταφέρθηκε ελεύθερα από 6 από τα 11 στελέχη (54,5%) *K.pneumoniae* στο *E. coli* στέλεχος-δέκτη. Τα τέσσερα από τα έξι στελέχη έφεραν επίσης το γονίδιο *bla*<sub>SHV-5</sub> το οποίο συν-μεταφέρθηκε στο στέλεχος δέκτη μόνο σε μία περίπτωση (Πίνακας 18).

### 3.6. Ανίχνευση παραγωγής β-λακταμασών με ισοηλεκτρική εστίαση (IEF)

Ισοηλεκτρική εστίαση έγινε για όλα τα κλινικά στελέχη *K.pneumoniae*, *E.cloacae* και *C.freundii*, καθώς και τα μετασυζευγμένα στελέχη που δημιουργήθηκαν. Σε όλα πιστοποιήθηκε η παρουσία της αντίστοιχης του είδους

χρωμοσωμικής κεφαλοσπορινάσης όπως της β-λακταμάσης με pI 7,6 για τα στελέχη *K.pneumoniae* (SHV-1-τύπου), της β-λακταμάσης με pI 8,0 για τα στελέχη *E.cloacae* και της β-λακταμάσης με pI 9.0 για το στέλεχος *C.freundii* (Εικόνα 12). Σε κανένα στέλεχος δεν ανιχνεύτηκε β-λακταμάση με pI 5,3 που αντιστοιχεί στην VIM. Είναι γνωστή από την βιβλιογραφία η χαμηλή υδρολυτική ικανότητα της VIM έναντι της νιτροσεφίνης (Rasmussen BA et al, 1997). Σε 64 στελέχη *K.pneumoniae* ανιχνεύτηκε β-λακταμάση με pI 8,2 που αντιστοιχεί στις ευρέως φάσματος β-λακταμάσες SHV-5 και SHV-12.

**Εικόνα 12.** Ισοηλεκτρική εστίαση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κλινικά στελέχη *K.pneumoniae*.



Σειρά 1 & Σειρά 7 : Πρότυπο στέλεχος *K. pneumoniae* με SHV-12 & SHV-11  
 Σειρές 2-6 & Σειρές 8-12 : Κλινικά στελέχη *K. pneumoniae*

### 3.7. Ανίχνευση και χαρακτηρισμός ιντεγκρονίων που φέρουν το *bla*<sub>VIM</sub>

Από την χαρτογράφηση με PCR φάνηκε ότι σε όλες τις περιπτώσεις το γονίδιο *bla*<sub>VIM-1</sub> ήταν μέρος ενός ιντεγκρονίου τάξεως 1. Αναδείχθηκε ένας κύριος τύπος ιντεγκρονίου με τέσσερις γονιδιακές κασέτες που περιλαμβάνουν από το 5'- άκρο προς το 3'- άκρο, τα γονίδια *bla*<sub>VIM-1</sub>, *aacA7*, *dhfrI* και *aadA1*. Το ιντεγκρόνιο αυτό που ανιχνεύτηκε σε όλα τα στελέχη *K. pneumoniae* και στα δύο στελέχη

*E. cloacae* (Πίνακας 18) έμοιαζε με το ήδη χαρακτηρισμένο ιντεγκρόνιο In-e541 (Vourli S. et al, 2006). Η μελέτη της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε επιλεγμένα στελέχη επαλήθευσε την μεγάλη ομολογία με το In-e541.

Το στέλεχος *C. freundii* έφερε ένα ιντεγκρόνιο που περιελάμβανε τα γονίδια *bla<sub>VIM-1</sub>* και *aac(6')-IIC* και ήταν πανομοιότυπο με το ιντεγκρόνιο In87 (GenBank αριθμός κατάθεσης no. AY648125), το οποίο έχει στο παρελθόν περιγραφεί από την ερευνητική μας ομάδα σε κλινικό στέλεχος *E. cloacae* (Galani I. et al, 2005). Μεταξύ των δύο ασθενών από τους οποίους απομονώθηκαν τα παραπάνω μικρόβια δεν υπήρχε καμία εμφανής επιδημιολογική σχέση καθώς ο πρώτος μεταφέρθηκε με βακτηριαμμία από *E. cloacae* από ένα περιφερειακό νοσοκομείο στην παθολογική πτέρυγα του Νοσοκομείου «Αττικόν» το 2003 ενώ ο δεύτερος νοσηλεύθηκε στη ΜΕΘ το 2004.

Το ιντεγκρόνιο In87 στην 5' συντηρημένη περιοχή έχει το γονίδιο της ιντεγκράσης τύπου I (IntI1), έναν ισχυρό υποκινητή P1 (TTGACAN17TAAACT), μια αδρανή μορφή του υποκινητή P2 (TTGTTAN14TACAGT) και την ειδική θέση ανασυνδυασμού attI1. Περιέχει δύο γονιδιακές κασέτες τις *bla<sub>VIM-1</sub>* and *aac(6')-IIC*, με την γονιδιακή κασέτα *bla<sub>VIM-1</sub>* να έχει ενσωματωθεί στο ιντεγκρόνιο στη θέση attI1. Ακολουθεί η γονιδιακή κασέτα *aac(6')-IIC* και τέλος στο 3'-CS άκρο του ιντεγκρονίου ανιχνεύτηκε το γονίδιο *qacED1* που ευθύνεται για την αντοχή στα άλατα του τεταρτοταγούς αμμωνίου. Το γονίδιο *aac(6')-IIC* κωδικοποιεί μια 6'-N-ακετυλοτρανσφεράση που ακετυλιώνει τη γενταμικίνη, την τομπραμυκίνη και τη νετιλμικίνη αλλά όχι την αμικασίνη (Hu Z. et al, 2009). Το ένζυμο AAC(6')-IIC παρουσιάζει 31–80% ομολογία με άλλες γνωστές ακετυλοτρανσφεράσες.

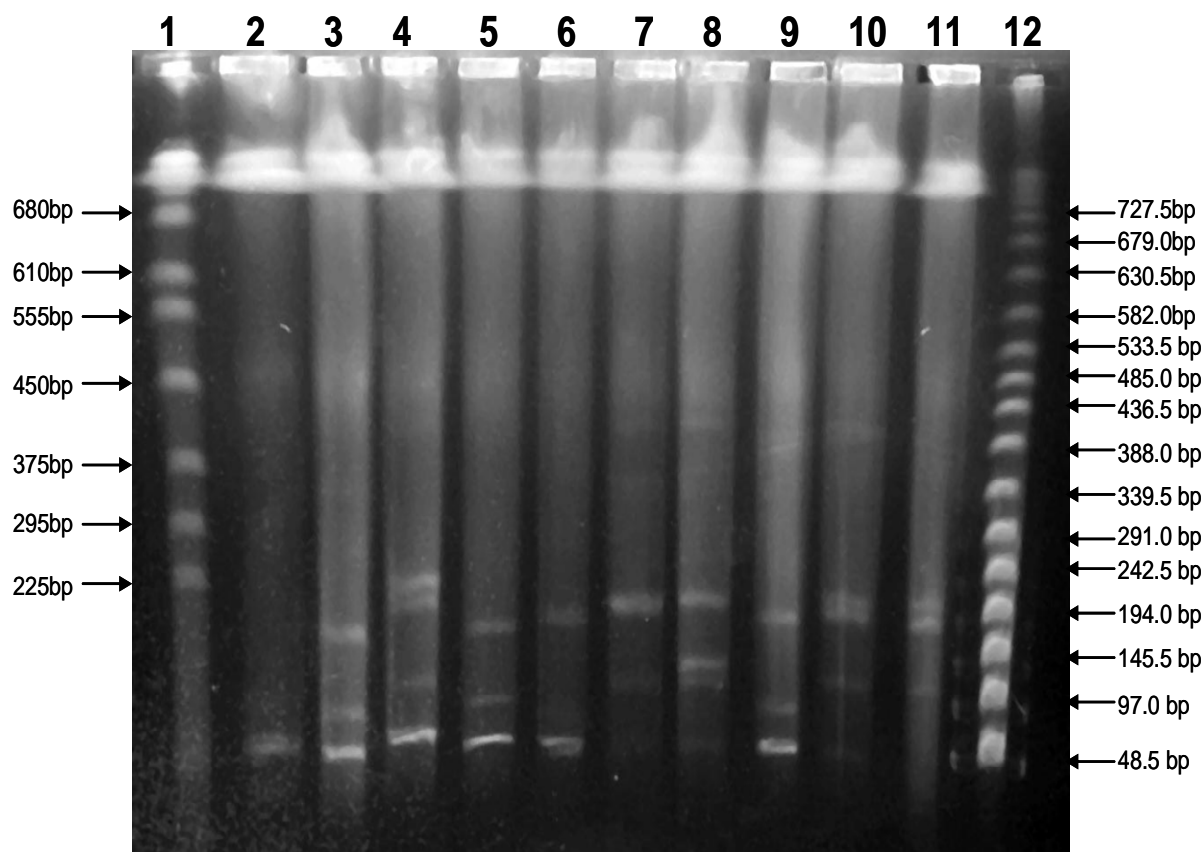
### 3.8. Έλεγχος πλασμιδιακού περιεχομένου

Με εξαίρεση ένα μόνο στέλεχος, αυτό που ανήκει στον κλώνο K, όλα τα στελέχη *K. pneumoniae* περιείχαν τουλάχιστον ένα και μέχρι τέσσερα πλασμίδια με μεγέθη που κυμαίνονται από 20 έως 220 kb. όπως φαίνεται από την πέψη του ολικού DNA με την S1 νουκλεάση (Πίνακας 18, Εικόνα 13). Για τα στελέχη εκείνα που περιείχαν ένα μόνο πλασμίδιο ή ήταν επιτυχής η μεταφορά του πλασμιδίου που έφερε το *bla<sub>VIM-1</sub>* σε εργαστηριακό στέλεχος-δέκτη *E. coli*, έγινε απομόνωση πλασμιδιακού DNA (Εικόνα 14) και πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση (Εικόνα 15).

Αναδείχτηκαν πέντε διαφορετικά πλασμίδια που περιείχαν το γονίδιο *bla*<sub>VIM-1</sub> με μεγέθη 200, 70, 65, 55 και 50 kb, το πρώτο από τα οποία έφερε επίσης το γονίδιο *bla*<sub>SHV-5</sub>. Και τα δύο στελέχη *E. cloacae* που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη έφεραν από ένα ίδιου μεγέθους πλασμίδιο (90 kb) και από ένα διαφορετικό πλασμίδιο μεγέθους 280 kb το ένα και 200 kb το άλλο στέλεχος. Το ιντεγκρόνιο που περιείχε το *bla*<sub>VIM-1</sub> ήταν παρόμοιο με εκείνο που περιγράφεται στα στελέχη *K. pneumoniae* (Πίνακας 18).

Το στέλεχος *C. freundii* έφερε ένα πλασμίδιο μεγέθους 40 kb με διαφορετικό ιντεγκρόνιο που περιλάμβανε τα γονίδια *bla*<sub>VIM-1</sub> και *aac(6')-IIc*.

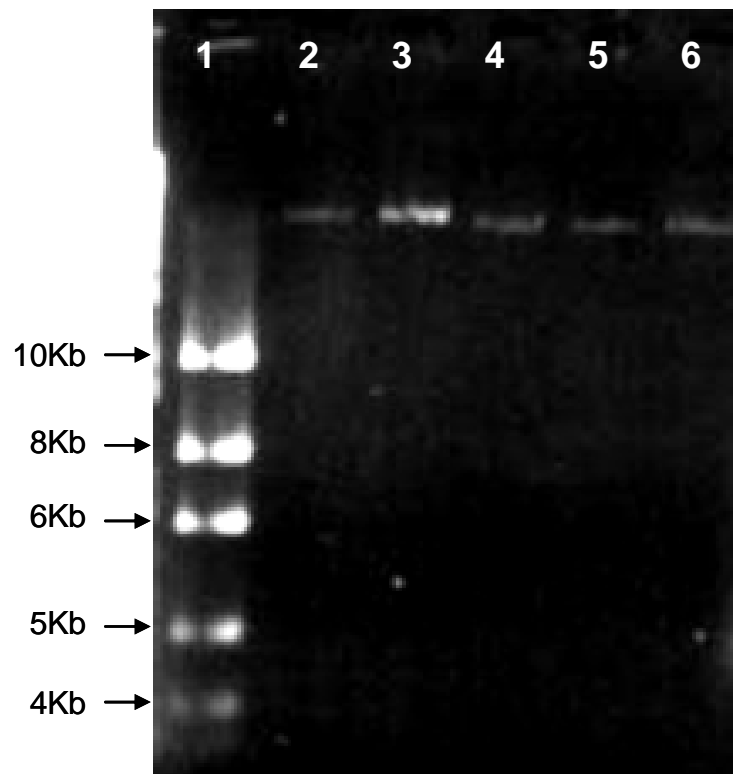
**Εικόνα 13.** Ηλεκτροφόρηση πλασμιδιακών εκχυλισμάτων σε εναλλασσόμενο πεδίο (PFGE) μετά από πέψη με S1 νουκλεάση.



Σειρά 1 : Lambda Ladder PFG Marker  
Σειρές 2-11 : Αντιπροσωπευτικά στελέχη *K.pneumoniae*  
Σειρά 12 : Yeast Chromosome PFG Marker

**Εικόνα 14.** Ηλεκτροφόρηση πλασμιδιακών εκχυλισμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης.

---



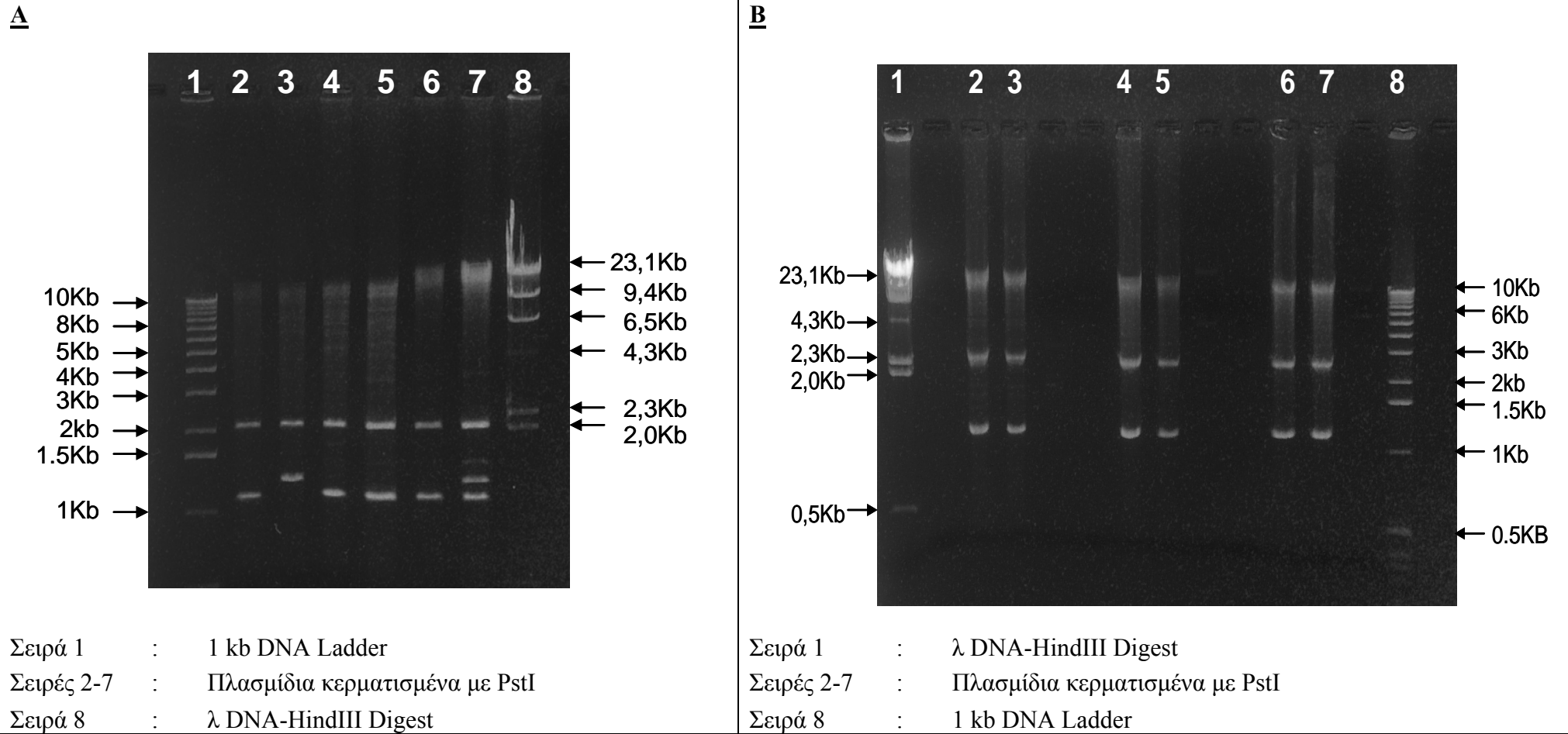
Σειρά 1 : Supercoiled DNA Ladder

Σειρές 2-6 : Πλασμιδιακό εκχύλισμα από κλινικά στελέχη *K.pneumoniae*

---



**Εικόνα 15.** RFLP ανάλυση πλασμιδίων με PstI.



**Πίνακας 18.** Κλινικά, επιδημιολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά των ασθενών και των Εντεροβακτηριακών που παρήγαγαν MBL και συμπεριελήφθησαν στην μελέτη

