



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Α.Ζ. ΤΣΑΚΡΗΣ

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ

ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ AmpC β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΩΝ ΚΑΙ

ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΩΝ ΣΤΑ ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΟΕΙΔΗ ΣΤΗΝ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΠΙΚΡΑΤΕΙΑ

ΒΟΥΛΓΑΡΗ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

ΙΑΤΡΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΟΣ-ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2014

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Α.Ζ. ΤΣΑΚΡΗΣ

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ

ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ AmpC β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΩΝ ΚΑΙ

ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΩΝ ΣΤΑ ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΟΕΙΔΗ

ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΠΙΚΡΑΤΕΙΑ

ΒΟΥΛΓΑΡΗ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

ΙΑΤΡΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΟΣ-ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2014

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΑΙΤΗΣΗΣ: 23/10/08 (Α. Π. 1686)

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 29/06/09 (Α. Π. 11014)

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ: 30/09/09 (Α. Π. 828)

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

Επιβλέπων: Αθανάσιος Τσακρής, Καθηγητής Μικροβιολογίας

Μέλη: Γεωργία Βρυώνη, Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

Βιολέττα Καψιμάλη, Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: 19/11/2014

ΜΕΛΗ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

1. Αθανάσιος Τσακρής, Καθηγητής Μικροβιολογίας
2. Ευαγγελία Κουσκούνη, Καθηγήτρια Μικροβιολογίας
3. Σπυρίδων Πουρνάρας, Αναπληρωτής Καθηγητής Μικροβιολογίας
4. Γεωργία Βρυώνη, Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας
5. Βιολέττα Καψιμάλη, Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας
6. Ιωσήφ Παπαπαρασκευάς, Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας
7. Ευαγγελία Δημητρούλια, Λέκτορας Μικροβιολογίας

6 Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

 ΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ, ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ,
 ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝ
 ΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙ
 ΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ
 ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ' ΗΓΗΣΑΣΘΑΙ
 ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗ
 Ν ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ, Κ
 ΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, Κ
 ΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΥΤΕΡΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝ
 ΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ,
 ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥ
 ΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
 ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣ
 ΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝ
 ΤΟΣ, ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΛΡ
 ΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ, ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ
 ΔΙΔΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΛΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟ
 ΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗ
 ΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ, ΕΙΡΞΕΙΝ, ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ
 ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕΥ
 ΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ' ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥ
 ΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΪΟΝ ΔΩΣΩ, ΑΓΓΥΣ Δ
 Ε ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝ
 ΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ, ΟΥ ΤΕΜΕΛ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘ
 ΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΛΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡ
 ΗΞΙΟΣ ΤΗΣΔΕ, ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΩ
 ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΛΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤ
 ΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΗΣ, Τ
 ΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥ
 ΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡ
 ΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ, Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ,
 Η ΙΔΩ, Η ΔΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΗΤΗΣ ΚΑΤΑ Β
 ΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ
 ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟ
 ΙΑΥΤΑ, ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕ
 Δ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘ
 ΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ Π
 ΔΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙ
 ΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΛΝ.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή μου κ. Αθανάσιο Τσακρή που με επέλεξε και μου εμπιστεύτηκε το θέμα της διδακτορικής αυτής διατριβής, προσφέροντας μου την δυνατότητα να ασχοληθώ σε βάθος με την επιστήμη μου. Η συμβολή του στην ολοκλήρωση και διεξαγωγή αυτής της εργασίας υπήρξε καθοριστική καθώς μου έδωσε τα θεμέλια της εκπαίδευσης μου, τα εργαλεία που χρειαζόμουν και συντέλεσε καθοριστικά στην μορφοποίηση της διαγνωστικής μου σκέψης.

Θερμά θα ήθελα να ευχαριστήσω και την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Γεωργία Βρυώνη που παρά τις αντίξοες συνθήκες πάντα έβρισκε τρόπο να μου παρέχει τα εργαλεία που χρειαζόμουν για να συνεχίζω απρόσκοπτα την δουλειά μου καθώς και την Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολέττα Καψιμάλη για την εποικοδομητική συνεργασία όλο αυτό το διάστημα.

Ευχαριστώ επίσης θερμά την συνάδελφο και φίλη κ. Κυριακή Ρανέλλου που εργάστηκε υπομονετικά μαζί μου και με στήριξε στην προσπάθεια μου, καθώς και το προσωπικό του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Τέλος ευχαριστώ την οικογένεια μου που με στήριξε όλα αυτά τα χρόνια με την υπομονή και την αγάπη τους.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: Βούλγαρη Ευαγγελία
ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ: Ιατρική Βιοπαθολογία-Μικροβιολογία
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: 19/11/1975
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ: Βοσπόρου 14, Νέα Φιλαδέλφεια Αθήνα
ΤΗΛ.ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ: 6949987448, 210-2528293
e-mail: evanvoul@yahoo.com

ΣΠΟΥΔΕΣ

Προπτυχιακή εκπαίδευση

1994-2000: Ολοκλήρωση βασικών σπουδών στο τμήμα Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Μεταπτυχιακή εκπαίδευση

2003-2007: Εξειδίκευση στην Ιατρική Βιοπαθολογία-Μικροβιολογία στο ΓΝΑ Ευαγγελισμός.

2008: Απόκτηση τίτλου ειδικότητας Ιατρικής Βιοπαθολογίας-Μικροβιολογίας

Διδακτορική διατριβή

2008-Σήμερα: Υποψήφια διδάκτορας Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών Τμήμα Μικροβιολογίας με θέμα: «Επιδημιολογική μελέτη και διερεύνηση πλασμιδιακών AmpC β-λακταμασών και καρβαπενεμασών στα Εντεροβακτηριοειδή στην Ελληνική επικράτεια».

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Απρίλιος 2001-Απρίλιος 2002: Αγροτικός ιατρός αποσπασμένη από το κέντρο υγείας Αγίας Βαρβάρας Ηρακλείου στο Ογκολογικό Τμήμα του Βενιζελείου Γενικού Περιφερειακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης

Μάιος 2002-Φεβρουάριος 2003: Ιατρός υπεύθυνη για το πρόγραμμα «Βοήθεια στο Σπίτι» του Δήμου Αρχανών, Νομού Ηρακλείου, Κρήτης.

Μάρτιος 2003-Δεκέμβριος 2007: Ειδικότητα Ιατρικής Βιοπαθολογίας στο Γ.Ν.Α
Ευαγγελισμός

Μάρτιος 2008 - Σήμερα: Επιστημονικός συνεργάτης του τμήματος Μικροβιολογίας
της Ιατρικής σχολής Αθηνών. Ερευνητικό τμήμα καταγραφής, ανίχνευσης και
μοριακής διερεύνησης βακτηριακών αντοχών. Απασχόληση στον ιδιωτικό τομέα .

ΓΝΩΣΕΙΣ ΞΕΝΩΝ ΓΛΩΣΣΩΝ

Αγγλικά: Cambridge Certificate of Proficiency in English: Grade A, International
English Language Testing System (IELTS): Grade 9

Γερμανικά: Zertificat Deutsch als Fremdsprache: Gesamtnote Sehr gut

Γαλλικά: Diplôme Supérieur de langue Française établissement Pigier: Très bien

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Voulgari E, Gartzonika C, Vrioni G, Politi L, Priavali E, Levidiotou-Stefanou S, Tsakris A. The Balkan region: NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 clonal strain causing outbreaks in Greece. *J Antimicrob Chemother.* 2014 Aug;69(8):2091-7. doi: 10.1093/jac/dku105. Epub 2014 Apr 15.
2. Agodi A, Voulgari E, Barchitta M, Quattrocchi A, Bellocchi P, Poulou A, Santangelo C, Castiglione G, Giaquinta L, Romeo MA, Vrioni G, Tsakris A. Spread of a carbapenem- and colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* ST2 clonal strain causing outbreaks in two Sicilian hospitals. *J Hosp Infect.* 2014 Apr;86(4):260-6. doi: 10.1016/j.jhin.2014.02.001. Epub 2014 Feb 20.
3. Poulou A, Voulgari E, Vrioni G, Koumaki V, Xidopoulos G, Chatzipantazi V, Markou F, Tsakris A. Outbreak caused by an ertapenem-resistant, CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 101 clone carrying an OmpK36 porin variant. *J Clin Microbiol.* 2013 Oct;51(10):3176-82. doi: 10.1128/JCM.01244-13. Epub 2013 Jul 12.
4. Voulgari E, Poulou A, Koumaki V, Tsakris A. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: now that the storm is finally here, how will timely detection

help us fight back? *Future Microbiol.* 2013 Jan;8(1):27-39. doi: 10.2217/fmb.12.130. Review.

5. Voulgari E, Zarkotou O, Ranellou K, Karageorgopoulos DE, Vrioni G, Mamali V, Themeli-Digalaki K, Tsakris A. Outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece involving an ST11 clone. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Jan;68(1):84-8. doi: 10.1093/jac/dks356. Epub 2012 Sep 3.
6. Poulou A, Voulgari E, Vrioni G, Xidopoulos G, Pliagkos A, Chatzipantazi V, Markou F, Tsakris A. Imported *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* clones in a Greek hospital: impact of infection control measures for restraining their dissemination. *J Clin Microbiol.* 2012 Aug;50(8):2618-23. doi: 10.1128/JCM.00459-12. Epub 2012 May 30.
7. Vrioni G, Daniil I, Voulgari E, Ranellou K, Koumaki V, Ghirardi S, Kimouli M, Zambardi G, Tsakris A. Comparative evaluation of a prototype chromogenic medium (chromID CARBA) for detecting carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* in surveillance rectal swabs. *J Clin Microbiol.* 2012 Mar 29.
8. Ranellou K, Kadlec K, Poulou A, Voulgari E, Vrioni G, Schwarz S, Tsakris A. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* of the international clonal complex 11 carrying the bla_{PER-1} extended spectrum β -lactamase gene in Greece. *J Antimicrob Chemother.* 2012 Feb;67(2):357-61
9. Gogou V, Pournaras S, Giannouli M, Voulgari E, Piperaki ET, Zarrilli R, Tsakris A. Evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages: a 10 year study in Greece (2000-09). *J Antimicrob Chemother.* 2011 Dec; 66(12):2767-72
10. Agodi A, Voulgari E, Barchitta M, Politi L, Koumaki V, Spanakis N, Giaquinta L, Valenti G, Romeo MA, Tsakris A. Containment of an Outbreak of KPC-3 carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy. *J Clin Microbiol.* 2011 Nov;49(11):3986-9.

11. Tsakris A, Themeli-Digalaki K, Poulou A, Vrioni G, Voulgari E, Koumaki V, Agodi A, Pournaras S, Sofianou D. Comparative evaluation of combined-disk tests using different boronic acid compounds for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* clinical isolates. *J Clin Microbiol.* 2011 Aug; 49(8):2804-9.
12. Papadimitriou M, Voulgari E, Ranellou K, Koemtziidou E, Lebessi E, Tsakris A. Emergence of VIM-1 metallo- β -lactamase producing *Escherichia coli* in a Neonatal Intensive Care Unit. *Microb Drug Resist.* 2011 Mar; 17(1):105-8
13. Tsakris A, Poulou A, Pournaras S, Voulgari E, Vrioni G, Themeli-Digalaki K, Petropoulou D, Sofianou D. A simple phenotypic method for the differentiation of metallo- β -lactamases and class A KPC carbapenemases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Aug; 65(8):1664-71.
14. Pournaras S, Poulou A, Voulgari E, Vrioni G, Kristo I, Tsakris A. Detection of the new metallo- β -lactamase VIM-19 along with KPC-2, CMY-2 and CTX-M-15 in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Aug; 65(8):1604-7.
15. Zarkotou O, Pournaras S, Voulgari E, Chrysos G, Prekates A, Voutsinas D, Themeli-Digalaki K, Tsakris A. Risk factors and outcomes associated with the acquisition of colistin-resistant KPC producing *Klebsiella pneumoniae*: A matched case control study. *J Clin Microbiol.* 2010 Jun; 48(6):2271-4.
16. Tsakris A, Voulgari E, Poulou A, Kimouli M, Pournaras S, Ranellou K, Kosmopoulou O, Petropoulou D. In vivo acquisition of a plasmid mediated *bla*KPC-2 gene among clonal isolates of *Serratia marcescens*. *J Clin Microbiol.* 2010 May Jul; 48(7):2546-9.
17. Tsakris A, Poulou A, Themeli-Digalaki K, Voulgari E, Pittaras T, Sofianou D, Pournaras S, Petropoulou D. Use of boronic acid disk tests to detect extended spectrum β -lactamases in clinical isolates of KPC carbapenemase possessing *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol.* 2009 Nov; 47(11):3420-6.

18. Pournaras S, Protonotariou E, Voulgari E, Kristo I, Dimitroulia E, Vitti D, Tsalidou M, Maniatis AN, Tsakris A, Sofianou DClonal spread of KPC-2 carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greece *J Clin Microbiol.* 2009 August; 64(2):348-52

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	2
1. Γενικοί μηχανισμοί μικροβιακής αντοχής	3
1.1. Απόκτηση γονιδίων αντοχής	3
1.1.1. Πλασμίδια	4
1.1.2. Μεταθετά στοιχεία	5
1.2. Παραγωγή αδρανοποιητικών ενζύμων	5
1.3. Αλλαγή του στόχου δράσης	6
1.4. Αποτυχία πρόσδεσης στο στόχο δράσης	7
2. Αντοχή Εντεροβακτηριακών στα β-λακταμικά αντιβιοτικά	8
2.1. Δομή κυτταρικού τοιχώματος	8
2.2. Μηχανισμοί αντοχής	9
3. β-λακταμικά αντιβιοτικά	10
3.1. Πενικιλίνες	10
3.2. Κεφαλοσπορίνες	12
3.3. Καρβαπενέμες	12
3.4. Μονοπακτάμες	12
4. β-λακταμάσες	13
4.1. Μηχανισμός δράσης	13
4.2. Ταξινόμηση	14
5. AmpC β-λακταμάσες	19
5.1. Ομαδοποίηση και γενικά χαρακτηριστικά	19
5.2. Ανίχνευση	21
6. NDM καρβαπενεμάσες	23
7. OXA-48 καρβαπενεμάσες	26
8. OXA-48-like β-λακταμάσες	28
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	33
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	34
1. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΕΣ AmpC β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΕΣ	34
1.1. Βακτηριακά στελέχη	34
1.1.1. Αρχική απομόνωση, ταυτοποίηση και έλεγχος ευαισθησίας	35
1.1.2. Έλεγχος ευαισθησίας με διάχυση δισκίων – MIC ερταπενέμης	36

1.2. Μοριακή διερεύνηση στελεχών	37
1.2.1. Εκχύλιση βακτηριακού DNA	37
1.2.2. Ενίσχυση των γονιδίων β-λακταμασών με PCR	37
1.2.3. Διερεύνηση κλωνικότητας με ERIC και REP-PCR.	43
1.2.4. Πρωτόκολλο MLST για στελέχη <i>K.pneumoniae</i>	45
1.3. Φαινοτυπικός έλεγχος.	47
1.3.1. Φαινοτυπικός έλεγχος για AmpC β-λακταμάσες.	47
1.3.2. Φαινοτυπικός έλεγχος για ESBL.	49
1.3.3. Τροποποιημένο CLSI-ESBL επιβεβαιωτικό τεστ.	50
1.4. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.	51
2. ΝΕΩΤΕΡΕΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ.....	51
2.1. Βακτηριακά στελέχη	51
2.1.1. Αρχική απομόνωση, ταυτοποίηση και έλεγχος ευαισθησίας.	53
2.2. Φαινοτυπικός έλεγχος και τυποποίηση.	53
2.2.1. Έλεγχος για παρουσία καρβαπενεμασών.	53
2.2.2. Τυποποίηση καρβαπενεμασών τάξης A και B.	54
2.2.3. Έλεγχος για ESBL.	55
2.3. Μοριακή διερεύνηση	56
2.3.1. Εκχύλιση βακτηριακού DNA	56
2.3.2. Ενίσχυση των γονιδίων β-λακταμασών με PCR.	56
2.3.3. Διερεύνηση γονιδιακού περιβάλλοντος.	57
2.3.4. Διερεύνηση των <i>OmpK35</i> και <i>OmpK36</i> πορινών των <i>K.pneumoniae</i>	58
2.3.5. Έλεγχος κλωνικότητας με ERIC-PCR.	59
2.3.6. Πρωτόκολλο PFGE για στελέχη <i>K.pneumoniae</i>	59
2.3.7. Πειράματα βακτηριακής σύζευξης.	61
2.3.8. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση.	62
2.3.9. Τυποποίηση πλασμιδίων με βάση την PCR.	64
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	66
1. Αποτελέσματα μελέτης πλασμιδιακών AmpC.	66
1.1. Αποτελέσματα μοριακού ελέγχου.	66
1.2. Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας.	69
1.3. Αποτελέσματα φαινοτυπικού ελέγχου για AmpC β-λακταμάσες.	71
1.4. Αποτελέσματα φαινοτυπικού ελέγχου για ESBL.	77

1.5. Αποτελέσματα μοριακής τυποποίησης	81
2. Αποτελέσματα μελέτης καρβαπενεμασών.	84
2.1. NDM-1 Καρβαπενεμάση.....	84
2.2.1. Βακτηριακά στελέχη, ασθενείς και επιδημίες.	84
2.2.2. Περιγραφή αρχικής επιδημίας.	86
2.2.3. Περιγραφή συνεχιζόμενης επιδημίας.	87
2.2.4. Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας.	87
2.2.5. Αποτελέσματα φαινοτυπικού και μοριακού ελέγχου.	88
2.2.6. ERIC-PCR, PGFE και MLST.	89
2.2.7. Πειράματα βακτηριακής σύζευξης και πλασμιδιακή ανάλυση.	90
2.2. OXA-48 Καρβαπενεμάση	91
2.2.1. Βακτηριακά στελέχη και ασθενείς.	91
2.2.2. Περιγραφή επιδημίας.	93
2.2.3. Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας.	93
2.2.4. Αποτελέσματα φαινοτυπικού και μοριακού ελέγχου.	94
2.2.5. PFGE, MLST, πειράματα σύζευξης και πλασμιδιακή ανάλυση.	94
2.3. OXA-162 Καρβαπενεμάση	96
2.3.1. Βακτηριακά στελέχη, έλεγχος ευαισθησίας και φαινοτυπικός έλεγχος.	96
2.3.2. Αποτελέσματα μοριακού ελέγχου.	97
2.3.3. MLST, PFGE, πειράματα σύζευξης και πλασμιδιακή ανάλυση.	98
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	100
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	108
ABSTRACT.....	112
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	115
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ.....	132

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά αποτελούν μια κατηγορία αντιβιοτικών με ευρεία χρήση τόσο σε λοιμώξεις της κοινότητας όσο και σε επιπλεγμένες ενδονοσοκομιακές λοιμώξεις (Livermore, 2009a). Περιλαμβάνουν τις πενικιλλίνες, κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες και μονομπακτάμες. Η τάξη αυτή των αντιβιοτικών έχει δεχτεί την τελευταία δεκαετία ένα σημαντικό πλήγμα, με την ανάπτυξη μηχανισμών αντοχής, ικανών να επηρεάσουν την δραστηριότητα τους, οδηγώντας στον περιορισμό των διαθέσιμων θεραπευτικών σχημάτων για την αποτελεσματική αντιμετώπιση λοιμώξεων από στελέχη με αντοχή σε πολλαπλές κατηγορίες αντιβιοτικών (Livermore, 2009b; Nordmann et al., 2012a; Patel and Bonomo, 2013).

Ο βασικός μηχανισμός αντοχής στα β-λακταμικά αντιβιοτικά όσον αφορά τα εντεροβακτηριακά στελέχη, είναι ένζυμα ικανά να υδρολύουν τον β-λακταμικό δακτύλιο (Livermore, 2003; Medeiros, 1997). Τα ένζυμα αυτής της κατηγορίας είναι πολλαπλά (<http://www.lahey.org/studies>) και εμφανίζουν διαφοροποιήσεις και εκλεκτικότητα όσον αφορά το υπόστρωμα που υδρολύεται (Bush, 2013; Bush et al., 1995). Κωδικοποιούνται από γονίδια με χρωμοσωμιακή εντόπιση ή από πλασμιδιακούς γόνους φερόμενους επί μεταθετών στοιχείων ή ιντεγκρόνιων (Jacoby, 2009; Nordmann et al., 2012a; Poirel et al., 2011a, 2012).

Υπό την πίεση της αυξανόμενης και εκτός συνταγογράφησης χρήσης αντιβιοτικών οι βακτηριακοί πληθυσμοί προσαρμόζονται υιοθετώντας αυτούς τους μηχανισμούς άμυνας έναντι των β-λακταμικών αντιβιοτικών (Walsh and Toleman, 2012; Walsh et al., 2011). Δεδομένου ότι η ανάπτυξη νεοτέρων αντιβιοτικών, ανθεκτικών στην υδρόλυση από τις β-λακταμάσες ή αντιβιοτικών με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης, δεν διαφαίνεται στο εγγύς μέλλον παρά τις έντονες ερευνητικές προσπάθειες, η ανάγκη για έγκαιρη, αξιόπιστη ανίχνευση και τυποποίηση των ενζύμων αυτών, η

γνώση της δεδομένης επιδημιολογικής κατάστασης και ο εξορθολογισμός της χρήσης των διαθέσιμων σχημάτων αποτελούν τον ακρογωνιαίο λίθο για τον περιορισμό της διασποράς μικροβιακών αντοχών.

Με την παρούσα διατριβή επιχειρείται, αφενός η καταγραφή και διερεύνηση πλασμιδιακών AmpC β-λακταμασών σε στελέχη εντεροβακτηριακών, με ταυτόχρονη συγκριτική εκτίμηση της αποτελεσματικότητας διαφόρων αναστολέων στην ανίχνευση τους και αξιολόγηση ενός τροποποιημένου CLSI ESBL τεστ και αφετέρου η καταγραφή και διερεύνηση των νεωτέρων καρβαπενεμασών που έχουν ανιχνευθεί στην Ελληνική επικράτεια.

1. Γενικοί μηχανισμοί μικροβιακής αντοχής.

1.1. Απόκτηση γονιδίων αντοχής

Η επιτυχής επιβίωση των μικροβίων σε ένα περιβάλλον αυξανόμενης πίεσης εξαιτίας της χρήσης αντιμικροβιακών ουσιών επιβάλλει την απόκτηση στοιχείων ανθεκτικότητας. Γονίδια αντοχής υπάρχουν στον μικροβιακό κόσμο και μπορούν να αποκτηθούν από τα ευαίσθητα στελέχη του ίδιου οικολογικού συστήματος. Η πρόσληψη αυτή μπορεί πραγματοποιείται με τις ακόλουθες διαδικασίες.

Καταρχάς με την φυσική μεταμόρφωση (transformation) που συνίσταται στην απόκτηση τμημάτων DNA από το περιβάλλον και μέσω ομόλογου ανασυνδιασμού, ενσωμάτωση τους στο βακτηριακό χρωμόσωμα με πιθανότητα δημιουργίας λειτουργικών γονιδίων (Hakenbeck and Coyette, 1998). Με μεταγωγή (transduction), κατά την οποία η μεταφορά της γονιδιακής πληροφορίας πραγματοποιείται μέσω των βακτηριοφάγων που χρησιμοποιούν τους μηχανισμούς του κυττάρου ξενιστή για τον πολλαπλασιασμό τους. Κατά την συναρμολόγηση των ιϊκών σωματιδίων, μαζί με το ιϊκό DNA παγιδεύονται και κομμάτια χρωμοσωμιακού DNA που εν συνεχεία διασπείρονται με την προσβολή των νέων κυττάρων ξενιστών. Διακρίνονται δύο

τύποι μεταγωγής, η γενικευμένη (generalized) με μεταφορά οποιοδήποτε τμήματος DNA και η εξειδικευμένη (specialized) με μεταφορά μόνο γειτνιαζόντων τμημάτων DNA με την θέση πρόσδεσης του φάγου (Lyon and Skurray, 1987). Τέλος μέσω βακτηριακής σύζευξης και οριζόντιας μεταφοράς συζευκτικών πλασμιδίων που ενδέχεται να φέρουν γονίδια αντοχής, μεταξύ βακτηριδίων του ίδιου αλλά και διαφορετικού είδους (Dunny et al., 1995).

1.1.1. Πλασμίδια

Τα πλασμίδια είναι εξωχρωμοσωμιακά τμήματα δίκλωνου DNA που διαθέτουν μηχανισμούς για την αυτόνομη αντιγραφή τους, τον έλεγχο του αριθμού των αντιγράφων τους και την διατήρησή τους κατά την διχοτόμηση του κυττάρου. Ποικίλλουν σε μέγεθος και διακρίνονται σε συζευκτικά και μη ανάλογα με τα αν διαθέτουν τα απαραίτητα γονίδια για την κωδικοποίηση των λειτουργιών που χρειάζονται για την μεταφορά τους ή χρειάζονται άλλα συζευκτικά πλασμίδια στο κύτταρο ξενιστή για την ολοκλήρωση της διαδικασίας (Carattoli, 2009). Η συχνότητα μεταφοράς ποικίλει. Για την λειτουργική κατάταξη των πλασμιδίων χρησιμοποιείται η διάκριση με βάση την ασυμβατότητά τους (Couturier et al., 1988; Datta and Hedges, 1971). Η ασυμβατότητα αφορά την αδυναμία πλασμιδίων που ελέγχονται από κοινό σύστημα αντιγραφής να συνυπάρχουν στην ίδια κυτταρική σειρά. Για την εργαστηριακή ανίχνευση και διάκριση έχει αναπτυχθεί και προταθεί μια μέθοδος τυποποίησης με βάση την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR based replicon typing-PBRT) που στοχεύει σε θέσεις αντιγραφής των πιο σημαντικών οικογενειών πλασμιδίων (Carattoli et al., 2005). Επί των πλασμιδίων ενδέχεται να εντοπίζονται μεταθετά στοιχεία φέροντα γονίδια αντοχής, συντελώντας στην διασπορά τους (Rice, 2000).

1.1.2. Μεταθετά στοιχεία.

Χαρακτηριστικά μεταθετά στοιχεία είναι τα τρανσποζόνια και τα ιντεγρόνια (Bennett, 2008; Collis and Hall, 1992). Τα στοιχεία αυτά έχουν την ιδιότητα να μεταφέρονται σε άλλη θέση εντός της ίδιας περιοχής DNA, από DNA μόριο σε διαφορετικό DNA μόριο, από πλασμίδιο σε πλασμίδιο ή τέλος από πλασμίδιο στο βακτηριακό γονιδίωμα ή και ανάποδα. Τα μεταθετά στοιχεία επιτυγχάνουν την μεταφορά τους είτε κωδικοποιώντας τις απαραίτητες συζευκτικές λειτουργίες ή αν δεν διαθέτουν αυτούς τους μηχανισμούς χρησιμοποιώντας για τον σκοπό αυτό την προσωρινή ή μη ενσωμάτωση τους σε πλασμίδια.

Τα τρανσποζόνια είναι μεταθετά στοιχεία που έχουν ενσωματώσει τουλάχιστον ένα γονίδιο αντοχής. Τα ιντεγρόνια αποτελούν γενετικά στοιχεία ενσωματωμένα σε τρανσποζόνια που ενδέχεται να εντοπίζονται είτε σε πλασμίδια είτε στο βακτηριακό χρωμόσωμα. Αποτελούν γενετικές δομές ικανές να ενσωματώνουν γονιδιακές κασέτες. Δομικά αποτελούνται από δύο σταθερές τελικές περιοχές (constant sequences CS) και μία ενδιάμεση μεταβλητή στην οποία ενσωματώνονται τα διάφορα γονίδια αντοχής ως γονιδιακές κασέτες. Στην 5' CS περιοχή εντοπίζεται το γονίδιο που κωδικοποιεί μια DNA ιντεγκράση (int) και η παρακείμενη περιοχή ανασυνδιασμού (attI). Οι γονιδιακές κασέτες ενσωματώνονται στην θέση ανασυνδιασμού (attI) μέσω της ιντεγράσης με συνέπεια να εντοπίζονται στην μεταβλητή περιοχή.

1.2. Παραγωγή αδρανοποιητικών ενζύμων

Τα ένζυμα αυτά μπορεί να είναι υδρολυτικά ή μη. Χαρακτηριστικό παράδειγμα υδρολυτικού ενζύμου αποτελούν οι β-λακταμάσες που επιτυγχάνουν την καταστροφή του β-λακταμικού δακτυλίου, ενώ μη υδρολυτικού μηχανισμού οι τρανσπεπτιδάσες που προσθέτουν χημικές ομάδες στις αμινογλυκοσίδες με αποτέλεσμα να καθίσταται αδύνατη η πρόσδεσή τους στο RNA και ως εκ τούτου να είναι αδρανείς Εικόνα 1

(Azucena and Mobashery, 2001; Jacoby and Sutton, 1985). Η πλειονότητα των ενζύμων αυτών είναι επίκτητα περιγράφονται όμως και ενδογενή γονίδια όπως οι χρωμοσωμικές β-λακταμάσες των Gram-αρνητικών βακτηριδίων, των οποίων η έκφραση διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα ή αφορά την αδρανοποίηση πολύ ευαίσθητων β-λακταμών. Απώλεια ή διατάραξη του ρυθμιστικού αυτού ελέγχου οδηγεί σε υπερέκφραση των γονιδίων αυτών και εκδήλωση αντοχής (Jacoby, 2009; Livermore, 1992).

1.3. Αλλαγή του στόχου δράσης

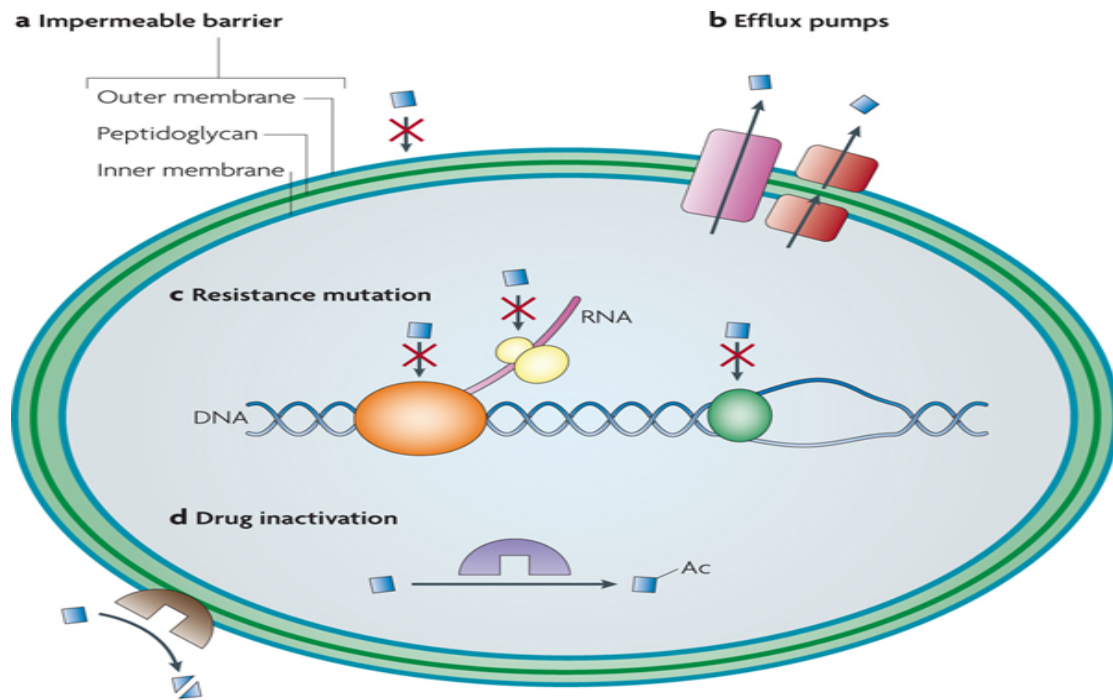
Για την επίτευξη της δράσης ενός αντιβιοτικού απαραίτητη προϋπόθεση είναι η αποτελεσματική και σταθερή πρόσδεση το στόχο. Οι θέσεις σύνδεσης του αντιβιοτικού και του κυτταρικού στόχου είναι ειδικές. Αλλαγές στην νουκλεοτιδική αλληλουχία ακόμα και σημειακές δύναται να οδηγήσουν σε αλλαγή του μεταγραφικού προϊόντος με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η συνάφεια και ικανότητα πρόσδεσης του αντιβιοτικού στο μόριο στόχο Εικόνα 1 (Eliopoulos et al., 1984; Wehrli, 1983). Αποτυχία σύνδεσης είναι ικανή να οδηγήσει σε εμφάνιση αντοχής. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η τροποποίηση των πενικιλλινοδεσμευτικών πρωτεϊνών (Penicillin binding proteins-PBPs), με συνέπεια να επηρεάζεται η συγγένεια τους για τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, μηχανισμός που παρατηρείται κυρίως στα Gram-θετικά βακτήρια, η αντοχή στα γλυκοπεπίδια, η αντοχή στις φθοριοκινολόνες λόγω αλλαγών στην DNA γυράση και στην τοποϊσομεράση IV και οι μεταλλάξεις στην RNA πολυμεράση που προσδίδουν αντοχή στην ριφαμπικίνη (Hakenbeck and Coyette, 1998; Morais Cabral et al., 1997; Wehrli, 1983).