Αρ. Ασθενή	Ημερομηνία (εισαγωγής-εξόδου ή θανάτου)	Είδος	Κλώνος	Πηγή (αριθμός στελεγχών)	Κλινική σημασία	Άλλα <i>bla</i> γονίδια	Μέγεθος πλασμιδίου (kb)	Σύζευξη	Σειρά γονιδιακών κασσετών στο ιντεγκρόνιο (από 5' → 3')
1	17/06/05-31/10/05	Κρπ	Ε	Αίμα	BKK	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	190+170+100	ΔΕ	<i>bla<sub>VIM-1</sub>, aacA7, dhfrI, aadA1</i>
				ΚΦΚ	Φορεία				
				Βρογχικές εκκρίσεις	Φορεία				
			Θ	Ορθικό	Φορεία	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
			Κ	Αίμα	ΒΑ	SHV-1- τύπου	Κανένα	ΔΕ	<i>bla<sub>VIM-1</sub>, aacA7, dhfrI, aadA1</i>
Ορθικό	Φορεία	190+90							
2	8/4/04-13/5/04	Κρπ	Γ	Ορθικό	Φορεία	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	ΔΕ	ΔΕ	<i>bla<sub>VIM-1</sub>, aacA7, dhfrI, aadA1</i>
				Πύον	ΧΛ	SHV-1-τύπου			
			Ε	Βρογχικές εκκρίσεις	Φορεία	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
3	19/11/04-29/12/04	Κρπ	Γ	Ορθικό	Φορεία	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
				Παροχέτευση	Φορεία				
4	10/11/04-16/11/04	Κρπ	Ε	Αίμα	ΒΑ	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	200+180+100+20	ΔΕ	<i>bla<sub>VIM-1</sub>, aacA7, dhfrI, aadA1</i>
				Ορθικό	Φορεία				
5	11/3/04-12/5/04	Κρπ	A	Πύον	ΛΜΜ	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	200	ΔΕ	ΔΕ
			Ε	Ορθικό	Φορεία	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
				ΚΦΚ	Φορεία				
			Η	Πύον	ΛΜΜ	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου, TEM-1-τύπου	55	ΔΕ	<i>bla<sub>VIM-1</sub>, aacA7, dhfrI, aadA1</i>
Θ	Βρογχικές εκκρίσεις	ΠΑν	SHV-1-τύπου	ΔΕ	ΔΕ	<i>bla<sub>VIM-1</sub>, aacA7, dhfrI, aadA1</i>			

Αρ. Ασθενή	Ημερομηνία (εισαγωγής-εξόδου ή θανάτου)	Είδος	Κλώνος	Πηγή (αριθμός στελεχών)	Κλινική σημασία	Άλλα <i>bla</i> γονίδια	Μέγεθος πλασμιδίου (kb)	Σύζευξη	Σειρά γονιδιακών κασσετών στο ιντεγκρόνιο (από 5' → 3')
6	6/4/04-10/5/04	Kpn	A	Αίμα	BA	SHV-1-τύπου	190+40	ΔΕ	<i>bla<sub>VIM-1</sub>, aacA7, dhfrI, aadA1</i>
			Θ	Βρογχικές εκκρίσεις	ΠΑν	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
7	23/6/04-29/7/04	Kpn	B	Παροχέτευση	Φορεία	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	ΔΕ	ΔΕ	<i>bla<sub>VIM-1</sub>, aacA7, dhfrI, aadA1</i>
8	26/2/05-1/6/05	Kpn	A	Βρογχικές εκκρίσεις	Φορεία	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	200	Επιτυχής (μεταφέρθηκε και το γονίδιο της SHV-5)	ΔΕ
					Φορεία		200+70	Επιτυχής	
			B	Ορθικό	Φορεία	SHV-1-τύπου	125+70	Επιτυχής	<i>bla<sub>VIM-1</sub>, aacA7, dhfrI, aadA1</i>
			Δ	Ορθικό	Φορεία	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	70	ΔΕ	<i>bla<sub>VIM-1</sub>, aacA7, dhfrI, aadA1</i>
			Ecl	1	Ορθικό	Φορεία	AmpC	280+90	ΔΕ
9	20/12/04-8/2/05	Kpn	Γ	Ορθικό	Φορεία	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
10	23/8/04-7/2/05	Kpn	A	Αίμα	BKK	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	65	ΔΕ	<i>bla<sub>VIM-1</sub>, aacA7, dhfrI, aadA1</i>
				ΚΦΚ					
				Βρογχικές εκκρίσεις	Φορεία				
			B	Ορθικό	Φορεία	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
			Γ	Ορθικό	Φορεία	SHV-1-τύπου	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
				Βρογχικές εκκρίσεις	Φορεία				
Z	ΚΦΚ	Φορεία	SHV-1-τύπου	ΔΕ	ΔΕ	<i>bla<sub>VIM-1</sub>, aacA7, dhfrI, aadA1</i>			

Αρ. Ασθενή	Ημερομηνία (εισαγωγής-εξόδου ή θανάτου)	Είδος	Κλώνος	Πηγή (αριθμός στελεχών)	Κλινική σημασία	Άλλα <i>bla</i> γονίδια	Μέγεθος πλασμιδίου (kb)	Σύζευξη	Σειρά γονιδιακών κασσετών στο ιντεγκρόνιο (από 5' → 3')
11	6/10/04-2/11/04	Kpn	Γ	Ορθικό	Φορεία	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
12	18/6/04-22/7/04	Kpn	B	Ορθικό	Φορεία	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	55	ΔΕ	ΔΕ
			Γ	Ορθικό	Φορεία		50	ΔΕ	ΔΕ
13	5/4/04-24/5/04	Kpn	Z	Αίμα	ΒΑ	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	180+55	ΔΕ	<i>bla<sub>VIM-1</sub>, aacA7, dhfrI, aadA1</i>
			Θ	Ορθικό	Φορεία	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
			I	CVC	Φορεία	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	55	ΔΕ	<i>bla<sub>VIM-1</sub>, aacA7, dhfrI, aadA1</i>
14	9/11/04 - 17/1 /05	Kpn	Γ	Αίμα	BKK	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	ΔΕ	ΔΕ	<i>bla<sub>VIM-1</sub>, aacA7, dhfrI, aadA1</i>
				ΚΦΚ					
			Παροχέτευση	Φορεία					
			Ορθικό	Φορεία					
Θ	Ορθικό	Φορεία	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ			
15	13/5/05-27/8/05	Kpn	A	Ούρα	Φορεία	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
			E	Ορθικό	Φορεία	SHV-1-τύπου	ΔΕ	Επιτυχής	<i>bla<sub>VIM-1</sub>, aacA7, dhfrI, aadA1</i>
		Βρογχικές εκκρίσεις		Φορεία	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	200+100	Ανεπιτυχής		
Ecl	2	Ορθικό	Φορεία	AmpC	200+90	ΔΕ	<i>bla<sub>VIM-1</sub>, aacA7, dhfrI, aadA1*</i>		
16	5/8/04-10/11/04	Kpn	A	Βρογχικές εκκρίσεις	Φορεία	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
			Γ	Ορθικό	Φορεία	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ

Αρ. Ασθενή	Ημερομηνία (εισαγωγής-εξόδου ή θανάτου)	Είδος	Κλώνος	Πηγή (αριθμός στελεχών)	Κλινική σημασία	Άλλα <i>bla</i> γονίδια	Μέγεθος πλασμιδίου (kb)	Σύζευξη	Σειρά γονιδιακών κασσετών στο ιντεγκρόνιο (από 5' → 3')
17	9/3/04-17/6/04	Kpn	E	Ορθικό	Φορεία	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
			Z	ΚΦΚ	Φορεία	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
			H	Ορθικό	Φορεία	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	55	Επιτυχής	<i>bla<sub>VIM-1</sub>, aacA7, dhfrI, aadA1</i>
		Cfr		Ορθικό	Φορεία	AmpC	40	Ανεπιτυχής	<i>bla<sub>VIM-1</sub>, aac(6')-IIc</i>
18	20/5/04-28/9/04	Kpn	A	Ούρα	Φορεία	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
			B	Πύον	ΛΜΜ	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	55	Ανεπιτυχής	ΔΕ
				Ορθικό	Φορεία		ΔΕ		
			Z	ΚΦΚ	Φορεία	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	170+90+60	Ανεπιτυχής	ΔΕ
19	3/6/04-22/10/04	Kpn	B	Ούρα	Φορεία	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
			Γ	Βρογχικές εκκρίσεις	Φορεία	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	50	Επιτυχής	ΔΕ
				Ορθικό	Φορεία		ΔΕ		
20	19/2/05-22/6/05	Kpn	A	Βρογχικές εκκρίσεις	Φορεία	SHV-1-τύπου	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
				Ορθικό	Φορεία				
21	14/4/04-3/8/04	Kpn	Γ	Ορθικό	Φορεία	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
			E	Ούρα	Φορεία	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	220+200+100+60	ΔΕ	ΔΕ
			Θ	Αίμα	BKK	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	180+80+50	Ανεπιτυχής	ΔΕ
				ΚΦΚ			160+80+50		
				Βρογχικές εκκρίσεις	Φορεία		ΔΕ		
Ορθικό	Φορεία	ΔΕ							

Αρ. Ασθενή	Ημερομηνία (εισαγωγής-εξόδου ή θανάτου)	Είδος	Κλώνος	Πηγή (αριθμός στελεχών)	Κλινική σημασία	Άλλα <i>bla</i> γονίδια	Μέγεθος πλασμιδίου (kb)	Σύζευξη	Σειρά γονιδιακών κασσετών στο ιντεγκρόνιο (από 5' → 3')
22	22/10/04-7/12/04	Kpn	Α	Ούρα	Φορεία	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
				Ορθικό	Φορεία				
			Γ	Αίμα	ΒΑ	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	55	ΔΕ	
				Ούρα	Φορεία		ΔΕ		
Z	Βρογχικές εκκρίσεις	ΠΑν	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ			
23	21/3/05-8/6/05	Kpn	Γ	Βρογχικές εκκρίσεις	ΠΑν	SHV-5-τύπου, SHV-1-τύπου	55	ΔΕ	ΔΕ
				Ούρα	Φορεία	SHV-1-like	ΔΕ		
				Ορθικό	Φορεία	SHV-5-like, SHV-1-like	ΔΕ		
			H	Ούρα	Φορεία	SHV-5-like, SHV-1-like	55	ΔΕ	

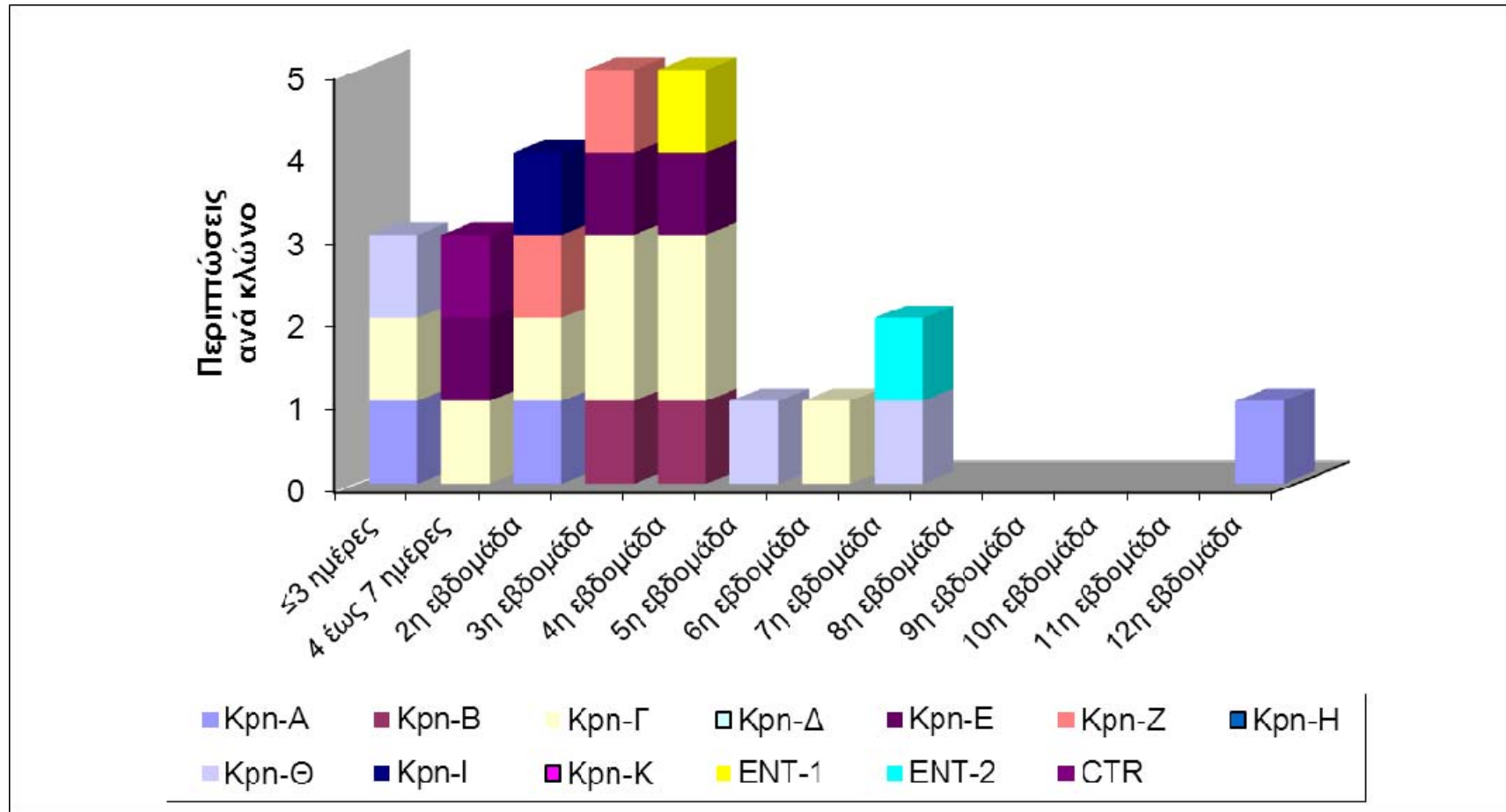
\* βασισμένο στη χαρτογράφηση με PCR με τη χρήση εναρκτήριων ολιγονουκλεοτιδικών αλληλουχιών βάση της αλληλουχίας του In-e541 [bib1] (δεν έγινε ανάγνωση ολόκληρης της αλληλουχίας).

Kpn, *K.pneumoniae*; Ecl, *E.cloacae*; Cfr, *C.freundii*; ΒΑ, βακτηριαμία; ΚΦΚ, κεντρικός φλεβικός καθετήρας; ΒΚΚ, βακτηριαμία σχετιζόμενη με κεντρικό φλεβικό καθετήρα; ΧΛ, χειρουργική λοίμωξη; ΛΜΜ, λοίμωξη μαλακών μορίων; ΠΑν, πνευμονία σχετιζόμενη με αναπνευστήρα; ΔΕ, δεν έγινε.