1.4. Αποτυχία πρόσδεσης στο στόχο δράσης

Δύο βασικοί μηχανισμοί σχετίζονται με την αποτυχία του αντιβιοτικού να φτάσει στο στόχο δράσης του σε επαρκή ποσότητα ώστε να εκδηλωθεί κλινικά σημαντική δράση, ο περιορισμός της πρόσβασης, κυρίως λόγω αλλαγών στις πρωτεΐνες φορείς της εξωτερικής κυτταρικής μεμβράνης και η ενεργητική μεταφορά του αντιβιοτικού εκτός κυττάρου από αντλίες εκροής Εικόνα 1.

Απώλεια, μειωμένη παραγωγή ή παραγωγή τροποποιημένων πρωτεϊνών φορέων (πορινών, outer membrane proteins-OMPs)) οδηγεί σε ελαττωμένη διείσδυση του αντιβιοτικού και μπορεί να επιφέρει ανοχή. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η ανοχή στην ερταπενέμη στην *Klebsiella pneumoniae*, στην ιμιπενέμη στην *Pseudomonas aeruginosa*, και στην κεφεπίμη στο *Enterobacter cloacae* (Livermore, 1992; Poulou et al., 2013; Tsai et al., 2013). Για την εκδήλωση υψηλών επιπέδων ανοχής συνήθως απαιτείται και η παρουσία ενός επιπλέον μηχανισμού συνήθως με την μορφή υδρολυτικών ενζύμων (εκδήλωση ανοχής στις καρβαπενέμες στα Gram-αρνητικά βακτήρια λόγω συνδιασμού μειωμένης διαπερατότητας και παρουσίας εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (ESBLs) ή AmpC τύπου β-λακταμασών) (Cornaglia and Rossolini, 2010; Nordmann et al., 2012a; Poirel et al., 2012).

Σημαντικός αριθμός βακτηριδίων διαθέτουν συστήματα ενεργούς εκροής (efflux pumps). Οι αντλίες αυτές ενδέχεται να παρουσιάζουν εκλεκτικότητα. Η παρουσία τους έχει ως συνέπεια το αντιβιοτικό να αποβάλλεται με πολύ μεγαλύτερο ρυθμό απ'ότι εισέρχεται στο κύτταρο με συνέπεια η ενδοκυτταρική του συγκέντρωση να παραμένει χαμηλή και ανεπαρκής.



Nature Reviews | Microbiology

Εικόνα 1 Σχηματική απεικόνιση δυνατικών μηχανισμών αντοχής. Α. Μεμβρανική αδιαβατότητα, Β. Αντλίες εκροής, C.Αλλαγή στόχου σύνδεσης, Δ Αδρανοποιητικά ένζυμα.

2. Αντοχή Εντεροβακτηριακών στα β-λακταμικά αντιβιοτικά.

2.1. Δομή κυτταρικού τοιχώματος

Για την επαρκή κατανόηση των μηχανισμών αντοχής των Εντεροβακτηριακών στα β-λακταμικά αντιβιοτικά οφείλουμε να λαμβάνουμε υπ' όψιν μας καταρχάς την δομή του κυτταρικού τους τοιχώματός.

Το κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από την εσωτερική κυτταροπλασματική μεμβράνη, την πεπτιδογλυκάνη, την εξωτερική μεμβράνη με δύο στοιβάδες (εσωτερική φωσφολιπιδίων και πρωτεϊνών και εξωτερική λιποπολυσακχαριτών-LPS) και το έλυτρο.

Η κυτταροπλασματική μεμβράνη αποτελεί το όριο μεταξύ κυτταροπλάσματος και περιβάλλοντος. Είναι υπεύθυνη για την ροή θρεπτικών συστατικών και προϊόντων

μεταβολισμού εντός και εκτός του κυττάρου και συμμετέχει στην ανάπτυξη και τον μεταβολισμό του βακτηριδίου καθώς δομικά συστατικά του κυττάρου όπως η πεπτιδογλυκάνη, οι LPS και τα φωσφολιπίδια συντίθενται από ένζυμα εντός αυτής (Osborn et al., 1972).

Η πεπτιδογλυκάνη διαφυλάσσει την δομική ακεραιότητα και το σχήμα του κυττάρου. Αποτελείται από ένα δίκτυο γραμμικών αλυσίδων άμινο-σακχάρων που περιέχουν εναλλασσόμενα κατάλοιπα N-ακετύλ-γλυκοζαμίνης (NAG) και N-ακετύλ-μουραμικού οξέως (NAM) συνδεδεμένα σε τετραπεπίδια για την σύνθεση των οποίων βασικό ρόλο διαδραματίζουν οι PBPs που εμφανίζουν δράση τρανσπεπτιδάσης, δημιουργώντας τον δεσμό D-αλανίνη-D-αλανίνη (Goffin and Ghuysen, 1998; Osborn, 1969).

Εντός της εξωτερικής μεμβράνης εντοπίζονται οι πρωτεΐνες φορείς (πορίνες) διαμέσου των οποίων τα αντιβιοτικά διαχέονται στο εσωτερικό του κυττάρου.

2.2. Μηχανισμοί αντοχής.

Στα Εντεροβακτηριακά στελέχη η αντοχή στα β-λακταμικά αντιβιοτικά μπορεί να εκδηλωθεί με τέσσερεις διαφορετικούς μηχανισμούς που συχνά βρίσκονται και σε δυναμική σχέση μεταξύ τους.

Η εμφάνιση μεταλλάξεων στα γονίδια που κωδικοποιούν τις PBPs ή η απόκτηση γονιδίων που συνθέτουν τροποποιημένες PBPs αποτελούν παράγοντες που σχετίζονται με αλλαγές στο ενεργό κέντρο των PBPs και ενδέχεται να οδηγούν σε μικρότερη συνάφεια προς τα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Ο μηχανισμός αυτός αν και συχνότερος στους Gram θετικούς κόκκους έχει συσχετιστεί και με την αντοχή στην ιμιπενέμη στελεχών *Proteus* spp στην (Donskey et al., 2000; Neuwirth et al., 1995; Pitout et al., 1997; Rybkine et al., 1998).

Για να εκδηλωθεί η αντιμικροβιακή δράση των β-λακταμών το αντιβιοτικό πρέπει διαπερνώντας το κυτταρικό τοίχωμα να συνδεθεί με τις PBPs. Τα Gram αρνητικά βακτήρια διαθέτουν ένα ισχυρό κυτταρικό τοίχωμα πολυσακχαριτών, λιπιδίων και πρωτεϊνών, η διέλευση μέσω του οποίου είναι εφικτή μόνο μέσω ειδικών OMPs. Η δυσχερής διέλευση του β-λακταμικού αντιβιοτικού στον περιπλασμικό χώρο λόγω είτε ελαττωμένης έκφρασης των OMPs, εκλεκτικής απουσίας φυσιολογικών πρωτεϊνών ή σύνθεσης τροποποιημένων πρωτεϊνών με μειωμένη δυνατότητα πρόσδεσης οδηγεί σε περιορισμό της πρόσβασης των β-λακταμών (Doumith et al., 2009; Lee et al., 2007; Livermore, 2001).

Η υπερέκφραση αντλιών εκροής συντελεί στην απαγωγή των β-λακταμικών αντιβιοτικών από τον περιπλασμικό χώρο στο εξωτερικό περιβάλλον του κυττάρου με συνέπεια να αποτυγχάνουν να συνδεθούν με τις PBPs και να εκδηλώσουν την δράση τους (Poole, 2004).

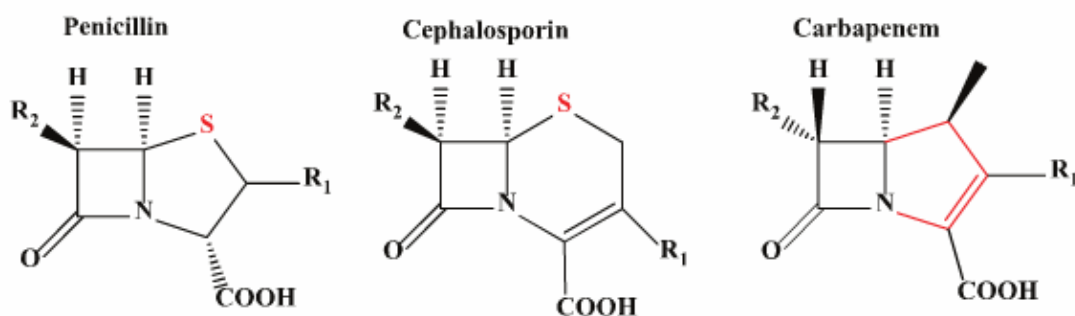
Τέλος βασικός μηχανισμός αποτελεί η παραγωγή ενζύμων με δραστικότητα β-λακταμάσης που υδρολύουν το β-λακταμικό δακτύλιο, αδρανοποιώντας το αντιβιοτικό στον περιπλασμικό χώρο (Livermore and Woodford, 2006; Queenan and Bush, 2007). Η αποτελεσματικότητα των ενζύμων αυτών εξαρτάται από ένα συνδυασμό παραγόντων όπως η εντόπιση του ενζύμου, η ποσοτική του έκφραση και η συνάφεια πρόσδεσης του.

3. β-λακταμικά αντιβιοτικά.

3.1. Πενικιλίνες.

Πρόκειται για μία κατηγορία φυσικών και ημισυνθετικών αντιβιοτικών που περιέχουν τον χημικό πυρήνα του 6-αμινοπενικιλανικού οξέως που αποτελείται από

τον β-λακταμικό δακτύλιο συνδεδεμένο με ένα δακτύλιο θιαζολιδίνης. Τα φυσικά αντιβιοτικά αυτής της κατηγορίας παράγονται από στελέχη *Penicillium* spp. Διαφέρουν λόγω υποκαταστάσεων στην θέση 6, με συνέπεια αυτές οι αλλαγές στις πλευρικές αλυσίδες να επιφέρουν διαφοροποιήσεις στην φαρμακοκινητικές τους ιδιότητες και στην αντιβακτηριδιακή τους δράση (Εικόνα 2).



Εικόνα 2 Σχηματική απεικόνιση δομής πενικιλινών, κεφαλοσπορινών και καρβαπενεμών (Papp-Wallace et al., 2011).

Η αντιμικροβιακή τους δράση βασίζεται κυρίως στην ικανότητα τους να αναστέλλουν την σύνθεση του βακτηριακού τοιχώματος με άμεση συνέπεια την κατάλυση της ακεραιότητας του (Waxman and Strominger, 1983). Η δράση αυτή επιτυγχάνεται μέσω της αναστολής διαφόρων βακτηριακών ενζύμων κυρίως όμως των PBPs. Ο β-λακταμικός δακτύλιος μοιάζει δομικά με την D-αλανίνη-D-αλανίνη με άμεση συνέπεια να ανταγωνίζεται για τις θέσεις πρόσδεσης επί των PBPs. Η πρόσδεση αυτή έχει ως συνέπεια την ακετυλίωση των PBPs που καθίστανται ανενεργές, με παράλληλη ενεργοποίηση μεμβρανικών αυτολυτικών μηχανισμών που οδηγούν στην καταστροφή του κυτταρικού τοιχώματος.

Δευτερεύοντες μηχανισμοί δράσης αφορούν αφενός την αναστολή των βακτηριακών ενδοπεπτιδασών και γλυκοσιδασών, που είναι ένζυμα σχετιζόμενα με την ανάπτυξη του κυττάρου και αφετέρου υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί σε συγκεκριμένα στελέχη

να αναστέλλουν την σύνθεση του mRNA προκαλώντας κυτταρικό θάνατο απουσία κυτταρικής λύσης (McDowell and Reed, 1989).

3.2. Κεφαλοσπορίνες.

Βασικό δομικό συστατικό τους είναι ο πυρήνας 7-αμινοκεφαλοσπορανικού οξέως, που περιλαμβάνει ένα β-λακταμικό δακτύλιο συνδεδεμένο με ένα διυδροθειαζιδικό δακτύλιο (Εικόνα 2). Διάφορες υποκαταστάσεις στις θέσεις 3 και 7 αλλάζουν τις βακτηριοκτόνες δράσεις των ενζύμων και τις φαρμακοκινητικές τους ιδιότητες. Η προσθήκη στην θέση 7 του β-λακταμικού δακτυλίου μίας μεθόξυ ομάδας δημιουργεί την ομάδα των κεφαμυκινών. Η δράση των ενζύμων αυτών είναι παρόμοια με αυτή των πενικιλινών και στηρίζεται στην σύνδεση με τις PBPs (Waxman and Strominger, 1983).

3.3. Καρβαπενέμες.

Αποτελούν μια ξεχωριστή κατηγορία β-λακταμικών αντιβιοτικών και έχουν το ευρύτερο φάσμα αντιμικροβιακής δράσης. Δομικά διαφοροποιούνται από της υπόλοιπες β-λακτάμες καθώς διαθέτουν μια υδροξυεθυλ πλευρική αλυσίδα σε trans διαμόρφωση στην θέση 6 και δεν φέρουν άτομο οξυγόνου ή θείου στον δικυκλικό πυρήνα (Εικόνα 2). Συνδέονται με τις PBP1 και PBP2 προκαλώντας μεγέθυνση του κυττάρου και λύση (Spratt et al., 1977).

3.4. Μονομπακτάμες.

Η αζτρεονάμη αποτελεί την μόνη μονοβακτάμη με κλινική χρήση. Οι μονομπακτάμες είναι β-λακτάμες με διάφορες πλευρικές αλυσίδες ενωμένες με τον μονοκυκλικό πυρήνα. Συνδέονται με την PBP3 διαταράσσοντας την σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος (Bush et al., 1982).

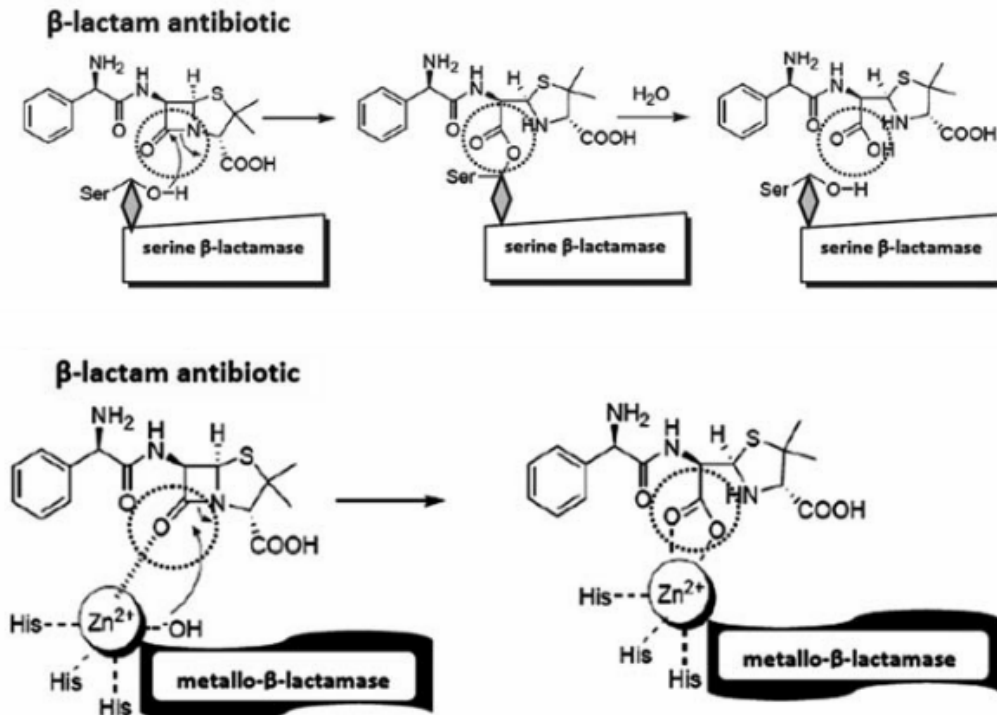
4. β-λακταμάσες.

Η παρουσία των β-λακταμασών προηγήθηκε της χρήσης τους ως θεραπευτικό εργαλείο. Η πρώτη πενικιλινάση ανιχνεύτηκε σε στέλεχος *Escherichia coli* πριν την χρήση της πενικιλίνης. Λίγα χρόνια αργότερα απομονώθηκε πλασμιδιακό ένζυμο από στέλεχος *Staphylococcus aureus* (Livermore, 2009a). Σημειώνεται ότι υπάρχουν Gram αρνητικοί μικροοργανισμοί όπως πχ *Enterobacter spp*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* και *P.aeruginosa* που φέρουν χρωμοσωμικές β-λακταμάσες, πιθανώς στα πλαίσια ενός εξελικτικού μηχανισμού άμυνας έναντι των β-λακταμών που παράγονται από περιβαλλοντικούς μικροοργανισμούς (Ghuysen, 1991).

Με την εισαγωγή των β-λακταμικών αντιβιοτικών στην θεραπευτική φαρέτρα των λοιμώξεων παρατηρήθηκε και η παράλληλη εμφάνιση και διάδοση των αντίστοιχων β-λακταμασών με πρώτο ένζυμο την πλασμιδιακή TEM-1. Έκτοτε η διασπορά και βιοποικιλότητα των ενζύμων αυτών παρουσίασε σημαντική εξέλιξη και παγκόσμια κατανομή (Livermore, 2009a; Nordmann et al., 2012a; Poirel et al., 2012).

4.1. Μηχανισμός δράσης.

Η β-λακταμάση συνδέεται με το β-λακταμικό αντιβιοτικό σχηματίζοντας ένα μη ομοιοπολικό σύμπλοκο Michaelis. Στα ένζυμα που εμφανίζουν δραστικότητα σερίνης το ελεύθερο υδροξύλιο της πλευρικής αλυσίδας που βρίσκεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου προσβάλλει το β-λακταμικό δακτύλιο και σχηματίζεται με ομοιοπολικό δεσμό ένας ακυλ-εστέρας (Knox, 1995). Με την υδρόλυση του εστέρα απελευθερώνεται το ένζυμο και το υδρολυμένο, πλέον ανενεργό β-λακταμικό αντιβιοτικό (Sacha et al., 2008). Τα ένζυμα της τάξης B καταλύουν την ίδια ακριβώς υδρόλυση με την διαφορά ότι χρησιμοποιούν ένα ή ζεύγος ιόντων ψευδαργύρου (Zn^{2+}) σε συνέργεια με τις His/His/Asp του ενεργού τους κέντρου (Εικόνα 3) (Rasmussen and Bush, 1997).



Εικόνα 3 Μηχανισμοί υδρόλυσης β -λακταμικών αντιβιοτικών από ένζυμα με δραστικότητα σερίνης και από μέταλλο- β -λακταμάσες (Sacha et al., 2008)

4.2. Ταξινόμηση.

Η αρχική κατάταξη των β -λακταμασών βασίστηκε στην χρήση αντιορρών, στο είδος του υδρολυτικού υποστρώματος ή στο ισοηλεκτρικό σημείο των ενζύμων (Richmond and Sykes, 1973; Sawai et al., 1968; Sykes and Matthew, 1976).

Οι κατατάξεις όμως αυτές ήρθαν σύντομα να αντικατασταθούν από μια πιο λειτουργική ταξινόμηση που προτάθηκε από τον Ambler και στηρίζεται στον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των γονιδίων που κωδικοποιούν τις β -λακταμάσες (Ambler, 1980; Ambler et al., 1991).

Με βάση την κατηγοριοποίηση κατά Ambler οι β -λακταμάσες κατατάσσονται σε 4 μοριακές τάξεις A, B, C και D. Τα ένζυμα των τάξεων A, C, D αδρανοποιούν τον β -λακταμικό δακτύλιο μέσω μιας καταλυτικά ενεργού σερίνης, ενώ τα τάξης B ένζυμα

είναι μέταλλο-ένζυμα που απαιτούν για να εκφράσουν την καταλυτική τους δράση ιόντα Zn^{2+} .

Αναλυτικά με βάση την ταξινόμηση κατά Ambler τα β-λακταμικά αντιβιοτικά μπορούν να ανήκουν στις ακόλουθες τάξεις:

Τάξη A (class A): Περιλαμβάνει ένζυμα συνήθως ευαίσθητα στους β-λακταμικούς ανασταλείς (κλαβουλανικό, ταζομπακτάμη και σουλμπακτάμη). Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει τις TEM-1, TEM-2 και SHV-1 πενικιλινάσες, τις εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (Extended spectrum β-lactamases, ESBLs) που υδρολύουν τις κεφαλοσπορίνες ευρέως φάσματος και τις KPC-τύπου καρβαπενεμάσες (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemases-KPCs) που υδρολύουν την πλειονότητα των β-λακταμικών αντιβιοτικών συμπεριλαμβανομένου και της αζτρεονάμης.

Τάξη B (class B): Πρόκειται για μέταλλο-β-λακταμάσες (MBLs). Διαφέρουν λειτουργικά από τις υπόλοιπες β-λακταμάσες καθώς χρησιμοποιούν ένα ή ζεύγος ιόντων Zn^{2+} στο ενεργό τους κέντρο για να εκδηλώσουν την καταλυτική τους δράση και υποδιαιρούνται σε υποκατηγορίες, B1, B2, και B3 ανάλογα με το είδος των αμινοξέων που περιβάλλουν τα ιόντα Zn^{2+} . Υδρολύουν τα β-λακταμικά αντιβιοτικά με εξαίρεση την αζτρεονάμη.

Τάξη C (class C): Πρόκειται για κεφαλοσπορινάσες με πλασμιδιακή ή χρωμοσωμική εντόπιση. Υδρολύουν τις πενικιλίνες, τους συνδιασμούς τους με β-λακταμικούς αναστολείς και τις κεφαλοσπορίνες συμπεριλαμβανομένου και των κεφαμυκινών. Δεν υδρολύουν την κεφεπίμη και τις καρβαπενέμες, εμφανίζουν χαμηλή υδρολυτική δράση έναντι της αζτρεονάμης και αναστέλλονται από την κλοξασιλίνη. Τα πλασμιδιακά ένζυμα ανάλογα με τις διαφορές τους σε νουκλεοτιδικό επίπεδο έχουν καταταχισθεί σε οχτώ ομάδες (CMY,FOX,ACC,MIR,DHA,ACT και MOX). Τα χρωμοσωμικά ένζυμα ανιχνεύονται ενδογενώς σε *Enterobacter* spp, *C.freundii*,

S.marcescens και *P.aeruginosa* εμφανίζουν συνήθως χαμηλά επίπεδα έκφρασης λόγω καταστολής, δύναται όμως να επαχθούν παρουσία κεφοξιτίνης ενώ εκφράζονται πλήρως με αποκαταστολή (derepression).

Τάξη D (class D): Στην ομάδα αυτή ανήκουν οξασιλλινάσες με την δυνατότητα υδρόλυσης διαφόρων υποστρωμάτων. Περιλαμβάνονται ένζυμα που μπορούν να υδρολύουν πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες ευρέως φάσματος (OXA-type ESBLs) καθώς και καρβαπενέμες (OXA-type carbapenemases). Με εξαίρεση τις OXA-12 και OXA-18 πρόκειται για ένζυμα που δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ αλλά από το NaCl.

Σε συνέχεια της κατηγοριοποίησης κατά Ambler προέκυψε η ανάγκη για μια κατάταξη που να βασίζεται στα λειτουργικά χαρακτηριστικά των ενζύμων. Η νεώτερη κατάταξη κατά Bush-Jacoby-Medeiros στηρίζεται στο υπόστρωμα δράσης (πενικιλίνη, οξασιλλίνη, καρμπενικιλίνη, κεφαλοριδίνη, ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες και ιμιπενέμη) και το είδος του αναστολέα (κλαβουλανικό οξύ, ταζομπακτάμη, σουλμπακτάμη) (Bush and Jacoby, 2010; Bush et al., 1995; Medeiros, 1997). Διακρίνονται τρεις βασικές ομάδες ενζύμων.

Η ομάδα 1 περιλαμβάνει κεφαλοσπορινάσες πλασμιδιακές ή με χρωμοσωμική εντόπιση τύπου AmpC που δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό και ανήκουν στην τάξη C κατά Ambler (Jacoby, 2009). Εμφανίζουν μεγάλη συγγένεια για την αζτρεονάμη και η έκφραση τους μπορεί να είναι επαγόμενη από την έκθεση τους στην αμοξυκιλλίνη, την αμπικιλίνη, την ιμιπενέμη και το κλαβουλανικό οξύ (Jacoby, 2009; Livermore et al., 1987; Weber and Sanders, 1990). Στην υποομάδα 1e ανήκουν οι εκτεταμένου φάσματος AmpC (ESAC) που παρουσιάζουν μεγαλύτερη δραστικότητα έναντι της κεφταζιδίμης.

Η ομάδα 2 περιλαμβάνει β-λακταμάσες με δράση πενικιλινάσης, κεφαλοσπορινάσης η και τα δύο που αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ και αντικατοπτρίζουν τα αρχικά TEM και SHV ένζυμα. Αποτελεί την πολυπληθέστερη ομάδα και περιλαμβάνει β-λακταμάσες τάξης A και D. Οι κυριότερες υποομάδες είναι οι ακόλουθες:

Υποομάδα 2a: Πενικιλινάσες τάξης A που ανιχνεύονται σε Gram θετικούς κόκκους

Υποομάδα 2b: Ευρέως φάσματος β-λακταμάσες τάξης A που υδρολύουν πενικιλίνες και κεφαλοσπορίνες. Περιλαμβάνει τις πλασμιδιακές TEM-1, TEM-2 και την χρωμοσωμική SHV-1 (Bush et al., 1995). Από τη υποομάδα 2b διαχωρίζονται και δύο νέες υποομάδες η υποομάδα 2be με εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες τάξης A (ESBLs), που αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ και υδρολύουν κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς (κεφταζιδίμη, κεφοταξίμη και κεφποντοξίμη) καθώς και την αζτρεονάμη και η υποομάδα 2br που περιλαμβάνει τις ευρέως φάσματος β-λακταμάσες τάξης A που δεν αναστέλλονται από τους αναστολείς (κλαβουλανικό οξύ και σουλμπακτάμη και διατηρούν συνήθως την ευαισθησία τους στην ταζομπακτάμη, εκτός και αν περιγράφεται αμινοξική αντικατάσταση στην θέση met69.

Υποομάδα 2c: Ένζυμα με δράση καρβασιλινάσης, τάξης A.

Υποομάδα 2d: OXA-τύπου β-λακταμάσες που υδρολύουν την κλοξασιλλίνη και την οξασιλλίνη ανήκουν στην τάξη D και αναστέλλονται από το NaCl. Η υποομάδα 2de περιλαμβάνει τις εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες τύπου OXA που υδρολύουν την οξασιλλίνη αλλά και τις οξυ-ίμινο κεφαλοσπορίνες ενώ η υποομάδα 2df περιλαμβάνει τις OXA-τύπου λακταμάσες με δράση καρβαπενεμάσης (OXA-23, OXA-48, OXA-48-like και OXA-181) που δεν ανταποκρίνονται στην αναστολή με το κλαβουλανικό οξύ.

Υποομάδα 2e: Κεφαλοσπορινάσες τάξης A που υδρολύουν την αζτρεονάμη και αναστέλλονται από το κλαβουλανικό και την ταζομπακτάμη.

Υποομάδα 2f: Καρβαπενεμάσες με δραστικότητα σερίνης που ανήκουν στην τάξη A (KPC,SME, IMI-1,NMC-1 και ορισμένες GES)

Η ομάδα 3 περιλαμβάνει μεταλλοένζυμα (MBLs) που δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ και την ταζομπακτάμη, εμφανίζουν δράση καρβαπενεμάσης και ανήκουν στην τάξη B. Η υποομάδα 3a αντιστοιχεί στις υποκατηγορίες B1 και B3 κατά Ambler, εμφανίζει ευρύ φάσμα υδρόλυσης και περιλαμβάνει τις VIM, NDM και IMP μέταλλο-β-λακταμάσες καθώς και την χρωμοσωμική L1 της *Stenotrophomonas maltophilia*. Τα ένζυμα αυτής της κατηγορίας φέρουν δύο ιόντα Zn^{2+} στο δραστικό τους κέντρο που προσδέονται με τις αντίστοιχες His116/H118/His196 και Asp120/Cys221/His263 ή Asp120/His121/His263 αντίστοιχα (Merino et al., 2010). Η υποομάδα 3b περιλαμβάνει την χρωμοσωμική καρβαπενεμάση της *Aeromonas spp* και απαιτεί μόνο ένα ιόν Zn^{2+} για την υδρολυτική της δράση σε συνέργεια με τις Asp120/Cys221/His263 του ενεργού της κέντρου, παρουσία δευτέρου ιόντος Zn^{2+} έχει ανασταλτική δράση, ανήκει στην υποκατηγορία B2 κατά Ambler και έχει υδρολυτικό φάσμα περιορισμένο για τις καρβαπενέμες.

Σήμερα οι β-λακταμάσες ταξινομούνται με ένα σύνθετο σύστημα που στηρίζεται στην αντιστοίχιση των δύο αυτών βασικών ταξινομήσεων, συνδιάζοντας τα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των ενζύμων Πίνακας 1(Bush and Jacoby, 2010; Drawz and Bonomo, 2010).

Πίνακας 1. Σχήμα κατάταξης β-λακταμασών (Bush and Jacoby, 2010)

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

^a CA, clavulanic acid; TZB, tazobactam.

^b NI, not included.

5. AmpC β-λακταμάσες

5.1. Ομαδοποίηση και γενικά χαρακτηριστικά.

Πρόκειται για κεφαλοσπορινάσες με πλασμιδιακή ή χρωμοσωμική εντόπιση που ανήκουν στην τάξη C κατά Ambler (Jacoby, 2009). Το πρώτο ένζυμο της κατηγορίας ανιχνεύτηκε σε στέλεχος *E.coli* και εμφάνιζε δράση έναντι της πενικιλίνης (Abraham and Chain, 1988). Υδρολύουν τις πενικιλίνες, τους συνδιασμούς με β-

λακταμικούς αναστολείς, τις κεφαλοσπορίνες συμπεριλαμβανομένου των κεφαμυκινών και των οξυϊμινοκεφαλοσπορινών και σε μικρό βαθμό την αζτρεονάμη (Jacoby, 2009). Δεν υδρολύουν την κεφεπίμη και τις καρβαπενέμες ενώ αναστέλλονται από την κλοξασιλίνη και από παράγωγα του βορονικού οξέως (Beesley et al., 1983; Jacoby, 2009; Tan et al., 2009). Στην περίπτωση που η παρουσία τους συνδιαστεί με προβλήματα διαπερατότητας μπορούν να εκφέρουν υψηλού επιπέδου αντοχή στις καρβαπενέμες (Mammeri et al., 2010; Oteo et al., 2008).

Τα χρωμοσωμικά ένζυμα ανιχνεύονται ενδογενώς σε *Acinetobacter* spp, *Aeromonas* spp, *Chromobacterium violacium*, *C.freundii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp, *Hafnia alvei*, *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri*, *Providencia stuartii*, *S.marcescens*, *P.aeruginosa* και *Yersinia enterocolitica*, εμφανίζουν συνήθως χαμηλά επίπεδα έκφρασης λόγω καταστολής, δύναται όμως να επαχθούν παρουσία κεφοξιτίνης ενώ εκφράζονται πλήρως με αποκαταστολή (derepression) (Jacoby, 2009).

Τα πλασμιδιακά ένζυμα ανάλογα με τις διαφορές τους σε νουκλεοτιδικό επίπεδο έχουν κατανεμηθεί σε πέντε ομάδες: την ομάδα του *C. freundii* που αντιπροσωπεύεται από την CMY-2, το γκρουπ του *Enterobacter* με το MIR-1 και την ACT-1, την ομάδα της *M. morganii* με την DHA-1, το γκρουπ της *Hafnia alvei* με την ACC-1, και τέλος η ομάδα της *Aeromonas* με την MOX-1 (ή αλλιώς CMY-1) και την FOX-1 που αποτελούν δύο σαφείς υποομάδες (Philippon et al., 2002). Παρουσιάζουν το ίδιο φάσμα υδρόλυσης με τα χρωμοσωμικά ένζυμα με εξαίρεση την ACC-1 που αναστέλλεται από την κεφοξιτίνη και δεν επάγει αντοχή στις κεφαμυκίνες και την ACC-2 που υδρολύει αποτελεσματικά την κεφπιρόμη (Bauernfeind et al., 1999; Girlich et al., 2000).

Οι πλασμιδιακές AmpC β-λακταμάσες παρουσιάζουν παγκόσμια κατανομή. Στην Ελλάδα τα ένζυμα αυτά παραμένουν ασυνήθη και μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί από στελέχη Εντεροβακτηριακών (*E.coli* και *K.pneumoniae*) τα ακόλουθα ένζυμα MOX-2 από την ομάδα της *Aeromonas*, CMY-2, CMY-4, CMY-6 CMY-13, CMY-30 και CMY-31 από την ομάδα του *Citrobacter* και τέλος τα πιο ασυνήθη ACC-4 και LAT-1 ένζυμα (Gazouli et al., 1998; Kotsakis et al., 2009; Miriagou et al., 2004; Papagiannitsis et al., 2010, 2011; Raskine et al., 2002; Tsakris et al., 2011).

5.2. Ανίχνευση.

Οι AmpC β-λακταμάσες χαρακτηρίζονται από τις δυσκολίες που υπάρχουν για την ανίχνευση τους. Η PCR αποτελεί και στην περίπτωση αυτών των ενζύμων την μέθοδο αναφοράς για την εύρεση και ταυτοποίηση τους (Perez-Perez and Hanson, 2002). Καθώς οι μοριακές τεχνικές δεν είναι εύκολα εφαρμόσιμες σε όλα τα εργαστήρια, έχουν προταθεί διάφορα φαινοτυπικά τεστ που βασίζονται είτε στην υδρόλυση των κεφαμυκινών είτε στην αναστολή των AmpC ενζύμων και στοχεύουν στην διαφοροποίηση τους από τα ESBL ένζυμα και τα προβλήματα μεμβρανικής διαπερατότητας (Jacoby, 2009).

Επιβεβαιωτικά φαινοτυπικά τεστ που ανιχνεύουν την υδρόλυση των κεφαμυκινών περιλαμβάνουν το κεφοξιτίνη-Hodge test, τα τρισδιάστατα τεστ και το AmpC τεστ δισκίων (Black et al., 2005; Lee et al., 2005; Thomson and Sanders, 1992). Το κεφοξιτίνη-Hodge test, διενεργείται με την χρήση ενός ευαίσθητου στελέχους *E.coli*, ποιοτικά στρωμένου, κεντρική τοποθέτηση επί του τρυβλίου ενός δισκίου κεφοξιτίνης, ενοφθαλμισμό των υπό εξέταση μικροοργανισμών σε ευθεία γραμμή από την άκρη του τρυβλίου μέχρι την άκρη του κεντρικού δισκίου κεφοξιτίνης και εκτίμηση της ενίσχυσης της ανάπτυξης γύρω από την γραμμή του εξεταζόμενου οργανισμού στο σημείο τομής της γραμμής και της επαγόμενης ζώνης αναστολής

(Lee et al., 2005). Στα τρισδιάστατα τεστ πραγματοποιείται αρχικά η κλασσική μέθοδος διάχυσης δισκίων με ένα ευαίσθητο στέλεχος και σε μία εσωτερική χαραγή σε απόσταση 3 mm από τα δισκία ενοφθαλμίζεται εναιώρημα του υπό εξέταση στελέχους (Thomson and Sanders, 1992). Τέλος στο AmpC τεστ δισκίων σε τρυβλίο Mueller-Hinton (MH) με ποιοτικά στρωμένο ευαίσθητο στέλεχος *E.coli*, εκτιμάται η από το υπό διερεύνηση μικροοργανισμό, έπειτα από επεξεργασία με Tris-EDTA, επαγόμενη υδρόλυση κεφοξιτίνης, με την χρήση ενός απλού δισκίου άνευ αντιβιοτικού στο οποίο έχει ενοφθαλμιστεί εναιώρημα τοποθετημένο σε άμεση γειννίαση με το δισκίο κεφοξιτίνης, (Black et al., 2005).

Οι αναστολείς των AmpC ενζύμων που έχουν χρησιμοποιηθεί διακρίνονται σε β-λακταμικούς όπως η κλοξασιλλίνη και μη β-λακταμικούς όπως το βορονικό οξύ και τα παράγωγα του (Jacoby, 2009). Με την αναστολή των AmpC β-λακταμασών επιτυγχάνεται ενίσχυση της υδρολυτικής δραστηριότητας των κεφαλοσπορινών που εξετάζονται ως υπόστρωμα. Βασική διαφορά ανάμεσα στους β-λακταμικούς και μη αναστολείς αποτελεί το γεγονός ότι το βορονικό οξύ και τα παράγωγα του σε αντίθεση με την κλοξασιλλίνη αναστέλλουν και τις KPC-τύπου καρβαπενεμάσες με άμεση συνέπεια να χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή στην εκτίμηση των αποτελεσμάτων στην περίπτωση στελεχών με μειωμένη ευαισθησία στις καρβαπενέμες (Pournaras et al., 2010). Για την αποφυγή επίσης ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων συνιστάται και η ταυτόχρονη χρήση δισκίων αποκλειστικά με βορονικό οξύ ή τα παράγωγα του ως κόντρόλ για την εκτίμηση πιθανής αναστολής της ανάπτυξης των στελεχών υπό εξέταση (Thomson, 2010). Υποστρώματα που έχουν προταθεί για τον έλεγχο της παρουσίας AmpC ενζύμων είναι οι κεφαμυκίνες (κεφοξιτίνη και κεφοτετάνη) καθώς και η κεφατζιδίμη και η κεφοταξίμη σε συγκεντρώσεις 30μg ανά δισκίο (Coudron, 2005; Peter-Getzlaff et al., 2011; Polsfuss et al., 2011; Tan et al., 2009; Tenover et al.,

2009; Yagi et al., 2005). Παρατηρούνται διαφοροποιήσεις όσον αφορά το προτεινόμενο cut-off για τα θεωρούμενα ως θετικά δείγματα, με ορισμό του σε επιθυμητή αύξηση της ζώνης αναστολής παρουσία του αναστολέα είτε $\geq 4\text{mm}$ είτε $\geq 5\text{mm}$ (Coudron, 2005; Polsfuss et al., 2011). Παράγωγα του βορονικού οξέως που έχουν μέχρι στιγμής μελετηθεί περιλαμβάνουν το φαινύλ-βορονικό οξύ (PBA) και το 3-άμινο-φαινύλ βορονικό οξύ (APBA) (Coudron, 2005; Tenover et al., 2009). Πέρα από την χρήση δισκίων διατίθεται και εμπορικά διαθέσιμα Etest με βάση τον συνδιασμό κεφοτετάνης και κεφοτετάνης-κλοξασιλίνης ή κεφοξιτίνης και κεφοξιτίνης-κλοξασιλίνης (Peter-Getzlaff et al., 2011).

Τέλος σημειώνεται ότι με εξαίρεση την χρήση μοριακών τεχνικών οι λοιπές φαινοτυπικές δοκιμασίες δεν δύναται να διακρίνουν τα χρωμοσωμικά de-repressed και επαγόμενα ένζυμα από τις επίκτητες πλασμιδιακές AmpC.

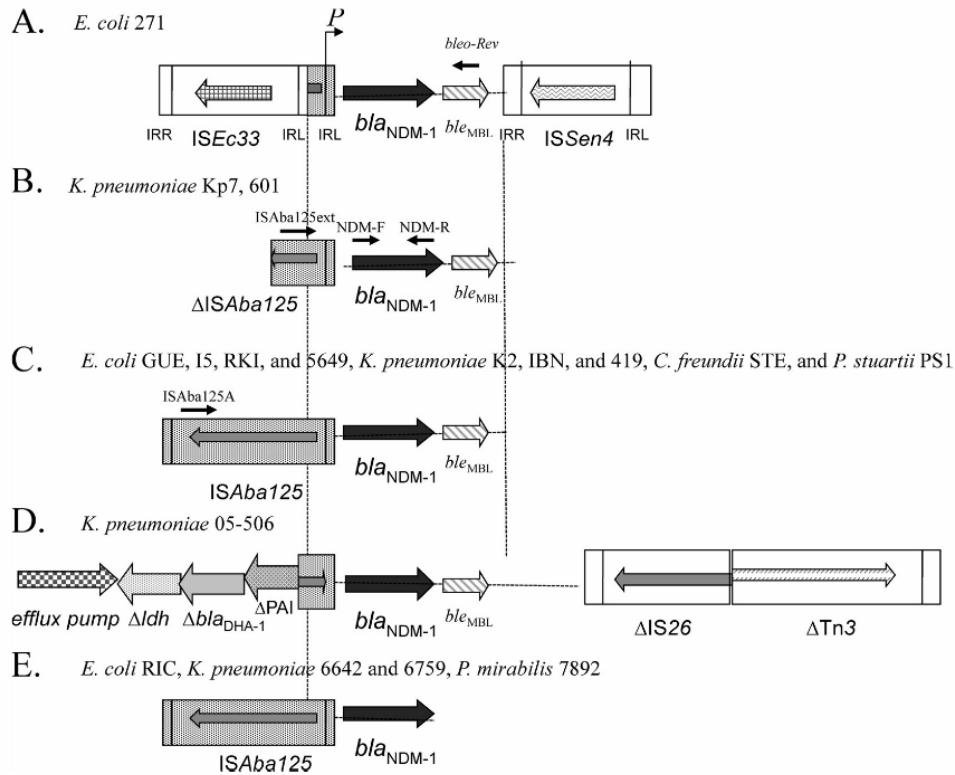
6. NDM καρβαπενεμάσες

Πρόκειται για μια νέα τάξη μέταλλο-β-λακταμασών. Ανήκουν στην υποτάξη B1 που απαιτεί δύο ιόντα Zn^{2+} για την καταλυτική της δράση, διαφέρει όμως από τις υπόλοιπες MBL καθώς εμφανίζει μεγαλύτερο ενεργό κέντρο (Kim et al., 2011). Μέχρι στιγμής έχουν αναγνωριστεί δώδεκα παραλλαγές του NDM-1 ενζύμου (NDM-2 με NDM-12) (<http://www.lahey.org/studies/>). Έχει εντοπιστεί σε διαφορά στελέχη της οικογένειας των Εντεροβακτηριακών κυρίως *K.pneumoniae* και *E.coli* αλλά και λιγότερο συχνά *E.cloacae*, *M.morganii*, *C. freundii* *P. rettgeri* καθώς και σε άλλα gram αρνητικά βακτήρια όπως το *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas spp* και *Acinetobacter baumannii* (Darley et al., 2012; Flateau et al., 2012; Kumarasamy et al., 2010; Peirano et al., 2014; Rozales et al., 2014).

Παρά το γεγονός ότι έχει περιγραφεί σε συγκεκριμένα στελέχη και χρωμοσωμική εντόπιση του ενζύμου, η NDM καρβαπενεμάση έχει συσχετιστεί κυρίως με πολλαπλά

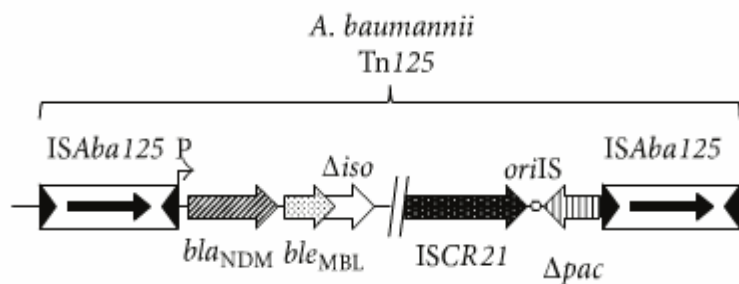
ξεχωριστά γεγονότα πρόσληψης μέσω πλασμιδίων διαφορετικών μεγεθών που ανήκουν σε μία πολυπληθή παλέτα από γκρουπ ασυμβατότητας όπως IncF, IncA/C, IncL/M, IncH, IncN και IncX3 (Hishinuma et al., 2013; Johnson and Woodford, 2013; Kumarasamy et al., 2010; Poirel et al., 2011a; Sonnevend et al., 2013; Villa et al., 2012). Παρατηρούνται επί συζευτικών ή μη πλασμιδίων και συχνά απαιτείται η παρουσία βοηθητικών πλασμιδίων για την επιτυχή μεταφορά τους (Poirel et al., 2011a). Πλασμίδια που ανήκουν σε περιορισμένου φάσματος δέκτες όπως τα IncF μπορούν να διασπαρούν μόνο μεταξύ στελεχών της οικογένειας των Εντεροβακτηριακών ενώ πλασμίδια με πιο ευρύ φάσμα δεκτών όπως τα IncA/C και σε άλλα γένη όπως *Acinetobacter* και *Pseudomonas* (Poirel et al., 2011a).

Σε αντίθεση με άλλες επίκτητες β-λακταμάσες (*bla_{VIM}* και *bla_{IMP}*) η NDM καρβαπενεμάση δεν έχει συσχετιστεί με μεταθετά στοιχεία επί ιντεργκρονίων τάξεως 1 (Walsh et al., 2005). Από την γενετική ανάλυση του περιβάλλοντος που πλαισιώνει το *bla_{NDM}* γονίδιο φαίνεται ότι σταθερά προηγείται του γονιδίου το *ISAbal25* στοιχείο ολόκληρο ή τμηματικά ενώ συνήθως έπεται το *ble_{MBL}*, ένα νέο γονίδιο που εκφέρει αντοχή στην βλεομυκίνη (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση των γενετικών περιοχών που φέρουν το *bla*_{NDM-1} γονίδιο όπως έχουν συσχετιστεί σε Εντεροβακτηριακά στελέχη (Poirel et al., 2011a).

Σε στελέχη *A.baumannii* το γονίδιο εντοπίζεται μεταξύ δύο αντιγράφων του στοιχείου *ISAbal25* σχηματίζοντας ένα σύνθετο τρανσποζόνιο το *Tn125* (Εικόνα 5) (Dortet et al., 2014).



Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση της γενετικής περιοχής που φέρει το *bla*_{NDM-1} γονίδιο σε στελέχη *A.baumannii* (Dortet et al., 2014).

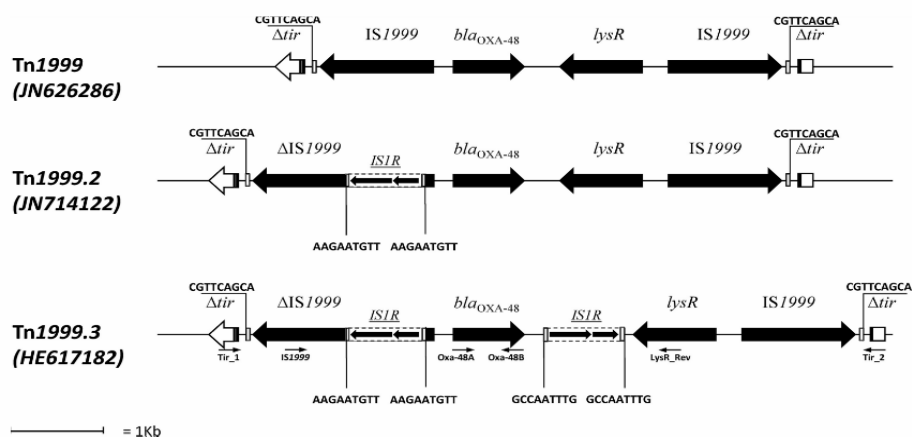
Την αρχική εμφάνιση του ενζύμου στην ινδική/πακιστανική χερσόνησο ακολούθησε η επιτυχής παγκόσμια διασπορά του με αναφορές από την Αγγλία και άλλες Ευρωπαϊκές χώρες, Ρωσία, Καναδά, Αυστραλία, Βόρεια και Νότια Αμερική, Νέα Ζηλανδία, Κίνα, Ταϊβάν και την Αραβική Χερσόνησο (Ageevets et al., 2014; Bushnell et al., 2013; Johnson and Woodford, 2013; Kumarasamy et al., 2010; Liu et al., 2014; Patel and Bonomo, 2013; Wang et al., 2013). Στην Ευρώπη οι επιδημίες παραμένουν λίγες και με περιορισμένο αριθμό περιστατικών (Decousser et al., 2013; Gaibani et al., 2011; Koo et al., 2012; Poirel et al., 2014). Εκτός από την ινδική/πακιστανική χερσόνησο, τα Βαλκάνια αποτελούν μια περιοχή εντός του Ευρωπαϊκού χώρου που ενδέχεται να υποκρύπτει ένα δεύτερο θύλακα διασποράς καθώς τα περιστατικά που έχουν αναφερθεί δεν συσχετίστηκαν με περιοχές γνωστής ενδημικότητας (Gecaj-Gashi et al., 2011; Nordmann et al., 2011a; Patel and Bonomo, 2013; Struelens et al., 2010).

7. OXA-48 καρβαπενεμάσες

Πρόκειται για β-λακταμάσες που ανήκουν στην τάξη D κατά Ambler και δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ, την ταζομπακτάμη και την σουλμπακτάμη ενώ *in vitro* η δραστηριότητα τους αναστέλλεται από το NaCl (Poirel et al., 2010a). Παρουσιάζουν χαμηλή υδρολυτική ικανότητα για τις καρβαπενέμες ενώ δεν υδρολύουν τις εκτεταμένου φάσματος κεφαλοσπορίνες (Poirel et al., 2004, 2012). Όταν η παρουσία των ενζύμων αυτών συνδυαστεί με την έκφραση ESBL ενζύμων ή προβλημάτων στην μεμβρανική διαπερατότητα, η επαγόμενη αντίσταση στις κεφαλοσπορίνες και καρβαπενέμες δύναται να είναι υψηλή (Pfeifer et al., 2012; Pitart et al., 2011; Poirel et al., 2012).

Φέρονται συνήθως επί ενός σύνθετου τρανσποζονίου του Tn1999 που περιλαμβάνει δύο αντίγραφα του IS1999 ή επί των παραλλαγών του Tn1999.2 και Tn1999.3, που

έχουν ένα αντίγραφο του IS1R να προηγείται (Tn1999.2) ή να προηγείται και να έπεται (Tn1999.3) (Εικόνα 6) (Aubert et al., 2006; Giani et al., 2012). Τα τρανσποζόνια αυτά εντοπίζονται επί συζευκτικών πλασμιδίων με ομοιομορφία ως προς την ομάδα ασυμβατότητας, ανήκοντας στην IncL/M, με μέγεθος ~ 62 kb (Dimou et al., 2012; Pfeifer et al., 2012; Pitart et al., 2011; Poirel et al., 2012).



Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση του τρανσποζονίου Tn1999 και των νεωτέρων Tn1999.2 και Tn1999.3 (Giani et al., 2012)

Η αρχική απομόνωση του ενζύμου έγινε από στέλεχος *K.pneumoniae* στην Κωνσταντινούπολη το 2001 (Poirel et al., 2004). Έκτοτε η OXA-48 καρβαπενεμάση έχει παρουσιάσει μια επιτυχή παγκόσμια διασπορά έχοντας απομονωθεί εκτός από χώρες της λεκάνης της μεσογείου και της μέσης Ανατολής όπως η Αίγυπτος, Τυνησία, το Μαρόκο, η Αλγερία, ο Λίβανος, η Σαουδική Αραβία και το Ομάν και από λοιπές Ευρωπαϊκές χώρες μη γειτνιάζουσες με την Τουρκία όπως η Αγγλία, Ιρλανδία, Γαλλία, Βέλγιο, Γερμανία, Ισπανία, Ιταλία, Ελβετία και Πολωνία (Agabou et al., 2014; Cantón et al., 2012; Dimou et al., 2012; Giani et al., 2013; Glupczynski et al., 2012; Majewski et al., 2014; Oteo et al., 2013; Pantel et al., 2014; Pfeifer et al., 2012; Pitart et al., 2011; Poirel et al., 2012; Seiffert et al., 2014; Wrenn et al., 2014). Μεμονωμένα περιστατικά που συχνά συνδέονται με μεταφορά ασθενών από ενδημικές περιοχές έχουν αναφερθεί επίσης στην Ιαπωνία, Σιγκαπούρη, ΗΠΑ,

Καναδά και την Τανζανία ((Ellis et al., 2013; Hashimoto et al., 2014; Marimuthu et al., 2014; Mathers et al., 2013; Mushi et al., 2014). Παράλληλα έχουν σημειωθεί επιδημίες στην Αγγλία, Γαλλία, Ισπανία, Ιρλανδία, Ρωσία, στις χώρες της Βαλτικής και το Ισραήλ (Cantón et al., 2012; Pitart et al., 2011; Poirel et al., 2012; Villa et al., 2014; Wrenn et al., 2014).

8. OXA-48-like β-λακταμάσες

Η αρχική ανακάλυψη της OXA-48 β-λακταμάσης συνοδεύτηκε από την σταδιακή αναγνώριση και νεοτέρων παραλλαγών του ενζύμου. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί 7 νέα ένζυμα με υδρολυτική δράση έναντι των καρβαπενεμών καθώς και ένα με μεγαλύτερη δράση έναντι των εκτεταμένου φάσματος κεφαλοσπορινών.

Η OXA-162 καρβαπενεμάση, προϊόν σημειακής υποκατάστασης (Thr223Ala) που εμφανίζει παρόμοια υδρολυτική δράση έναντι των β-λακταμών με την πρόδρομη OXA-48, απομονώθηκε αρχικά από στέλεχος *K.pneumoniae* στην Τουρκία και έκτοτε έχει αναγνωριστεί σε μεμονωμένα περιστατικά στην Γερμανία που αφορούσαν στελέχη *E.coli*, *C.freundii* και *R.ornithinolytica* και πρόσφατα σε *K.pneumoniae* στην Ουγγαρία (Jánvári et al., 2014; Kasap et al., 2013; Pfeifer et al., 2012).

Η OXA-181 καρβαπενεμάση διαφέρει από το OXA-48 ένζυμο κατά 4 σημειακές αντικαταστάσεις (Thr104Ala, Asn110Asp, Glu175Gln και Ser179Ala), έχει απομονωθεί σε στελέχη *K.pneumoniae*, *C.freundii*, *P.rettgeri* και *E.coli* και έχει μια εκτεταμένη διασπορά με αναφορές από την Ινδία, Νέα Ζηλανδία, Ομάν, Αγγλία, Γαλλία, Νορβηγία, Ρουμανία, και Σιγκαπούρη (Balm et al., 2013a; Castanheira et al., 2011; Dimou et al., 2012; Poirel et al., 2012; Potron et al., 2011a; Ruppé et al., 2014; Samuelsen et al., 2013; Székely et al., 2013). Σημειώνεται ότι έχει παρατηρηθεί ταυτόχρονη έκφραση της OXA-181 και της NDM-1 καρβαπενεμάσης σε στελέχη *K.pneumoniae* (Balm et al., 2013b; Samuelsen et al., 2013; Székely et al., 2013).

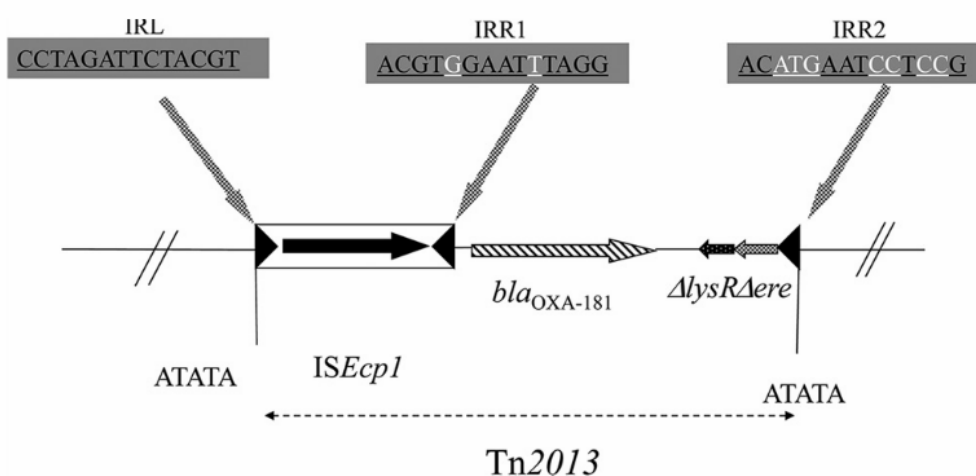
Η OXA-204 καρβαπενεμάση έχει απομονωθεί σε στελέχη *K.pneumoniae* από την Τυνησία και εμφανίζει δύο υποκαταστάσεις (Gln98His και Thr99Arg) σε σχέση με την OXA-48 καρβαπενεμάση, η OXA-232 διαφέρει κατά 5 σημειακές αντικαταστάσεις και έχει βρεθεί στην Ινδία και την Σιγκαπούρη και οι OXA-244 και OXA-245 με σημειακές υποκαταστάσεις (Arg222Gly και Glu125Tyr αντίστοιχα) έχουν βρεθεί σε στελέχη *K.pneumoniae* στην Ισπανία (Oteo et al., 2013; Potron et al., 2013a, 2013b; Teo et al., 2013).

Η OXA-163 β-λακταμάση εμφανίζει διαφορετικό υπόστρωμα υδρόλυσης από την OXA-48 καρβαπενεμάση καθώς υδρολύει τις εκτεταμένου φάσματος κεφαλοσπορίνες και πολύ ασθενώς τις καρβαπενέμες ενώ αναστέλλεται από το κλαβουλανικό αλλά όχι από το NaCl (Poirel et al., 2011b). Σε σχέση με την OXA-48 έχει μια υποκατάσταση (Ser220Asp) και τέσσερις σημειακές απαλοιφές (Arg214, Ile215, Glu216 και Pro217) ενώ μέχρι στιγμής υπάρχουν περιορισμένες αναφορές για το ένζυμο σε στελέχη *K.pneumoniae* και *E.cloacae* στην Αργεντινή και στην Αίγυπτο (Abdelaziz et al., 2012; Poirel et al., 2011b). Συνδιασμός με προβλήματα διαπερατότητας οδηγεί σε αντοχή και στις καρβαπενέμες (Abdelaziz et al., 2012).

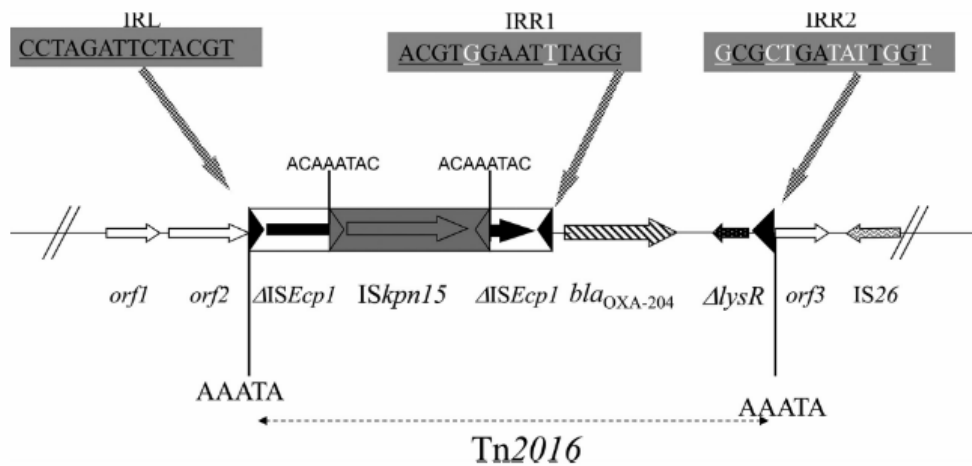
Τέλος η OXA-247 αποτελεί μια παραλλαγή της OXA-163 με δράση καρβαπενεμάσης και δύο αμινοξικές υποκαταστάσεις σε σχέση με το αρχικό ένζυμο (Y219S και D220N) και αναγνωρίστηκε σε στέλεχος *K.pneumoniae* στην Αργεντινή (Gomez et al., 2013).

Σε αντίθεση με την OXA-48 β-λακταμάση που παρουσιάζει μια σχετική ομοιομορφία όσον αφορά την γενετική περιοχή στην οποία μεταφέρεται, οι OXA-48-like καρβαπενεμάσες έχουν συσχετιστεί και με διαφορετικά γενετικά περιβάλλοντα που δεν φέρουν το IS1999. Συγκεκριμένα στην περίπτωση της OXA-181 προ του γονιδίου φέρεται το ISEcp1 ενώ μετά το γονίδιο εντοπίζονται *ΔereA-like* και *ΔlysR-like* open

reading frames (ORF) σχηματίζοντας ένα νέο τρανσποζόνιο το Tn2013, ενώ έχουν περιγραφή και πλασμίδια που δεν φέρουν τα ORF και ενδέχεται να αποτελούν νέα τρανσποζόνια (Εικόνα 7) (Balm et al., 2013b; Potron et al., 2011a). Η μεταφορά επίσης γίνεται σε πλασμίδια ποικίλου μεγέθους (7-200kb) που ανήκουν στα ColE2, IncA/C, IncFII ή είναι μη τυποποιήσιμα (Balm et al., 2013b; Castanheira et al., 2011; Potron et al., 2011a; Samuelsen et al., 2013). Το *ISEcp1* στοιχείο συνδέεται επίσης και με την OXA-204 με την διαφορά ότι απέχει 49bp από το ένζυμο και διακόπτεται από το *ISkpn15* σχηματίζοντας ένα νέο τρανσποζόνιο το Tn2016 (Εικόνα 8)(Potron et al., 2013a).