### 3.9. Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης

Κατά την διάρκεια της μελέτης, από τους 23 ασθενείς, 12 υπέστησαν μία ή περισσότερες κλινικές λοιμώξεις από εντεροβακτηριακά που παρήγαγαν καρμπαπενεμάση τύπου MBL. Σε αυτή την ομάδα ασθενών καταγράφηκαν συνολικά εννέα επεισόδια βακτηριαιμίας, τέσσερα από τα οποία οφείλονταν σε ΚΦΚ, τέσσερις πνευμονίες σχετιζόμενες με αναπνευστήρα, τρεις λοιμώξεις μαλακών μορίων και μία λοίμωξη χειρουργικού πεδίου. Σε όλους τους ασθενείς με ή χωρίς επιβεβαιωμένη λοίμωξη ανιχνεύθηκε αποικισμός σε μία ή περισσότερες περιοχές από μικροοργανισμό που παρήγαγε MBL τύπου VIM. Ο γαστρεντερικός σωλήνας ήταν η πιο κοινή εστία αποικισμού με 21 από τους 23 ασθενείς να είναι αποικισμένοι (91,3%) και ακολουθούσε το αναπνευστικό σύστημα με 9 ασθενείς να είναι αποικισμένοι (39,1%). Σε δύο ασθενείς (αριθ. 8 και 15) εντοπίστηκε στέλεχος *bla<sub>VIM-2</sub>*-θετικής *P. aeruginosa* στις βρογχικές εκκρίσεις στον ένα και στα ούρα στον άλλο. Προφανώς δεν υπήρξε οριζόντια μεταφορά του γονιδίου *bla<sub>VIM</sub>* από μη ζυμώντα τη λακτόζη σε εντεροβακτηριακά δεδομένου ότι δεν έχουν την ίδια παραλλαγή του γονιδίου. Ο μέσος χρόνος εμφάνισης VIM-θετικού Εντεροβακτηριακού στελέχους στους ασθενείς της μελέτης σε σχέση με την ημερομηνία εισαγωγής τους ήταν 21 ημέρες (διάμεσος χρόνος 19 ημέρες, εύρος 0-81 ημέρες) που επιβεβαιώνει την ενδονοσοκομειακή απόκτηση του στελέχους στην πλειονότητα των ασθενών, όπως φαίνεται αναλυτικά και στο Σχήμα 2.

**Σχήμα 2.** Χρόνος πρώτης απομόνωσης VIM-θετικού Εντεροβακτηριακού στελέχους σε σχέση με την ημερομηνία εισαγωγής των ασθενών της μελέτης. Κάθε γενετικά διακριτός κλώνος συμβολίζεται με διαφορετικό χρώμα.





#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ΜΕΘ του Γενικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου «Αττικών» άρχισε να λειτουργεί στα τέλη του 2003. Ένα χρόνο νωρίτερα, το 2002, είχαν διαπιστωθεί οι τρεις πρώτες εστίες επιδημίας *K. pneumoniae* που παρήγαγαν VIM-1 σε τρία τριτοβάθμια νοσοκομεία των Αθηνών (Scoulica EV et al, 2004). Η συστηματική παρακολούθηση των καλλιεργειών αποικισμού των ασθενών μας έδωσε τη δυνατότητα να διαπιστώσουμε ότι το γονίδιο *bla<sub>VIM-1</sub>* εισήχθηκε στην ΜΕΘ του «Αττικών» με τη μεταφορά αποικισμένων ασθενών από άλλα νοσοκομεία. Σύντομα έγινε σαφές ότι η αντοχή των Εντεροβακτηριακών στις καρβαπενέμες στη ΜΕΘ του «Αττικών» οφειλόταν κυρίως στη διασπορά αυτού του γονιδίου. Τα διαθέσιμα στοιχεία του Εθνικού Συστήματος Επιτήρησης της Αντοχής στα Αντιμικροβιακά (<http://www.mednet.gr/whonet/top.htm>) επιβεβαιώνουν και σε εθνικό επίπεδο τη συσχέτιση της πολυαντοχής της *K. pneumoniae* με τη διασπορά των *bla<sub>VIM-1</sub>*-θετικών στελεχών στα μεγάλα Ελληνικά νοσοκομεία από το 2002 ως το 2007 (Vatoroulos A et al, 2008).

Η παρούσα μελέτη διεξήχθη για να απαντήσει σε ερωτήματα σχετικά με την επιδημιολογία των *bla<sub>VIM-1</sub>*-θετικών εντεροβακτηριακών στην αρχή της επιδημίας στη ΜΕΘ ενός μεγάλου Πανεπιστημιακού νοσοκομείου της Αθήνας: Μήπως η αυξημένη συχνότητα απομόνωσης των στελεχών αυτών στο νοσοκομείο μας οφειλόταν στην διασπορά ενός συγκεκριμένου κλώνου, ή μήπως ήταν αποτέλεσμα οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων μεταξύ περισσότερων κλώνων; Θα μπορούσε να οφείλεται στη διάδοση ενός συζευκτικού πλασμιδίου μεταξύ των διαφόρων μικροβιακών ειδών; Ήταν πιθανό τα MBL-θετικά στελέχη *P. aeruginosa*, των οποίων η εμφάνιση προηγήθηκε αυτής των MBL-θετικών εντεροβακτηριακών, να αποτελούσαν την δεξαμενή αυτών των γονιδίων; Ποιος ήταν ο ρόλος του αποικισμού από στελέχη που παρήγαγαν MBL στην ανάπτυξη κλινικής λοίμωξης; Υπάρχει διαφορά μεταξύ των διαφόρων κλώνων στην πιθανότητα να προκαλέσουν λοίμωξη;

Μεταξύ των εντεροβακτηριακών που παρήγαγαν VIM στους ασθενείς της ΜΕΘ του νοσοκομείου μας διαπιστώθηκε πολυκλωνικότητα δεδομένου ότι τα 77 στελέχη MBL-θετικής *K. pneumoniae* αντιστοιχούσαν σε δέκα διαφορετικούς γενετικούς κλώνους, με τα 49 (63,6%) να ανήκουν στους τρεις μεγαλύτερους κλωνικούς τύπους. Ένας ασθενής μπορούσε να φέρει περισσότερους από ένα, και

μέχρι τέσσερις, γενετικά διακριτούς κλωνικούς τύπους. Παρατηρήθηκε επίσης διαφορετικοί ασθενείς που νοσηλεύθηκαν διαφορετικά χρονικά διαστήματα και χωρίς εμφανή επιδημιολογική συσχέτιση μεταξύ τους, να έχουν αποικισμό ή/και λοίμωξη από κοινούς κλώνους *K. pneumoniae* (οι ασθενείς αριθ. 1, 2 και 4 μοιράζονταν στελέχη κλωνικού τύπου E), κάτι που υποδηλώνει ότι η επιδημία αυτή τροφοδοτείται από πολλές διαφορετικές πηγές είτε από το περιβάλλον της ΜΕΘ είτε εκτός ΜΕΘ (σε άλλες πτέρυγες ή πιθανότερα σε άλλα νοσοκομεία).

Οι περισσότεροι κλωνικοί τύποι βρέθηκε να είναι υπεύθυνοι τόσο για αποικισμό όσο και για λοίμωξη. Συγκεκριμένα, οι κλώνοι E και K του ασθενούς Αρ. 1 ή ο κλώνος Γ του ασθενούς Αρ. 14 βρέθηκαν υπεύθυνοι αποικισμού στο γαστρεντερικό αλλά ταυτόχρονα υπεύθυνοι για βακτηραιμία στους ίδιους ασθενείς. Ωστόσο παρατηρήθηκε και το αντίθετο φαινόμενο όπου ασθενείς αποικισμένοι από κάποιους κλωνικούς τύπους έκαναν λοίμωξη από στελέχη που άνηκαν σε άλλους κλώνους. Συγκεκριμένα, ο ασθενής Αρ. 13 ήταν αποικισμένος από τους κλώνους Θ και K αλλά εμφάνισε βακτηραιμία από στέλεχος που ανήκε στον κλώνο Z. Τέλος, ορισμένοι ασθενείς είχαν αποικιστεί από περισσότερους του ενός κλώνους ή περισσότερα από ένα μικροβιακά είδη στο γαστρεντερικό σωλήνα, αλλά ποτέ δεν εμφάνισαν κλινική λοίμωξη (π.χ. Αρ. ασθενή 17). Πιθανότατα, η εμφάνιση ή όχι κλινικής λοίμωξης από τη χλωρίδα του ασθενούς σχετίζεται περισσότερο με τα χαρακτηριστικά του ξενιστή δηλαδή τις συν-νοσηρότητες και την επάρκεια του ανοσολογικού του συστήματος. Δεν κατέστη δυνατό να αναγνωρίσουμε κάποιους κλώνους με υψηλή λοιμογονικότητα δηλαδή ιδιαίτερη ικανότητα να προκαλούν κλινική λοίμωξη. Δεν εντοπίστηκε επίσης κάποια συσχέτιση μεταξύ συγκεκριμένων κλώνων και είδους λοίμωξης (π.χ. βακτηραιμία). Από την παρούσα μελέτη δεν μπόρεσε να διευκρινισθεί η ακριβής σημασία του προηγούμενου αποικισμού για την ανάπτυξη κλινικής λοίμωξης και αυτό παραμένει ένα «ανοικτό» ζήτημα για μελλοντική έρευνα.

Η πολυκλωνική φύση της επιδημίας στη ΜΕΘ του νοσοκομείου μας έρχεται σε αντίθεση με μερικές Ελληνικές δημοσιεύσεις. Οι Σκούλικα και συν. περιέγραψαν μία μικρή επιδημία από ένα κλώνο *E.coli* που παρήγαγε VIM-1 σε νοσοκομείο της Κρήτης το 2001 (Scoulica EV et al, 2004), οι Βουρλή και συν. μία μικρή επιδημία από έναν κυρίως κλώνο *P.mirabilis* που παρήγαγε VIM-1 σε νοσοκομείο της Θεσσαλονίκης το 2004-2005 (Vourli S et al, 2006), οι Πούλου και συν. μία κλωνική

επιδημία από VIM-1-θετική *K.pneumoniae* στις Σέρρες το 2007-2008 (Poulou A et al, 2010) και οι Τοκατλίδου και συν. μία κλωνική επιδημία από VIM-12-θετική *K.pneumoniae* στο Ιπποκράτειο Νοσοκομείο της Θεσσαλονίκης, το 2006-2007 (Tokatlidou D et al, 2008). Η πρώτη αναφορά της παρουσίας στελεχών *K.pneumoniae* που παρήγαγαν VIM-1 στη χώρα μας περιγράφει τέσσερις κλώνους σε τρία νοσοκομεία της Αθήνας το 2002 (Giakkouri P et al, 2003) ενώ οι Οικονομίδης και συν. δημοσίευσαν επιδημία από ένα κλώνο *K.pneumoniae* σε δύο νοσοκομεία, ένα στη Λάρισα και ένα στη Θεσσαλονίκη το 2004-2005 (Ikonomidis A et al, 2005). Η πολυκλωνικός χαρακτήρας της επιδημίας του «Αττικών» συμφωνεί με δεδομένα της Ψυχογιού και συν. που περιγράφουν τη διανοσοκομειακή ή/και ενδονοσοκομειακή διασπορά πολλών διαφορετικών κλώνων *K.pneumoniae* σε διάφορα νοσοκομεία της Αθήνας το 2004-2006, χαρακτηριστική της εξέλιξης μιας επιδημίας σε ενδημία (Psichogiou M et al, 2008). Όπως λοιπόν προκύπτει, η επιδημία του «Αττικών» αποτελούσε εξ αρχής μέρος της ενδημικής διασποράς πολλαπλών VIM-θετικών κλώνων στα νοσοκομεία της χώρας μας. Σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες περιγράφονται είτε κλωνικές επιδημίες Εντεροβακτηριακών με VIM, όπως ενδεικτικά στην Ιταλία (Cagnacci S et al, 2008) και στη Γαλλία (Kassis-Chikhani N et al, 2006) είτε πρόσφατα πολυκλωνικές επιδημίες όπως στο Bolzano της Ιταλίας (Aschbacher R et al, 2011) και σε νοσοκομείο στη Μαδρίτη (Gijón D et al, 2012), όπου όμως ξεκίνησε με μια πιο σύνθετη εικόνα με συνύπαρξη μονοκλωνικής επιδημίας από VIM-θετικά στελέχη *K.pneumoniae* και πολυκλωνικής επιδημίας από VIM-θετικά στελέχη *Enterobacter cloacae* (Tato M et al, 2010). Παρόμοια δεδομένα δημοσιεύθηκαν από νοσοκομείο της Βικτώρια στην Αυστραλία όπου κλωνικές επιδημίες από IMP-4 –θετικά στελέχη *S.marcescens* και *E.cloacae* συνυπήρχαν με πολυκλωνική επιδημία από *K.pneumoniae* (Peleg AY et al, 2005).

Είναι ενδιαφέρον ότι όλοι οι γενετικά διακριτοί κλώνοι *K. pneumoniae* στο νοσοκομείο μας, καθώς και οι δύο κλώνοι *E. cloacae* μοιράζονται την ίδια δομή ιντεγκρονίου, η οποία έχει περιγραφεί προηγουμένως σε άλλους κλώνους *K. pneumoniae* (GenBank Ap. καταχώρησης AY340637) (Scoulica EV et al, 2004; Psichogiou M et al, 2008) καθώς και σε *E. coli* (GenBank Ap. καταχώρησης AY339625) (Miriagou V et al, 2003), *Providencia stuartii* (Miriagou V et al, 2007), *Proteus mirabilis* (Galani I et al, 2005), *Serratia liquefaciens*, *Klebsiella oxytoca* (Miriagou V et al, 2008) και *Acinetobacter baumannii* (GenBank Ap. καταχώρησης

DQ112355) (Tsakris A et al, 2006), που απομονώθηκαν σε διαφορετικά νοσοκομεία της Ελλάδας. Το ιντεγκρόνιο αυτό που έχει χαρακτηριστεί ως In-e541, έχει κυρίως βρεθεί σε μια ποικιλία IncN πλασμιδίων και μόνο σπάνια έχει ανευρεθεί σε χρωμόσωμα (Vourli S et al, 2006) ή σε πλασμίδια IncW (Miriagou V et al, 2008). Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η αλληλουχία εισδοχής IS26 είναι υπεύθυνη για την κινητοποίηση του και τη μεταφορά του μεταξύ διαφορετικών ειδών και μεταξύ στελεχών του ίδιου είδους (Miriagou V et al, 2005). Πρόσφατα, παρόμοιες δομές ιντεγκρονίων που περιέχουν τα γονίδια *bla<sub>VIM-4</sub>* ή *bla<sub>VIM-19</sub>* ως πρώτη γονιδιακή κασέτα έχουν εντοπιστεί σε Εντεροβακτηριακά στην Ελλάδα (Pournaras S et al, 2010; Ikonomidis A et al, 2007). Οι Carattoli και συν. (Carattoli A et al, 2006) επιβεβαιώνουν ότι οι διαφορετικοί κλώνοι των VIM-θετικών στελεχών *K.pneumoniae* από διάφορα ελληνικά νοσοκομεία φέρουν πλασμίδια που έχουν διαφορετικό μέγεθος και ηλεκτροφορητικό προφίλ μετά από πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, αλλά ανήκουν στην ίδια ομάδα ασυμβατότητας IncN και επομένως έχουν κοινή φυλογενετική προέλευση αν και έχουν υποστεί ποικιλία γεγονότων γενετικού ανασυνδυασμού.