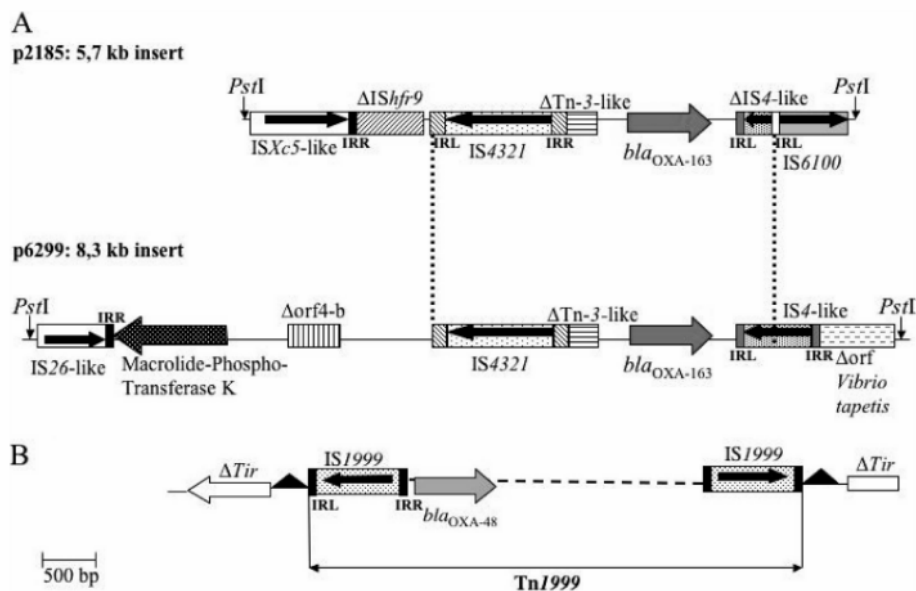


Εικόνα 7. Σχηματικός χάρτης της δομής του τρανσποζονίου Tn2013 (Potron et al., 2011a)



Εικόνα 8. Σχηματικός χάρτης της δομής του τρανσποζονίου Tn2016 (Potron et al., 2013a).

Επίσης η OXA-163 και OXA-247 εμφανίζουν ένα διαφορετικό γενετικό περιβάλλον με ένα IS4321 στοιχείο να προηγείται και ένα διακοπτόμενο IS4-like στοιχείο να έπεται (Εικόνα 9) (Abdelaziz et al., 2012; Gomez et al., 2013; Poirel et al., 2011b).



Εικόνα 9. Σχηματική απεικόνιση των γενετικών περιβαλλόντων που έχουν συσχετιστεί με το *bla*_{OXA-163} γονίδιο σε σχέση με το τρανσποζόνιο Tn1999 (Poirel et al., 2011b).

Σε αντίθεση με τα παραπάνω ένζυμα η OXA-162 έχει παρατηρηθεί σε IncL/M πλασμίδια μεγέθους 40 ή 60kb και οι OXA-244 και OXA-245 επίσης σε IncL/M τύπου πλασμίδια ~60 kb, σε τρανσποζόνια τύπου Tn1999.2 οι δύο πρώτες και Tn1999 η τελευταία (Kasap et al., 2013; Oteo et al., 2013; Pfeifer et al., 2012).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΕΣ AmpC β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΕΣ

1.1. Βακτηριακά στελέχη

Η αρχική συλλογή βακτηριακών στελεχών που μελετήθηκαν περιλάμβανε στελέχη τα οποία προήλθαν από τα παρακάτω Ελληνικά νοσοκομεία: Γενικό Νοσοκομείο Πειραιά «Γζάνειον» και Γενικό Νοσοκομείο Σερρών κατά την διάρκεια της χρονικής περιόδου από το 2004 έως το 2012. Τα στελέχη αυτά προέρχονταν από καλλιέργειες βιολογικών υλικών όπως δείγματα ούρων, αίματος, τραύματα, κατακλύσεις και κεντρικές φλεβικές γραμμές. Έγινε επιλογή στελεχών *K.pneumoniae*, *K.oxytoca* και *P.mirabilis* που παραδοσιακά δεν φέρουν πλασμιδιακά *bla*_{AmpC} γονίδια και στελεχών *E.coli* που φέρουν χρωμοσωμικό *bla*_{AmpC} γονίδιο χαμηλής έκφρασης, και μπορούν να εμφανίζουν αντοχή είτε λόγω αλλαγής των ρυθμιστικών χρωμοσωμιακών AmpC γονιδίων είτε λόγω εισαγωγής πλασμιδιακών γονιδίων.

Τα κριτήρια επιλογής των στελεχών που περιελήφθησαν στην μελέτη είναι τα ακόλουθα:

Εμφάνιση μειωμένης ευαισθησίας ή αντοχής τουλάχιστον σε μία κεφαμυκίνη. Συγκεκριμένα περιελήφθησαν στελέχη που χαρακτηρίστηκαν είτε για την κεφοξιτίνη (FOX) μετρίως ευαίσθητα (MIC>8-32 mg/L) ή ανθεκτικά (MIC≥ 32 mg/L) είτε για την κεφοτετάνη (CTT) μετρίως ευαίσθητα (MIC>16-64 mg/L) ή ανθεκτικά (MIC≥ 64 mg/L) σύμφωνα με τις οδηγίες του CLSI 2012, σε συνδιασμό με αντοχή ή μειωμένη ευαισθησία σε μία τουλάχιστον εκτεταμένου φάσματος κεφαλοσπορίνη.

Συνολικά για τον έλεγχο της παρουσίας πλασμιδιακών AmpC β-λακταμασών διερευνήθηκαν 105 στελέχη με ύποπτα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Η κατανομή των στελεχών αυτών ανά είδος απεικονίζεται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Στελέχη υπό μελέτη για την παρουσία πλασμιδικών AmpC β-λακταμασών.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ
<i>K.pneumoniae</i>	36
<i>K.oxytoca</i>	10
<i>E.coli</i>	53
<i>P.mirabilis</i>	6
ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ	105

Τα στελέχη αρχειοθετήθηκαν, συμπεριλήφθηκαν στην συλλογή αρχειακών στελεχών του εργαστηρίου μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών και αποθηκεύτηκαν στους -70°C σε ζωμό Brain-Heart (BH) με προσθήκη 15% γλυκερόλης.

1.1.1. Αρχική απομόνωση, ταυτοποίηση και έλεγχος ευαισθησίας.

Η αρχική απομόνωση των στελεχών πραγματοποιήθηκε στα παραπέμποντα εργαστήρια σε κοινά θρεπτικά υλικά όπως MacConkey (MC) άγαρ στους 37°C για 18-24 ώρες. Η ταυτοποίηση των μικροβίων και ο έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά έγινε είτε με το αυτοματοποιημένο μηχάνημα Microscan 4 (Siemens, Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA) με panel negative combo 30 για ταυτοποίηση είτε με το Vitek 2 (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) χρησιμοποιώντας την κάρτα GN. Τα panel εμβολιάστηκαν με μικροβιακό εναιώρημα σε ειδικό ζωμό, επωάστηκαν στους 37°C για 18h και η ανάγνωση πραγματοποιήθηκε την επόμενη μέρα. Η ταυτοποίηση έγινε σύμφωνα με τα αποτελέσματα ελέγχου 23-24 βιοχημικών ιδιοτήτων. Ως στέλεχος ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο στέλεχος *E.coli* ATCC 25922.

Για την περαιτέρω ταυτοποίηση των μικροβίων χρησιμοποιήθηκε και το σύστημα API20E που προσδιορίζει το είδος κάθε μικροβίου με βάση τις βιοχημικές του

ιδιότητες σύμφωνα με τον αλγόριθμο που προτείνεται από την κατασκευάστρια εταιρεία (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France).

1.1.2. Έλεγχος ευαισθησίας με διάχυση δισκίων – MIC ερταπενέμης.

Η προετοιμασία του ενοφθαλμίσματος των στελεχών έγινε με την διαδοχική εναιώρηση αποικιών, από πρόσφατη ανακαλλιέργεια, 18-20 ωρών, σε MC άγαρ, των αρχειακών στελεχών, σε φυσιολογικό ορό έως ότου επιτευχθεί πυκνότητα ισοδύναμη με 0,5 της πρότυπης κλίμακας McFarland, η οποία αντιστοιχεί σε $\sim 1,5 \times 10^8$ cfu/ml. Στην συνέχεια ενοφθαλμίστηκαν 10μl από το εναιώρημα σε τετράγωνα τρυβλία MH άγαρ. Ακολούθησε η τοποθέτηση των δισκίων αντιβιοτικών εντός 10 λεπτών. Χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα δισκία αντιβιοτικών cefoxitin 30μg, cefotetan 30μg, amoxicillin-clavulanate 20/10μg, cefaclor 30μg, cefotaxime 30μg, cefuroxime 30μg, ceftazidime 30μg, ceftriaxone 30μg, cefepime 30μg, aztreonam 30μg, meropenem 10μg, imipenem 10μg, ertapenem 10μg, trimethoprim-sulfomethoxazole 1,25/23,75μg, ciprofloxacin 5μg, gentamicin 10μg (Becton-Dickinson, BD). Η τοποθέτηση των δισκίων έγινε σε απόσταση 25mm. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων έγινε σύμφωνα με τα αναθεωρημένα ερμηνευτικά κριτήρια του CLSI,2013.

Ο προσδιορισμός της MIC για την ερταπενέμη έγινε με την χρήση διαβαθμισμένων ταινιών Etest (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) που τοποθετήθηκαν σε τρυβλία MH άγαρ μετά από ενοφθαλμισμό με βακτηριακό εναιώρημα 0,5 McFarland. Ακολούθησε επώαση για 18-20 ώρες στους 37°C εκτίμηση του αποτελέσματος και ερμηνεία των αποτελεσμάτων σύμφωνα με τα αναθεωρημένα ερμηνευτικά κριτήρια του CLSI,2013.

1.2. Μοριακή διερεύνηση στελεχών

1.2.1. Εκχύλιση βακτηριακού DNA

Για την εκχύλιση βακτηριακού DNA χρησιμοποιήθηκε το kit QuickGen DNA whole blood kitS (Fujifilm). Η λύση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε μετά από επώαση του βακτηριακού εναιωρήματος σε διάλυμα πρωτεΐνάσης-K/SDS. Η εκχύλιση έγινε μέσω στηλών. Το κεκαθαρισμένο DNA ήταν άμεσα χρησιμοποιούμενο. Αναλυτικά ή διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η ακόλουθη:

Αρχική ανακαλλιέργεια του στελέχους σε MC άγαρ και επώαση στους 37°C για 16-18 ώρες. Δημιουργία βακτηριακού εναιωρήματος από μεμονωμένες αποικίες με θολερότητα αντίστοιχη με 0,5 της κλίμακας McFarland σε αποστειρωμένο σωληνάριο με στείρο διάλυμα απεσταγμένου ύδατος (WFI). Ομογενοποίηση του διαλύματος με έντονη ανάδευση (vortex) για 15 sec.

Εκχύλιση DNA με το ημιαυτόματο σύστημα στηλών της FujiFilm life science ως εξής: Μεταφορά 200 μl βακτηριακού εναιωρήματος σε σωληνάριο τύπου eppendorf 1,5 ml. Προσθήκη 30 μl πρωτεΐνάσης K και 250 μl λυτικού διαλύματος (Lysis Buffer LDB) και άμεσο πιπετάρισμα 5 φορές. Έντονη ανάδευση (vortex) για 15 sec και στην συνέχεια καθίζηση του διαλύματος με μία σύντομη φυγοκέντρηση (short spin). Επώαση στους 56°C για 2 min. Προσθήκη 250 μl απόλυτης αιθανόλης (>99%) και vortex για 15 sec. Καθίζηση του διαλύματος με μια σύντομη φυγοκέντρηση. Εισαγωγή του δείγματος στην συσκευή των στηλών εκχύλισης για το αυτοματοποιημένο κομμάτι της έκλουσης του DNA Παραλαβή 200 μl εναιωρήματος DNA. Φύλαξη σε σωληνάρια τύπου eppendorf στους -70°C μέχρι την χρήση.

1.2.2. Ενίσχυση των γονιδίων β-λακταμασών με PCR

Η τεχνική της PCR χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της παρουσίας γονιδίων αντοχής στα β-λακταμικά αντιβιοτικά στα στελέχη υπό διερεύνηση. Έγινε έλεγχος για γονίδια πλασμιδιακών AmpC β-λακταμασών, ευρέως φάσματος β-λακταμασών

ESBLs (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}), και μέταλλο β-λακταμασών (*bla*_{VIM}). Σε επιλεγμένα στελέχη έγινε επιπλέον έλεγχος για τις *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-2} και *bla*_{OXA-10}. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των παραπάνω γονιδίων και για τον προσδιορισμό των νουκλεοτιδικών τους αλληλουχιών καθώς και οι συνθήκες περιγράφονται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακες 3,4,5 και 6).

Πίνακας 3. Εκκινητές και συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση γονιδίων πλασμιδιακών AmpC β-λακταμασών (Perez-Perez and Hanson, 2002)

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5' – 3')	Προϊόν (bp)	Συνθήκες PCR
MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8 έως CMY-11	MOXMF MOXMR	GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C	520	94°C 3min 94° C 30sec 64° C 30sec (x35) 72° C 1min 72° C 10min
LAT-1 - LAT-4, CMY-2 - CMY-7, BIL-1	CITMF CITMR	TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC	462	
DHA-1, DHA-2	DHAMF DHAMR	AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC	405	
ACC	ACCMF ACCMR	AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC	346	
MIR-1T ACT-1	EBCMF EBCMR	TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT	302	
FOX-1 - FOX-5b	FOXMF FOXMR	AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG	190	

Πίνακας 4. Εκκινητές και συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των γονιδίων των πλασμιδιακών AmpC λακταμασών

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5' – 3')	Συνθήκες PCR	Αναφορά
CMY/MOX	MOX C1	ATG CAA CAA CGA CAA TCC ATC	94°C 3min <u>94° C 45sec</u> <u>58° C 45sec (x35)</u> <u>72° C 1min</u> 72° C 10min	(Pai et al., 1999)
	MOX C2	GTT GGG GTA GTT GCG ATT GG		(Ye et al., 2010)
	MOX AmpR	TTC TGC AGT TAC CTG GCC AGT TGC GT		(Perez-Perez and Hanson, 2002)
CMY/LAT	Amp C F	AAC ACA CTG ATT GCG TCT GAC		(Wang et al., 2008)
	Amp C R	CTG GGC CTC ATC GTC AGT TA		(Bauernfeind et al., 1997)
MIR-4	MIR4 F	CCT TGA ACT GCT ATT ACG GA		(Yan et al., 2002)
	MIR4 R	CGC CAC CCG GCA ATG TTT AC		
FOX	FOX-1H	CAC CAC GAG AAT AAC CAT	(Yan et al., 2002)	
	FOX-1F	ATG TGG ACG CCT TGA ACT		
DHA	DHA-1A	CTG ATG AAA AAA TCG TTA TC	(Yan et al., 2002)	
	DHA-1B	ATT CCA GTG CAC TCA AAA TA		

Πίνακας 5. Εκκινητές και συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση και τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας γονιδίων επιπλέον β-λακταμασών.

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5' – 3')	Προϊόν	Συνθήκες PCR	Αναφορά				
<i>bla</i> _{CTX-M}	CTX-M F	GGT TAA AAA ATC ACT GCG	873bp	95°C 5min 94° C 45sec 54° C 45sec (x35) 72° C 1min 72° C 10min	(Tzelepi et al., 2003)				
	CTX- M R	TTA CAA ACC GTC GGT GA							
<i>bla</i> _{SHV}	SHV A	ACT GAA TGA GGC GCT TCC	220bp		95°C 5min 94° C 45sec 54° C 45sec (x35) 72° C 1min 72° C 10min	(Tzelepi et al., 2003)			
	SHV B	CGC ACC CCG CTT GCT							
<i>bla</i> _{SHV}	SHV total F sequencing	GCC CGG GTT ATT CTT ATT TGT CGC	1014 bp			95°C 5min 94° C 45sec 54° C 45sec (x35) 72° C 1min 72° C 10min	(Nüesch-Inderbinen et al., 1996)		
	SHV total R sequencing	TCT TTC CGA TGC CGC CGC CAG TCA							
<i>bla</i> _{TEM}	TEM F	TTG GGT GCA CGA GTG GGT TA	465bp				95°C 5min 94° C 45sec 54° C 45sec (x35) 72° C 1min 72° C 10min	(Tzelepi et al., 2003)	
	TEM R	TAA TTG TTG CCG GGA AGC TA							
<i>bla</i> _{OXA-1}	OXA-1 F	ACA CAA TAC ATA TCA ACT TCG C	813bp					95°C 5min 94° C 45sec 54° C 45sec (x35) 72° C 1min 72° C 10min	(Ouellette et al., 1987; Steward et al., 2001)
	OXA-1 R	AGT GTG TTT AGA ATG GTG ATC							
<i>bla</i> _{OXA-2}	OXA-2 F	TTC AAG CCA AAG GCA CGA TAG	702bp	95°C 5min 94° C 45sec 54° C 45sec (x35) 72° C 1min 72° C 10min					(Costa et al., 2006)
	OXA-2 R	TCC GAG TTG ACT GCC GGG TTG							
<i>bla</i> _{OXA-10}	OXA-10 F	TTC AAG CCA AAG GCA CGA TAG	651bp		95°C 5min 94° C 45sec 54° C 45sec (x35) 72° C 1min 72° C 10min				(Steward et al., 2001)
	OXA-10R	TCC GAG TTG ACT GCC GGG TTG							

Πίνακας 6. Εκκινητές και συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση και τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας γονιδίων επιπλέον καρβαπενεμασών.

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5' – 3')	Προϊόν	Συνθήκες PCR	Αναφορά	
<i>bla_{VIM}</i>	VIMN-F	AGT GGT GAG TAT CCG ACA G	276bp	95°C 5min 94° C 45sec 54° C 45sec (x35) 72° C 1min 72° C 10min	(Woodford et al., 2004)	
	VIMN-R	ATG AAA GTG CGT GGA GAC				
<i>bla_{VIM}</i>	VIM-1 F sequencing	TTA TGG AGC AGC AAC GAT GT	920bp			(Yan et al., 2001)
	VIM-1R sequencing	CAA AAG TCC CGC TCC AAC GA				
<i>bla_{NDM}</i>	NDM-W F	GGG CAG TCG CTT CCA ACG GT	475 bp			(Voulgari et al., 2014)
	NDM-W R	GTA GTG CTC AGT GTC GGC AT				
<i>bla_{OXA-48}</i>	OXA-48 A	TTG GTG GCA TCG ATT ATC GG	725 bp		(Poirel et al., 2004)	
	OXA-48 B	GAG CAC TTC TTT TGT GAT GGC				
<i>bla_{OXA-181}</i>	OXA-181 F sequencing	ATG CGT GTA TTA GCC TTA TCG	798bp		(Castanheira et al., 2011)	
	OXA-181 R sequencing	AAC TAC AAG CGC ATC GAG CA				

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με DNA πολυμεράση υψηλής πιστότητας (Kapa Taq DNA polymerase, Kapa Biosystems, Boston, USA). Η αντίδραση έλαβε χώρα σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X που περιείχε 1,5mM MgCl₂, 200μM από κάθε τριφωσφορικό δεοξυριβονουκλεοτίδιο dNTP, 0,2μM από κάθε εκκινητή, 1U DNA πολυμεράσης και 100-200ng γενωμικού DNA σε τελικό όγκο 50 μl.

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

Αναμίχθηκαν 10μl από το προϊόν της PCR με 2μl χρωστικής φόρτωσης 6X (6X Loading Dye Solution, Fermentas), και από το προϊόν αυτό συνολικά 10μl μεταφέρθηκαν σε μία από τις θέσεις υποδοχής της πηκτής. Παράλληλα με τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκε και δείκτης μοριακού βάρους (DNA Ladder 100bp ή 1kb) με τμήματα DNA γνωστού μεγέθους (100-1000bp ή 100-3000bp αντιστοίχως). Σε κάθε PCR χρησιμοποιήθηκε ένας θετικός μάρτυρα από γνωστά τυποποιημένα στελέχη της συλλογής του εργαστηρίου καθώς και αρνητικός μάρτυρας. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 190V για 45 λεπτά, σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X. Η οπτική απεικόνιση έγινε κάτω από την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Η τυποποίηση των στελεχών που δίνουν θετικές μάντες στα προβλεπόμενα μοριακά βάρη έγινε με νέα PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές που υβριδίζουν τα υπό μελέτη γονιδιώματα στο πλήρες μήκος τους.

Στα προϊόντα που έγινε προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήθηκε εταιρεία παροχής αντίστοιχων υπηρεσιών για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων και την ανεύρεση τυχόν μεταλλάξεων. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με μηχανήμα αλληλούχισης ABI Prism 377 DNA sequencer, Applied Biosystems, Foster City, CA. Οι αλληλουχίες συγκρίθηκαν με την χρήση διαδικτυακής πλατφόρμας (Nucleotide Blast, Blastn, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), με τις υπάρχουσες καταχωρημένες αλληλουχίες στην Τράπεζα Γονιδιακών Πληροφοριών (Genbank) όπως διατίθενται από το NCBI (National Center for Biological Information).

1.2.3. Διερεύνηση κλωνικότητας με ERIC και REP-PCR.

Η ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR) και η REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic Sequence) αναπτύχθηκαν με την προοπτική να παρέχουν ένα απλό και εύχρηστο εργαλείο σε σχέση με την ηλεκτροφόρηση παλλόμενου πεδίου (Pulsed-field gel electrophoresis-PFGE) για την μοριακή διερεύνηση της επιδημιολογικής συγγένειας διαφορετικών στελεχών (Versalovic et al., 1991).

Στηρίζονται στην παρουσία μικρών, συντηρημένων αλληλουχιών μεγέθους που δεν κωδικοποιούν γονίδια αλλά επαναλαμβάνονται σε τυχαίες θέσεις του γονιδιώματος. Ο αριθμός και τα μοριακά μεγέθη των προϊόντων της PCR αντιπροσωπεύουν διαφορές στο γενετικό υλικό των υπό εξέταση στελεχών με συνέπεια να είναι εφικτή με αρκετά καλή διακριτική ικανότητα η διερεύνηση της κλωνικής τους σχέσης. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ERIC και την REP PCR αναφέρονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ERIC-PCR και την REP-PCR.

Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5' – 3')	Αναφορά
ERIC2	AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G	(Versalovic et al., 1991)
ERIC1R	ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C	
REP-1R I	III ICG ICG ICA TCI GGC	
REP-2 I	ICG ICT TAT CIG GCC TAC	

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με DNA πολυμεράση υψηλής πιστότητας (Kapa Taq DNA polymerase, Kapa Biosystems, Boston, USA).

Η αντίδραση για την ERIC-PCR για τα στελέχη *E.coli* έλαβε χώρα σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X που περιείχε 1,5mM MgCl₂, 300μM από κάθε τριφωσφορικό δεοξυριβονουκλεοτίδιο dNTP, 50 μM από κάθε εκκινητή, 10% DMSO, 2U DNA πολυμεράσης και 100-400ng γενωμικού DNA σε τελικό όγκο 50 μl. Πραγματοποιήθηκε στις ακόλουθες συνθήκες: αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 3 λεπτά, αποδιάταξη στους 95°C για 1 λεπτό, υβριδισμός στους 48°C για ένα λεπτό, επιμήκυνση στους 65°C για 8 λεπτά, για 40 κύκλους και τελική επιμήκυνση στους 65°C για 16 λεπτά.

Η αντίδραση για την ERIC-PCR για τα στελέχη *K.oxytoca* και *P.mirabilis* έλαβε χώρα σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X που περιείχε 1,5mM MgCl₂, 200μM από κάθε τριφωσφορικό δεοξυριβονουκλεοτίδιο dNTP, 10 μM από κάθε εκκινητή, 1,5U DNA πολυμεράσης και 100-200ng γενωμικού DNA σε τελικό όγκο 50 μl. Πραγματοποιήθηκε στις ακόλουθες συνθήκες: αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 7 λεπτά, αποδιάταξη στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα, υβριδισμός στους 48°C για ένα λεπτό, επιμήκυνση στους 72°C για 5 λεπτά, για 40 κύκλους και τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά.

Η αντίδραση για την REP-PCR για τα στελέχη *K.pneumoniae* έλαβε χώρα σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X που περιείχε 1,5mM MgCl₂, 300μM από κάθε τριφωσφορικό δεοξυριβονουκλεοτίδιο dNTP, 50 μM από κάθε εκκινητή, 10X DMSO, 2U DNA πολυμεράσης και 100-400ng γενωμικού DNA σε τελικό όγκο 50 μl. Πραγματοποιήθηκε στις ακόλουθες συνθήκες: αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 3 λεπτά, αποδιάταξη στους 95°C για 45 δευτερόλεπτα, υβριδισμός στους 45°C για ένα λεπτό, επιμήκυνση στους 65°C για 8 λεπτά, για 40 κύκλους και τελική επιμήκυνση στους 65°C για 16 λεπτά.

Τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% χρησιμοποιώντας ως ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X για 3 ώρες στα 80V. Για την παρασκευή του πηκτώματος προστέθηκαν 20μl διαλύματος EtBr (από αρχικό stock 10mg/ml), σε 200ml αγαρόζης. Παράλληλα με τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν και δείκτες μοριακού βάρους (DNA Ladder) με τμήματα DNA γνωστού μεγέθους (100-1000bp ή 100-3000bp). Σε κάθε PCR χρησιμοποιήθηκε ένας αρνητικός μάρτυρας. Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων και σύγκριση των ζωνών ηλεκτροφόρησης μεταξύ των διαφορετικών στελεχών έγινε οπτικά.

1.2.4. Πρωτόκολλο MLST για στελέχη *K.pneumoniae*.

Η περαιτέρω διερεύνηση της μοριακής επιδημιολογίας επιλεγμένων στελεχών *K.pneumoniae* έγινε με την χρήση τυποποίησης με νουκλεοτιδική ανάλυση πολλαπλών γενετικών τόπων (multilocus sequence typing-MLST) (www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst) με την χρήση διαδικτυακών εργαλείων (Πίνακας 8). Η MLST αποτελεί μία προέκταση της τυποποίησης με ηλεκτροφόρηση πολλαπλών γενετικών τόπων (multilocus enzyme electrophoresis-MLEE) (Selander et al., 1986) που βασίζεται στην μοριακή διερεύνηση και λήψη πληροφοριών από πολλές χρωμοσωμικές περιοχές, με την μελέτη 7-10, ανάλογα με το είδος συντηρημένων γονιδίων (housekeeping genes) και υβριδισμό εσωτερικών περιοχών τους. Τα γονίδια αυτά έχουν επιλεγεί καθώς θεωρούνται ζωτικής σημασίας για την βιωσιμότητα του κυττάρου, εκφράζονται σε όλα τα στελέχη ενός συγκεκριμένου είδους και οι μεταλλάξεις στο εσωτερικό τους θεωρούνται σιωπηλές. Για κάθε γονίδιο οι διαφορετικές αλληλουχίες καταχωρούνται ως διακριτά αλλήλια και κάθε στέλεχος διακρίνεται από το ειδικό αλλήλιο που έχει σε καθένα από τα housekeeping genes (τύπος αλληλουχιών, sequence type ST) (Maiden et al., 1998; Urwin and Maiden, 2003).

Πίνακας 8. Εκκινητές και συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την MLST σε στελέχη *K.pneumonia* (Diancourt et al., 2005).

Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητή (5' – 3')	Συνθήκες PCR
<i>rpoB</i> : F : Vic3 :	GGCGAAATGGCWGAGAACCA	95°C 5min 95° C 45sec 50° C 45sec (x35) 72° C 1min 72° C 10min
<i>rpoB</i> : R : Vic2 :	GAGTCTTCGAAGTTGTAACC	
<i>mdh</i> : F : 130 :	CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG	
<i>mdh</i> : R : 867 :	CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG	
<i>pgi</i> : F : 1R :	GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC	
<i>pgi</i> : R : 1F :	CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT	
<i>phoE</i> : F : 604.1 :	ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG	
<i>phoE</i> : R : 604.2 :	TGATCAGAACTGGTAGGTGAT	
<i>infB</i> : 1F :	CTCGCTGCTGGACTATATTCG	
<i>infB</i> : 1R :	CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC	
<i>gapA</i> : F : 173 : <i>gapA</i> : R : 181	TGAAATATGACTCCACTCACGG CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT	95°C 5min 95° C 45sec 60° C 45sec (x35) 72° C 1min 72° C 10min
<i>tonB</i> : 1F : <i>tonB</i> : 2R :	CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG	95°C 5min 95° C 45sec 45° C 45sec (x35) 72° C 1min 72° C 10min
<i>infB</i> :2 sequencing :	ACTAAGGTTGCCTCCGGCGAAGC	95°C 5min 95° C 45sec 50° C 45sec (x35) 72° C 1min 72° C 10min
<i>pgi</i> :2F sequencing :	CTGCTGGCGCTGATCGGCAT	
<i>pgi</i> :2R sequencing :	TTATAGCGGTTAATCAGGCCGT	

Σημειώνεται ότι οι παραπάνω εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν και για την αλληλούχιση των γονιδιωμάτων με εξαίρεση τα γονίδια *infB* και *pgi* για τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για το *infB* ο εκκινητής *infB2f* αντί για τον *infB1f*, και για το *pgi* το ζεύγος εκκινητών *pgi2F* και *pgi2R*.

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με DNA πολυμεράση υψηλής πιστότητας (Kapa Taq DNA polymerase, Kapa Biosystems, Boston, USA). Η αντίδραση έλαβε χώρα σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X που περιείχε 1,5mM MgCl₂, 200μM από κάθε τριφωσφορικό δεοξυριβονουκλεοτίδιο dNTP, 0,2μM από κάθε εκκινητή, 1U DNA πολυμεράσης και 100-200ng γενωμικού DNA σε τελικό όγκο 50 μl.

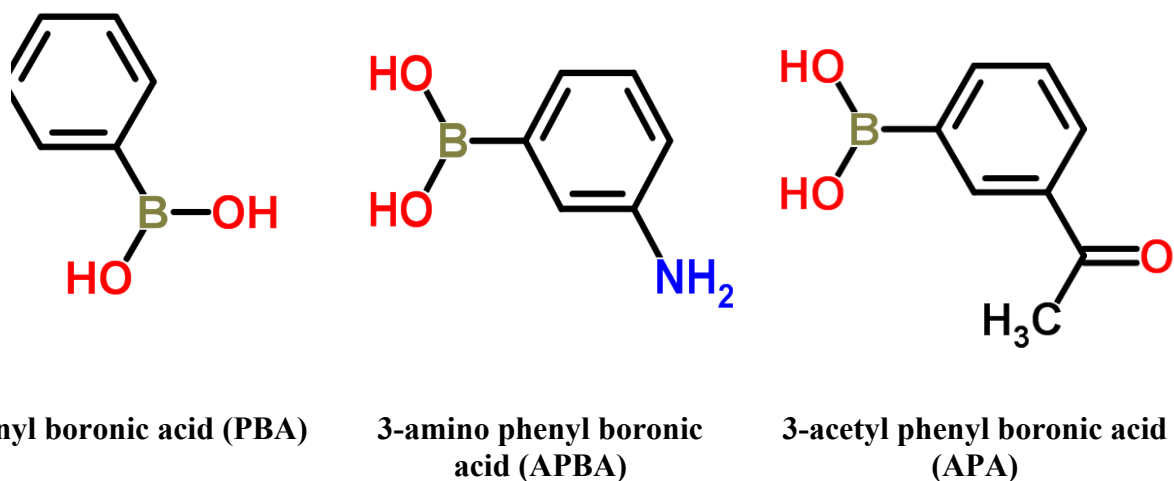
Οι ηλεκτροφορήσεις των προϊόντων PCR πραγματοποιήθηκαν όπως στα προηγούμενα πειράματα και στα προϊόντα έγινε προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας από εταιρεία παροχής αντίστοιχων υπηρεσιών. Η εύρεση των ST έγινε με την χρήση διαδικτυακών εργαλείων (http://www.pasteur.fr/cgi-bin/genopole/PF8/mlstdbnet.pl?file=klebs_profiles.xml).

1.3. Φαινοτυπικός έλεγχος.

1.3.1. Φαινοτυπικός έλεγχος για AmpC β-λακταμάσες.

Τα Εντεροβακτηριακά στελέχη που αναγνωρίστηκαν κατόπιν μοριακού ελέγχου ότι φέρουν πλασμιδιακές AmpC β-λακταμάσες διερευνήθηκαν συγκριτικά για την εκτίμηση του αποδοτικότερου αναστολέα. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε δοκιμασία ανίχνευσης του ενζύμου με ενσωμάτωση σε δισκία κεφοξιτίνης (FOX) 30μg και κεφοτετάνης (CTT) 30μg, κεφαζιδίμης (CAZ) 30μg και κεφοταξίμης (CTX) 30μg διαφορετικών παραγώγων βορονικού οξέως και κλοξασιλίνης. Χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικά ως αναστολείς 400μg φαινύλ-βορονικού οξέως (PBA), 300μg ακετύλ-φαινύλ βορονικού οξέως (APA), 300μg 3-άμινο-φαινύλ-βορονικού

οξέως (APBA), 600μg 3-άμινο-φαινύλ-βορονικού οξέως (APBA) και 750 μg κλοξασιλίνης (CLOX) (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Δομή του φαινύλ βορονικού οξέως και των παραγώγων του.

Η δοκιμή πραγματοποιήθηκε σε MH άγαρ χρησιμοποιώντας ενοφθάλμισμα 0,5 McFarland και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 18 ώρες. Διαφορά $\geq 5\text{mm}$ μεταξύ των διαμέτρων στις ζώνες αναστολής γύρω από τα δισκία κεφαλοσπορίνης με και χωρίς αναστολέα θεωρήθηκε ενδεικτική AmpC φαινοτύπου. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε συγκριτική εκτίμηση της παρατηρούμενης αύξησης της ζώνης αναστολής ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα και αναστολέα.

Τα δισκία με τις επιθυμητές συγκεντρώσεις βορονικού οξέως, παραγώγων βορονικού οξέως και κλοξασιλίνης ετοιμάστηκαν ως εξής:

- PBA: 120mg φαινύλ-βορονικού οξέος διαλύθηκαν σε 3 ml διμέθυλο σουλφοξείδιο (DMSO) και 3ml αποστειρωμένου αποσταγμένου νερού προστέθηκαν στο προηγούμενο διάλυμα. 20μl του διαλύματος στοκ μοιράστηκαν στα δισκία με το αντιβιοτικό (Coudron, 2005).
- APA: 150mg 3-ακετύλ-φαινύλ-βορονικού οξέος διαλύθηκαν σε 2,5 ml DMSO και 2,5 ml αποστειρωμένου αποσταγμένου νερού προστέθηκαν στο

προηγούμενο διάλυμα. 10μl του διαλύματος στοκ μοιράστηκαν στα δισκία με το αντιβιοτικό.

- APBA 300μg: 150mg 3-άμινο-φαινύλ-βορονικού οξέος διαλύθηκαν σε 5 ml αποστειρωμένου αποσταγμένου νερού. 10μl του διαλύματος στοκ μοιράστηκαν στα δισκία με το αντιβιοτικό.
- APBA 600μg: 300mg 3-άμινο-φαινύλ-βορονικού οξέος διαλύθηκαν σε 5 ml αποστειρωμένου αποσταγμένου νερού. 10μl του διαλύματος στοκ μοιράστηκαν στα δισκία με το αντιβιοτικό.
- Κλοξασιλίνη: 150mg κλοξασιλίνης σε 2 ml αποστειρωμένου αποσταγμένου νερού. 10μl διαλύματος στοκ μοιράστηκαν στα δισκία με το αντιβιοτικό.

Τα δισκία αφέθηκαν να στεγνώσουν για 30 λεπτά και χρησιμοποιήθηκαν αμέσως.

1.3.2. Φαινοτυπικός έλεγχος για ESBL.

Ο φαινοτυπικός έλεγχος για πιθανή παραγωγή ESBL τύπου β-λακταμάσης πραγματοποιήθηκε με τρία διαφορετικά τεστ.

Αρχική εκτίμηση έγινε κατά την διεξαγωγή του ελέγχου ευαισθησίας με την χρήση δισκίων αντιβιοτικών με το τεστ επαγωγής συνέργειας με την χρήση ως επαγωγέα δισκίων κλαβουλανικού οξέως. Συγκεκριμένα σε απόσταση 25mm από το κέντρο δίσκου αμοξικιλίνης-κλαβουλανικού (20/10μg) και σε διάταξη σταυρού τοποθετήθηκαν δισκία κεφοταξίμης (CTX) (30μg), κεφταζιδίμης (CAZ) (30μg), κεφεπίμης (FEP) (30μg) και αζτρεονάμης (AZT) (30μg). Εμφάνιση συνέργειας μεταξύ των δισκίων ερμηνεύτηκε ως ενδεικτική παραγωγής ESBL τύπου β-λακταμάσης.

Επιπλέον οι μικροοργανισμοί ελέγχθηκαν και με την μέθοδο συνδυασμένων δισκίων DDTS (double disk synergy test), με κλαβουλανικό οξύ για την επιβεβαίωση του φαινοτύπου ESBL. Χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του CLSI, δισκία

CTX (30μg) και CAZ (30μg) χωρίς και σε συνδιασμό με κλαβουλανικό οξύ (CL) (10μg). Η δοκιμή πραγματοποιήθηκε σε MH άγαρ χρησιμοποιώντας ενοφθάλμισμα 0,5 McFarland και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 18 ώρες. Διαφορά ≥ 5 mm μεταξύ των διαμέτρων στις ζώνες αναστολής γύρω από τα δισκία κεφαλοσπορίνης με και χωρίς κλαβουλανικό οξύ θεωρήθηκε ενδεικτική ESBL φαινοτύπου.

Τέλος χρησιμοποιήθηκε και το κεφεπίμη ESBL Etest (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France). Το κεφεπίμη ESBL Etest διενεργείται με ταινία δύο όψεων που περιέχει βαθμίδωση σκέτης κεφεπίμης στην μία άκρη και σε συνδυασμό με κλαβουλανικό οξύ στην άλλη άκρη. Τοποθετήθηκαν σε τρυβλία MH άγαρ μετά από ενοφθαλμισμό με βακτηριακό εναιώρημα 0,5 McFarland. Ακολούθησε επώαση για 18-20 ώρες στους 37°C. Το τεστ θεωρείται θετικό όταν υπάρχει τριπλάσια ή και μεγαλύτερη μείωση της MIC της κεφεπίμης παρουσία του κλαβουλανικού οξέως.

Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το *E.coli* ATCC 25922 .

1.3.3. Τροποποιημένο CLSI-ESBL επιβεβαιωτικό τεστ.

Το τροποποιημένο CLSI-ESBL τεστ σχεδιάστηκε να διαφέρει από το κλασσικό CLSI-ESBL τεστ στην ταυτόχρονη χρήση ενός αναστολέα των AmpC β-λακταμασών. Το φαινοτυπικό τεστ πραγματοποιήθηκε με την εκ των προτέρων προσθήκη στα δισκία FOX (30μg) και CAZ (30μg) και των συνδιασμών τους με κλαβουλανικό οξύ (CL) (10μg) και επιπλέον ενός από τους προαναφερθέντες λακταμικούς και μη αναστολείς (CLOX, PBA, APBA, APA) στις ίδιες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των AmpC β-λακταμασών. Διαφορά ≥ 5 mm μεταξύ των διαμέτρων στις ζώνες αναστολής γύρω από τα δισκία κεφαλοσπορίνης/αναστολέα και κεφαλοσπορίνης/αναστολέα με κλαβουλανικό οξύ θεωρήθηκε ενδεικτική ESBL φαινοτύπου.

Έγινε συγκριτική εκτίμηση των αποτελεσμάτων του τροποποιημένου CLSI-ESBL τεστ σε σχέση με το κλασσικό CLSI-ESBL τεστ.

1.4. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Οι μέσες τιμές (mean) και οι τυπικές αποκλίσεις (Standard Deviation=SD) χρησιμοποιήθηκαν για την περιγραφή των ποσοτικών μεταβλητών. Οι απόλυτες (N) και οι σχετικές (%) συχνότητες χρησιμοποιήθηκαν για την περιγραφή των ποιοτικών μεταβλητών. Για τη σύγκριση αναλογιών χρησιμοποιήθηκε το Pearson's χ^2 test ή το Fisher's exact test όπου ήταν απαραίτητο. Για τη σύγκριση των αυξήσεων στις διαμέτρους των δισκίων μεταξύ των διαφόρων συνδυασμών χρησιμοποιήθηκε το paired t-test. Επίσης, υπολογίστηκε η ευαισθησία (Se), η ειδικότητα (Sp), η αρνητική (NPV) και θετική προγνωστική αξία (PPV) που έχουν οι συνδυασμοί CAZ vs CAZ/CL ή/και CTX vs CTX/CL στο κλασσικό CLSI-ESBL τεστ σε σύγκριση με τους συνδυασμούς τους με τους αναστολείς CLOX, PBA, APBA, APA στο προτεινόμενο τροποποιημένο CLSI-ESBL τεστ. Τα επίπεδα σημαντικότητας είναι αμφίπλευρα και η στατιστική σημαντικότητα τέθηκε στο 0,05. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 18.0.

2. ΝΕΩΤΕΡΕΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ

2.1. Βακτηριακά στελέχη

Η αρχική συλλογή βακτηριακών στελεχών που μελετήθηκαν περιλάμβανε στελέχη τα οποία προήλθαν από τα παρακάτω Ελληνικά νοσοκομεία: Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων, Γενικό Νοσοκομείο Σερρών, Γενικό Νοσοκομείο Πειραιά «Τζάνειον», κατά την διάρκεια της χρονικής περιόδου από 2010 έως 2013. Τα στελέχη αυτά προέρχονται από καλλιέργειες βιολογικών υλικών όπως δείγματα

ούρων, αίματος, τραύματα, κατακλύσεις, βρογχικές εκκρίσεις, κεντρικές και περιφερικές φλεβικές γραμμές.

Τα κριτήρια επιλογής των στελεχών που περιελήφθησαν στην μελέτη είναι τα ακόλουθα:

Αντοχή ή μειωμένη ευαισθησία σε τουλάχιστον μία καρβαπενέμη (ιμιπενέμη και μεροπενέμη >1mg/L,ερταπενέμη >0,5mg/L), με θετικό αρχικό φαινοτυπικό έλεγχο για παραγωγή καρβαπενεμάσης με το τροποποιημένο Hodge τεστ (MHT) με βάση τις επικαιροποιημένες οδηγίες του CLSI, 2013 και υποψία παραγωγής καρβαπενεμάσης τάξης B μετά τα αρχικά φαινοτυπικά τεστ ή και αρνητικά αρχικά φαινοτυπικά τεστ για την παραγωγή καρβαπενεμασών τάξης A ή B.

Διερευνήθηκαν 148 στελέχη που περιγράφονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9. Στελέχη εντεροβακτηριακών με μειωμένη ευαισθησία ή αντοχή σε τουλάχιστον μια καρβαπενέμη.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ
<i>K.pneumoniae</i>	143
<i>E.cloacae</i>	4
<i>P.mirabilis</i>	1
ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ	148

Στην μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν σαν στελέχη ελέγχου τα πρότυπα στελέχη *E.coli* ATCC 25922, *K.pneumoniae* ATCC BAA 2146 (NDM+), *K.pneumoniae* NZTCC 13442 (OXA-48+) καθώς και εσωτερικά στελέχη ελέγχου.

Τα στελέχη αρχειοθετήθηκαν, συμπεριλήφθησαν στην συλλογή αρχειακών στελεχών του εργαστηρίου μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών και αποθηκεύτηκαν στους -70°C σε ζυμό BH με προσθήκη 15% γλυκερόλης.

2.1.1. Αρχική απομόνωση, ταυτοποίηση και έλεγχος ευαισθησίας.

Η αρχική απομόνωση των στελεχών έγινε σε MC άγαρ στους 37°C για 18-24 ώρες στα παραπέμποντα εργαστήρια. Η αρχική ταυτοποίηση των μικροβίων και ο έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά πραγματοποιήθηκαν με το Vitek 2 (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) χρησιμοποιώντας την κάρτα GN. Τα panel εμβολιάστηκαν με μικροβιακό εναιώρημα σε ειδικό ζωμό, επώασθηκαν στους 37°C για 18h και η ανάγνωση πραγματοποιήθηκε την επόμενη μέρα. Η ταυτοποίηση έγινε σύμφωνα με τα αποτελέσματα ελέγχου 23-24 βιοχημικών ιδιοτήτων.

Για την περαιτέρω ταυτοποίηση συγκεκριμένων στελεχών χρησιμοποιήθηκε και το σύστημα API20E που προσδιορίζει το είδος κάθε μικροβίου με βάση τις βιοχημικές του ιδιότητες σύμφωνα με τον αλγόριθμο που προτείνεται από την κατασκευάστρια εταιρεία (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France).

Οι MIC για τις καρβαπενέμες, την τιγκεκυκλίνη και την κολιστίνη, κατά περίπτωση, προσδιορίστηκαν με την χρήση ταινιών Etest (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) σε τρυβλία MH έπειτα από ανακαλλιέργεια των αρχειακών στελεχών. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων έγινε με βάση τις οδηγίες του CLSI 2012 για τα Εντεροβακτηριακά, για την κολιστίνη χρησιμοποιήθηκαν οι συστάσεις του CLSI για τα *Acinetobacter spp.* (ευαίσθητο $\leq 2\text{mg/l}$, ανθεκτικό $\geq 4\text{mg/l}$) και για την τιγκεκυκλίνη οι συστάσεις της Αμερικανικής Υπηρεσίας τροφίμων και φαρμάκων (FDA), (ευαίσθητο $\leq 2\text{mg/l}$, ανθεκτικό $\geq 8\text{mg/l}$).

2.2. Φαινοτυπικός έλεγχος και τυποποίηση.

2.2.1. Έλεγχος για παρουσία καρβαπενεμασών.

Η παρουσία καρβαπενεμάσης ελέγχθηκε με το MHT χρησιμοποιώντας το στέλεχος *E.coli* ATCC 25922 ως δείκτη και δισκία μεροπενέμης 10mg ή ερταπενέμης 10mg (http://www.cdc.gov/hai/pdfs/labsettings/hodgetest_carbapenemase_enterobacteriaceae.pdf) (Lee et al., 2003). Έγινε παρασκευή εναιωρήματος 0,5 McFarland από το

στελέχος δείκτη και στην συνέχεια 0,5ml του εναιωρήματος προστέθηκαν σε 4,5ml φυσιολογικού ορού ώστε να επιτευχθεί μια αραιώση 1:10. Ακολούθησε ποσοτικό στρώσιμο σε ένα τρυβλίο MH. Το τρυβλίο αφέθηκε να στεγνώσει για 3-10 λεπτά και στην συνέχεια τοποθετήθηκε το δισκίο της καρβαπενέμης. Σε μια ευθεία γραμμή ενοφθαλμίστηκαν τα στελέχη προς εξέταση από την άκρη του τρυβλίου μέχρι την άκρη του δισκίου. Σε κάθε τρυβλίου δύναται να ελεγχθούν έως 4 στελέχη. Χρησιμοποιήθηκαν παράλληλα και ένας θετικός και αρνητικός μάρτυρας. Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 16-18 ώρες. Τα τρυβλία ελέγχθηκαν για ενισχυμένη ανάπτυξη γύρω από την γραμμή του εξεταζόμενου οργανισμού στο σημείο τομής της γραμμής και της ζώνης αναστολής. Θετικά θεωρούνται τα τεστ με ενισχυμένη ανάπτυξη.

2.2.2. Τυποποίηση καρβαπενεμασών τάξης A και B.

Ο ταυτοποίηση των ενζύμων έγινε με την δοκιμή συνδιασμένων δισκίων με την χρήση μεροπενέμης ως υπόστρωμα υδρόλυσης. Ως αναστολείς χρησιμοποιήθηκαν EDTA, PBA και συνδυασμός τους (Tsakris et al., 2010).

Σε δισκία μεροπενέμης 10mg προστέθηκαν EDTA σε συγκέντρωση 292μg/δισκίο και PBA σε συγκέντρωση 400μg ανά δισκίο. Για το EDTA χρησιμοποιήθηκε 10μl/δισκίο έτοιμου διαλύματος EDTA 0,1M. Για την παρασκευή του PBA, 120mg PBA διαλύθηκαν σε 3 ml DMSO και 3ml WFI, 20μl του διαλύματος στοκ μοιράστηκαν σε έκαστο δισκίο αντιβιοτικού, αφέθηκαν να στεγνώσουν για 30 λεπτά και χρησιμοποιήθηκαν αμέσως. Το τεστ πραγματοποιήθηκε σε τρυβλία MH όπου ενοφθαλμίστηκε βακτηριακό εναιώρημα 0,5 McFarland και στην συνέχεια έγινε τοποθέτηση των δισκίων σε απόσταση 30mm. Μετά από επώαση 18-24 ωρών έγινε σύγκριση των ζωνών αναστολής γύρω από το δισκίο της μεροπενέμης, και των δισκίων με τους αναστολείς και τους συνδιασμούς τους.

Στην περίπτωση παρουσίας καρβαπενεμάσης τάξης A, η ζώνη αναστολής γύρω από το δισκίο της μεροπενέμης με το PBA μεγαλώνει λόγω της ανασταλτικής δράσης του PBA. Μια διαφορά $\geq 5\text{mm}$ στις διαμέτρους ζωνών αναστολής γύρω από τα δισκία μεροπενέμης με PBA και μεροπενέμης με PBA και EDTA σε σχέση με το απλό δισκίο μεροπενέμης είναι ενδεικτική θετικού αποτελέσματος.

Στην περίπτωση παρουσίας της μέταλλο-β-λακταμάσης η ζώνη αναστολής γύρω από το δισκίο της μεροπενέμης με το EDTA μεγαλώνει λόγω της ανασταλτικής δράσης του EDTA στην μέταλλο-β-λακταμάση. Μια διαφορά $\geq 5\text{mm}$ στις διαμέτρους ζωνών αναστολής γύρω από τα δισκία μεροπενέμης και μεροπενέμης με EDTA και μεροπενέμης με PBA και EDTA είναι ενδεικτική θετικού αποτελέσματος.

Θεωρήθηκε ότι ένα στέλεχος παράγει και τις δύο τάξεις ενζύμων όταν η ζώνη αναστολής γύρω από το δισκίο μεροπενέμης με PBA και EDTA μεγαλώνει $\geq 5\text{mm}$ σε σχέση με τον απλό δίσκο μεροπενέμης, ενώ οι ζώνες αναστολής γύρω από τα δισκία μεροπενέμης με PBA και μεροπενέμης με EDTA μεγαλώνουν $< 5\text{mm}$ σε σχέση με το απλό δισκίο μεροπενέμης.

Στην περίπτωση που δεν παρατηρήθηκε αύξηση της ζώνης αναστολής γύρω από κανένα αναστολέα το στέλεχος θεωρήθηκε αρνητικό για παραγωγή καρβαπενεμενασών τάξης A και B.

2.2.3. Έλεγχος για ESBL.

Ο φαινοτυπικός έλεγχος για παραγωγή ESBL πραγματοποιήθηκε με την χρήση ενός τροποποιημένου CLSI-ESBL τεστ, όπως περιγράφεται στις προηγούμενες ενότητες, με την εκ των προτέρων προσθήκη PBA και EDTA (262 μg) στα δισκία FOX (30 μg) και CAZ (30 μg) και των συνδιασμών τους με κλαβουλανικό οξύ (CL) (10 μg) (Poulou et al., 2014; Tsakris et al., 2009). Διαφορά $\geq 5\text{mm}$ μεταξύ των διαμέτρων στις ζώνες αναστολής γύρω από τα δισκία κεφαλοσπορίνης/αναστολέα και

κεφαλοσπορίνης/αναστολέα με κλαβουλανικό οξύ θεωρήθηκε ενδεικτική ESBL φαινοτύπου.

2.3. Μοριακή διερεύνηση

2.3.1. Εκχύλιση βακτηριακού DNA

Η εκχύλιση του βακτηριακού DNA έγινε με θέρμανση βακτηριακού εναιωρήματος στους 100°C. Αναλυτικά ή διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι ή ακόλουθη:

Ανακαλλιέργεια των στελεχών σε MC άγαρ και επώαση στους 37°C για 16-18 ώρες.

Δημιουργία βακτηριακού εναιωρήματος από τμήμα μίας απομονωμένης αποικίας σε αποστειρωμένο σωληνάριο erpendorf με στείρο διάλυμα WFI. Ομογενοποίηση του διαλύματος με έντονο vortex για 15 sec. Εκχύλιση του DNA με θέρμανση 500μl βακτηριακού εναιωρήματος στους 100°C για 5 λεπτά. Καθίζηση του διαλύματος με μία σύντομη φυγοκέντρηση (short spin). Φύλαξη σε σωληνάρια τύπου erpendorf στους -70°C μέχρι την χρήση.

2.3.2. Ενίσχυση των γονιδίων β-λακταμασών με PCR.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση γονιδίων πλασμιδιακών AmpC β-λακταμασών, ευρέως φάσματος β-λακταμάσες ESBL *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, καρβαπενεμασών τάξεων B και D κατά Ambler περιγράφονται στους Πίνακες 3,4,5 και 6. Για την ανίχνευση των γονιδίων των τάξης A καρβαπενεμασών οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των τάξης A κατά Ambler καρβαπενεμασών.

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5' – 3')	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Αναφορά
<i>bla</i> _{KPC}	KPC-F	TCG CTA AAC TCG AAC AGG	780 bp	(Lomaestro et al., 2006)
	KPC-R	TTA CTG CCC GTT GAC GCC CAA TCC		

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με τον ίδιο τρόπο και στις ίδιες συνθήκες που αναφέρθηκαν στις προηγούμενες ενότητες.

2.3.3. Διερεύνηση γονιδιακού περιβάλλοντος.

Με την χρήση συνδιασμών εκκινητών καθορίστηκε το περιεχόμενο και η σειρά των αλληλουχιών εισδοχής (insertion sequences IS) και των γονιδίων αντοχής των υπό μελέτη στελεχών. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με τον ίδιο τρόπο που αναφέρθηκε στις προηγούμενες ενότητες χρησιμοποιώντας διαδοχικά σετ εκκινητών. Η χαρτογράφηση της σχετικής θέσης ως προς τα γονίδια των β-λακταμασών έγινε χρησιμοποιώντας ζευγάρια εκκινητών με έναν από τους εκκινητές για το στοιχείο εισδοχής και έναν από τους εκκινητές για το γονίδιο που κωδικοποιεί την β-λακταμάση (Πίνακας 11).

Πίνακας 11. Εκκινητές και συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την διερεύνηση και χαρτογράφηση του υφιστάμενου γονιδιακού περιβάλλοντος

Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5' – 3')	Συνθήκες PCR	Αναφορά
IS1999A	CAGCAATTCTTTCTCCGTG	95° C 5min 95° C 45sec 50° C 45sec (x35) 72° C 1min 72° C 10min	(Poirel et al., 2004)
IS1999B	CAAGCACAACATCAAGCGC		
OXA-48 A	TTG GTG GCA TCG ATT ATC GG		
OXA-48 B	GAG CAC TTC TTT TGT GAT GGC		
IsAba125A	TGT ATA TTT CTG TGA CCC AC	95° C 5min 95° C 45sec 50° C 45sec (x35) 72° C 1min 72° C 10min	(Poirel et al., 2011a)
IsAba125ext	ACA CCA TTA GAG AAA TTT GC		
bleo-Rev	GGC GAT GAC AGC ATC ATC CG		
NDM-W F	GGG CAG TCG CTT CCA ACG GT		(Voulgari et al., 2014)
NDM-W R	GTA GTG CTC AGT GTC GGC AT		

Σε κάθε PCR χρησιμοποιήθηκε ένας αρνητικός μάρτυρας και αντίστοιχος θετικός μάρτυρας (ATCC BAA 2146, NDM(+), NZTCC 13442 OXA-48(+)). Σε επιλεγμένα προϊόντα που έγινε προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων της PCR και σύγκριση με την χρήση διαδικτυακής πλατφόρμας (Nucleotide Blast, Blastn, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), με τις υπάρχουσες καταχωρημένες αλληλουχίες στην Τράπεζα Γονιδιακών Πληροφοριών (Genbank).

2.3.4. Διερεύνηση των *OmpK35* και *OmpK36* πορίων των *K.pneumoniae*.

Τα στελέχη *K.pneumoniae* φέρουν παραδοσιακά στην εξωτερική τους μεμβράνη τις πορίνες *OmpK35* και *OmpK36* που σχετίζονται με την διαβατότητα της μεμβράνης και κατ'επέκταση την ικανότητα των β-λακταμικών αντιβιοτικών να φτάνουν επιτυχώς στις θέσεις δράσης τους. Με την χρήση κατάλληλων εκκινητών διερευνήθηκε σε πρώτη φάση η ύπαρξη των γονιδίων που κωδικοποιούν αυτές τις πορίνες στα στελέχη υπό μελέτη και σε δεύτερη φάση η ύπαρξη γνωστών μεταλλάξεων που να σχετίζονται με επηρεασμένη διαπερατότητα. Οι εκκινητές και συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στον Πίνακα 12.

Πίνακας 12. Εκκινητές και συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την διερεύνηση των *OmpK35* και *Omp36* γονιδίων.

Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5' – 3')	Συνθήκες PCR	Αναφορά
OMP K 36 F	ACA GAG GGT TAA TAA CAT GAA	95° C 5min 95° C 45sec 50° C 45sec (x35) 72° C 1min 72° C 10min	(Lee et al., 2007)
OMP K 36 R	TAG AAC TGG AAA CCA GGC		
OMP K 35 F	TGA TCC CTG CCC TGC TGG T		
OMP K 35 R	CCG GAG TCA TGT TGT AAG TCT		

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με τον ίδιο τρόπο που αναφέρθηκε στις προηγούμενες ενότητες. Χρησιμοποιήθηκε αρνητικός μάρτυρας και θετικός μάρτυρας. Ακολούθησε αλληλούχιση των προϊόντων.

2.3.5. Έλεγχος κλωνικότητας με ERIC-PCR.

Έγινε μοριακή διερεύνηση της κλωνικότητας των στελεχών υπό μελέτη με την μεθοδολογία που αναπτύχθηκε στις προηγούμενες ενότητες.

2.3.6. Πρωτόκολλο PFGE για στελέχη *K.pneumoniae*.

Η PFGE αποτελεί βασικό εργαλείο της μοριακής επιδημιολογίας. Βασίζεται στην ηλεκτροφόρηση του βακτηριακού γονιδιώματος έπειτα από πέψη με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα, με εναλλαγή της κατεύθυνσης του ηλεκτροφορητικού πεδίου κατά 60 μοίρες ώστε να επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός τμημάτων DNA με μέγεθος μεγαλύτερο από 15kb (Schwartz and Cantor, 1984).

Αναλυτικά ή διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η ακόλουθη:

Ανακαλλιέργεια των στελεχών σε Nutrient agar (NH) και επώαση στους 37°C για 16-18 ώρες. Παρασκευή βακτηριακού εναιωρήματος σε διάλυμα SE (0.75 M NaCl, 0.25 M EDTA, pH8.0) με θολερότητα 2 της κλίμακας McFarland. Μεταφορά 500μl του εναιωρήματος σε αποστειρωμένα erpendorf. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό και 30 δευτερόλεπτα σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στα 10000 rpm. Απόρριψη του υπερκείμενου και έκπλυση του ιζήματος με 1ml SE. Επανάληψη της διαδικασίας δύο φορές. Απόρριψη του υπερκείμενου και ανασύσταση του ιζήματος σε 300μl EC (6mM Tris pH 8.0, 1M NaCl, 100mM EDTA pH 8.0, 0,2% Na deoxycholate, 0,5% Na laurylsarcosine). Παρασκευή με βρασμό αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξεως (low melting temperature agarose LMT) 2% σε διάλυμα λύσης EC. Διατήρηση στους 56°C σε υδατόλουτρο. Ανάμιξη 300μl αγαρόζης/EC και 20μl λυσοζύμης (25mg/ml) με βακτηριακό εναιώρημα. Ανάδευση για 5 δευτερόλεπτα στο vortex και γέμισμα δύο

θέσεων βυσμάτων ανά στέλεχος. Διατήρηση βυσμάτων στους 4°C για 10 λεπτά. Τοποθέτηση σε 500μl EC. Επώαση στους 37°C για 90 λεπτά ώστε να γίνει λύση του κυτταρικού τοιχώματος. Επώαση για 10 λεπτά στους 4°C. Αφαίρεση με προσοχή του EC και πλυσίματα με 850μl 0,5M EDTA pH 9.0 για 5 λεπτά. Αφαίρεση με προσοχή του υγρού και προσθήκη 500μl ESP που περιέχει πρωτεϊνάση K (8ml EDTA pH 8.0, 2 ml sarcosyl 5%, 100μl ProtK 1mg/ml). Ολονύκτια επώαση στους 55°C. Τοποθέτηση εκ νέου των βυσμάτων στους 4°C για 10 λεπτά. Διαδοχικά πλυσίματα με 850μl αποστειρωμένο διάλυμα TE (Tris EDTA) (10mM Tris-HCL, 10mM EDTA Na₂, pH 8.0-8.5). Πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση XbaI για 20 ώρες στους 37°C 12,5μl 10X διάλυμα πέψης, 0,25μl XbaI 5U/μl, 112,25μl δις απεσταγμένο νερό). Τοποθέτηση εκ νέου των βυσμάτων στους 4°C για 10 λεπτά. Αφαίρεση του διαλύματος του ενζύμου και προσθήκη 500μl 0,5X TBE (44,5 mM βορικό οξύ, 1mM EDTA Na₂, pH 8,0-8,5). Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 1% σε διάλυμα 0,5X TBE. Τοποθέτηση στα βοθρία του πηκτώματος των βυσμάτων τα οποία σφραγίστηκαν με 1% LMT αγαρόζη καθώς και των δεικτών μοριακού βάρους (Pulse MakeTM 50-1000kb Sigma-Aldrich). Τοποθέτηση του πηκτώματος αγαρόζης στην συσκευή ηλεκτροφόρησης CHEF-DRIII (Biorad). Προστέθηκαν 2 λίτρων 0,5X TBE που είχε προηγουμένως ψυχθεί στους 14°C. Ηλεκτροφόρηση στις ακόλουθες συνθήκες: αρχικός χρόνος εναλλαγής 5 δευτερόλεπτα και τελικός χρόνος εναλλαγής 37 δευτερόλεπτα, για 23 ώρες. Χρωματισμός του πηκτώματος μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης για 45 λεπτά με βρωμιούχο αιθίδιο (0,5μg/ml), υπό ανάδευση και σε συνθήκες σκότους. Αποχρωματισμός με απεσταγμένο νερό και φωτογράφιση σε υπεριώδες φως. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων έγινε με βάση τα κριτήρια του Tenover et al (Tenover et al., 1995). Η ψηφιακή ανάλυση και εξαγωγή της φυλογενετικής σχέσης των στελεχών έγινε με το λογισμικό Quality One (Biorad).

2.3.7. Πειράματα βακτηριακής σύζευξης.

Ελέγχθηκε η δυνατότητα μεταφοράς των γονιδίων μέσω πλασμιδίων από τα υπό μελέτη στελέχη-δότες σε γνωστά στελέχη-δέκτες. Κατά την βακτηριακή σύζευξη γίνεται μεταφορά γενετικού υλικού μεταξύ δότη και δέκτη μέσω μίας πρωτεϊνικής γέφυρας που αποτελείται από συζευκτικά ινίδια. Μεταφορά των γονιδίων αντοχής από τον δότη στον δέκτη είναι ενδεικτική πλασμιδιακής εντόπισης.