Στα ίδια πλαίσια κινείται και μία δημοσίευση από την Γένοβα της Ιταλίας για ένα στέλεχος *K. pneumoniae* που προκάλεσε επιδημία βακτηριαμίων το 2004 και το οποίο έφερε ιντεγκρόνιο πανομοιότυπο με το In87, με *bla<sub>VIM-1</sub>* και *aac(6')*-IIc (Cagnacci S et al, 2008). Το ιντεγκρόνιο αυτό, όπως προαναφέρθηκε, είχε εντοπισθεί για πρώτη φορά από την ομάδα μας το 2003 σε *E. cloacae* από Έλληνα ασθενή μετά από νοσηλεία σε επαρχιακό νοσοκομείο (Giakkouri P et al, 2003) καθώς και στο *C. freundii* της παρούσας μελέτης. Οι συγγραφείς από την Ιταλία υπογράμμισαν την πιθανότητα κοινής περιβαλλοντικής πηγής για την προέλευση των εν λόγω ιντεγκρονίων, μια και δεν μπόρεσε να βρεθεί καμία επιδημιολογική σχέση μεταξύ του πρώτου Ιταλού ασθενούς με την Ελλάδα ή με Έλληνες. Ιντεγκρόνια με δομή παρόμοια με του In87 έχουν περιγραφεί σε πολύ απομακρυσμένες γεωγραφικές περιοχές όπως την Ιαπωνία: το InK27AT σε στέλεχος *K. oxytoca*, το οποίο φέρει το γονίδιο *bla<sub>IMP-1</sub>* ως πρώτη γονιδιακή κασέτα (Ode T et al, 2006) και τα In-s1 και In-s3 σε στελέχη *Serratia marcescens*, τα οποία φέρουν το γονίδιο *bla<sub>IMP-1</sub>* ή *bla<sub>IMP-10</sub>* ως πρώτη γονιδιακή κασέτα, αντίστοιχα (Hu Z et al, 2009). Παρόμοια παρατήρηση για διασπορά της αντοχής στις καρβαπενέμες με μεταφορά μεταξύ διαφορετικών ειδών Εντεροβακτηριακών άλλων δομών ιντεγκρονίων (In110, In113), που περιέχουν το

γονίδιο *bla*<sub>VIM-1</sub> δημοσιεύθηκε πρόσφατα και από την Ισπανία, ερμηνεύοντας την επιδημία από VIM-1 θετικά στελέχη σε Νοσοκομείο της Μαδρίτης το 2005-2007 (Tato M et al, 2010). Αντίθετα, η μεταφορά συζευκτικών πλασμιδίων μεταξύ διαφορετικών ειδών σπάνια έχει αναφερθεί ως αιτία της διασποράς της μεταλλο-β-λακταμάσης τύπου VIM (Galani I et al., 2007; March A et al, 2010; Luzzaro F et al, 2004).

Είναι προφανές ότι υπάρχει μια εξαιρετικά αποτελεσματική μεταφορά εντεγκρονίων τάξεως 1 μεταξύ μικροβιακών ειδών και κλώνων, η οποία διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο στην ανάπτυξη και τη διασπορά της πολλαπλής αντοχής των Εντεροβακτηριακών στα αντιμικροβιακά και εν μέρει ερμηνεύει την πανδημική εξάπλωση της αντοχής στις καρβαπενέμες μέσω των VIM (Leverstein-van Hall MA et al, 2003)

Τέλος, είναι αξιοσημείωτη η διαφορά στην επιδημιολογία των Εντεροβακτηριακών και ιδιαίτερα των στελεχών *K.pneumoniae* που παράγουν VIM-1, τα οποία επικράτησαν στα Ελληνικά νοσοκομεία από το 2002 ως το 2007, σε σχέση με τα στελέχη που παράγουν KPC καρβαπενεμάση, τα οποία επικρατούν από το 2008 ως σήμερα. Η επιδημία των KPC ήταν μονοκλωνική, με ένα υπερενδημικό κλωνικό τύπο (ST 258) να επικρατεί διεθνώς όπως και στη χώρα μας και μόνο πρόσφατα άρχισαν να αναφέρονται νέοι κλώνοι με το γονίδιο *bla*<sub>KPC</sub> στα Ελληνικά νοσοκομεία (Giakkoupi et al, 2011). Επιπλέον, η μεταφορά του γονιδίου μεταξύ διαφορετικών ειδών Εντεροβακτηριακών έχει συσχετισθεί με την παρουσία ενός συγκεκριμένου τρανσποζονίου (*Tn* 4401) ή με μεταφορά ολοκλήρου του πλασμιδίου (Munoz-Price LS et al, 2009).

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μελέτη της μοριακής επιδημιολογίας της πρώτης επιδημίας από Εντεροβακτηριακά που παράγαν VIM μεταλλο-β-λακταμάση στη ΜΕΘ του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου «Αττικών» επιβεβαίωσε τον πολυκλωνικό της χαρακτήρα και την διασπορά ενός κυρίως ιντεγκρονίου τάξεως 1 μεταξύ διαφορετικών κλώνων και διαφορετικών ειδών Εντεροβακτηριακών ενώ τα VIM θετικά στελέχη δεν μοιράζονταν κοινά πλασμίδια. Η πλειονότητα των ασθενών της μελέτης απέκτησαν το θετικό στέλεχος κατά τη νοσηλεία τους και η συχνότερη θέση αποικισμού ήταν ο γαστρεντερικός σωλήνας. Μεταξύ των δέκα διαφορετικών κλώνων *K. pneumoniae* δεν αναγνωρίστηκε κάποιος με ιδιαίτερη λοιμογονική δράση και δεν κατέστη δυνατό να βρεθεί συσχέτιση κάποιου κλώνου με την πρόκληση κάποιας συγκεκριμένης κλινικής λοίμωξης. Οι παραπάνω παρατηρήσεις συνεισφέρουν στην καλύτερη κατανόηση της επιδημιολογίας των Εντεροβακτηριακών που παράγουν VIM και στην διαμόρφωση κατάλληλων στρατηγικών για την αναχαίτιση της διασποράς τους.

## 6. ABSTRACT

The molecular epidemiology of VIM-producing Enterobacteriaceae isolated at the beginning of an epidemic in the Intensive Care Unit (ICU) of University General Hospital “ATTIKON” was studied. All Gram-negative organisms isolated from March 2004 to November 2005 positive for metallo- $\beta$ -lactamase (MBL) production were submitted to polymerase chain reaction (PCR) and sequencing, to repetitive sequence-based PCR (Rep-PCR) for molecular typing, and to S1 nuclease digestion for plasmid DNA characterization. Conjugation experiments and isoelectric focusing were performed to identify co-existing  $\beta$ -lactamases. Amongst 23 patients, 12 suffered one or more clinical infections. Eighty-two isolates representing one isolate per clone, source and ICU patient were studied, including *Klebsiella pneumoniae* (77), *Enterobacter cloacae* (2), *Citrobacter freundii* (1) and *Pseudomonas aeruginosa* (2). High clonal diversity was detected amongst the *K. pneumoniae*, with 10 distinct clones identified. Conjugation was successful in 54.5% of *K. pneumoniae*, and five different-sized plasmids were detected. All *K. pneumoniae* and both *E. cloacae* isolates shared the same *bla*<sub>VIM-1</sub>-containing class 1 integron structure also carrying *aacA7*, *dhfrI* and *aadA1* gene cassettes. The *C. freundii* isolate carried a different integron that included *bla*<sub>VIM-1</sub> and *aac(6')-IIc*. Both *P. aeruginosa* isolates were positive for *bla*<sub>VIM-2</sub>. It was not possible to identify specific clones with the potential to cause clinical infections. In conclusion, a multiclonal cluster of MBL-producers was responsible for the first cases of colonisation and/or infection in the ICU. A single integron structure, common in Greek hospitals, efficiently disseminated between clones and species, suggesting that the epidemic was mainly the result of successful horizontal transfer of mobile genetic material rather than the result of horizontal transfer of one or a few clones.

## 7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2008, Abstract P2000.
- 2) Agwuh KN, MacGowan A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylicyclines. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006;58(2), 256-265.
- 3) Al-Agamy MH, Shibl AM, Tawfik AF, Radwan HH. High prevalence of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* from Saudi Arabia. *J Chemother* 2009; 21: 461–62.
- 4) Alley, D. 2011. Novel boron-containing aminoacyl-tRNA synthetase inhibitors with Gram-negative bacterial activity. *Abstr. 51st Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother.*, abstr. 1071.
- 5) Ambler, R. P. 1980. The structure of  $\beta$ -lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 289:321–331.
- 6) Ambler, R. P., A. F. W. Coulson, J. M. Frere, J. M. Ghuysen, B. Joris, M. Forsman, R. C. Levesque, G. Tiraby, and S. G. Waley. 1991. A standard numbering scheme for the class A  $\beta$ -lactamases. *Biochem. J.* 276:269–270.
- 7) Andrade S. S., R. N. Jones, A. C. Gales, and H. S. Sader. 2003. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centres: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2001). *J. Antimicrob. Chemother.* 52:140–U7.
- 8) Antoniadou A, Kontopidou F, Poulakou G, Koratzanis E, Galani I, Papadomichelakis E, Kopterides P, Souli M, Armaganidis A, Giamarellou H. Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: first report of a multiclonal cluster. *J Antimicrob Chemother.* 2007 Apr;59(4):786-90



- 9) Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K et al. Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 40–43.
- 10) Arakawa, Y., M. Murakami, K. Suzuki, H. Ito, R. Wacharotayankun, S. Ohsuka, N. Kato, and M. Ohta. 1995. A novel integron-like element carrying the metallo- $\beta$ -lactamase gene blaIMP. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1612–1615.
- 11) Aschbacher R, Pagani L, Doumith M, Pike R, Woodford N, Spoladore G, Larcher C, Livermore DM. Metallo- $\beta$ -lactamases among Enterobacteriaceae from routine samples in an Italian tertiary-care hospital and long-term care facilities during 2008. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Feb;17(2):181-9.
- 12) Azim A, Dwivedi M, Rao PB, et al. Epidemiology of bacterial colonization at intensive care unit admission with emphasis on extended-spectrum  $\beta$ -lactamase- and metallo- $\beta$ -lactamase-producing Gram-negative bacteria—an Indian experience. *J Med Microbiol* 2010; 59: 955–60.
- 13) Bahar G, Mazzariol A, Koncan R, et al. Detection of VIM-5 metallo- $\beta$ -lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 282–83.
- 14) Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem* 1995;226:235–40.
- 15) Beaber, J. W., B. Hochhut, and M. K. Waldor. 2004. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* 427:72–74.
- 16) Bellais, S., L. Poirel, S. Leotard, T. Naas, and P. Nordmann. 2000. Genetic diversity of carbapenem-hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamases from *Chryseobacterium* (Flavobacterium) indologenes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 3028–3034.
- 17) Bellais, S., O. Mimoz, S. Leotard, A. Jacolot, O. Petitjean, and P. Nordmann. 2002. Efficacy of  $\beta$ -lactams for treating experimentally induced pneumonia due to a carbapenem-hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamase-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 2032–2034.

- 18) Ben Othman A, Zribi M, Masmoudi A, Abdellatif S, Ben Lakhal S, Fendri C. Phenotypic and molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Rabta Hospital, Tunisia. *Arch Inst Pasteur Tunis* 2007; 84: 11–19.
- 19) Bennett, P. M. 1999. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 43:1–4.
- 20) Biendo M, Canarelli B, Thomas D, et al. Successive emergence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and carbapenemase-producing *Enterobacter aerogenes* isolates in a university hospital. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1037–44.
- 21) Bogaerts P, Verroken A, Jans B, Denis O, Glupczynski Y. Global spread of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase 1. *Lancet Infect Dis* 2010; 10: 831–32.
- 22) Bonnet et al. Novel Cefotaximase (CTX-M-16) with Increased Catalytic Efficiency Due to Substitution Asp-240→Gly. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2269-2275.
- 23) Boschi, L., P. S. Mercuri, M. L. Riccio, G. Amicosante, M. Galleni, J. M. Frere, and G. M. Rossolini. 2000. The *Legionella* (*Fluoribacter*) *gormanii* metallo- $\beta$ -lactamase: a new member of the highly divergent lineage of molecular-subclass B3  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:1538–1543.
- 24) Bosnjak Z, Bedenić B, Mazzariol A, Jarza-Davila N, Suto S, Kalenić S. VIM-2  $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Zagreb, Croatia. *Scand J Infect Dis* 2010; 42: 193–97.
- 25) Bounaga, S., A. P. Laws, M. Galleni, and M. I. Page. 1998. The mechanism of catalysis and the inhibition of the *Bacillus cereus* zinc-dependent  $\beta$ -lactamase. *Biochem. J.* 331:703–711.
- 26) Bratu S, Mooty M, Nichani S et al. Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3018–3020.

- 27) Bulik, C. C., H. Christensen, P. Li, C. A. Sutherland, D. P. Nicolau, and J. L. Kuti. 2010. Comparison of the activity of a human simulated, high-dose, prolonged infusion of meropenem against *Klebsiella pneumoniae* producing the KPC carbapenemase versus that against *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro pharmacodynamic model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:804-810.
- 28) Bush K. 1999.  $\beta$ -Lactamases of increasing clinical importance. *Curr.Pharm. Des.* 5:839–845.
- 29) Bush K. 2001. New  $\beta$ -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin. Infect. Dis.* 32:1085–1089.
- 30) Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Mar;54(3):969-76. Epub 2009 Dec 7. Review.)
- 31) Bush K., G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros. 1995. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1211–1233.
- 32) Bush, K. 1989. Classification of  $\beta$ -lactamases—group-2c, group-2d, group-2e, group-3, and group-4. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:271–276
- 33) Buynak, J. D., H. Chen, L. Vogeti, V. R. Gadhachanda, C. A. Buchanan, T. Palzkill, R. W. Shaw, J. Spencer, and T. R. Walsh. 2004. Penicillin-derived inhibitors that simultaneously target both metallo- and serine- $\beta$ -lactamases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14:1299-1304.
- 34) Buzala, G., M. Psychogiou, L. Hadjihanas, V. Sypsa, M. Grammaticou, G. Daikos. 2011. Risk factors for carbapenem resistant enterobacteriaceae carriage on admission to a surgical unit and acquisition rate during hospitalization, abstr. P687. Abstr. 21st Eur. Congr. Clin. Microbiol. Infect. Dis., Milan, Italy.
- 35) Cagnacci S, Gualco L, Roveta S, Mannelli S, Borgianni L, Docquier JD, Dodi F, Centanaro M, Debbia E, Marchese A, Rossolini GM. Bloodstream infections caused by multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing the

- carbapenem-hydrolysing VIM-1 metallo-beta-lactamase: first Italian outbreak. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Feb;61(2):296-300.
- 36) Carattoli A, Miriagou V, Bertini A, Loli A, Colinon C, Villa L, Whichard JM, Rossolini GM. Replicon typing of plasmids encoding resistance to newer beta-lactams. *Emerg Infect Dis.* 2006 Jul;12(7):1145-8.
- 37) Cardoso O, Alves AF, Leitao R. Metallo-beta-lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a cystic fibrosis patient. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31:375–9
- 38) Castanheira M, Bell JM, Turnidge JD, Mathai D, Jones RN. Carbapenem resistance among *Pseudomonas aeruginosa* strains from India: evidence for nationwide endemicity of multiple metallo- $\beta$ -lactamase clones (VIM-2, -5, -6, and -11 and the newly characterized VIM-18). *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 1225–27.
- 39) 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 Feb;52(2):570-3.
- 40) Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a  $\beta$ -lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo- $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4654–61.
- 41) Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Detection of Enterobacteriaceae isolates carrying metallo- $\beta$ -lactamase—United States, 2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2010; 59: 750.
- 42) Chen LR, Zhou HW, Cai JC, Zhang R, Chen GX. Combination of IMP-4 metallo-beta-lactamase production and porin deficiency causes carbapenem resistance in a *Klebsiella oxytoca* clinical isolate. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009;65:163–7.