Για τα στελέχη *K.pneumoniae* χρησιμοποιήθηκε ως δέκτης το στέλεχος *E.coli* 39R793, lactose (-), rifampicin (R).

Αναλυτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η ακόλουθη:

Έγιναν ανακαλλιέργειες των δοτών και του δέκτη σε τρυβλία MH άγαρ χωρίς προσθήκη αντιβιοτικού για τους δέκτες και με προσθήκη αμοξυκιλλίνης (100mg/L) για τους δότες. Ακολούθησε επώαση για 18 ώρες στους 37°C. Έγινε λήψη μίας αποικίας από το στέλεχος δότη και εμβολισμός σε 10ml θρεπτικό ζωμό Luria Bertani (LB) με αμοξυκιλλίνη (100mg/L), και μίας αποικίας του δέκτη και εμβολισμός σε 10ml ζωμό LB με ριφαμπικίνη (100mg/L). Ακολούθησε επώαση στους 37°C υπό ανάδευση για 18ώρες. Μετά από φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στα 10000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου, απορρίφθηκε ο υπερκείμενος ζωμός και αφέθηκε το ίζημα να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου για 30-60 λεπτά. Έγινε ανασύσταση του ιζήματος με 1ml ζωμό LB χωρίς αντιβιοτικό. Αναμίχθηκαν σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου erpendorf 150μl εναιωρήματος δότη με 750μl εναιωρήματος δέκτη. Το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά στα 10000rpm. Έγινε απόρριψη του υπερκείμενου και το ίζημα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Ακολούθησε μεταφορά του ιζήματος σε ένα τρυβλίο με LB άγαρ και επώαση στους 37°C για 18 ώρες. Στην περίπτωση των NDM-1 στελεχών τα πειράματα σύζευξης πραγματοποιήθηκαν στους 37° και στους 30°C. Έγινε παρασκευή διπλών εκλεκτικών υλικών για την απομόνωση των διασυζευκτικών

στελεχών (transconjugants) με την προσθήκη εκλεκτικού αντιβιοτικού (αμοξυκιλλίνης 100mg/L ή ερταπενέμης 0,5mg/L ή 0,25 mg/L κατά περίπτωση) και ριφαμπικίνης (100mg/L) σε MC άγαρ και αντίστοιχων τρυβλίων ελέγχου MC με αμοξυκιλλίνη (100mg/L) για τον έλεγχο της ανάπτυξης του δότη και MC με ριφαμπικίνη (100mg/L) για τον έλεγχο ανάπτυξης του δέκτη. Με την προσθήκη 1ml LB ζωμού άνευ αντιβιοτικού έγινε η ανασύσταση του βακτηριακού ιζήματος και μεταφορά του σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου erpendorf. Σε 900μl LB ζωμού άνευ αντιβιοτικού μεταφέρθηκαν 100μl εναιωρήματος. Ακολούθησε η παρασκευή επιπλέον αραιώσεων από 10^{-2} έως 10^{-8} . Έγινε ενοφθαλμισμός 100μL από τις αραιώσεις 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} στα διπλά εκλεκτικά υλικά και ποσοτικό στρώσιμο. Επίσης έγινε ενοφθαλμισμός 100μL από τις αραιώσεις 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} στα τρυβλία ελέγχου και ποσοτικό στρώσιμο. Τα τρυβλία επώαστηκαν για 18 ώρες στους 37°C.

Στα τρυβλία με τα αντιβιοτικά επιλογής μετρήθηκαν οι αποικίες των διασυζευκτών, ενώ στα τρυβλία χωρίς αντιβιοτικά έγινε καταμέτρηση των αποικιών του δότη και του δέκτη με βάση την ιδιότητα διάσπασης της λακτόζης.

Η συχνότητα μεταβίβασης υπολογίζεται από τον λόγο του αριθμού των αποικιών των διασυζευκτών προς τον αριθμό των αποικιών του δότη.

Ακολούθησε μοριακός έλεγχος με PCR για την ανίχνευση των γονιδίων αντοχής και αντιβιογράμματα των διασυζευκτών για φαινοτυπική επιβεβαίωση της μεταφοράς των γονιδίων αντοχής.

2.3.8. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση.

Η αλκαλική λύση επιτυγχάνει το διαχωρισμό του πλασμιδιακού από το χρωμοσωμικό DNA. Στηρίζεται στην αύξηση του pH>12 η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αποδιάταξη του χρωμοσωμιακού DNA ενώ το πλασμιδιακό DNA αποδιατάσσεται μερικώς.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η ακόλουθη (Schwarz and Liebisch, 1994):

Μια αποικία ενοφθαλμίστηκε σε 3ml LB ζωμό με αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100mg/l και επώαστηκε στους 37°C, υπό ανάδευση στα 210 rpm. Ελαιώρημα 1,5ml μεταφέρθηκε σε ένα αποστειρωμένο φιαλίδιο τύπου erpendorf και φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στα 7000rpm στους 4°C. Έγινε απόρριψη του υπερκείμενου διαλύματος και προσθήκη 100μl P1 (25mM Tris HCL, 10mM EDTA, 50mM Glucose, pH8,0 με 100μl/ml Pure link RNaseA) με ανασύσταση του διαλύματος και καλή ανάδευση. Προστέθηκαν 200μl διαλύματος P2 (1% SDS, 0,2 N NaOH) και έγινε προσεκτική ανάδευση του ελαιωρήματος με ήπιες κινήσεις αναποδογυρίζοντας το erpendorf μέχρι το διάλυμα να γίνει βλενώδες. Ακολούθησε επώαση για 5 λεπτά σε πάγο. Προστέθηκαν 150μl από το διάλυμα Minilysat III (3M NaAc, 5M Acetate), με σύντομη ανάδευση σε Vortex μέχρι το χρώμα να γίνει γαλακτώδες και εντός τους διαλύματος να παρατηρηθεί κροκύδωση. Επώαση εκ νέου σε πάγο για 10 min και φυγοκέντρωση για 30 λεπτά στα 13000rpm στους 4°C. Μεταφέρθηκε το υπερκείμενο (400μl) σε ένα νέο erpendorf με 1ml παγωμένης αιθανόλης 100% χωρίς την χρήση πιπέτας και έγινε ανάδευση του διαλύματος αναποδογυρίζοντας το erpendorf 14 φορές. Ακολούθησε επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και φυγοκέντρωση εκ νέου για 30 λεπτά στα 13.000rpm στους 4°C. Έγινε απόρριψη του υπερκείμενου και προσθήκη 500μl αιθανόλης 80% χωρίς ανάδευση, με φυγοκέντρωση στην συνέχεια για 10 λεπτά στα 13.000rpm. Έγινε απόρριψη του υπερκείμενου με αρχική αφαίρεση 1ml με πιπέτα τύπου pasteur αρχικά και μετά επιπλέον 100μl. Το ίζημα αφέθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για τουλάχιστον 1 ώρα και αναδιαλύθηκε με 30μl δισ-απεσταγμένου ύδατος με ήπιο vortex. Μεταφέρθηκαν 10μl μετά από την προσθήκη 2μl loading buffer σε πήκτωμα αγαρόζης 1% σε TBE 0,5X με προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου. Ακολούθησε

ηλεκτροφόρηση για 1 ώρα και 30 λεπτά στα 40V και στην συνέχεια στα 80V για τρεις ώρες.

Για την συγκριτική εκτίμηση του μεγέθους των πλασμιδίων χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης μοριακού βάρους το πρότυπο στέλεχος 39R861 που φέρει πλασμίδια γνωστού μοριακού βάρους (98kb, 42kb, 23,9kb, 4,6kb)

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA έγινε με την χρήση του NucleoSpin® and PCR clean-up (Mackerey-Nagel). Η εκχύλιση έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κιτ.

2.3.9. Τυποποίηση πλασμιδίων με βάση την PCR

Η τυποποίηση των πλασμιδίων βασίζεται στις ομάδες ασυμβατότητας (Incompatibility groups) (Novick, 1987). Η κατάταξη των πλασμιδίων στηρίζεται στην παραδοχή ότι πλασμίδια που χρησιμοποιούν το ίδιο σύστημα πολλαπλασιασμού (replication control) είναι ασύμβατα και δεν μπορούν να υπάρχουν ταυτόχρονα στον ίδιο κύτταρο δέκτη (Couturier et al., 1988; Datta and Hughes, 1983). Ο έλεγχος των ομάδων ασυμβατότητας πραγματοποιήθηκε σε πλασμιδιακό DNA με την χρήση των εκκινητών του Πίνακα 13 που αναγνωρίζουν τις μείζονες ομάδες ασυμβατότητας FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1-Ig, L/M, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, F, και FIIA για τα Εντεροβακτηριακά στελέχη (Carattoli et al., 2005).

Πίνακας 13. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την τυποποίηση των πλασμιδίων
(Carattoli et al., 2005).

Name	DNA sequence	Target site	EMBL accession no.	Amplicon size (bp)
H11 FW	5'-ggagcggatggattactcagta-3'	parA-parB	AF250878	471
H11 RV	5'-tgccgtttcacctcgtgagta-3'			
H12 FW	5'-ttctcctgagtcacctgtaaacac-3'	iterons	BX664015	644
H12 RV	5'-ggctcactaccgttgatcct-3'			
II FW	5'-cgaaagccggacggcagaa-3'	RNAI	M20413	139
II RV	5'-tcgtcgtccccaagtcgt-3'			
X FW	5'-aaccttagaggctatattaagttgctgat-3'	ori γ	Y00768	376
X RV	5'-tgagagtcaattttatctcatgttttagc-3'			
L/M FW	5'-ggatgaaaaactacagcatctgaag-3'	repA,B,C	U27345	785
L/M RV	5'-ctgcagggggcattcttagg-3'			
N FW	5'-gtctaacgagctaccgaag-3'	repA	NC_003292	559
N RV	5'-gttcaactctccaagtc-3'			
FIA FW	5'-ccatgctggttctagagaagtg-3'	iterons	J01724	462
FIA RV	5'-gtatatccttactggcttccgcag-3'			
FIB FW	5'-ggagttctgacacagatttctg-3'	repA	M26308	702
FIB RV	5'-ctcccgtcgttcagggcatt-3'			
W FW	5'-cctaagaacaacaagccccg-3'	repA	U12441	242
W RV	5'-ggtgcgcgcatagaaccgt-3'			
Y FW	5'-aattcaacaacactgtgcagcctg-3'	repA	K02380	765
Y RV	5'-gcgagaatggacgattacaaaactt-3'			
P FW	5'-ctatggccctgcaaacgcgccagaaa-3'	iterons	M20134	534
P RV	5'-tcacgcccaggggcagcc-3'			
FIC FW	5'-gtgaactggcagatgaggagg-3'	repA2	AH003523	262
FIC RV	5'-ttctctcgtcgcctaaactagat-3'			
A/C FW	5'-gagaaccaagacaagacctgga-3'	repA	X73674	465
A/C RV	5'-acgacaaacctgaattgctcctt-3'			
T FW	5'-ttggcctgttgtgcctaaacct-3'	repA	K00053	750
T RV	5'-cgttgattacactagcttggac-3'			
FII _S FW	5'-ctgtcgttaagctgatggc-3'	repA	AE006471	270
FII _S RV	5'-ctctgccacaaactcagc-3'			
F _{repB} FW	5'-tgatcgtttaaggaatttg-3'	RNAI/repA	AY234375	270
F _{repB} RV	5'-gaagatcagtcacaccatcc-3'			
K/B FW	5'-gcggtccggaagccagaaaaac-3'	RNAI	M93063	160
K RV	5'-tcttcacgagcccgcacaa-3'			
B/O RV	5'-tctcgttccccaagtcga-3'	RNAI	M28718	159

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με DNA πολυμεράση υψηλής πιστότητας (Kapa Taq DNA polymerase, Kapa Biosystems, Boston, USA) ανά γονίδιο. Η αντίδραση έλαβε χώρα σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X που περιείχε 1,5mM MgCl₂, 200μM από κάθε τριφωσφορικό δεοξυριβονουκλεοτίδιο dNTP, 0,2μM από κάθε εκκινητή, 1U DNA πολυμεράσης και 100-200ng γενωμικού DNA σε τελικό όγκο 50 μl, στις ακόλουθες συνθήκες αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 5 λεπτά, αποδιάταξη στους 95°C για 1 λεπτό, υβριδισμός στους 55°C για 45 δευτερόλεπτα, επιμήκυνση στους 72°C για 1 λεπτό, για 30 κύκλους και τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Αποτελέσματα μελέτης πλασμιδιακών AmpC.

1.1. Αποτελέσματα μοριακού ελέγχου.

Συνολικά έγινε έλεγχος 105 Εντεροβακτηριακών στελεχών (53 *E.coli*, 36 *K.pneumoniae*, 10 *K.oxytoca* και 6 *P.mirabilis*) με ύποπτα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά και 59 στελέχη βρέθηκαν να εκφράζουν πλασμιδιακές AmpC β-λακταμάσες, συγκεκριμένα 23 (39%) *K.pneumoniae*, 23 (39%) *E.coli*, 7 (11,9%) *K.oxytoca* και 6 (10,2%) *P.mirabilis*. Επιπλέον 25 στελέχη (42,3%) πέρα από τους πλασμιδιακούς AmpC γόνους έφεραν και ESBL β-λακταμάσες, συγκεκριμένα 4 έφεραν την CTX-M 15 β-λακταμάση ενώ τα υπόλοιπα SHV και TEM τύπου γονίδια (Πίνακας 14). Σημειώνεται ότι καμία από τις *K.oxytoca* και τους *P.mirabilis* δεν κωδικοποιούσε ESBL β-λακταμάσες. Θετικά για την VIM μέταλλο-β-λακταμάση ήταν 7 στελέχη ενώ ένα έφερε την OXA-162 καρβαπενεμάση. Επιπλέον 27 από τα 59 στελέχη έφεραν την TEM-1 και ένα στέλεχος την OXA-1 β-λακταμάση.

Πίνακας 14. Συχνότητα ESBL αρνητικών και θετικών στελεχών ανάμεσα στα στελέχη με πλασμιδιακές AmpC β-λακταμάσες.

	ESBL(-) N (%)	ESBL(+) N (%)
<i>E.coli</i>	9 (39.1)	14 (60.9)
<i>K.oxytoca</i>	7 (100.0)	0 (0.0)
<i>K.pneumoniae</i>	2 (8.7)	21 (91.3)
<i>P.mirabilis</i>	6 (100.0)	0 (0.0)

Η νουκλεοτιδική αλληλούχιση των πλασμιδιακών AmpC β-λακταμασών αναγνώρισε από το *Aeromonas* γκρουπ τη MOX-2 λακταμάση, από το *C.freundii* γκρουπ τα CMY-2, CMY-4, CMY-13, CMY-16, CMY-31 και CMY-4-like, από το *Enterobacter* ένα MIR-4-like και από το *M.morganii* ένα DHA-1. Οι συχνότητες απομόνωσης συνολικά και ανά είδος συνοψίζονται στους Πίνακες 15 και 16.

Πίνακας 15. Πλασμιδιακές AmpC β-λακταμάσες που ανιχνεύθηκαν και συνολική συχνότητα απομόνωσης.

Πλασμιδιακές AmpC	N	(%)
MOX-2	28	47,5
CMY-2	10	16,9
CMY-31	10	16,9
CMY-4 like	3	5,1
CMY-4	3	5,1
CMY-16	2	3,4
CMY-13	1	1,7
DHA-1	1	1,7
MIR-2-like	1	1,7

Πίνακας 16. Πλασμιδιακές AmpC και λοιπές β-λακταμάσες ανά είδος.

	ρAmpC	Επιπλέον β-λακταμάσες	N
<i>K.pneumoniae</i> (n=23)	MOX-2 <i>(n=19)</i> <i>(82,6%)</i>	SHV-ESBL, TEM-1	11
		SHV-ESBL	7
		TEM-1	1
	CMY-4 <i>(n=3)</i> <i>(13%)</i>	CTX-M-15,VIM	2
		SHV-ESBL, CTX-M-15	1
DHA-1 <i>(n=1)</i> <i>(4,4%)</i>	OXA-1,OXA-162	1	
<i>E.coli</i> (n=23)	MOX-2 <i>(n=9)</i> <i>(39,1%)</i>	SHV-ESBL, TEM-1	7
		TEM-1	1
		TEM-ESBL	1
	CMY-2 <i>(n=9)</i> <i>(39,1%)</i>	SHV-ESBL, TEM-1	1
		TEM-ESBL	2
		(-)	4
		SHV-ESBL	2
	CMY-31 <i>(n=3)</i> <i>(13%)</i>	(-)	2
		CTX-M-15	1
	CMY-13 <i>(n=1)</i> <i>(4,4%)</i>	SHV-ESBL,VIM	1
MIR-4-like <i>(n=1)</i> <i>(4,4%)</i>	TEM-1,VIM	1	
<i>K.oxytoca</i> (n=7)	CMY-31 <i>(n=7)</i> <i>(100%)</i>	(-)	5
		VIM-1	2
<i>P.mirabilis</i> (n=6)	CMY-4 like <i>(n=3)</i> <i>(50%)</i>	TEM-1	3
	CMY-16 <i>(n=2)</i> <i>(33,4%)</i>	TEM-1	1
		TEM-1, VIM-1	1
CMY-2 <i>(n=1)</i> <i>(16,6%)</i>	TEM-1	1	

Σημειώνονται τρία πρωτοεμφανιζόμενα στον Ελλαδικό χώρο ένζυμα, η DHA-1 και δύο νεότερες AmpC β-λακταμάσες μία CMY-4-like και μία MIR-4-like. Σε σχέση με την διαφοροποίηση των ενζύμων αυτών από τα πρόδρομα ένζυμα φάνηκε ότι η CMY-4-like διαφέρει κατά ένα αμινοξύ από την CMY-4 (Asp218Tyr) ενώ η MIR-4-like λακταμάση κατά ένα αμινοξύ από την MIR-4 και κατά δύο αμινοξέα από την MIR-2.

1.2. Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας.

Συνολικά ελέγχθηκαν συμπληρωματικά 59 στελέχη με την μέθοδο διάχυσης δισκίων για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας τους σε συγκεκριμένες τάξεις αντιβιοτικών. Στα στελέχη αυτά έγινε επιπλέον προσδιορισμός των MIC για την ερταπενέμη με την μέθοδο των Etest. Οι ευαισθησίες στα βασικά αντιβιοτικά που ελέγχθηκαν συνοψίζονται στον Πίνακα 17. Για τα β-λακταμικά αντιβιοτικά δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα ESBL θετικά και μη στελέχη με εξαίρεση τα ποσοστά ανθεκτικών στελεχών στην αζτρεονάμη που ήταν σημαντικά ψηλότερα για τα στελέχη που έφεραν ESBL β-λακταμάσες. Όσον αφορά της καρβαπενέμες παρατηρήθηκαν συνολικά 13 στελέχη που παρουσίαζαν μειωμένη ευαισθησία ή αντοχή σε τουλάχιστον μία καρβαπενέμη. Σε οχτώ από τα στελέχη αυτά η παρουσία καρβαπενεμάσης (VIM ή OXA-162) θεωρήθηκε υπεύθυνη, ενώ για τα υπόλοιπα ενδέχεται να εμπλέκονται προβλήματα διαπερατότητας. Οι MIC για την ερταπενέμη για τα ανθεκτικά στελέχη κυμαίνονταν από 3- \geq 32 μ g/ml ενώ για τα μετρίως ευαίσθητα από 0,75-1 μ g/ml. Σημειώνεται επιπλέον ότι η πλειονότητα των στελεχών παρουσίαζαν επιπλέον αντοχή στην τριμεθοπρίμη σουλφομεθοξαζόλη (84,7%) και στην σιπροφλοξασίνη (64,4%) ενώ το διατηρούσαν την ευαισθησία τους για την γενταμυκίνη (61%).

Πίνακας 17 . Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας έναντι των αντιβιοτικών των στελεχών με πλασμιδιακές AmpC β-λακταμάσες με την μέθοδο διάχυσης δισκίων συνολικά καθώς και σε σχέση με την παραγωγή ESBL β-λακταμασών.

Antibiotics	Susceptibility pattern	Total isolates N (%)	Non-ESBL isolates (n=24) N (%)	ESBL producing isolates (n=35) N (%)
Cefoxitin	resistant	55 (93.2)	22 (91.7)	33 (94.3)
	intermediate	4 (6.8)	2 (8.3)	2 (5.7)
	sensitive	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Cefotetan	resistant	18 (30.5)	5 (20.8)	13 (37.1)
	intermediate	18 (30.5)	2 (8.3)	16 (45.7)
	sensitive	23 (39)	17 (70.8)	6(17.1)
Cefotaxime	resistant	58 (98.3)	23 (95.8)	35 (100)
	intermediate	1 (1.7)	1 (4.2)	0 (0)
	sensitive	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Ceftazidime	resistant	46 (78)	17 (70.8)	29 (82.9)
	intermediate	13 (22)	7 (29.2)	6 (17.1)
	sensitive	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Ceftriaxone	resistant	44 (74.6)	17 (70.8)	27 (77.1)
	intermediate	12 (20.3)	5 (20.8)	7 (20)
	sensitive	3 (5.1)	2 (8.3)	1 (2.9)
Cefepime	resistant	2 (3.4)	0 (0)	2 (5.7)
	intermediate	9 (15.3)	3 (12.5)	6 (17.1)
	sensitive	48 (81.4)	21 (87.5)	27 (77.1)
Imipenem	resistant	1 (1.7)	1 (4.2)	0 (0)
	intermediate	6 (10.2)	4 (16.7)	2 (5.7)
	sensitive	52 (88.1)	19 (79.2)	33 (94.3)
Meropenem	resistant	4 (6.8)	4 (16.7)	0 (0)
	intermediate	5 (8.5)	5 (20.8)	0 (0)
	sensitive	50 (84.7)	15 (62.5)	35 (100)
Ertapenem	resistant	5 (8.5)	5 (20.8)	0 (0)
	intermediate	5 (8.5)	4 (16.7)	1 (2.9)
	sensitive	49 (83)	15(62.5)	34 (97.1)
Aztreonam	resistant	33 (55.9)	4 (16.7)	29 (82.9)
	intermediate	8 (13.6)	5 (20.8)	3 (8.6)
	sensitive	18 (30.5)	15 (62.5)	3 (8.6)

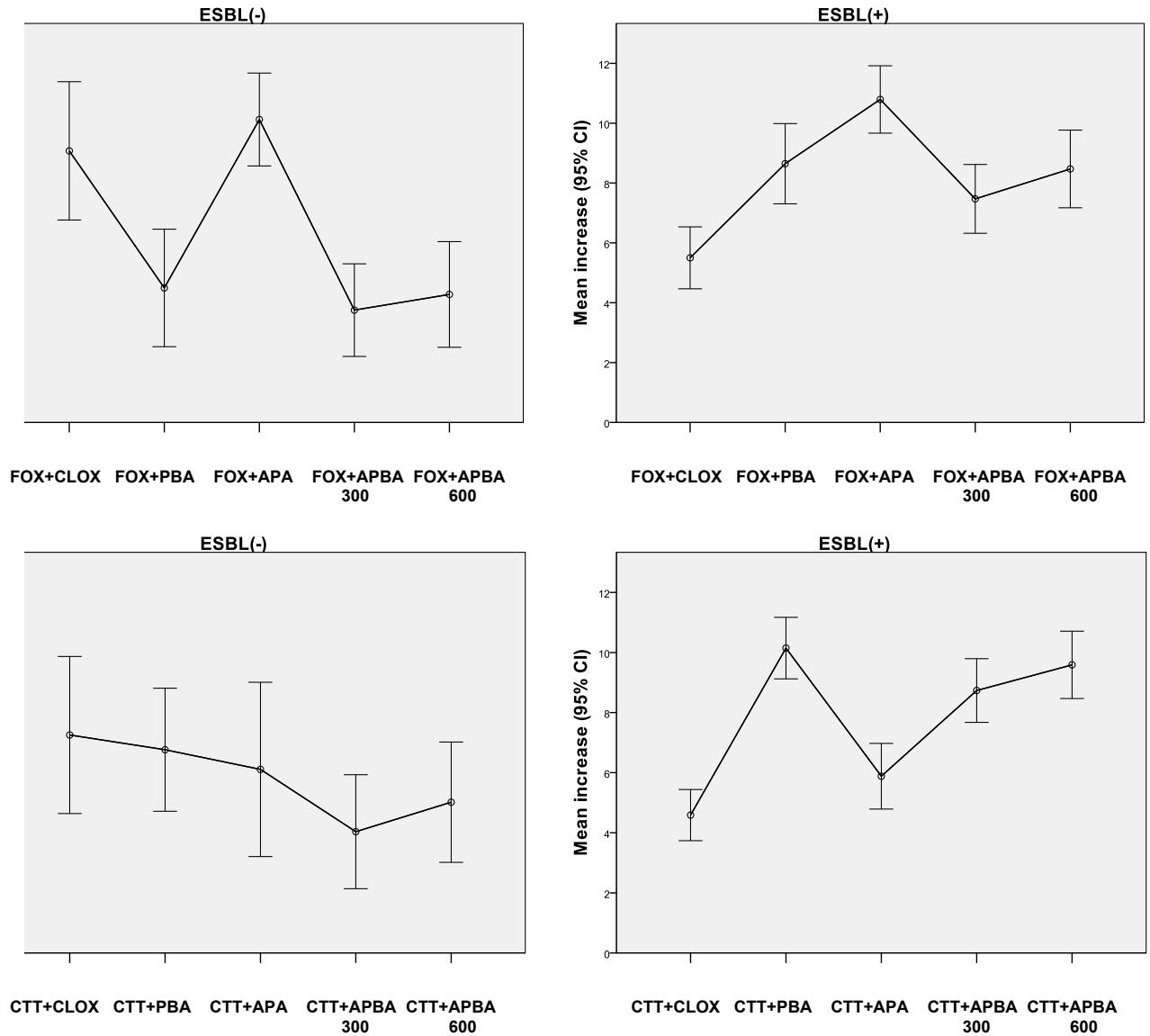
1.3. Αποτελέσματα φαινοτυπικού ελέγχου για AmpC β-λακταμάσες.

Η κεφοξιτίνη υπερτερούσε σημαντικά σε σχέση με την κεφοτετάνη στην δυνατότητα χρήσης ως αρχικό screening για την επιλογή πιθανών στελεχών με AmpC τύπου β-λακταμάσες. Θέτοντας την κεφοτετάνη ως υπόστρωμα υδρόλυσης, 39% (23/59) των στελεχών, εμφανίζουν ευαισθησία και διαφεύγουν δυνητικά της διερεύνησης σε αντίθεση με την κεφοξιτίνη που δίνει όλα τα στελέχη είτε μετρίως ευαίσθητα είτε ανθεκτικά (Πίνακας 17).

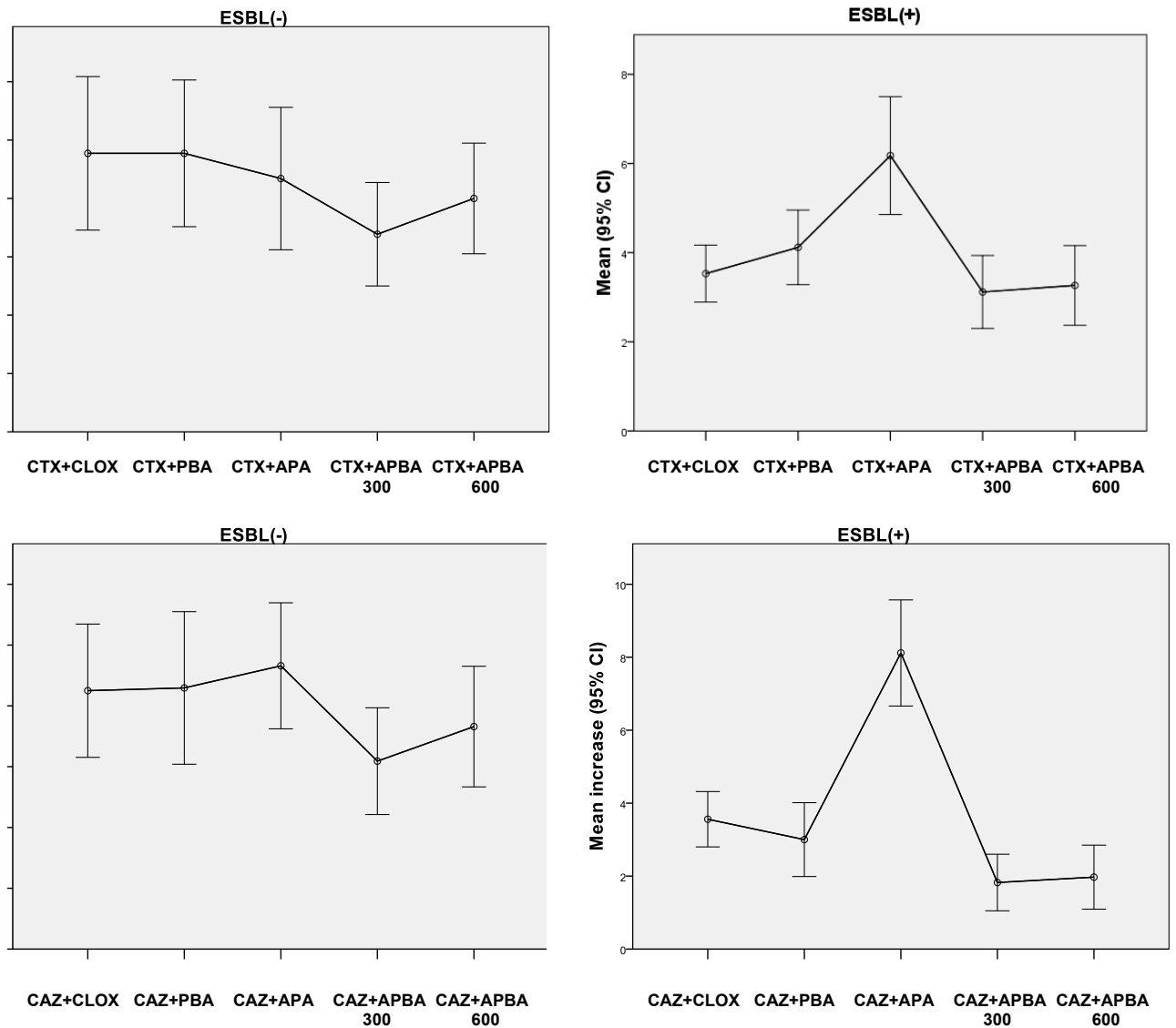
Στα πλαίσια του φαινοτυπικού ελέγχου για AmpC β-λακταμάσες έγινε προσπάθεια να εκτιμηθούν δύο παράγοντες, καταρχάς το καλύτερο υπόστρωμα υδρόλυσης ανάμεσα στην FOX, CTT, CAZ και CTX και αφετέρου ο καλύτερος αναστολέας. Η μέση κατανομή των ζωνών αναστολής των FOX, CTX, CAZ, CTT πριν και μετά την προσθήκη CLOX, PBA, APA, APBA 300, APBA 600 φαίνεται στον Πίνακα 18 και σχηματικά στις Εικόνες 11 και 12.

Πίνακας 18. Μέση διάμετρος των ζωνών αναστολής χωρίς και με την προσθήκη αναστολέων για τα ESBL (-) και ESBL (+) στελέχη αντίστοιχα.