- 43) Chen LR, Zhou HW, Cai JC, Zhang R, Chen GX. Detection of plasmid-mediated IMP-1 metallo- $\beta$ -lactamase and quinolone resistance determinants in an ertapenem-resistant *Enterobacter cloacae* isolate. *J Zhejiang Univ Sci B* 2009; 10: 348–54.
- 44) Chen, Y. H., J. Succi, F. C. Tenover, and T. M. Koehler. 2003.  $\beta$ -Lactamase genes of the penicillin-susceptible *Bacillus anthracis* Sterne strain. *J. Bacteriol.* 185:823–830.
- 45) Cheng X, Wang P, Wang Y, et al. Identification and distribution of the clinical isolates of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying metallo- $\beta$ -lactamase and/or class 1 integron genes. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2008; 28: 235–38.
- 46) Chiu CH, Lee HY, Tseng LY, et al. Mechanisms of resistance to ciprofloxacin, ampicillin/sulbactam and imipenem in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Taiwan. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35: 382–86.
- 47) Chu YW, Aal-Shah M, Houang ET, et al. IMP-4, a novel metallo- $\beta$ -lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp collected in Hong Kong between 1994 and 1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 710–14.
- 48) Chu YW, Cheung TK, Ngan JY, Kam KM. EDTA susceptibility leading to false detection of metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* by Etest and an imipenem–EDTA disk method. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 26: 340–341.
- 49) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 19th informational supplement. CLSI document M100-S19. Wayne, PA: CLSI, 2009.
- 50) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 22nd informational supplement. CLSI document M100-S22. CLSI, Wayne, PA, USA, 2012

- 51) Collis, C. M., M. J. Kim, H. W. Stokes, and R. M. Hall. 2002. Integron-encoded Int1 integrases preferentially recognize the adjacent cognate attL site in recombination with a 59-bp site. *Mol. Microbiol.* 46:1415–1427.
- 52) Concha, N. O., B. A. Rasmussen, K. Bush, and O. Herzberg. 1996. Crystal structure of the wide-spectrum binuclear zinc  $\beta$ -lactamase from *Bacteroides fragilis*. *Structure* 4:823–836.
- 53) Cornaglia G, Akova M, Amicosante G, et al, for the ESCMID Study Group for Antimicrobial Resistance Surveillance (ESGARS). Metallo- $\beta$ -lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29: 380–88.
- 54) Cornaglia G, Riccio ML, Mazzariol A, Lauretti L, Fontana R, Rossolini GM. Appearance of IMP-1 metallo- $\beta$ -lactamase in Europe. *Lancet* 1999; 353: 899–900.
- 55) Crowder, M. W., Z. Wang, S. L. Franklin, E. P. Zovinka, and S. J. Benkovic. 1996. Characterization of the metal-binding sites of the  $\beta$ -lactamase from *Bacteroides fragilis*. *Biochemistry* 35:12126–12132.
- 56) Cuzon, G., T. Naas, H. Truong, M. V. Villegas, K. T. Wisell, Y. Carmeli, A. C. Gales, S. N. Venezia, J. P. Quinn, and P. Nordmann. 2010. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce  $\beta$ -lactamase blaKPC-2 gene. *Emerg. Infect. Dis.* 16:1349-1356.
- 57) Da Silva GJ, Correia M, Vital C, et al. Molecular characterization of blaIMP-5, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 215: 33–39.
- 58) Daikos G. L., A. Skiada, J. Pavleas, C. Vafiadi, K. Salatas, P. Tofas, K. Tzanetou, A. Markogiannakis, G. Thomopoulos, I. Vafiadi, and G. Petrikos. 2010. Serum bactericidal activity of three different dosing regimens of colistin with implications for optimum clinical use. *J. Chemother.* 22:175-178.

- 59) Daikos GL, Markogiannakis A, Souli M, Tzouvelekis LS. Bloodstream infections caused by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a clinical perspective. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012 Dec;10(12):1393-404.
- 60) Daikos GL, Petrikkos P, Psychogiou M, Kosmidis C, Vryonis E, Skoutelis A, Georgousi K, Tzouvelekis LS, Tassios PT, Bamia C, Petrikkos G. Prospective observational study of the impact of VIM-1 metallo-beta-lactamase on the outcome of patients with *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 May;53(5):1868-73.
- 61) Daikos GL, Skiada A, Pavleas J, Vafiadi C, Salatas K, Tofas P, Tzanetou K, Markogiannakis A, Thomopoulos G, Vafiadi I, Petrikkos G. Serum bactericidal activity of three different dosing regimens of colistin with implications for optimum clinical use. *J Chemother*. 2010 Jun;22(3):175-8.
- 62) Daikos, G. L., A. Karabinis, E. Paramythiotou, V. P. Syriopoulou, C. Kosmidis, A. Avlami, P. Gargalianos, K. Tzanetou, D. Petropoulou, and H. Malamou-Lada. 2007. VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: analysis of 28 cases. *Int. J. Antimicrob. Agents* 29:471-473.
- 63) Daikos, G. L., A. Panagiotakopoulou, E. Tzelepi, A. Loli, L. S. Tzouvelekis, and V. Miriagou. 2007. Activity of imipenem against VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the murine thigh infection model. *Clin. Microbiol. Infect.* 13:202-205
- 64) Daikos, G. L., and A. Markogiannakis. 2011. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: (when) might we still consider treating with carbapenems? *Clin. Microbiol. Infect.* 17:1135-1141.
- 65) Daikos, G. L., P. Petrikkos, M. Psychogiou, C. Kosmidis, E. Vryonis, A. Skoutelis, K. Georgousi, L. S. Tzouvelekis, P. T. Tassios, C. Bamia, and G. Petrikkos. 2009. Prospective observational study of the impact of VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase on the outcome of patients with *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:1868-1873.

- 66) Daoud Z, Hobeika E, Choucair A, Rohban R. Isolation of the first metallo- $\beta$ -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in Lebanon. *Rev Esp Quimioter* 2008; 21: 123–26.
- 67) Deplano A, Rodriguez-Villalobos H, Glupczynski Y, et al Emergence and dissemination of multidrug resistant clones of *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase in Belgium. *Euro Surveill* 2007; 12: E070118.2.
- 68) Detection of Enterobacteriaceae isolates carrying metallo-beta-lactamase – United States, 2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2010;59:750.
- 69) Docquier JD, Lamotte-Brasseur J, Galleni M, Amicosante G, Frère JM, Rossolini GM. On functional and structural heterogeneity of VIM-type metallo-beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 2003 Feb;51(2):257-66.
- 70) Docquier JD, Riccio ML, Mugnaioli C, et al. IMP-12, a new plasmid-encoded metallo- $\beta$ -lactamase from a *Pseudomonas putida* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1522–28.
- 71) Docquier, J. D., J. Lamotte-Brasseur, M. Galleni, G. Amicosante, J. M. Frere, and G. M. Rossolini. 2003. On functional and structural heterogeneity of VIM-type metallo- $\beta$ -lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* 51:257–266.
- 72) Dortet L, Radu I, Gautier V, Blot F, Chachaty E, Arlet G. Intercontinental travels of patients and dissemination of plasmid-mediated carbapenemase KPC-3 associated with OXA-9 and TEM-1. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:455–7.
- 73) Duljasz W, Gniadkowski M, Sitter S, Wojna A, Jebelean C. First organisms with acquired metallo- $\beta$ -lactamases (IMP-13, IMP-22, and VIM-2) reported in Austria. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53: 2221–22.
- 74) Dwivedi M, Mishra A, Azim A, et al. Ventilator-associated pneumonia caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae carrying multiple metallo- $\beta$ -lactamase genes. *Indian J Pathol Microbiol* 2009; 52: 339–42.



- 75) Endimiani A, Depasquale JM, Forero S et al. Emergence of blaKPC-containing *Klebsiella pneumoniae* in a long-term acute care hospital: a new challenge to our healthcare system. *J Antimicrob Chemother* 2009; Sep 9
- 76) Espedido BA, Partridge SR, Iredell JR. blaIMP-4 in different genetic contexts in Enterobacteriaceae isolates from Australia. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:2984-7.
- 77) Falagas ME, Maraki S, Karageorgopoulos DE, Kastoris AC, Mavromanolakis E, Samonis G. Antimicrobial susceptibility of multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) Enterobacteriaceae isolates to fosfomycin. *Int J Antimicrob Agents*. 2010 Mar;35(3):240-3.
- 78) Figueiredo S, Poirel L, Papa A, Koulourida V, Nordmann P. First identification of VIM-4 metallo- $\beta$ -lactamase in *Acinetobacter* spp. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 289-90.
- 79) Frere, J. M. 1995.  $\beta$ -lactamases and bacterial resistance to antibiotics. *Mol Microbiol*. 16:385-395.
- 80) Fukigai S, Alba J, Kimura S, et al. Nosocomial outbreak of genetically related IMP-1  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a general hospital in Japan. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29: 306-10.
- 81) Galani I, Souli M, Chryssouli Z, Orlandou K, Giamarellou H. Characterization of a new integron containing blaVIM-1 and aac(6')-IIc in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate from Greece. *J Antimicrob Chemother* 2005;55:634-8.
- 82) Galani I, Souli M, Daikos GL, Chryssouli Z, Poulakou G, Psychogiou M, Panagea T, Argyropoulou A, Stefanou I, Plakias G, Giamarellou H, Petrikos G. Activity of plazomicin (ACHN-490) against MDR clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Enterobacter* spp. from Athens, Greece. *J Chemother*. 2012 Aug;24(4):191-4.
- 83) Galani I, Souli M, Koratzanis E, Koratzanis G, Chryssouli Z, Giamarellou H. Emerging bacterial pathogens: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* and *Proteus mirabilis* clinical isolates harbouring the same transferable plasmid coding for metallo-beta-lactamase VIM-1 in Greece. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Mar;59(3):578-9.

- 84) Garonzik SM, Li J, Thamlikitkul V, Paterson DL, Shoham S, Jacob J, Silveira FP, Forrest A, Nation RL. Population pharmacokinetics of colistin methanesulfonate and formed colistin in critically ill patients from a multicenter study provide dosing suggestions for various categories of patients.. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Jul;55(7):3284-94
- 85) Garza-Ramos U, Morfi n-Otero R, Sader HS, et al. Metallo- $\beta$ -lactamase gene blaIMP-15 in a class 1 integron, In95, from *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a hospital in Mexico. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 2943–46
- 86) Garza-Ramos U, Tinoco P, Silva-Sanchez J, et al. Metallo- $\beta$ -lactamase IMP-18 is located in a class 1 integron (In96) in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa* from Mexico. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31: 78–80. (a)
- 87) Giakkoupi P, Papagiannitsis CC, Miriagou V, Pappa O, Polemis M, Tryfinopoulou K, Tzouvelekis LS, Vatopoulos AC. An update of the evolving epidemic of blaKPC-2-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009-10). *J Antimicrob Chemother*. 2011; 66(7):1510-3
- 88) Giakkoupi P, Papagiannitsis CC, Miriagou V, Pappa O, Polemis M, Tryfinopoulou K, Tzouvelekis LS, Vatopoulos AC. An update of the evolving epidemic of blaKPC-2-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009-10). *J Antimicrob Chemother*. 2011 Jul;66(7):1510-3.
- 89) Giakkoupi P, Tzouvelekis LS, Daikos GL et al. Discrepancies and interpretation problems in susceptibility testing of VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 494–496.
- 90) Giakkoupi P, Vourli S, Polemis M et al. Supplementation of growth media with Zn<sup>2+</sup> facilitates detection of VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1568–1569.
- 91) Giakkoupi P, Xanthaki A, Kanelopoulou M, Vlahaki A, Miriagou V, Kontou S, et al. VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greek hospitals. *J Clin Microbiol* 2003;41:3893–6.

- 92) Gibb AP, Tribuddharat C, Moore RA, et al. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new blaIMP allele, blaIMP-7. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 255–58.
- 93) Gijón D, Curiao T, Baquero F, Coque TM, Cantón R. Fecal carriage of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a hidden reservoir in hospitalized and nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol*. 2012 May;50(5):1558-63. doi: 10.1128/JCM.00020-12. Epub 2012 Mar 7.
- 94) Giske CG, Libisch B, Colinon C, et al. Establishing clonal relationships between VIM-1-like metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains from four European countries by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 4309–15.
- 95) Gootz TD, Lescoe MK, Dib-Hajj F, Dougherty BA, HeW, Della-Latta P, et al. Genetic organization of transposase regions surrounding blaKPC carbapenemase genes on plasmids from *Klebsiella* strains isolated in a New York City hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:1998–2004.
- 96) Hammerun AM, Toleman MA, Hanse F, et al. Global spread of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase 1. *Lancet Infect Dis* 2010; 10: 829–30.
- 97) Hanson ND, Hossain A, Buck L, Moland ES, Thomson KS. First occurrence of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in the United States producing an IMP metallo- $\beta$ -lactamase, IMP-18. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2272–73.
- 98) Hawkey PM, Xiong J, Ye H, Li H, M’Zali FH. Occurrence of a new metallo- $\beta$ -lactamase IMP-4 carried on a conjugative plasmid in *Citrobacter youngae* from the People’s Republic of China. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 194: 53–57.
- 99) Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases : an emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:1119–25.

- 100) Hocquet D, Plésiat P, Dehecq B, Mariotte P, Talon D, Bertrand X, for the Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques. Nationwide investigation of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, metallo- $\beta$ -lactamases, and extended-spectrum oxacillinases produced by *Pseudomonas aeruginosa* strains in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 3512–15.
- 101) Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control* 2008;36:309–32.
- 102) Hrabák J, Cervená D, Izdebski R, et al. Regional spread of *Pseudomonas aeruginosa* ST357 producing the IMP-7 metallo- $\beta$ -lactamase in central Europe. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 474–75.
- 103) Hrabák J, Fridrichová M, Stolbová M, Bergerová T, Zemlickova H, Urbaskova P. First identification of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Czech Republic. *Euro Surveill* 2009;14: 19102
- 104) Hu Z, Zhao WH. Identification of plasmid- and integron-borne blaIMP-1 and blaIMP-10 in clinical isolates of *Serratia marcescens*. *J Med Microbiol*. 2009 Feb;58(Pt 2):217-21
- 105) Huovinen, P., S. Huovinen, and G. A. Jacoby. 1988. Sequence of PSE-2  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother*. 32:134–136.
- 106) Hwa WE, Subramaniam G, Navaratnam P, Sekaran SD. Detection and characterization of class 1 integrons among carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter* spp in Malaysia. *J Microbiol Immunol Infect* 2009; 42: 54–62.
- 107) Ikonmidis A, Ntokou E, Maniatis AN et al. Hidden VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase phenotypes among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 346–349.
- 108) Ikonmidis A, Ntokou E, Maniatis AN et al. Hidden VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase phenotypes among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 346–349.

- 109) Ikonomidis A, Spanakis N, Poulou A, Pournaras S, Markou F, Tsakris A. Emergence of carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* carrying VIM-4 metallo- $\beta$ -lactamase and SHV-2a extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in a conjugative plasmid. *Microb Drug Resist* 2007;13:221–6.
- 110) Ikonomidis A, Tokatlidou D, Kristo I, Sofianou D, Tsakris A, Mantzana P, Pournaras S, Maniatis AN. Outbreaks in distinct regions due to a single *Klebsiella pneumoniae* clone carrying a bla VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase gene. *J Clin Microbiol*. 2005 Oct;43(10):5344-7.
- 111) Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S, Wacharotayankun R, Kato N, Ohta M. Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 824–829
- 112) Iwanaga, M., C. Toma, T. Miyazato, S. Insisiengmay, N. Nakasone, and M. Ehara. 2004. Antibiotic resistance conferred by a class I integron and SXT constin in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in Laos. *Antimicrob. Agents Chemother*. 48:2364–2369.
- 113) Iyobe S, Kusadokoro H, Ozaki J, et al. Amino acid substitutions in a variant of IMP-1 metallo- $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2023–27.
- 114) Iyobe S, Kusadokoro H, Takahashi A, et al. Detection of a variant metallo- $\beta$ -lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an *Alcaligenes xylooxidans* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2014–16.
- 115) Jaurin, B., and T. Grundstrom. 1981. ampC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of  $\beta$ -lactamases of the penicillinase type. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:4897–4901.
- 116) Jones RN, Biedenbach DJ, Sader HS, Fritsche TR, Toleman MA, Walsh TR. Emerging epidemic of metallo- $\beta$ -lactamase-mediated resistances. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 51: 77–84.

- 117) Jones RN, Deshpande LM, Bell JM, et al. Evaluation of the contemporary occurrence rates of metallo- $\beta$ -lactamases in multidrug-resistant Gram-negative bacilli in Japan: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998–2002). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 49: 289–94.
- 118) Juan C, Beceiro A, Gutiérrez O, et al. Characterization of the new metallo- $\beta$ -lactamase VIM-13 and its integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 3589–96.
- 119) Kassis-Chikhani N, Decré D, Gautier V, Burghoffer B, Saliba F, Mathieu D, Samuel D, Castaing D, Petit JC, Dussaix E, Arlet G. First outbreak of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying blaVIM-1 and blaSHV-5 in a French university hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2006 Jan;57(1):142-5.
- 120) Khosravi AD, Mihani F. Detection of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in Ahwaz, Iran. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 60: 125–28. Khosravi AD
- 121) Khosravi Y, Tee Tay S, Vadivelu J. Metallo- $\beta$ -lactamase-producing imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in a university teaching hospital in Malaysia: detection of IMP-7 and first identification of IMP-4, VIM-2, and VIM-11. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 67: 294–96.
- 122) Kimura S, Ishii Y, Yamaguchi K. Evaluation of dipicolinic acid for detection of IMP- or VIM-type metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 53:241–244.
- 123) Koh TH, Khoo CT, Tan TT, et al. Multilocus sequence types of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Singapore carrying metallo- $\beta$ -lactamase genes, including the novel blaIMP-26 gene. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 2563–64.
- 124) Koh TH, Sng LH, Wang GC, Hsu LY, Zhao Y. IMP-4 and OXA  $\beta$ -lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Singapore. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 627–32.

- 125) Koh TH, Wang GC, Sng LH. IMP-1 and a novel metallo- $\beta$ -lactamase, VIM-6, in fluorescent pseudomonads isolated in Singapore. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2334–36.
- 126) Kouda S, Kuwahara R, Ohara M, et al. First isolation of blaIMP-7 in a *Pseudomonas aeruginosa* in Japan. *J Infect Chemother* 2007;13: 276–77.
- 127) Krapivina IV, Galeeva EV, Veshutova NS, Ivanov DV, Sidorenko SV. Antimicrobial susceptibility and molecular mechanisms of resistance to  $\beta$ -lactams of gram-negative microorganisms— causative agents of nosocomial infections. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 2007; 5: 16–20 (in Russian)
- 128) Kristóf K, Tóth A, Damjanova I, et al. Identification of a blaVIM-4 gene in the internationally successful *Klebsiella pneumoniae* ST11 clone and in a *Klebsiella oxytoca* strain in Hungary. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 1303–05.
- 129) Ktari S, Arlet G, Mnif B, et al. Emergence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates producing VIM-4 metallo- $\beta$ -lactamase, CTX-M-15 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, and CMY-4 AmpC  $\beta$ -lactamase in a Tunisian university hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 4198–201.
- 130) Kumarasamy K, Thirunarayan MA, Krishnan P. Coexistence of blaOXA-23 with blaNDM-1 and armA in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 2253–2254.(a)
- 131) Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 2010; 10: 597–602.(b)
- 132) Landman D, Bratu S, Quale J. Contribution of OmpK36 to carbapenems susceptibility in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Med Microbiol* 2009; 58: 1303–1308.
- 133) Laraki, N., N. Franceschini, G. M. Rossolini, P. Santucci, C. Meunier, E. de Pauw, G. Amicosante, J. M. Frere, and M. Galleni. 1999. Biochemical characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 101/1477 metallo- $\beta$ -

- lactamase IMP-1 produced by *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:902–906.
- 134) Lartigue MF, Poirel L, Nordmann P. First detection of a carbapenem-hydrolyzing metalloenzyme in an Enterobacteriaceae isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4929–30.
- 135) Laupland KB, Parkins MD, Church DL, et al. Population-based epidemiological study of infections caused by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: importance of metallo- $\beta$ -lactamase (MBL)-producing strains. *J Infect Dis* 2005;192: 1606–12.
- 136) Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Jul;43(7):1584-90.
- 137) Lauretti, L., M. L. Riccio, A. Mazzariol, G. Cornaglia, G. Amicosante, R. Fontana, and G. M. Rossolini. 1999. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1584–1590.
- 138) Leavitt A, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Schwaber MJ, Carmeli Y. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:3026–9.
- 139) Lee K, Chong Y, Shin HB et al. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7: 88–91.
- 140) Lee K, Kim CK, Hong SG, et al. Characteristics of clinical isolates of *Acinetobacter* genomospecies 10 carrying two different metallo- $\beta$ -lactamases. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36: 259–63.
- 141) Lee K, Lim YS, Yong D et al. Evaluation of the Hodge test and the imipenem–EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-beta-



- lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4623–4629.
- 142) Lee K, Yum JH, Yong D, et al. Novel acquired metallo- $\beta$ -lactamase gene, blaSIM-1, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49: 4485–91
- 143) Lee MF, Peng CF, Hsu HJ, Chen YH. Molecular characterisation of the metallo- $\beta$ -lactamase genes in imipenem-resistant Gram-negative bacteria from a university hospital in southern Taiwan. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32: 475–80.
- 144) Lee, K., W. G. Lee, Y. Uh, G. Y. Ha, J. Cho, and Y. Chong. 2003. VIM- and IMP-type metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean hospitals. *Emerg. Infect. Dis.* 9:868–871.
- 145) Lepsanovic Z, Libisch B, Tomanovic B, Nonkovic Z, Balogh B, Füzi M. Characterisation of the first VIM metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Serbia. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2008; 55: 447–54.
- 146) Leverstein-van Hall MA, Blok HEM, Donders ART, Paauw A, Fluit AC, Verhoef J. Multidrug resistance among Enterobacteriaceae is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin. *J Infect Dis* 2003;187:251–9.
- 147) Leverstein-van Hall MA, Stuart JC, Voets GM, Versteeg D, Roelofsen E, Fluit AC. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumonia* following foreign travel. *Ned Tijdschr Geneesk* 2010; 154: A2013 (in Dutch).
- 148) Libisch B, Gacs M, Csizsár K, Muzslay M, Rókusz L, Füzi M. Isolation of an integron-borne blaVIM-4 type metallo- $\beta$ -lactamase gene from a carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Hungary. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3576–78.

- 149) Libisch B, Giske CG, Kovács B, Tóth TG, Füzi M. Identification of the first VIM metallo- $\beta$ -lactamase-producing multi-resistant *Aeromonas hydrophila* strain. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1878–80.
- 150) Lienard, B. M., G. Garau, L. Horsfall, A. I. Karsisiotis, C. Damblon, P. Lassaux, C. Papamichael, G. C. Roberts, M. Galleni, O. Dideberg, J. M. Frere, and C. J. Schofield. 2008. Structural basis for the broad-spectrum inhibition of metallo- $\beta$ -lactamases by thiols. *Org. Biomol. Chem.* 6:2282-2294.
- 151) Lim, H. M., J. J. Pene, and R. W. Shaw. 1988. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Bacillus cereus* 5/B/6  $\beta$ -lactamase II structural gene. *J. Bacteriol.* 170:2873–2878.
- 152) Lin YC, Sheng WH, Chen YC, Chang SC, Hsia KC, Li SY. Differences in carbapenem resistance genes among *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter* genospecies 3 and *Acinetobacter* genospecies 13TU in Taiwan. *Int J Antimicrob Agents* 2010;35: 439–43.
- 153) Lincopan N, McCulloch JA, Reinert C, Cassettari VC, Gales AC, Mamizuka EM. First isolation of metallo- $\beta$ -lactamase-producing multi-resistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 516–19.
- 154) Livermore D.M. , 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. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2011;37: 415–419
- 155) Livermore DM., Hill R L.R., Thomson H., Charlett A., Turton JF., Pike R., Patel BC., Manuel R., Gillespie S., Balakrishnan I., Barrett SP., Cumberland N., Twagira M. Antimicrobial treatment and clinical outcome for infections with carbapenems and multiply-resistant *Acinetobacter baumannii* around London., C-MRAB Study Group. *International Journal of Antimicrobial Agents* 35 (2010) 19–24.
- 156) Livermore, D. M., S. Mushtaq, M. Warner, J. C. Zhang, S. Maharjan, M. Doumith, and N. Woodford. 2011. Activity of aminoglycosides, including

- ACHN-490, against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 66:48-53.
- 157) Loli A, Tzouvelekis LS, Gianneli D et al. Outbreak of *Acinetobacter baumannii* with chromosomally encoded VIM-1 undetectable by imipenem–EDTA synergy tests. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 1894–1896.
- 158) Loli A, Tzouvelekis LS, Tzelepi E et al. Sources of diversity of carbapenem resistance levels in *Klebsiella pneumoniae* carrying blaVIM-1. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 669–672.
- 159) Lombardi, G., F. Luzzaro, J. D. Docquier, M. L. Riccio, M. Perilli, A. Coli, G. Amicosante, G. M. Rossolini, and A. Toniolo. 2002. Nosocomial infections caused by multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas putida* producing VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase. *J. Clin. Microbiol.* 40:4051–4055.
- 160) Luzzaro F, Docquier JD, Colinon C, Endimiani A, Lombardi G, Amicosante G, Rossolini GM, Toniolo A. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates of the VIM-4 metallo-beta-lactamase encoded by a conjugative plasmid. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Feb;48(2):648-50.
- 161) Mammeri, H., S. Bellais, and P. Nordmann. 2002. Chromosome-encoded  $\beta$ -lactamases TUS-1 and MUS-1 from *Myroides odoratus* and *Myroides odoratimimus* (Formerly *Flavobacterium odoratum*), new members of the lineage of molecular subclass B1 metalloenzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:3561–3567.
- 162) Maniati A. N., S. Pournaras, S. Orkopoulou, P. T. Tassios, and N. J. Legakis. 2003. Multiresistant *Acinetobacter baumannii* isolates in intensive care units in Greece. *Clin. Microbiol. Infect.* 9:547–553.
- 163) Mansour W, Poirel L, Bettaieb D, Bouallegue O, Boujaafar N, Nordmann P. Metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Tunisia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009;64: 458–61.

- 164) March A, Aschbacher R, Dhanji H, Livermore DM, Böttcher A, Slegel F, Maggi S, Noale M, Larcher C, Woodford N. Colonization of residents and staff of a long-term-care facility and adjacent acute-care hospital geriatric unit by multiresistant bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 2010 Jul;16(7):934-44.
- 165) Marchaim D, Chopra T, Pogue JM, Perez F, Hujer AM, Rudin S, Endimiani A, Navon-Venezia S, Hothi J, Slim J, Blunden C, Shango M, Lephart PR, Salimnia H, Reid D, Moshos J, Hafeez W, Bheemreddy S, Chen TY, Dhar S, Bonomo RA, Kaye KS. Outbreak of colistin-resistant, carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in metropolitan Detroit, Michigan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Feb;55(2):593-9.
- 166) Martins AF, Zavascki AP, Gaspareto PB, Barth AL. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo- $\beta$ -lactamases in hospitals from southern Brazil. *Infection* 2007; 35:
- 167) Massidda, O., G. M. Rossolini, and G. Satta. 1991. The *Aeromonas hydrophila* *cphA* gene: molecular heterogeneity among class B metallo- $\beta$ -lactamases. *J. Bacteriol.* 173:4611–4617.
- 168) Matthaiou DK, Michalopoulos A, Rafailidis PI, Karageorgopoulos DE, Papaioannou V, Ntani G, Samonis G, Falagas ME. Risk factors associated with the isolation of colistin-resistant gram-negative bacteria: a matched case-control study. *Crit Care Med.* 2008 Mar;36(3):807-11.
- 169) Mazzariol A, Mammina C, Koncan R, et al. A novel VIM-type metallo- $\beta$ -lactamase (VIM-14) in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from a neonatal intensive care unit. *Clin Microbiol Infect* 2010; published online Dec 14. DOI:10.1111/j.1469-0691.2010.03424.x.
- 170) McManus-Munoz, S., and M. W. Crowder. 1999. Kinetic mechanism of metallo- $\beta$ -lactamase L1 from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Biochemistry* 38:1547–1553.
- 171) Medeiros, A. A., and R. S. Hare. 1986.  $\beta$ -Lactamase-mediated resistance to penems and carbapenems amongst *Enterobacteriaceae*, abstr. 116. 26th Intersci.Conf. Antimicrob. Agents Chemother. American Society for Microbiology, Washington, DC.

- 172) Melino, S., C. Capo, B. Dragani, A. Aceto, and R. Petruzzelli. 1998. A zinc-binding motif conserved in glyoxalase II,  $\beta$ -lactamase and arylsulfatases. *Trends Biochem. Sci.* 23:381–382.
- 173) Mendes RE, Bell JM, Turnidge JD, et al. Carbapenem-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* in China and detection of a conjugative plasmid (blaKPC-2 plus qnrB4) and a blaIMP-4 gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 798–99.
- 174) Mendes RE, Toleman MA, Ribeiro J, Sader HS, Jones RN, Walsh TR. Integron carrying a novel metallo- $\beta$ -lactamase gene, blaIMP-16, and a fused form of aminoglycoside-resistant gene aac(6')-30/aac(6')-Ib': report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4693–702.
- 175) Mezzatesta ML, Gona F, Caio C, Petrolito V, Sciortino D, Sciacca A, Santangelo C, Stefani S. Outbreak of KPC-3-producing, and colistin-resistant, *Klebsiella pneumoniae* infections in two Sicilian hospitals. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Sep;17(9):1444-7
- 176) Michalopoulos A, Virtzili S, Rafailidis P, Chalevelakis G, Damala M, Falagas ME. Intravenous fosfomycin for the treatment of nosocomial infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in critically ill patients: a prospective evaluation. *Clin Microbiol Infect.* 2010 Feb;16(2):184-6.
- 177) Midilli K, Aygün G, Kuskucu M, et al. A new variant of metallo- $\beta$ -lactamase detected in a *Klebsiella pneumoniae* strain: VIM-5. KLIMIK Congress; Istanbul, Turkey; 2003. S-21 (in Turkish).
- 178) Migliavacca R, Docquier JD, Mugnaioli C et al. Simple microdilution test for detection of metallo-beta-lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4388–4390.

- 179) Miriagou V, Carattoli A, Tzelepi E, Villa L, Tzouvelekis LS. IS26-associated In4-type integrons forming multiresistance loci in enterobacterial plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:3541–3
- 180) Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, et al. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 112–22.
- 181) Miriagou V, Douzinas EE, Papagiannitsis CC, Piperaki E, Legakis NJ, Tzouvelekis LS. Emergence of *Serratia liquefaciens* and *Klebsiella oxytoca* with metallo- $\beta$ -lactamase-encoding IncW plasmids: further spread of the blaVIM-1-carrying integron In-e541. *Int J Antimicrob Agents* 2008;32:540–1.
- 182) Miriagou V, Tzelepi E, Gianneli D, Tzouvelekis LS. *Escherichia coli* with a selftransferable, multiresistant plasmid coding for the metallo- $\beta$ -lactamase VIM-1. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:395–7.
- 183) Miriagou V, Tzelepi E, Gianneli D, Tzouvelekis LS. *Escherichia coli* with a selftransferable, multiresistant plasmid coding for the metallo- $\beta$ -lactamase VIM-1. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:395–7.
- 184) Miriagou V, Tzouvelekis LS, Flevari K, Tsakiri M, Douzinas EE. *Providencia stuartii* with VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:183–4.
- 185) Miriagou V, C. Papagiannitsis, S. Kotsakis, A. Zioga, E. Siatravani, A. Loli, E. Tzelepi, L. Tzouvelekis, M. Donzelli, J. Spickermann, and M. Page. 2010. Efficacy of BAL30072, alone and combined with meropenem, against VIM-producing enterobacteria in a murine thigh infection model, abstr. P1240. Abstr. 20th Eur. Congr. Clin. Microbiol. Infect. Dis., Vienna, Austria.
- 186) Moloughney, J. G., J. D. Thomas, and J. H. Toney. 2005. Novel IMP-1 metallo- $\beta$ -lactamase inhibitors can reverse meropenem resistance in *Escherichia coli* expressing IMP-1. *FEMS Microbiol. Lett.* 243:65-71.
- 187) Morfi n-Otero R, Rodriguez-Noriega E, Deshpande LM, Sader HS, Castanheira M. Dissemination of a blaVIM-2-carrying integrin among Enterobacteriaceae species in Mexico: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Microb Drug Resist* 2009; 15: 33–35.

- 188) Mouloudi E, Protonotariou E, Zagorianou A, Iosifidis E, Karapanagiotou A, Giasnetsova T, Tsioka A, Roilides E, Sofianou D, Gritsi-Gerogianni N. Bloodstream infections caused by metallo- $\beta$ -lactamase/Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing K. pneumoniae among intensive care unit patients in Greece: risk factors for infection and impact of type of resistance on outcomes. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2010 Dec;31(12):1250-6.
- 189) Mulvey MR, Grant JM, Plewes K, Roscoe D, Boyd DA. New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase in Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli, Canada. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 103–06.
- 190) Munoz-Price LS, Quinn JP. The spread of Klebsiella pneumoniae carbapenemases: a tale of strains, plasmids, and transposons. *Clin Infect Dis.* 2009 Dec 1;49(11):1739-41
- 191) Naas, T., S. Bellais, and P. Nordmann. 2003. Molecular and biochemical characterization of a carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase from Flavobacterium johnsoniae. *J. Antimicrob. Chemother.* 51:267–273.
- 192) Nagano, R., Y. Adachi, H. Imamura, K. Yamada, T. Hashizume, and H. Morishima. 1999. Carbapenem derivatives as potential inhibitors of various  $\beta$ -lactamases, including class B metallo- $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:2497-2503.
- 193) Nagano, R., Y. Adachi, T. Hashizume, and H. Morishima. 2000. In vitro antibacterial activity and mechanism of action of J-111,225, a novel 1b-methylcarbapenem, against transferable IMP-1 metallo- $\beta$ -lactamase producers. *J. Antimicrob. Chemother.* 45:271-276.
- 194) Navon-Venezia S, Leavitt A, Schwaber MJ, Rasheed JK, Srinivasan A, Patel JB, et al. First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing Klebsiella pneumoniae in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:818–20.