	ESBL(-)		ESBL(+)	
	Mean	SD	Mean	SD
FOX	8.9	2.8	7.1	2.8
FOX/CLOX	18.7	5.7	12.8	4.1
FOX/PBA	14.2	5.5	15.7	3.8
FOX/APA	19.4	2.4	18.0	2.2
FOX/APBA 300	12.7	4.5	14.6	3.1
FOX/APBA 600	13.2	5.1	15.6	3.5
CTX	13.8	6.0	14.5	4.7
CTX/CLOX	23.1	4.9	18.0	4.5
CTX/PBA	23.0	4.6	18.7	4.9
CTX/APA	22.2	2.6	20.8	2.5
CTX/APBA 300	19.9	4.2	17.9	5.3
CTX/APBA 600	21.1	4.2	18.0	5.5
CAZ	13.2	5.2	12.1	4.4
CAZ/CLOX	21.9	7.1	15.6	4.1
CAZ/PBA	21.9	7.9	15.1	4.9
CAZ/APA	22.4	2.9	20.2	1.7
CAZ/APBA 300	19.0	6.3	13.9	4.8
CAZ/APBA 600	20.2	7.0	14.1	4.9
CTT	17.4	6.1	13.0	3.3
CTT/CLOX	23.7	3.6	17.6	2.4
CTT/PBA	23.4	3.3	23.1	2.4
CTT/APA	22.6	2.4	19.0	2.3
CTT/APBA 300	20.8	4.1	21.7	1.4
CTT/APBA 600	21.6	4.1	22.6	1.4



Εικόνα 11. Σχηματική απεικόνιση των διακυμάνσεων των διαμέτρων των ζωνών αναστολής για την FOX και CTT για τα ESBL αρνητικά και θετικά στελέχη με την χρήση των διαφόρων αναστολέων.



Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση των διακυμάνσεων των διαμέτρων των ζωνών αναστολής για την CTX και CAZ για τα ESBL αρνητικά και θετικά στελέχη με την χρήση των διαφόρων αναστολέων.

Τόσο στα ESBL αρνητικά όσο και στα ESBL θετικά στελέχη όταν χρησιμοποιήθηκαν είτε η κεφοξιτίνη είτε η κεφαζιδίμη τα καλύτερα αποτελέσματα ήταν εφικτά με την χρήση του APA (μέση αύξηση ζώνης αναστολής 10,5mm και 9,2mm αντίστοιχα). Με την κεφοτετάνη για τα μεν ESBL (-) ο καλύτερος αναστολέας ήταν η κλοξασιλλίνη ενώ για τα ESBL (+) το PBA (6,3mm και 10,1mm αντίστοιχα). Στην περίπτωση της

κεφοταξίμης στα ESBL (-) η κλοξασιλλίνη και το PBA είχαν την καλύτερη δράση ενώ στα ESBL (+) υπερείχε το APA (9,3mm και 6,2mm αντίστοιχα). Η χρησιμοποίηση μεγαλύτερης συγκέντρωσης APBA (600mg σε σχέση με 300mg) οδήγησε σε μεγαλύτερη αύξηση των διαμέτρων αναστολής για όλα τα υποστρώματα ανεξαρτήτως της παραγωγής ή όχι και επιπλέον ESBL β-λακταμάσης. Παρόλα αυτά με εξαίρεση την κεφοτετάνη ως υπόστρωμα στα ESBL θετικά στελέχη το APBA είχε την μικρότερη αύξηση στις ζώνες αναστολής συγκριτικά με τους υπόλοιπους αναστολείς (Πίνακας 19).

Πίνακας 19. Μέση αύξηση των ζωνών αναστολής των FOX, CTX, CAZ, CTT με την προσθήκη CLOX, PBA, APA, APBA 300, APBA 600

	ESBL(-)				ESBL(+)			
	FOX	CTX	CAZ	CTT	FOX	CTX	CAZ	CTT
	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean(SD)	Mean (SD)
+CLOX	9.8 (5.3)	9.3 (5.7)	8.7 (4.8)	6.3 (4.8)	5.7 (3.3)	3.5 (1.8)	3.6 (2.1)	4.6 (2.4)
+PBA	5.3 (4.9)	9.3 (5.5)	8.8 (5.4)	6 (3.9)	8.6 (3.8)	4.1 (2.4)	3.1 (2.9)	10.1 (2.9)
+APA	10.5 (3.6)	8.4 (5.4)	9.2 (4.6)	5.3 (5.4)	10.9 (3.3)	6.2 (3.7)	8.1 (4.1)	6 (3.2)
+APBA 300	3.9 (3.6)	6.8 (4)	6.2 (4)	3.4 (3.6)	7.5 (3.3)	3.1 (2.3)	1.8 (2.2)	8.7 (3)
+APBA 600	4.5 (4.1)	8 (4.3)	7.3 (4.5)	4.2 (3.8)	8.5 (3.7)	3.3 (2.6)	2 (2.5)	9.6 (3.2)

Στα ESBL(-) στελέχη 95,8% παρουσίασε αύξηση ≥ 5 mm με υπόστρωμα την κεφοξιτίνη και αναστολέα το APA σημειώνοντας την μεγαλύτερη ευαισθησία ως φαινοτυπική μέθοδος ανίχνευσης. Αντίστοιχα στα ESBL (+) 97,1% των στελεχών αναγνωρίζονταν επιτυχώς με την χρήση της είτε της κεφοτετάνης ως υπόστρωμα και του PBA ως αναστολέα είτε της κεφοταξίμης και του APA (Πίνακας 20). Αν δούμε όμως συνολικά την ευαισθησία ανίχνευσης παρατηρούμε ότι η κεφοξιτίνη ως υπόστρωμα ανεξάρτητα από την παρουσία ESBL β-λακταμασών, με την χρήση του

APA ως αναστολέα επέτρεπε την αναγνώριση του μεγαλύτερου αριθμού AmpC θετικών στελεχών (57/59) (Πίνακας 21).

Πίνακας 20. Ποσοστά στελεχών με αύξηση ≥ 5 mm στις ζώνες αναστολής των FOX, CTX, CAZ, CTT με την προσθήκη αντίστοιχα αναστολέων CLOX, PBA, APA, APBA 300, APBA 600

	ESBL(-)				ESBL(+)			
	FOX	CTX	CAZ	CTT	FOX	CTX	CAZ	CTT
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
+CLOX								
<5 mm	5 (20.8)	7 (29.2)	7 (29.2)	10 (41.7)	14 (40)	29 (82.9)	28 (80)	15 (42.9)
≥ 5 mm	19 (79.2)	17 (70.8)	17 (70.8)	14 (58.3)	21 (60)	6 (17.1)	7 (20)	20 (57.1)
+PBA								
<5 mm	13 (54.2)	7 (29.2)	6 (25)	13 (54.2)	5 (14.3)	20 (57.1)	26 (74.3)	1 (2.9)
≥ 5 mm	11 (45.8)	17 (70.8)	18 (75)	11 (45.8)	30 (85.7)	15 (42.9)	9 (25.7)	34 (97.1)
+APA								
<5 mm	1 (4.2)	6 (25)	5 (20.8)	15 (62.5)	1 (2.9)	14 (40)	8 (22.9)	11 (31.4)
≥ 5 mm	23 (95.8)	18 (75)	19 (79.2)	9 (37.5)	34 (97.1)	21 (60)	27 (77.1)	24 (68.6)
+APBA 300								
<5 mm	13 (59.1)	9 (40.9)	7 (31.8)	13 (59.1)	7 (20.6)	25 (73.5)	29 (85.3)	5 (14.7)
≥ 5 mm	9 (40.9)	13 (59.1)	15 (68.2)	9 (40.9)	27 (79.4)	9 (26.5)	5 (14.7)	29 (85.3)
+APBA 600								
<5 mm	12 (54.5)	5 (22.7)	6 (27.3)	10 (45.5)	5 (14.7)	25 (73.5)	28 (82.4)	4 (11.8)
≥ 5 mm	10 (45.5)	17 (77.3)	16 (72.7)	12 (54.5)	29 (85.3)	9 (26.5)	6 (17.6)	30 (88.2)
P CLOX vs PBA	0.017	1.000	0.745	0.386	0.016	0.019	0.569	<0.001
P CLOX vs APA	0.188	0.745	0.505	0.149	0.001	<0.001	<0.001	0.322
P CLOX vs APBA300	0.008	0.404	0.845	0.238	0.080	0.348	0.562	0.010
P CLOX vs APBA600	0.018	0.619	0.887	0.796	0.019	0.348	0.803	0.004
P PBA vs APBA	<0.001	0.745	0.731	0.558	0.428	0.151	<0.001	0.002
P PBA vs APBA300	0.736	0.404	0.608	0.736	0.490	0.153	0.256	0.106
P PBA vs APBA600	0.979	0.619	0.861	0.555	0.960	0.153	0.417	0.154
P APA vs APBA300	<0.001	0.250	0.397	0.813	0.084	0.005	<0.001	0.100
P APA vs APBA600	<0.001	0.857	0.609	0.246	0.259	0.005	<0.001	0.048
PAPA300vsAPBA600	0.761	0.195	0.741	0.365	0.525	1.000	0.742	1.000

Πίνακας 21. Συνολικά ποσοστά αντίχνευσης AmpC β-λακταμασών ανά αναστολέα.

Inhibitor	Total isolates			
	FOX	CTX	CAZ	CTT
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
+CLOX				
≥5 mm	40	23	24	34
+PBA				
≥5 mm	41	32	27	45
+APA				
≥5 mm	57	39	46	33
+APBA 300				
≥5 mm	36	22	20	38
+APBA 600				
≥5 mm	39	26	22	42

1.4. Αποτελέσματα φαινοτυπικού ελέγχου για ESBL.

Τα αποτελέσματα του φαινοτυπικού ελέγχου για την παραγωγή ESBL για τα 59 AmpC θετικά στελέχη υπό εξέταση που περιελάμβαναν 24 ESBL θετικά και 35 ESBL αρνητικά στελέχη συνοψίζονται στους Πίνακες 22 και 23. Με την χρήση του κλασικού CLSI ESBL επιβεβαιωτικού τεστ βρέθηκε ότι στην περίπτωση που δεν χρησιμοποιηθούν και τα δύο υποστρώματα υδρόλυσης ως δείκτες, μειώνεται σημαντικά η ευαισθησία της μεθόδου από 85,7%, με την ταυτόχρονη χρήση, σε 74,3% αν χρησιμοποιηθεί αποκλειστικά η CAZ και 28,6% αν χρησιμοποιηθεί αποκλειστικά η CTX. Το γεγονός αυτό σχετίζεται με τα διαφορετικά υδρολυτικά χαρακτηριστικά των ESBL ενζύμων καθώς η πλειονότητα των στελεχών της μελέτης έφερε SHV-τύπου ένζυμα. Το ίδιο ισχύει και την περίπτωση εφαρμογής του τροποποιημένου CLSI ESBL τεστ ανεξάρτητα από τον αναστολέα που χρησιμοποιείται.

Πίνακας 22. Ειδικότητα, ευαισθησία, PPV και NPV για την κεφταζιδίμη και τους συνδιασμούς της με CLOX, PBA, APBA, APA με την προσθήκη CL, καθώς και της κεφοταξίμης αντίστοιχα με συνδιασμούς της με CLOX, PBA, APBA, APA με την προσθήκη CL για την ανίχνευση της παρουσίας ESBL.

		Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
CAZ	CAZ+CL	74.3	66.7	76.5	64.0
CAZ/CLOX	CAZ/CLOX+CL	88.6	79.2	86.1	82.6
CAZ/PBA	CAZ/PBA+CL	91.4	75.0	84.2	85.7
CAZ/APA	CAZ/APA+CL	45.7	91.7	88.9	53.7
CAZ/APBA 300	CAZ/APBA 300+CL	91.2	72.7	83.8	84.2
CAZ/APBA 600	CAZ/APBA 600+CL	91.2	72.7	83.8	84.2
CTX	CTX+CL	28.6	78.3	66.7	41.9
CTX/CLOX	CTX/CLOX+CL	31.4	91.7	84.6	47.8
CTX/PBA	CTX/PBA+CL	77.1	91.7	93.1	73.3
CTX/APA	CTX/APA+CL	17.1	91.7	75.0	43.1
CTX/APBA 300	CTX/APBA300+CL	64.7	95.5	95.7	63.6
CTX/APBA 600	CTX/APBA600+ CL	70.6	95.5	96.0	67.7

Πίνακας 23. Ειδικότητα, ευαισθησία, PPV και NPV για την κεφταζιδίμη και τους συνδιασμούς της με CLOX, PBA, APBA, APA με την προσθήκη CL, καθώς και της κεφοταξίμης αντίστοιχα με συνδιασμούς της με CLOX, PBA, APBA, APA με την προσθήκη CL για την ανίχνευση της παρουσίας ESBL με ταυτόχρονη εκτίμηση και των δυο υποστρωμάτων.

	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
CAZ vs CAZ/CL ή/και CTX vs CTX/CL	85.7	58.3	75.0	73.7
CAZ/CLOX vs CAZ/CLOX+CL ή/και CTX/CLOX vs CTX/CLOX+CL	91.4	75.0	84.2	85.7
CAZ/PBA vs CAZ/PBA+CL ή/και CTX/PBA vs CTX/PBA+CL	100	75.0	85.3	100
CAZ/APA vs CAZ/APA+CL ή/και CTX/APA vs CTX/APA+CL	54.3	83.3	82.6	55.6
CAZ/APBA 300 vs CAZ/APBA 300+CL ή/και CTX/APBA 300 vs CTX/APBA 300+CL	97.1	72.7	84.6	94.1
CAZ/APBA 600 vs CAZ/APBA 600+CL ή/και CTX/APBA 600 vs CTX/APBA 600+CL	97.1	72.7	84.6	94.1

Με την εφαρμογή του τροποποιημένου CLSI ESBL τεστ η ευαισθησία, ειδικότητα, PPV και NPV βελτιώνονται αισθητά όπως φαίνεται αναλυτικά στον Πίνακα 22. Από τους αναστολείς που εκτιμήθηκαν η μεγαλύτερη ευαισθησία (100%) παρατηρείται με την χρήση του PBA και εν συνεχεία με το APBA (97,1%) ανεξαρτήτως από την συγκέντρωση του αναστολέα. Η CLOX βελτιώνει και αυτήν την απόδοση του τεστ, εμφανίζει όμως μικρότερη ευαισθησία (91,4%) σε σχέση με το PBA και το APBA. Με την χρήση του APA ως αναστολέα το τροποποιημένο CLSI ESBL τεστ υπολείπεται σημαντικά όσον αφορά την ευαισθησία σε σχέση με το CLSI ESBL τεστ, δίνοντας σαν ποσοστό ευαισθησίας της μεθόδου 54,3%, με βελτιωμένη όμως την ειδικότητα (87,5%) και την PPV (85%). Η αδυναμία του APA ως αναστολέα έγκειται στο γεγονός ότι συγκριτικά με τους υπόλοιπους αναστολείς παρέχει την μεγαλύτερη αύξηση στις διαμέτρους αναστολείς με συνέπεια να μην είναι δυνατή σε όλα τα στελέχη η περαιτέρω αύξηση $\geq 5\text{mm}$ με την προσθήκη του κλαβουλανικού οξέως. Στην περίπτωση κατά την οποία η συγκριτική εκτίμηση της αύξησης της ζώνης αναστολής $\geq 5\text{mm}$ στα δισκία με την CAZ ή CTX παρουσία αναστολέα των πλασμιδιακών AmpC και CL γίνει σε σχέση με το απλό δισκίο CAZ ή CTX, η μέθοδος ανιχνεύει όλα τα ESBL στελέχη, επηρεάζεται όμως σημαντικά η ειδικότητα της μεθόδου όπως φαίνεται στους Πίνακες 24 και 25.

Πίνακας 24. Ειδικότητα, ευαισθησία, PPV και NPV για την κεφταζιδίμη και/ή την κεφοταξίμη και τους συνδυασμούς τους με CL, CL+CLOX, CL+PBA, CL+APA, CL+APBA300 και CL+APBA600 για την ανίχνευση της παρουσίας ESBL.

	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
CAZ vs CAZ+CL	74.3	66.7	76.5	64.0
CAZ vs CAZ+CL+CLOX	97.1	4.2	59.6	50.0
CAZ vs CAZ+CL+PBA	100.0	4.2	60.3	100.0
CAZ vs CAZ+CL+APBA	97.1	8.3	60.7	66.7
CAZ vs CAZ+CL+APA 300	97.1	4.5	61.1	50.0
CAZ vs CAZ+CL+APA 600	100.0	0.0	60.7	-
CTX vs CTX+CL	28.6	78.3	66.7	41.9
CTX vs CTX+CL+CLOX	71.4	20.8	56.8	33.3
CTX vs CTX+CL+PBA	94.3	16.7	62.3	66.7
CTX vs CTX+CL+APBA	80.0	29.2	62.2	50.0
CTX vs CTX+CL+APA 300	91.2	36.4	68.9	72.7
CTX vs CTX+CL+ APA 600	94.1	36.4	69.6	80.0

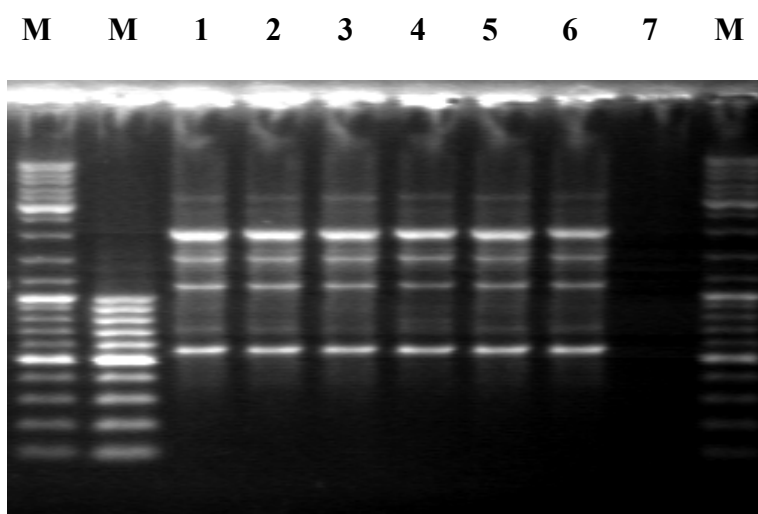
Πίνακας 25. Ειδικότητα, ευαισθησία, PPV και NPV για την κεφταζιδίμη και τους συνδυασμούς της με CL, CL+CLOX, CL+PBA, CL+APBA, CL+APA300 και CL+APA600 καθώς και της κεφοταξίμης αντίστοιχα με CL, CL+CLOX, CL+PBA, CL+APBA, CL+APA300 και CL+APA600 για την ανίχνευση της παρουσίας ESBL.

	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
CAZ vs CAZ/CLOX+CL ή/και CTX vs CTX/CLOX+CL	100.0	4.2	60.3	100.0
CAZ vs CAZ/PBA+CL ή/και CTX vs CTX/PBA+CL	100.0	0.0	59.3	-
CAZ vs CAZ/APA+CL ή/και CTX vs CTX/APA+CL	100.0	8.3	61.4	100.0
CAZ vs CAZ/APBA 300+CL ή/και CTX vs CTX/APBA 300+CL	100.0	4.5	61.8	100.0
CAZ vs CAZ/APBA 600+CL ή/και CTX vs CTX/APBA 600+CL	100.0	0.0	60.7	-

Τέλος το εμπορικά διαθέσιμο Etest με την κεφεπίμη σε σύγκριση με την κεφεπίμη κλαβουλανικό παρουσίασε χαμηλή μεν ευαισθησία (88,6%) αλλά υψηλή ειδικότητα (100%), PPV (100%) και NPV (85,7%) αντίστοιχα.

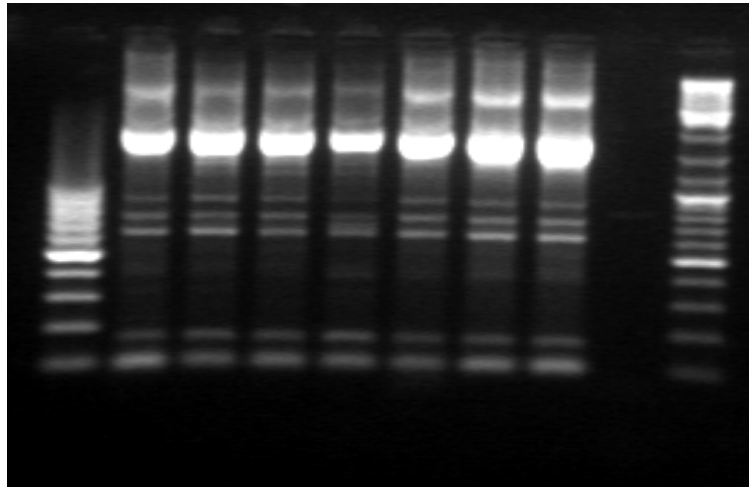
1.5. Αποτελέσματα μοριακής τυποποίησης .

Η ERIC-RCR έδειξε ότι τα 6 θετικά στελέχη *P.mirabilis* για πλασμιδιακές AmpC ανεξαρτήτως από τα γονίδια τα οποία έφεραν και των νοσοκομείων από τα οποία προέρχονταν ανήκαν στον ίδιο κλώνο, ενώ αντίστοιχα τα στελέχη *K.oxytoca*, όλα προερχόμενα από το ίδιο νοσοκομείο εμφάνιζαν δύο κλώνους (I και II) με ένα διακριτό υπότυπο Ia με την πλειονότητα των στελεχών να ανήκουν στον κλώνο I (Εικόνες 13 και 14).



Εικόνα 13. ERIC-PCR *P.mirabilis*. Τα ηλεκτροφορητικά πρότυπα των έξι στελεχών (σειρές 1-6), θέσεις M 1kb και 100 bp DNA ladder και θέση 7 αρνητικός μάρτυρας.

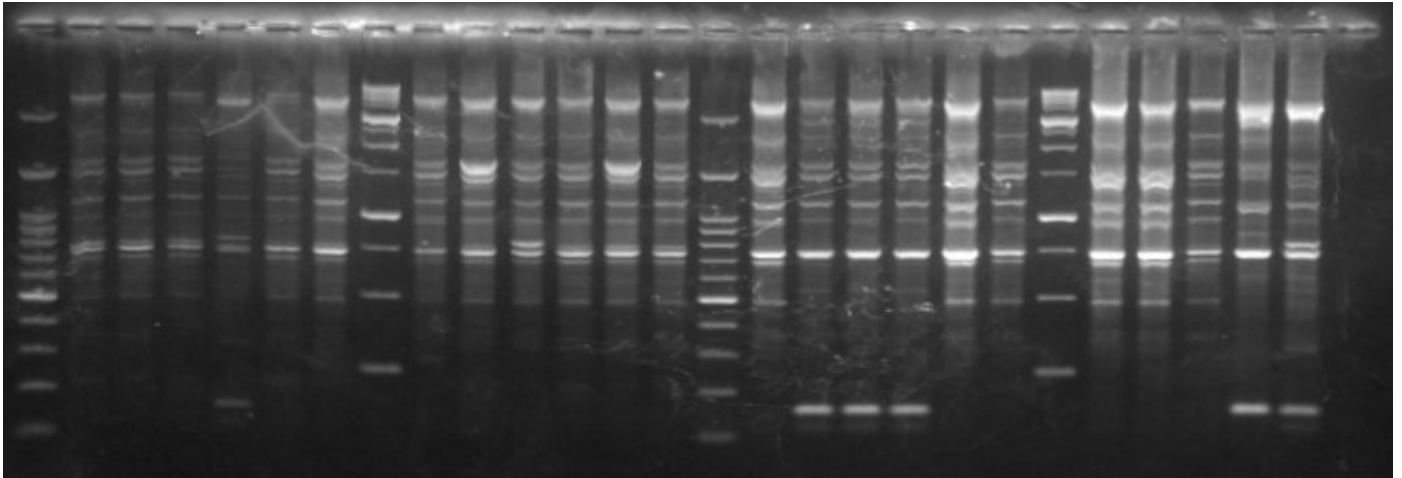
M	I	Ia	Ia	II	I	I	I	(-)	M
M	1	2	3	4	5	6	7	8	M



Εικόνα 14. ERIC-PCR *K. oxytoca*. Τα ηλεκτροφορητικά πρότυπα των επτά στελεχών (σειρές 1-7), θέσεις M 100bp και 1kb DNA ladder αντίστοιχα και θέση 8 αρνητικός μάρτυρας.

Η REP-PCR αντιστοιχίσε τα στελέχη *K. pneumoniae* σε οχτώ διακριτούς κλώνους (I-VIII) (Εικόνα 15). Σημειώνεται ότι τα στελέχη που έφεραν τα CMY-4 και CTX-M-15 γονίδια προέρχονταν από το ίδιο νοσοκομειακό ίδρυμα, από ασθενείς διαφορετικών κλινικών, είχαν συλλεχθεί εντός χρονικής περιόδου ενός έτους (από το Νοέμβριο 2008-Νοέμβριο 2009) και ανήκαν όλα στον ίδιο κλώνο VI. Ομοίως το DHA-1 στέλεχος διέφερε από τα υπόλοιπα και αντιστοιχίστηκε σε ένα διακριτό ξεχωριστό κλώνο VII.

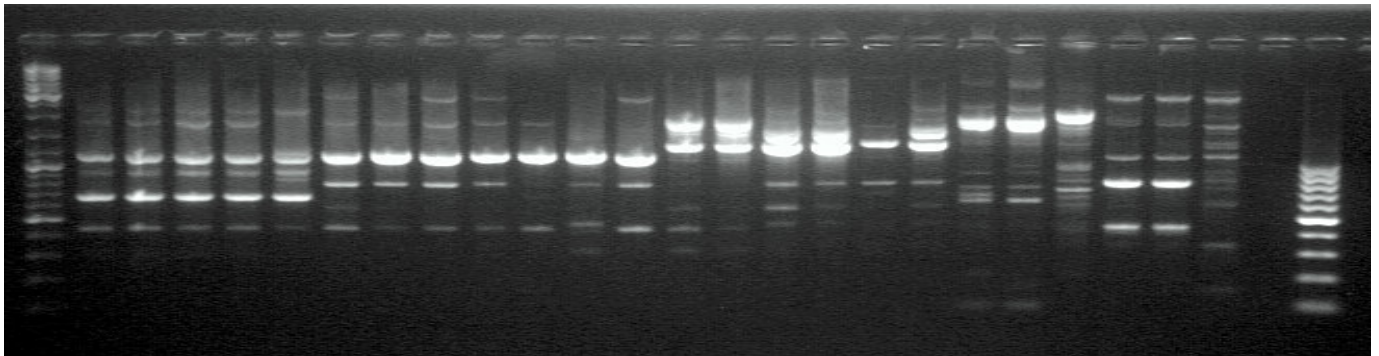
I I I II III IV IVa IVb IVc IV IVb IV V VI VI VI V III V V III VII VIII
M 1 2 3 4 5 6 M 7 8 9 10 11 12 M 13 14 15 16 17 18 M 19 20 21 22 23 24



Εικόνα 15. REP-PCR *K.pneumoniae*. Τα ηλεκτροφορητικά πρότυπα των 23 στελεχών (σειρές 1-23), θέσεις M 100bp και 1kb DNA ladder εναλλάξ και θέση 24 αρνητικός μάρτυρας. Στις θέσεις 14-16 παρατηρούνται τα στελέχη του κλώνου VI που φέρουν τα CMY-4 και CTX-M-15 γονίδια και στην θέση 22 το DHA-1 στέλεχος που ανήκει στον διακριτό κλώνο VII.

Τα 23 στελέχη *E.coli* διαχωρίστηκαν σε 11 διακριτούς κλώνους με βάση το ηλεκτροφορητικό τους προτύπωμα στην ERIC-PCR. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα δύο CMY-31 θετικά στελέχη με προέλευση το νοσοκομείο Σερρών ανήκουν σε δύο υπότυπους του ίδιου κλώνου IX αν και έχουν απομονωθεί με διαφορά 8 ετών, το 2004 και 2011, και διαφέρουν από το μεικτό CMY-31/CTX-M-15 με προέλευση το ‘Τζάνειο’ νοσοκομείο που ανήκει σε ξεχωριστό διακριτό κλώνο (VI). Τα στελέχη με το ένζυμο MOX-2 ανήκουν σε τρεις κλώνους I, III και VII ενώ τα φέροντα το CMY-2 στους κλώνους II, IV, V και XI (Εικόνα 16).

I I I I Ia II II III III IV V VI V Va VII VII VIII VII IXa IXb X XI XI
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 C (-) M



Εικόνα 16. ERIC-PCR *E.coli*. Απεικονίζονται τα ηλεκτροφορητικά πρότυπα των 23 στελεχών (σειρές 1-23), στις θέσεις M 1kb και 100bp DNA ladder, στην θέση 24 μη σχετιζόμενο στέλεχος και στην θέση 24 αρνητικός μάρτυρας.

2. Αποτελέσματα μελέτης καρβαπενεμασών.

Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής θα διαχωριστούν για λόγους ευκρίνειας σε τρεις ομάδες με βάση το γονίδιο αντοχής που ανιχνεύθηκε και θα αναλυθούν ανά ενότητα όσον αφορά τα αποτελέσματα του πειραματικού τμήματος.

2.1. NDM-1 Καρβαπενεμάση

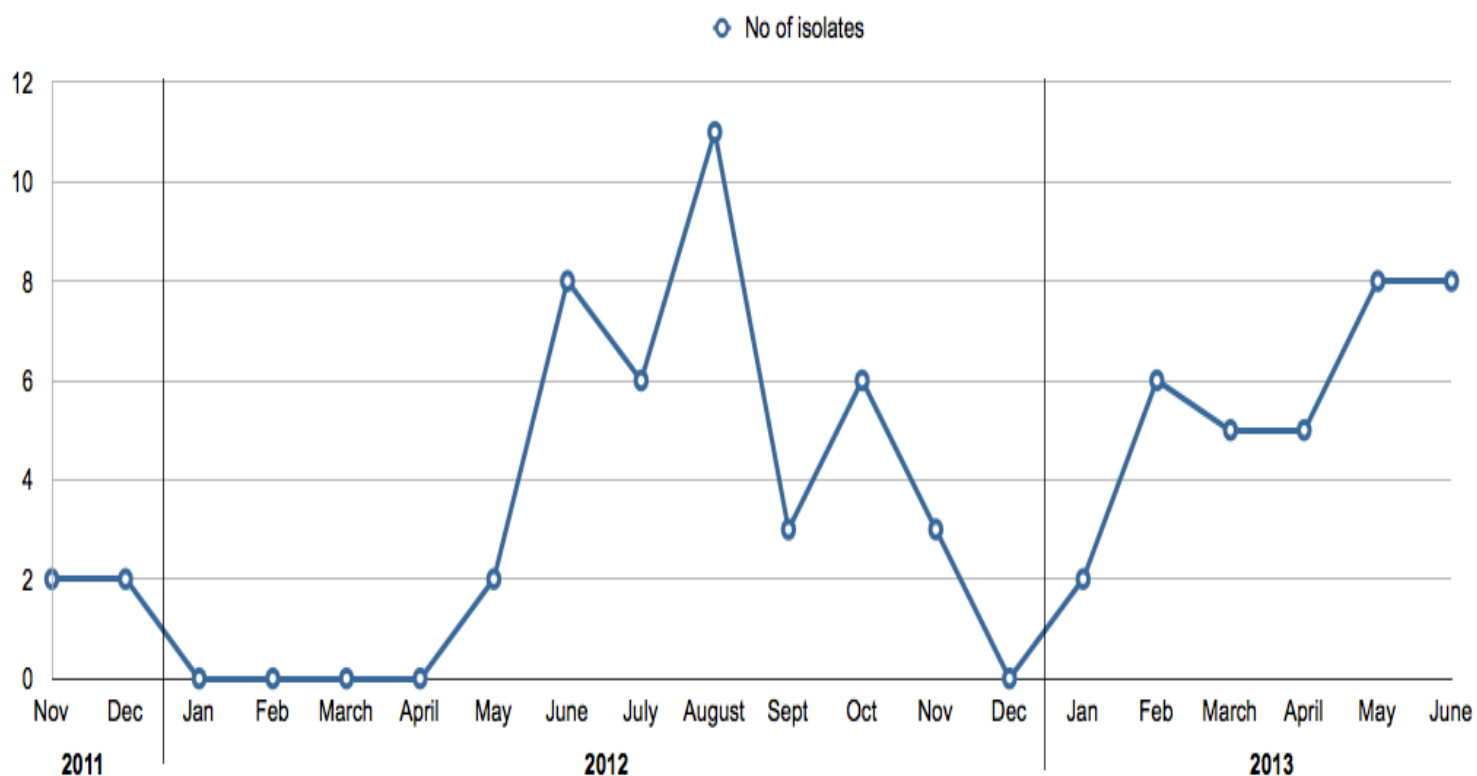
2.2.1. Βακτηριακά στελέχη, ασθενείς και επιδημίες.