- 195) Neuhauser M. M., R. A. Weinstein, R. Rydman, L. H. Danziger, G. Karam, and J. P. Quinn. 2003. Antibiotic resistance among gram-negative bacilli in US intensive care units—implications for fluoroquinolone use. *JAMA* 289:885–888.
- 196) Neuwirth C, Siebor E, Robin F, Bonnet R. First occurrence of an IMP metallo- $\beta$ -lactamase in *Aeromonas caviae*: IMP-19 in an isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 4486–88.
- 197) Nho SO, Jin JS, Kim JW, et al. Dissemination of the blaIMP-1 and blaVIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase genes among genetically unrelated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a South Korean hospital. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31: 586–88.
- 198) Nordmann, P., S. Mariotte, T. Naas, R. Labia, and M.-H. Nicolas. 1993. Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase for *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:939–946.
- 199) Ode T, Saito R, Kumita W, Sato K, Okugawa S, Moriya K, Koike K, Okamura N. Analysis of plasmid-mediated multidrug resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca* isolates from clinical specimens in Japan. *Int J Antimicrob Agents.* 2009 Oct;34(4):347-50
- 200) Ohlasova D, Kmet V, Niks M. First report of the carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing IMP-7 metallo- $\beta$ -lactamase in Slovakia. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 30: 370–71.
- 201) Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, et al. Molecular characterization of an enterobacterial metallo  $\beta$ -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 71–78.
- 202) Ozgumus OB, Caylan R, Tosun I, Sandalli C, Aydin K, Koksali I. Molecular epidemiology of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates carrying IMP-1 metallo- $\beta$ -lactamase gene in a University Hospital in Turkey. *Microb Drug Resist* 2007; 13: 191–98.



- 203) Pagani L, Colinon C, Migliavacca R, et al. Nosocomial outbreak caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing IMP-13 metallo- $\beta$ -lactamase. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3824–28.
- 204) Page, M. G., and J. Heim. 2009. New molecules from old classes: revisiting the development of  $\beta$ -lactams. *IDrugs* 12:561-565.
- 205) Page, M. G., C. Dantier, and E. Desarbre. 2010. In vitro properties of BAL30072, a novel siderophore sulfactam with activity against multiresistant gram-negative bacilli. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:2291-2302
- 206) Page, M. I. 1999. The reactivity of  $\beta$ -lactams, the mechanism of catalysis and the inhibition of  $\beta$ -lactamases. *Curr. Pharm. Des.* 5:895–913.
- 207) Page, M. I. 2002. Understanding metallo- $\beta$ -lactamases. *ASM News* 68: 217–221.
- 208) Pallecchi, L., M. L. Riccio, J. D. Docquier, R. Fontana, and G. M. Rossolini. 2001. Molecular heterogeneity of blaVIM-2-containing integrons from *Pseudomonas aeruginosa* plasmids encoding the VIM-2 metallo--lactamase. *FEMS Microbiol. Lett.* 195:145–150.
- 209) Partridge, S. R., and R. M. Hall. 2003. The IS1111 family members IS4321 and IS5075 have subterminal inverted repeats and target the terminal inverted repeats of Tn21 family transposons. *J. Bacteriol.* 185:6371–6384.
- 210) Pasteran F, Faccone D, Petroni A, et al. Novel variant blaVIM-11 of the metallo- $\beta$ -lactamase blaVIM family in a GES-1 extended-spectrum-  $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49: 474–75.
- 211) Pasteran F, Mendez T, Guerriero L et al. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1631–1639.
- 212) Peleg Anton Y., Clare Franklin, Jan M. Bell, and Denis W. Spelman. Dissemination of the Metallo- $\beta$ -Lactamase Gene blaIMP-4 among Gram-Negative Pathogens in a Clinical Setting in Australia. *Clin Infect Dis* 2005; 41:154.

- 213) Peleg AY, Bell JM, Hofmeyr A, Wiese P. Inter-country transfer of Gram-negative organisms carrying the VIM-4 and OXA-58 carbapenem-hydrolysing enzymes. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 794–95.
- 214) Peleg AY, Franklin C, Bell JM, Spelman DW. Dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP-4 among gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia. *Clin Infect Dis*. 2005 Dec 1;41(11):1549-56.
- 215) Peña C, Suarez C, Tubau F, Gutierrez O, Domínguez A, Oliver A, Pujol M, Gudiol F, Ariza J. Nosocomial spread of *Pseudomonas aeruginosa* producing the metallo-beta-lactamase VIM-2 in a Spanish hospital: clinical and epidemiological implications. *Clin Microbiol Infect*. 2007; 13:1026-9.
- 216) Picaõ RC, Andrade SS, Nicoletti AG et al. Metallo-beta-lactamase detection: comparative evaluation of double-disk synergy versus combined disk tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM-producing isolates. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2028–2037.
- 217) Picão RC, Poirel L, Gales AC, Nordmann P. Diversity of  $\beta$ -lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 3908–13.
- 218) Pitout JD, Chow BL, Gregson DB, Laupland KB, Elsayed S, Church DL. Molecular epidemiology of metallo- $\beta$ -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: emergence of VIM-2-producing isolates. *J Clin Microbiol* 2007;45: 294–98.
- 219) Pitout JD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3129–3135.
- 220) Plachouras D, Karvanen M, Friberg LE, Papadomichelakis E, Antoniadou A, Tsangaris I, Karaiskos I, Poulakou G, Kontopidou F, Armaganidis A, Cars O, Giamarellou H. Population pharmacokinetic analysis of colistin methanesulfonate and colistin after intravenous administration in critically ill

- patients with infections caused by gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Aug;53(8):3430-6.
- 221) Podglajen, I., J. Breuil, I. Casin, and E. Collatz. 1995. Genotypic identification of two groups within the species *Bacteroides fragilis* by ribotyping and by analysis of PCR-generated fragment patterns and insertion sequence content. *J. Bacteriol.* 177:5270–5275.
- 222) Poirel L, Al Maskari Z, Al Rashdi F, Bernabeu S, Nordmann P. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in the Sultanate of Oman. *J Antimicrob Chemother* 2010; published online Nov 23. DOI:10.1093/jac/dkq428.
- 223) Poirel L, Lagrutta E, Taylor P, Pham J, Nordmann P. Emergence of metallo- $\beta$ -lactamase NDM-1-producing multidrug resistant *Escherichia coli* in Australia. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 4914–16. **(c)**
- 224) Poirel L, Naas T, Nicolas D, et al. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 891–97.
- 225) Poirel L, Nordmann P, Lagrutta E, Cleary T, Munoz-Price LS. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:3072.
- 226) Poirel L, Pitout JD, Nordmann P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol* 2007; 2: 501–512.
- 227) Poirel L, Revathi G, Bernabeu S, Nordmann P. Detection of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Kenya. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 934–36.
- 228) Poirel L, Rodríguez-Martínez JM, Al Naiemi N, Debets-Ossenkopp YJ, Nordmann P. Characterization of DIM-1, an integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 2420–24. **(b)**

- 229) Poirel L, Ros A, Carricajo A, et al. Extremely drug-resistant *Citrobacter freundii* identified in a patient returning from India and producing NDM-1 and other carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 55: 447–48.
- 230) Poirel, L., M. Magalhaes, M. Lopes, and P. Nordmann. 2004. Molecular analysis of metallo- $\beta$ -lactamase gene blaSPM-1-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:1406–1409.
- 231) Poirel, L., T. Lambert, S. Turkoglu, E. Ronco, J. Gaillard, and P. Nordmann. 2001. Characterization of class 1 integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the blaVIM-2 carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase gene and of two novel aminoglycoside resistance gene cassettes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:546–552.
- 232) Poirel, L., T. Naas, D. Nicolas, L. Collet, S. Bellais, J. D. Cavallo, and P. Nordmann. 2000. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:891–897.
- 233) Pool K. 2003. Overcoming multidrug resistance in gram-negative bacteria. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 4:128–139.
- 234) Poulou A, Spanakis N, Pournaras S, Pitiriga V, Ranellou K, Markou F, Tsakris A. Recurrent healthcare-associated community-onset infections due to *Klebsiella pneumoniae* producing VIM-1 metallo-beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Dec;65(12):2538-42.
- 235) Pournaras S, Ikonomidis A, Tzouvelekis LS, et al. VIM-12, a novel plasmid-mediated metallo- $\beta$ -lactamase from *Klebsiella pneumoniae* that resembles a VIM-1/VIM-2 hybrid. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 5153–56.
- 236) Pournaras S, Poulou A, Voulgari E, Vrioni G, Kristo I, Tsakris A. Detection of the new metallo- $\beta$ -lactamase VIM-19 along with KPC-2, CMY-2 and CTX-M-15 in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 1604–07.

- 237) Pournaras S, Tsakris A, Maniati M, Tzouveleki LS, Maniatis AN. Novel variant (blaVIM-4) of the metallo- $\beta$ -lactamase gene blaVIM-1 in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 4026–28.
- 238) Psychogiou M, Tassios PT, Avlami A, Stefanou I, Kosmidis C, Platsouka E, Paniara O, Xanthaki A, Toutouza M, Daikos GL, Tzouveleki LS. Ongoing epidemic of blaVIM-1-positive *Klebsiella pneumoniae* in Athens, Greece: a prospective survey. *J Antimicrob Chemother*. 2008 Jan;61(1):59-63.
- 239) Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 440–458.
- 240) Quinones-Falconi F, Galicia-Velasco M, Marchiaro P, et al. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing metallo- $\beta$ -lactamases of the IMP-15 and VIM-2 types in Mexico. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 126–31.
- 241) Quiroga, M. I., N. Franceschini, G. M. Rossolini, G. Gutkind, G. Bonfiglio, L. Franchino, and G. Amicosante. 2000. Interaction of cefotetan and the metallo- $\beta$ -lactamases produced in *Aeromonas* spp. and in vitro activity. *Chemotherapy* 46:177–183.
- 242) Qureshi ZA, Paterson DL, Potoski BA, Kilayko MC, Sandovsky G, Sordillo E, Polsky B, Adams-Haduch JM, Doi Y. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Apr;56(4):2108-13.
- 243) Rasheed JK, Biddle JW, Anderson KF, et al. Detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase type 2 carbapenem-hydrolyzing enzyme in clinical isolates of *Citrobacter freundii* and *K. oxytoca* carrying a common plasmid. *J Clin Microbiol*. 2008;46:2066–2069
- 244) Rasheed MU, Dechu T. An overnight sedimentation method: improving the diagnosis of tuberculosis when electrical centrifuge is not available. *Trop Doct*. 2008 Apr;38(2):78-9.

- 245) Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997; 41: 223-232
- 246) Rasmussen, B. A., and E. Kovacs. 1991. Identification and DNA sequence of a new *Bacteroides fragilis* insertion sequence-like element. *Plasmid* 25:141–144.
- 247) Rasmussen, B. A., and K. Bush. 1997. Carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:223–232.
- 248) Ratkai C, Quinteira S, Grosso F, Monteiro N, Nagy E, Peixe L. Controlling for false positives: interpreting MBL Etest and MBL combined disc test for the detection of metallo-beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64: 657–658.
- 249) Rice LB & Bonomo RA. Genetic and biochemical mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. In: Lorian V, editor. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 4th edition. Baltimore, MD: Williams & Wilkins; 1996: 453–501
- 250) Richmond, M. H., and R. B. Sykes. 1973. The  $\beta$ -lactamases of Gramnegative bacteria and their possible physiological role, p. 31–88. In A. H.
- 251) Robin F, Aggoune-Khinache N, Delmas J, Naim M, Bonnet R. Novel VIM metallo- $\beta$ -lactamase variant from clinical isolates of Enterobacteriaceae from Algeria. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 466–70.
- 252) Robledo IE, Aquino EE, Sante MI, Santana JL, Otero DM, Leon CF, et al. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:1354–7.
- 253) Rolain JM, Parola P, Cornaglia G. New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): towards a new pandemic? *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 1699–701.
- 254) Rooney PJ, O’Leary MC, Loughrey AC et al. Nursing homes as a reservoir of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64: 635–641.

- 255) Rose and D. W. Tempest (ed.), *Advances in microbial physiology*, vol. 9. Academic Press, New York, NY.
- 256) Rossolini GM. Acquired metallo-beta-lactamases: an increasing clinical threat. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 1557–1558.
- 257) Rossolini, G. M., M. A. Condemni, F. Pantanella, J. D. Docquier, G. Amicosante, and M. C. Thaller. 2001. Metallo- $\beta$ -lactamase producers in environmental microbiota: new molecular class B enzyme in *Janthinobacterium lividum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:837–844.
- 258) Rossolini, G. M., N. Franceschini, L. Lauretti, B. Caravelli, M. L. Riccio, M. Galleni, J. M. Frere, and G. Amicosante. 1999. Cloning of a *Chryseobacterium* (Flavobacterium) meningosepticum chromosomal gene (blaACME) encoding an extended-spectrum class A  $\beta$ -lactamase related to the *Bacteroides cephalosporinases* and the VEB-1 and PER  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:2193–2199.
- 259) Ryoo NH, Lee K, Lim JB, Lee YH, Bae IK, Jeong SH. Outbreak by meropenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing IMP-6 metallo- $\beta$ -lactamase in a Korean hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 63: 115–17.
- 260) Saavedra, M. J., L. Peixe, J. C. Sousa, I. Henriques, A. Alves, and A. Correia. 2003. Sfh-1, a subclass B2 metallo- $\beta$ -lactamase from a *Serratia fonticola* environmental isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:2330–2333.
- 261) Salabi AE, Toleman MA, Weeks J, Bruderer T, Frei R, Walsh TR. First report of the metallo- $\beta$ -lactamase SPM-1 in Europe. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 582.
- 262) Samuelsen O, Buarø L, Giske CG, Simonsen GS, Aasnaes B, Sundsfjord A. Evaluation of phenotypic tests for the detection of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a low prevalence country. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 827–830.
- 263) Samuelsen O, Buarø L, Toleman MA, et al. The first metallo- $\beta$ -lactamase identified in Norway is associated with a TniC-like transposon in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate of sequence type 233 imported from Ghana. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 331–32.

- 264) Samuelsen O, Thilesen CM, Heggelund L, Vada AN, Kümme l A, Sunsfjord A. Identification of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Norway. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 670–72.
- 265) Samuelsen O, Toleman MA, Sunsfjord A, et al. Molecular epidemiology of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Norway and Sweden shows import of international clones and local clonal expansion. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 346–52.
- 266) Santella G, Pollini S, Docquier JD, et al. Intercontinental dissemination of IMP-13-producing *Pseudomonas aeruginosa* belonging in sequence type 621. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 4342–43.
- 267) Santos C, Caetano T, Ferreira S, Mendo S. First description of blaIMP-8 in a *Pseudomonas mendocina* isolated at the Hospital Infante D. Pedro, Aveiro, Portugal. *Res Microbiol* 2010; 161: 305–07.
- 268) Schneider I, Keuleyan E, Rasshofer R, Markovska R, Queenan AM, Bauernfeind A. VIM-15 and VIM-16, two new VIM-2-like metallo- $\beta$ -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Bulgaria and Germany. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 2977–79.
- 269) Scoulica EV, Neonakis IK, Gikas AI, Tselentis YJ. Spread of blaVIM-1-producing *E. coli* in a university hospital in Greece. Genetic analysis of the integrin carrying the blaVIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase gene. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;48:167–72.
- 270) Segal H, Elisha BG. Use of Etest MBL strips for the detection of carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 598.
- 271) Sekiguchi J, Morita K, Kitao T, et al. KHM-1, a novel plasmidmediated metallo- $\beta$ -lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 4194–97.
- 272) Sekowska A, Hryniewicz W, Gniadkowski M, Deptuła A, Kusza K, Gospodarek E. Antimicrobial susceptibility of metallo- $\beta$ -lactamase positive and negative *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from intensive care unit patients. *Pol J Microbiol* 2010; 59: 67–69.



- 273) Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S, Shimokata K, Kato N, Ohta M. PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (blaIMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. *J Clin Microbiol.* 1996 Dec;34(12):2909-13.
- 274) Senda K, Arakawa Y, Nakashima K, Ito H, Ichiyama S, Shimokata K, Kato N, Ohta M. Multifocal outbreaks of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum beta-lactams, including carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996 Feb;40(2):349-53.
- 275) Senda, K., Y. Arakawa, S. Ichiyama, K. Nakashima, H. Ito, S. Ohsuka, K. Shimokata, N. Kato, and M. Ohta. 1996. PCR detection of metallo- $\beta$ -lactamase gene (blaIMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum -lactams. *J. Clin. Microbiol.* 34:2909–2913.
- 276) Shen P, Wei Z, Jiang Y, Du X, Ji S, Yu Y, et al. Novel genetic environment of the carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 among Enterobacteriaceae in China. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:4333–8.
- 277) Shibata N, Doi Y, Yamane K, et al. PCR typing of genetic determinants for metallo- $\beta$ -lactamases and integrases carried by Gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5407–13.
- 278) Siarkou VI, Vitti D, Protonotariou E, Ikonomidis A, Sofi anou D. Molecular epidemiology of outbreak-related *Pseudomonas aeruginosa* strains carrying the novel variant blaVIM-17 metallo- $\beta$ -lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 1325–30.
- 279) Simm, A. M., C. S. Higgins, S. T. Pullan, M. B. Avison, P. Niumsup, O. Erdozain, P. M. Bennett, and T. R. Walsh. 2001. A novel metallo- $\beta$ -lactamase, Mb11b, produced by the environmental bacterium *Caulobacter crescentus*. *FEBS Lett.* 509:350–354.

- 280) Smith Moland E, Hanson ND, Herrera VL et al. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 711–714.
- 281) Sofianou D, Markogiannakis A, Metzidie E, Pournaras S, Tsakris A. VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase in *Achromobacter xylosoxidans* in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; 24: 854–55.
- 282) Souli M, Galani I, Boukovalas S, Gourgoulis MG, Chryssouli Z, Kanellakopoulou K, Panagea T, Giamarellou H. In vitro interactions of antimicrobial combinations with fosfomycin against KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* and protection of resistance development. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 May;55(5):2395-7.
- 283) Souli M, Konstantinidou E, Tzepe I, Tsaganos T, Pefanis A, Chryssouli Z, Galani I, Giamarellos-Bourboulis E, Giamarellou H. Efficacy of carbapenems against a metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* clinical isolate in a rabbit intra-abdominal abscess model. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(3): 611-7
- 284) Souli M, Kontopidou FV, Koratzanis E, Antoniadou A, Giannitsioti E, Evangelopoulou P, Kannavaki S, Giamarellou H. In vitro activity of tigecycline against multiple-drug-resistant, including pan-resistant, gram-negative and gram-positive clinical isolates from Greek hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Sep;50(9):3166-9
- 285) Speldooren V, Heym B, Labia R, Nicolas-Chanoine MH. Discriminatory detection of inhibitor-resistant  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* by single-strand conformation polymorphism-PCR. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42: 879-84.
- 286) Spencer, J., A. M. Simm, A. R. Clarke, R. B. Sessions, and T. R. Walsh. 2003. Abstr. 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, Ill., abstr. C1-568.

- 287) Spencer, J., A. R. Clarke, and T. R. Walsh. 2001. Novel mechanism of hydrolysis of therapeutic  $\beta$ -lactams by *Stenotrophomonas maltophilia* L1 metallo- $\beta$ -lactamase. *J. Biol. Chem.* 276:33638–33644.(a)
- 288) Struelens MJ, Monnet DL, Magiorakos AP, O'Connor FS, Giesecke J, for the European NDM-1 Survey Participants. New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase 1-producing Enterobacteriaceae: emergence and response in Europe. *Euro Surveill* 2010; 15: 19716.
- 289) Suh J.Y., Son J.S., Chung D.R., Peck K.R., Ko K.S., Song J.H. Nonclonal emergence of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from blood samples in South Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010;54:560-562
- 290) Sykes, R. B., and M. Matthew. 1976. The  $\beta$ -lactamases of Gram-negative bacteria and their role in resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 2:115–157.
- 291) Szabó D, Szentandrassy J, Juhász Z, Katona K, Nagy K, Rókus L. Imported PER-1 producing *Pseudomonas aeruginosa*, PER-1 producing *Acinetobacter baumannii* and VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains in Hungary. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2008; 7: 12.
- 292) Tato M, Coque TM, Baquero F, Cantón R. Dispersal of carbapenemase blaVIM-1 gene associated with different Tn402 variants, mercury transposons, and conjugative plasmids in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Jan;54(1):320-7
- 293) Tato M, Coque TM, Ruiz-Garbajosa P et al. Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of Enterobacteriaceae infection involving VIM-1 metallo-beta-lactamase in Spain: toward endemicity? *Clin Infect Dis* 2007; 45: 1171–1178
- 294) Tenover FC, Kalsi RK, Williams PP et al. Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* not detected by automated susceptibility testing. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 1209–1213.

- 295) Thompson, J. S., and M. H. Malamy. 1990. Sequencing of the gene for an imipenem-cefoxitin-hydrolyzing enzyme (CfiA) from *Bacteroides fragilis* TAL2480 reveals strong similarity between CfiA and *Bacillus cereus*  $\beta$ -lactamase BCII. *J. Bacteriol.* 172:2584–2593.
- 296) Tibbetts R, Frye JG, Marschall J, et al. Detection of KPC-2 in a clinical isolate of *Proteus mirabilis* and first reported description of carbapenemase resistance caused by a KPC beta-lactamase in *P. mirabilis*. *J Clin Microbiol.* 2008;46:3080–3083
- 297) Tokatlidou D, Tsivitanidou M, Pournaras S, Ikonomidis A, Tsakris A, Sofianou D. Outbreak caused by a multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clone carrying blaVIM-12 in a university hospital. *J Clin Microbiol.* 2008 Mar;46(3):1005-8.
- 298) Toleman MA, Bell J, Walsh T. 2010. Persistence and movement of the metallo- $\beta$ -lactamase (MBL) AIM-1 in *Pseudomonas* from Australia, abstr. 50th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; Boston, USA; Sept 12–15, 2010. 1805.
- 299) Toleman MA, Biedenbach D, Bennett DM, Jones RN, Walsh TR. Italian metallo-beta-lactamases: a national problem? Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *J Antimicrob Chemother* 2005;55:61–70.
- 300) Toleman MA, Rolston K, Jones RN, Walsh TR. blaVIM-7, an evolutionarily distinct metallo- $\beta$ -lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 329–32.
- 301) Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- $\beta$ -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 673–79.
- 302) Toleman MA, Vinodh H, Sekar U, Kamat V, Walsh TR. blaVIM-2-harboring integrons isolated in India, Russia, and the United States arise from an ancestral class 1 integron predating the formation of the 3' conserved sequence. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 2636–38.

- 303) Toleman, M. A., A. M. Simm, T. A. Murphy, A. C. Gales, D. J. Biedenbach, R. N. Jones, and T. R. Walsh. 2002. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo--lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J. Antimicrob. Chemother.* 50:673–679.
- 304) Toleman, M. A., D. Biedenbach, D. Bennett, R. N. Jones, and T. R. Walsh. 2003. Genetic characterization of a novel metallo- $\beta$ -lactamase gene, blaIMP-13, harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme. *J. Antimicrob. Chemother.* 52:583–590.
- 305) Toleman, M. A., K. Rolston, R. N. Jones, and T. R. Walsh. 2004. blaVIM-7, an evolutionarily distinct metallo- $\beta$ -lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:329–332.
- 306) Tóth Á., Damjanova I., Puskás E., Jánvári L., Farkas M., Dobák A., Böröcz K., Pászti J. Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone in Hungary.. *EJCMID* 2010;29:765-769
- 307) Towner KJ, Levi K, Vlassiadi M, et al. Genetic diversity of carbapenemresistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14:161–167
- 308) Tsakris A, Ikonmidis A, Pournaras S, et al. VIM-1 metallo- $\beta$ - lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* 2006;12: 981–83.
- 309) Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, Treccarichi EM, Tumietto F, Marchese A, Spanu T, Ambretti S, Ginocchio F, Cristini F, Losito AR, Tedeschi S, Cauda R, Bassetti M. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clin Infect Dis.* 2012 Oct;55(7):943-50.

- 310) Valenza G, Joseph B, Elias J, et al. First survey of metallo- $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a German university hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 3493–97.
- 311) Vatopoulos A. High rates of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece—a review of the current evidence. *Euro Surveill* 2008;13, pii:8023.
- 312) Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenemhydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1553–5.
- 313) Villegas MV, Lolans K, del Rosario Olivera M, et al, for the Colombian Nosocoimal Resistance Study Group. First detection of metallo- $\beta$ -lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Colombia. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 226–29.
- 314) Vourli S, Tsorlini H, Katsifa H, Polemis M, Tzouvelekis LS, Kontodimou A, et al. Emergence of *Proteus mirabilis* carrying the bla metallo-beta-lactamase gene. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12:691-4
- 315) Walsh TR, Bolmstrom A, Qvarnstrom A, Gales A. Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2755–2759
- 316) Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005;18:306–25.
- 317) Walsh TR. Clinically significant carbapenemases: an update. *Curr Opin Infect Dis* 2008; 21: 367–371.
- 318) Walsh TR. The emergence and implications of metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11 (suppl 6): 2–9.
- 319) Walsh, T. R., A. P. MacGowan, and P. M. Bennett. 1997. Sequence analysis and enzyme kinetics of the L2 serine  $\beta$ -lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:1460–1464.

- 320) Walsh, T. R., L. Hall, S. J. Assinder, W. W. Nichols, S. J. Cartwright, A. P. MacGowan, and P. M. Bennett. 1994. Sequence analysis of the L1 metallo- $\beta$ -lactamase from *Xanthomonas maltophilia*. *Biochim. Biophys. Acta* 1218:199–201.
- 321) Walsh, T. R., M. A. Toleman, W. Hryniewicz, P. M. Bennett, and R. N. Jones. 2003. Evolution of an integron carrying blaVIM-2 in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J. Antimicrob. Chemother.* 52:116–119.
- 322) Wang C, Wang J, Mi Z. *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamases and carrying two aminoglycoside-modifying enzymes in China. *J Hosp Infect* 2006; 62: 522–24.
- 323) Wang H, Guo P, Sun H, et al. Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp from Chinese hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 4022–28.
- 324) Wang, Z., and S. J. Benkovic. 1998. Purification, characterization, and kinetic studies of a soluble *Bacteroides fragilis* metallo--lactamase that provides multiple antibiotic resistance. *J. Biol. Chem.* 273:22402–22408.
- 325) Wang, Z., W. Fast, A. M. Valentine, and S. J. Benkovic. 1999. Metallo- $\beta$ -lactamase: structure and mechanism. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3:614–622.
- 326) Wang, Z., W. Fast, and S. J. Benkovic. 1998. Direct observation of an enzyme-bound intermediate in the catalytic cycle of the metallo- $\beta$ -lactamase from *Bacteroides fragilis*. *J. Am. Chem. Soc.* 120:10788–10789.
- 327) Wang, Z., W. Fast, and S. J. Benkovic. 1999. On the mechanism of the metallo--lactamase from *Bacteroides fragilis*. *Biochemistry* 38:10013–10023.
- 328) Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 147–51.
- 329) Weile J, Rahmig H, Gfröer S, Schroepel K, Knabbe C, Susa M. First detection of a VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase in a carbapenemresistant

- Citrobacter freundii* clinical isolate in an acute hospital in Germany. *Scand J Infect Dis* 2007; 39: 264–66
- 330) Woodford N, Tierno Jr PM, Young K, Tysall L, Palepou MF, Ward E, et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A betalactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:4793–9.
- 331) Woodford N, Zhang J, Kaufmann ME, et al. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing VEB-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62: 1265–68.
- 332) Wroblewska MM, Towner KJ, Marchel H, Luczak M. Emergence and spread of carbapenem-resistant strains of *Acinetobacter baumannii* in a tertiary-care hospital in Poland. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 490–96.
- 333) Xiong J, Hynes MF, Ye H, et al. blaIMP-9 and its association with large plasmids carried by *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the People's Republic of China. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 355–58.
- 334) Yahav D, Lador A, Paul M, Leibovici L. Efficacy and safety of tigecycline: a systematic review and meta-analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* 2011;66(9), 1963-1971.
- 335) Yakupogullari Y, Poirel L, Bernabeu S, Kizirgil A, Nordmann P. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate co-expressing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase PER-1 and metallo- $\beta$ -lactamase VIM-2 from Turkey. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 221–22.
- 336) Yamaguchi, Y., W. Jin, K. Matsunaga, S. Ikemizu, Y. Yamagata, J. Wachino, N. Shibata, Y. Arakawa, and H. Kurosaki. 2007. Crystallographic investigation of the inhibition mode of a VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* by a mercaptocarboxylate inhibitor. *J. Med. Chem.* 50:6647-6653.
- 337) Yamazoe, K., N. Kato, H. Kato, K. Tanaka, Y. Katagiri, and K. Watanabe. 1999. Distribution of the *cfiA* gene among *Bacteroides fragilis* strains in Japan and relatedness of *cfiA* to imipenem resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:2808–2810.



- 338) Yan JJ, Hsueh PR, Ko WC, et al. Metallo- $\beta$ -lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45: 2224–28.
- 339) Yan JJ, Ko WC, Chuang CL, Wu JJ. Metallo- $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolates in a university hospital in Taiwan: prevalence of IMP-8 in *Enterobacter cloacae* and first identification of VIM-2 in *Citrobacter freundii*. *J Antimicrob Chemother* 2002;50: 503–11.
- 340) Yan JJ, Ko WC, Wu JJ. Identification of a plasmid encoding SHV-12, TEM-1, and a variant of IMP-2 metallo- $\beta$ -lactamase, IMP-8, from a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2368–71.
- 341) Yan, J. J., P. R. Hsueh, W. C. Ko, K. T. Luh, S. H. Tsai, H. M. Wu, and J. J. Wu. 2001. Metallo- $\beta$ -lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:2224–2228.
- 342) Yang Q, Wang H, Sun H, Chen H, Xu Y, Chen M. Phenotypic and genotypic characterization of Enterobacteriaceae with decreased susceptibility to carbapenems: results from large hospital-based surveillance studies in China. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:573–7.
- 343) Yang, Y., P. Wu, and D. M. Livermore. 1990. Biochemical characterization of a  $\beta$ -lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:755–758.
- 344) Yano H, Kuga A, Okamoto R, Kitasato H, Kobayashi T, Inoue M. Plasmid-encoded metallo- $\beta$ -lactamase (IMP-6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1343–48.
- 345) Yatsuyanagi, J., S. Saito, S. Harata, N. Suzuki, Y. Ito, K. Amano, and K. Enomoto. 2004. Class 1 integron containing metallo- $\beta$ -lactamase gene blaVIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:626–628.

- 346) Yildirim I, Ceyhan M, Gur D, Mugnaioli C, Rossolini GM. First detection of VIM-1 type metallo- $\beta$ -lactamase in a multidrugresistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate from Turkey also producing the CTX-M-15 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *J Chemother* 2007; 19: 467–68.
- 347) Yong D, Bell JM, Ritchie B, Pratt R, Toleman MA, Walsh TR. A novel subgroup metallo- $\beta$ -lactamase (MBL), AIM-1 emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia. 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; Chicago, USA; Sept 17–20, 2007. C1-1417.
- 348) Yong D, Lee K, Yum JH et al. Imipenem–EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3798–3801.
- 349) Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, blaNDM-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.
- 350) Yuan M, Hall L M C, Savelkoul P H M, Vandenbroucke-Grauls C M J E, Livermore D M. SHV-13, a novel extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, in *Klebsiella pneumoniae* isolates from an intensive care unit in Amsterdam. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44:1081–1084
- 351) Yum JH, Yi K, Lee H, et al. Molecular characterization of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomospecies 3 from Korea: identification of two new integrons carrying the blaVIM-2 gene cassettes. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 837–40.