Συνολικά έγινε έλεγχος 132 μη επαναλαμβανόμενων στελεχών Εντεροβακτηριακών (127 *K.pneumoniae*, 4 *E.cloacae*, 1 *P.mirabilis*) από δείγματα ασθενών που είχαν ληφθεί εντός μιας περιόδου 3,5 ετών (Ιανουάριο 2010-Ιούνιο 2013). Η παραπομπή των στελεχών έγινε σε δύο διαφορετικές φάσεις. Αρχικά εκτιμήθηκαν 24 μη επαναλαμβανόμενα, ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη (23 *K.pneumoniae* και 1 *E.cloacae*) που συλλέχθηκαν από το Νοέμβριο 2012-Φεβρουάριο 2013 και ήταν ύποπτα για την παραγωγή MBL ή MBL και KPC καρβαπενεμάσης μετά τον αρχικό φαινοτυπικό έλεγχο με το συνδιασμένο τεστ PBA και EDTA με μεροπενέμη ως υπόστρωμα. Παρά το γεγονός ότι στην πλειονότητα τους τα στελέχη αυτά ήταν είτε

VIM ή VIM/KPC θετικά, η μοριακή τυποποίηση ανέδειξε την ύπαρξη 11 στελεχών που έφεραν την NDM καρβαπενεμάση. Η ανίχνευση αυτή οδήγησε στον έλεγχο των αρχειακών και πρόσφατων στελεχών σε τελικό βάθος 3,5 ετών (Ιανουάριο 2010-Ιούνιο 2013) που εμφάνιζαν αντοχή σε τουλάχιστον μια καρβαπενέμη (MIC ιμιπενέμη $\geq 4\text{mg/L}$, MIC μεροπενέμη $\geq 2\text{mg/L}$ ή MIC ερταπενέμη $\geq 4\text{mg/L}$) με βάση τα επικαιροποιημένα κριτήρια του CLSI και είχαν θετικές τις φαινοτυπικές δοκιμασίες για παραγωγή καρβαπενεμάσης τάξης A κατά Ambler.

Συνολικά βρέθηκαν 78 NDM-1 θετικά στελέχη τα οποία απομονώθηκαν από 71 ασθενείς σε δύο διακριτές επιδημικές εξάρσεις. Η πρώτη έξαρση σημειώθηκε από τον Νοέμβριο 2011 μέχρι το Δεκέμβριο 2011 ενώ η δεύτερη από το Μάιο του 2012 μέχρι τον Ιούνιο του 2013. Η πρώτη επιδημία περιλάμβανε 4 στελέχη *K.pneumoniae* από 4 ασθενείς της αιματολογικής κλινικής. Όλοι οι ασθενείς ήταν Έλληνες και δεν ανέφεραν πρόσφατο ταξιδιωτικό ιστορικό εκτός Ελλάδας. Η δεύτερη έξαρση ήταν σαφώς μακροβιότερη και συνεχιζόμενη καλύπτοντας μια περίοδο 14 μηνών και εμπλέκοντας 64 ασθενείς από τους οποίους απομονώθηκαν 74 NDM θετικά στελέχη. Με την εξαίρεση δύο ασθενών Αλβανικής καταγωγής (ο ένας αναγνωρίστηκε στην μέση της επιδημίας το Σεπτέμβριο του 2012, ενώ ο δεύτερος το Μάιο 2013) οι υπόλοιποι ήταν επίσης Έλληνες χωρίς ταξιδιωτικό ιστορικό σε ενδημικές περιοχές.

Τα στελέχη απομονώθηκαν από μια ποικιλία δειγμάτων κυρίως αιμοκαλλιέργειες και καλλιέργειες ούρων καθώς και από επιχρίσματα τραυμάτων, δείγματα ενδοφλέβιων καθετήρων, καλλιέργειες ασκητικών υγρών, πτύελα και βρογχικές αναρροφήσεις και ορθικές καλλιέργειες. Η σχηματική απεικόνιση των δύο επιδημιών αποτυπώνεται στην Εικόνα 17.



Εικόνα 17. Σχηματική απεικόνιση της εξέλιξης των επιδημιών

2.2.2. Περιγραφή αρχικής επιδημίας.

Το αρχικό στέλεχος *K.pneumoniae* απομονώθηκε από μια τυχαία καλλιέργεια ούρων ασθενούς (P1) στην 12^η ημέρα νοσηλείας της στην αιματολογική κλινική. Εν συνεχεία παρόμοια στελέχη απομονώθηκαν από τρεις επιπλέον ασθενείς της αιματολογικής κλινικής.

Την περίοδο της μελέτης οι κεντρικές γραμμές για την χορήγηση των σχημάτων χημειοθεραπείας τοποθετούνταν στην μονάδα εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ) όπου οι ασθενείς νοσηλεύονταν για 1-2 ημέρες. Μια τέτοια παρέμβαση είχε λάβει χώρα και για τους τέσσερις αιματολογικούς ασθενείς. Η χρονική περίοδος από την απομόνωση και την έκθεση στο περιβάλλον της ΜΕΘ κυμαινόταν από 2-32 μέρες. Αναδρομική μελέτη των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών από την ΜΕΘ για το 2011 δεν ανέδειξε άλλα NDM θετικά στελέχη. Υπάρχουν δύο πιθανά σενάρια είτε η ασθενής P1 εισήγαγε το στέλεχος στο περιβάλλον της αιματολογικής κλινικής ως

μέλος ενός μη αναγνωρισμένου κοινοτικού θύλακα ή η ασθενής εποικίστηκε κατά την παραμονή της στην ΜΕΘ από μια πηγή που δεν κατέστη δυνατό να αναγνωρίσουμε καθώς στην περίοδο αυτή δεν πραγματοποιήθηκε συλλογή περιβαλλοντικών δειγμάτων και εκτίμηση φορέας.

2.2.3. Περιγραφή συνεχιζόμενης επιδημίας.

Στην δεύτερη επιδημία (Μάιος 2012-Ιούνιος 2013) αναγνωρίστηκαν 67 ασθενείς (Εικόνα 17). Δύο πιθανά μοτίβα πρόσληψης παρατηρήθηκαν, ένα ενδονοσοκομειακής διασποράς και ένα κοινοτικής απόκτησης.

Η αρχική ασθενής (P5), ήταν ασθενής της ΜΕΘ που στην 8^η μέρα νοσηλείας παρουσίασε αιματογενή λοίμωξη από NDM θετικό στέλεχος. Δεδομένου ότι δεν είχε γίνει έλεγχος ορθικού με την εισαγωγή της ασθενούς δεν είναι δυνατό να προσδιοριστεί η πρότερη κατάσταση φορέας της. Επιπλέον δεδομένου ότι η ασθενής είχε στο ιστορικό της έκθεση σε άλλες δομές υγείας δεν είναι σαφές αν η λοίμωξη αυτή θα έπρεπε να θεωρηθεί προερχόμενη από την κοινότητα ή ενδονοσοκομειακή.

Με την εξαίρεση δύο ασθενών (P29 και P54) των οποίων οι λοιμώξεις ήταν δυνατόν να χαρακτηριστούν χωρίς αμφιβολία ως προερχόμενες από την κοινότητα, καθώς δεν είχαν ιστορικό έκθεσης σε μονάδες υγείας και τα στελέχη απομονώθηκαν από δείγματα ούρων και αίματος που ελήφθησαν με την εισαγωγή των ασθενών, οι προέλευση των υπολοίπων στελεχών παραμένει ασαφής. Περαιτέρω διερεύνηση των κινήσεων των ασθενών εντός του νοσοκομειακού περιβάλλοντος ανέδειξε ότι ανεξάρτητα από την αρχική κλινική εισαγωγής η γενική ΜΕΘ, η καρδιολογική ΜΕΘ, η χειρουργική κλινική και η μονάδα φυσικής αποκατάστασης λειτούργησαν ως θύλακες από τους οποίους έγινε η διασπορά προς τις υπόλοιπες κλινικές.

2.2.4. Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας.

Τα στελέχη εμφάνιζαν υψηλή αντοχή στα περισσότερα β-λακταμικά αντιβιοτικά, συμπεριλαμβανομένων των πενικιλινών και των συνδιασμών τους με αναστολείς,

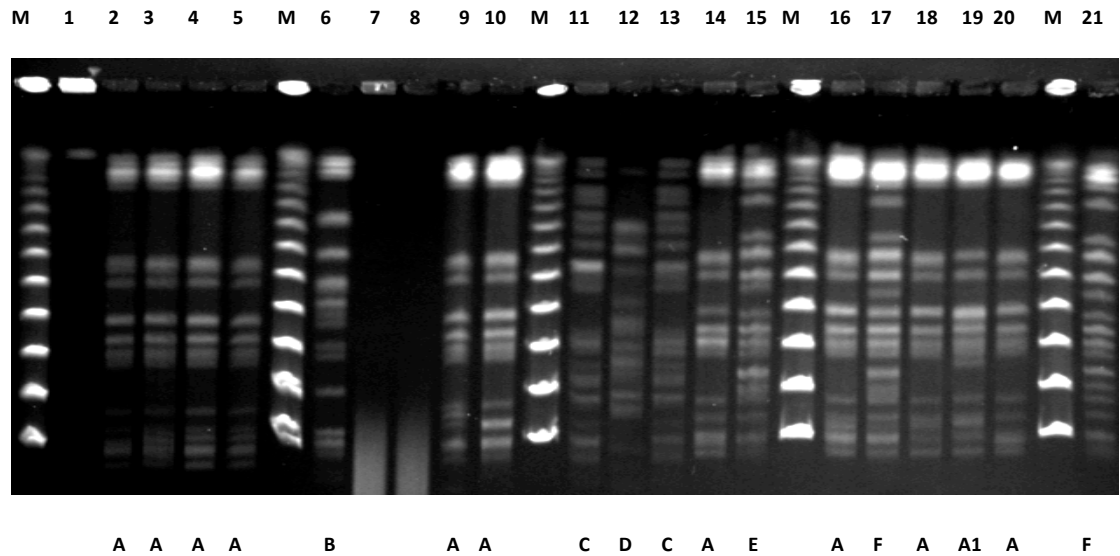
των κεφαλοσπορινών εκτεταμένου φάσματος και των καρβαπενεμών (ιμιπενέμη MICs>32 mg/L, μεροπενέμη MICs 16->32 mg/L και ερταπενέμη MICs 24->32mg/L). Επτά στελέχη παρέμεναν ευαίσθητα στην αζτρεονάμη (MIC≤1mg/L), που δεν υδρολύεται από τις MBL, γεγονός ενδεικτικό της παρουσίας επιπλέον β-λακταμασών στα υπόλοιπα στελέχη. Όλες οι *K.pneumoniae* ήταν ανθεκτικές στην αμικασίνη και στην σιπροφλοξασίνη ενώ 9 παρέμειναν ευαίσθητες στην γενταμυκίνη και τέσσερεις στην κοτριμοξαζόλη. Οι MICs για την κολιστίνη ήταν σταθερά χαμηλές ≤0,5mg/L με εξαίρεση 11 στελέχη (MICs 11-32mg/dl). Τέλος 20 στελέχη εμφάνιζαν ενδιάμεση ευαισθησία στην τιγκεκυκλίνη (MICs 3-4mg/L) και 11 ήταν ανθεκτικά (MICs 8-16mg/L).

2.2.5. Αποτελέσματα φαινοτυπικού και μοριακού ελέγχου.

Ο φαινοτυπικός έλεγχος με το ΜΗΤ ήταν θετικός για την παραγωγή καρβαπενεμάσης και το τεστ συνδιασμένων δισκίων ενδεικτικό παραγωγής καρβαπενεμάσης τάξης Β. Με εξαίρεση επτά στελέχη, τα υπόλοιπα έδιναν θετικό το τροποποιημένο CLSI-ESBL τεστ και θεωρήθηκε ότι εκφράζουν μια ESBL τύπου β-λακταμάση. Το γονίδιο NDM-1 ανιχνεύθηκε σε όλα τα στελέχη της συλλογής. Η πλειονότητα των στελεχών έφερε παράλληλα και τα *bla*_{OXA-1}, *bla*_{CTX-M-15} και *bla*_{TEM-1} γονίδια. Η PCR επιβεβαίωσε ότι τα επτά στελέχη με αρνητικό φαινοτυπικό έλεγχο για παραγωγή ESBL δεν έφεραν το *bla*_{CTX-M-15} γονίδιο, από αυτά τέσσερα στελέχη είχαν μόνο το *bla*_{NDM-1} ένζυμο. Τρία επιπλέον στελέχη δεν είχαν το *bla*_{OXA-1} γονίδιο και τέλος ένα στέλεχος έφερε τα *bla*_{NDM-1}, *bla*_{CTX-M-15} και *bla*_{OXA-1} γονίδια αλλά όχι το *bla*_{TEM-1}. Ανάλυση του γενετικού περιβάλλοντος του *bla*_{NDM-1} γονιδίου έδειξε ότι του γονιδίου προηγείτο ένα μη διακεκομμένο IS*Aba*125 στοιχείο ενώ μετά το γονίδιο ακολουθεί το *ble*_{MBL} γονίδιο.

2.2.6. ERIC-PCR, PGFE και MLST.

Η ERIC-PCR και η PFGE ανέδειξαν ότι όλα τα στελέχη ανήκαν σε ένα διακριτό κλώνο A, με μια υποομάδα A1, και διέφεραν από τους γνωστούς προϋπάρχοντες KPC, VIM, KPC/VIM κυκλοφορούντες κλώνους (Εικόνα 18). Η MLST συγκεκριμένων στελεχών και από τις δύο επιδημίες, συμπεριλαμβανομένου και των στελεχών προερχόμενων από την κοινότητα αντιστοίχησε τα στελέχη στο τύπο ST11.



Εικόνα 18. PFGE κλωνικοί τύποι και υπότυποι των *Xba*I-επεξεργασμένων DNA των *K. pneumoniae* στελεχών της μελέτης. Στήλες 2-5, 9-10, 14, 16, 18-20: επιδημικά NDM-1-θετικά στελέχη *K.pneumoniae*, στήλες 6, 11-13: χαρακτηριστικά αρχαικά VIM-1-θετικά στελέχη *K.pneumoniae*, στήλες 17, 21: χαρακτηριστικά αρχαικά KPC-2-θετικά στελέχη *K.pneumoniae*, στήλη 15: KPC-2 and VIM-1-θετικά *K.pneumoniae*. Στήλες M: Δείκτης μοριακού βάρους (multimers of phage lambda DNA (48.5 kb) molecular mass marker).

2.2.7. Πειράματα βακτηριακής σύζευξης και πλασμιδιακή ανάλυση.

Τα πειράματα βακτηριακής σύζευξης πραγματοποιήθηκαν με τα στελέχη KP36, KP37, KP39, KP48 που έφεραν όσον αφορά την αντοχή στα β-λακταμικά αντιβιοτικά μόνο το *bla*_{NDM-1} γονίδιο και τα στελέχη KP38 και KP41 που έφεραν το *bla*_{NDM-1} και το *bla*_{OXA-1} γονίδιο. Μεταφορά της αντοχής στις καρβαπενεμάσες επιτεύχθηκε μόνο με το στέλεχος KP36 με πάρα πολύ χαμηλή συχνότητα $\sim 1,3 \times 10^{-7}$ διασυζευτικά στελέχη ανά κύτταρο δότη. Ανάλυση των διασυζευτικών στελεχών ανέδειξε ότι προσέλαβαν το *bla*_{NDM-1} γονίδιο (Πίνακας 26). Παράλληλα έγινε μεταφορά και της αντοχής στην αμικασίνη. Η πλασμιδιακή ανάλυση έδειξε ότι το *bla*_{NDM-1} γονίδιο φέρεται επί ενός πλασμιδίου μεγέθους ~ 95 kbp και ανήκει στο στενού εύρους ξενιστή IncFII γκρουπ ασυμβατότητας.

Πίνακας 26. Ευαισθησία στα αντιβιοτικά του στελέχους KP36, του χαρακτηριστικού του διασυζευκτή που φέρει το pNDM-1 και του δέκτη *E.coli* 26R793.

Antibiotic	<i>K. pneumoniae</i> clinical isolate KP36	Tes <i>E. coli</i> 26R793 (pNDM-1)	<i>E. coli</i> 26R793 (lac ⁻ , Rif ^R)
Imipenem	>32	12	0.25
Meropenem	>32	3	0.03
Ertapenem	>32	4	0.06
Aztreonam	0.5	0.12	0.12
Cefotaxime	>64	>64	0.12
Cefepime	>32	2	0.12
Ceftazidime	>64	>64	1
Cefoxitin	>64	>64	4
Amoxicillin	>32	>32	4
Amoxicillin/clavulanate	>32	>32	4
Piperacillin/tazobactam	>128	>128	1
Tigecycline	0.25	0.064	0.12
Colistin	0.25	0.12	0.12
Ciprofloxacin	>32	0.06	0.06
Amikacin	>32	16	2
Gentamicin	>32	0.5	0.25

2.2.ΟΧΑ-48 Καρβαπενεμάση

2.2.1. Βακτηριακά στελέχη και ασθενείς.

Συνολικά ελέγχθηκαν 13 στελέχη *K.pneumoniae* ανθεκτικά στην ερταπενέμη (MIC>1mg/L) με φαινοτυπικά τεστ θετικά για την παραγωγή καρβαπενεμάσης και αρνητικά τεστ για την παραγωγή καρβαπενεμασών τάξης A και B. Τα στελέχη απομονώθηκαν από 9 ασθενείς σε μια περίοδο 4 μηνών από Δεκέμβριο 2011- Μάρτιο 2012. Οι ασθενείς νοσηλεύτηκαν σε πέντε διαφορετικές κλινικές, με ηλικίες που κυμαίνονταν από 35-89 έτη και δεν ανέφεραν ιστορικό μετανάστευσης ή ταξιδιωτικό ιστορικό σε περιοχές με διασπορά των ΟΧΑ-48-like ενζύμων. Όλοι οι ασθενείς είχαν λάβει πρότερες αντιβιοτικές αγωγές που περιλάμβαναν σιπροφλοξασίνη, τρίτης και τέταρτης γενιάς κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες, κλινδαμυκίνη και αζτρεονάμη. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών συνοψίζονται στον Πίνακα 27

Πίνακας 27 .Χαρακτηριστικά των ασθενών που μολύνθηκαν με *bla*OXA48 θετικά στελέχη *K.pneumoniae*.

Patient	Isolate no.	Site of isolation	Ward	Reason for hospitalization	Underlying disease/predisposing factor	Status	Antibiotic Regimen Administered	Patient Outcome
1	K1	Blood	Card-	Arrhythmia	Aortic valve stenosis, MDS	BSI	Imipenem/colistin/tigecycline	Deceased
	K2	Blood	Gen-ICU					
2	K3	CVC ^a	Cardiology	Arrhythmia	DVT	Col	None	Improved
	K4	Wound	Surgical	GSI haemorrhage	Gastrointestinal cancer	STI	Tigecycline	Improved
3	K5	Wound	Surgical					
		K6	Wound	Surgical				
4	K7	CVC	Cardiology	Endocarditis	Prosthetic valve	Col	None	Deceased
5	K8	Blood	Card-ICU	Arrhythmia	Cardiac arrest	BSI	Imipenem/colistin/tigecycline	Deceased
6	K9	Blood	Gen-ICU	Head Trauma	None	BSI	Amikacin	Improved
7	K10	Blood	Card-ICU	Cardiac arrest	None	BSI	Amikacin/tigecycline	Deceased
8	K11	Blood	Gen-ICU	Trauma	None	BSI	Imipenem/colistin/tigecycline	Improved
9	K12	CVC	Medical	Pneumonia	Infection	Col	None	Deceased
	K13	Ulcer	Medical					

^aCVC, central venous catheter; MDS, myelodysplastic syndrome; DVT, deep vein thrombosis; Card-ICU, cardiology ICU ; Gen-ICY, general ICU; GSI-haemorrhage, gastrointestinal haemorrhage;BSI, blood stream infection; STI, soft tissue infection; Col, colonization

2.2.2. Περιγραφή επιδημίας.

Το αρχικό στέλεχος K1 απομονώθηκε από ασθενή της καρδιολογικής ΜΕΘ την 18^η μέρα της νοσηλείας της. Λόγω επιδείνωσης της κλινικής της εικόνας έγινε μεταφορά της ασθενούς στην γενική ΜΕΘ. Πιθανώς το γεγονός αυτό συντέλεσε και στην εισαγωγή του συγκεκριμένου παθογόνου στο περιβάλλον της γενικής ΜΕΘ. Οι ασθενείς από τους οποίους απομονώθηκαν τα υπόλοιπα στελέχη είχαν σε κάποιο σημείο της νοσηλείας τους μεταφερθεί στην καρδιολογική ή γενική ΜΕΘ ή είχαν ταυτόχρονη νοσηλεία στην καρδιολογική ΜΕΘ με την αρχική ασθενή.

Ο ασθενής P9 αναγνωρίστηκε περίπου 1 μήνα μετά τον περιορισμό της αρχικής επιδημίας στην παθολογική κλινική. Επρόκειτο για μεταφορά από μονάδα φροντίδας ηλικιωμένων και δεν κατέστη δυνατό να βρεθεί σχέση με τους ασθενείς της προηγούμενης επιδημίας.

Τα στελέχη απομονώθηκαν 3-28 μέρες μετά την εισαγωγή των ασθενών και χαρακτηρίστηκα ενδονοσοκομειακά. Εκτός από τον ασθενή P9, επιπλέον τρεις ασθενείς συμπεριλαμβανομένου και του αρχικού P1 είχαν ιστορικό επανεισαγωγής ή νοσηλείας σε άλλο νοσοκομειακό ίδρυμα ή σε μονάδα φροντίδας ηλικιωμένων μέσα στο προηγούμενο έτος.

2.2.3. Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας.

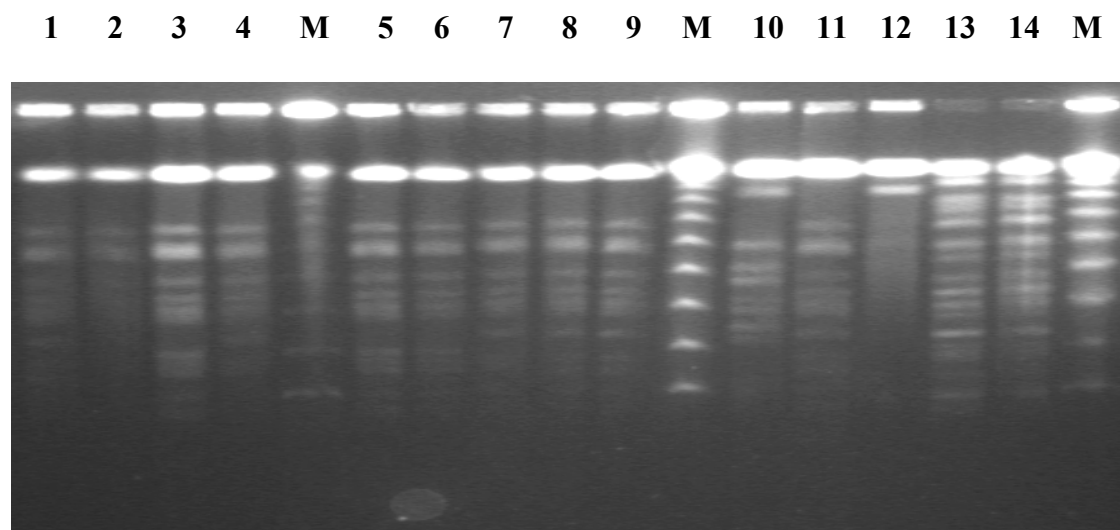
Όλες οι *K.pneumoniae* εμφάνιζαν αντοχή στις πενικιλίνες, στις κεφαλοσπορίνες εκτεταμένου φάσματος, στην αζτρεονάμη, σιπροφλοξασίνη, γενταμυκίνη, τριμεθοπρίμη-σουλφομεθοξαζόλη ενώ είχαν ετερογενή προφίλ αντοχής στις καρβαπενέμες. Οι MIC στην ερταπενέμη κυμαίνονταν από 4-12 mg/L. Αξίζει να σημειωθεί ότι ενώ τα στελέχη K1-K6 και K8-K11 ήταν είτε ευαίσθητα είτε ενδιάμεσα ευαίσθητα στην ιμιπενέμη και ευαίσθητα στην μεροπενέμη, τα K12 και K3 ήταν ανθεκτικά και στις δύο καρβαπενέμες όπως και το K7 που εμφάνιζε και μια ελαφρώς μεγαλύτερη αντοχή στην ερταπενέμη (MIC 12 mg/L) (Πίνακας 28).

2.2.4. Αποτελέσματα φαινοτυπικού και μοριακού ελέγχου.

Το τροποποιημένο CLSI ESBL τεστ ήταν ενδεικτικό παραγωγής ευρέως φάσματος β-λακταμάσης και η μοριακή διερεύνηση ανέδειξε την παρουσία σε όλα τα στελέχη του *bla*_{OXA-48} γονιδίου καθώς και του *bla*_{OXA-1} και του *bla*_{CTX-M-15}. Η ανάλυση του γενετικού περιβάλλοντος του OXA-48 γονιδίου πιστοποίησε την παρουσία του IS1999 πριν το γονίδιο, σχηματίζοντας το μεταθετό στοιχείο Tn1999. Η ανάλυση αλληλουχιών των γονιδίων των μεμβρανικών πρωτεϊνών *ompK35* και *ompK36* δεν ανέδειξε μεταλλάξεις σχετιζόμενες με προβλήματα διαβατότητας.

2.2.5. PFGE, MLST, πειράματα σύζευξης και πλασμιδιακή ανάλυση.

Η PFGE ομαδοποίησε τα στελέχη σε ένα διακριτό κλώνο, με δύο υπότυπους (Ia και Ib), διαφορετικό από τους γνωστούς κυκλοφορούντες κλώνους KPC και KPC/VIM του συγκεκριμένου νοσοκομειακού ιδρύματος (Εικόνα 19). Η MLST αντιστοίχησε τα στελέχη στο ST11.



Εικόνα 19.PFGE κλωνικοί τύποι των OXA-48 *K. pneumoniae* στελεγχών σε σχέση με αντιπροσωπευτικά στελέχη *K.pneumoniae* της ίδιας περιόδου. Στήλες 1-9 : K1, K3, K4, K6- K12, Στήλη 11: K12, Στήλη 10 : KPC/VIM στέλεχος; Στήλη 13-14 : KPC στελέχη. Στήλες M: Δείκτης μοριακού βάρους (multimers of phage lambda DNA (48.5 kb) molecular mass marker).

Η πλασμιδιακή ανάλυση έδειξε την ύπαρξη δύο μεγάλων πλασμιδίων ~140kb και ~62kb καθώς και 2-3 μικρότερου μεγέθους από 2-7kb. Τα πειράματα σύζευξης μετέφεραν επιτυχώς την αντοχή στις καρβαπενέμες με υψηλή συχνότητα. Ανεξαρτήτως δότη οι δέκτες εμφάνιζαν παρεμφερείς ευαισθησίες στα β-λακταμικά αντιβιοτικά (Πίνακας 28). Οι διασυζευκτές προσλάμβαναν μόνο το *bla*_{OXA-48} γονίδιο επί του 62kb πλασμιδίου της τάξης IncL/M.

Πίνακας 28. Προφίλ ευαισθησίας στελεχών *K.pneumoniae* OXA-48 θετικών, διασυζευκτών και του δέκτη *E.coli* 20R793.

Antibiotic	MIC (mg/L)				
	<i>K.pneumoniae</i> K1-K6 K8-K11	<i>K.pneumoniae</i> K7	<i>K.pneumoniae</i> K12-K13	Tcs <i>E.coli</i> 26R793 (K1/K3/K4/K7/K12) (pOXA-48)	<i>E.coli</i> 20R793
Imipenem	0.75-2	6	4	0.75-1	0.12
Meropenem	1	8	4-8	0.19-1	0.06
Ertapenem	4-6	12	6	1.5-2	0.06
Aztreonam	>256	>256	>256	0.064	0.064
Cefepime	32->128	>128	32-64	0.25-0.38	0.25
Ceftazidime	>256	>256	>256	0.125-0.38	0.125
Cefoxitin	8-16	16	8	1-2	1
Amoxicillin	>256	>256	>256	>256	4
Amoxicillin/clavulanate	>256	>256	>256	>256	4
Piperacillin/tazobactam	>256	>256	>256	64->256	2
Tigecycline	0.5-2	1	1	0.125	0.125
Colistin	0.5-2	1	1	0.5	0.5
Ciprofloxacin	>4	>4	>4	0.03	0.03
Amikacin	2	2	2	2	2
Gentamicin	>32	>32	>32	1	1
Cotrimoxazole	>32	>32	>32	0.13-0.25	0.13-0.25

2.3.ΟΧΑ-162 Καρβαπενεμάση

2.3.1. Βακτηριακά στελέχη, έλεγχος ευαισθησίας και φαινοτυπικός έλεγχος.

Ασθενής 57 ετών προσήλθε τον Ιανουάριο 2010 στα τακτικά εξωτερικά ιατρεία του νοσοκομείου Σερρών λόγω δυσουρικών ενοχλημάτων. Από την καλλιέργεια ούρων απομονώθηκε στέλεχος *K.pneumoniae* με αντοχή στις πενικιλίνες και στους συνδιασμούς τους με αναστολείς, στις εκτεταμένου φάσματος κεφαλοσπορίνες, κεφαμυκίνες και στις καρβαπενέμες (MIC ιμιπενέμη 4 mg/L, μεροπενέμη 2 mg/L, ερταπενέμη 8 mg/L), ενώ παρέμενε ευαίσθητο στην αζτρεονάμη. Παράλληλα το στέλεχος παρουσίαζε αντοχή στην σιπροφλοξασίνη, τριμεθοπρίμη-σουλφομεθοξαζόλη, τετρακυκλίνη και τομπραμυκίνη.

Ο αρχικός φαινοτυπικός έλεγχος με το ΜΗΤ με δίσκο ερταπενέμης ήταν ενδεικτικός παραγωγής καρβαπενεμάσης, ενώ και τα τεστ συνδιασμένων δισκίων αρνητικά για παραγωγή καρβαπενεμάσης τάξης Α ή Β. Καθώς το τροποποιημένο CLSI-ESBL τεστ ήταν αρνητικό, θεωρήθηκε ότι το στέλεχος δεν εκφράζει ESBL τύπου β-λακταμάση. Τα φαινοτυπικά τεστ για την ανίχνευση AmpC β-λακταμασών με υποστρώματα την κεφοταξίμη και κεφοτετάνη και αναστολείς PBA και κλοξασιλλίνη ήταν θετικά, ενώ παρατηρήθηκε και φαινόμενο επαγωγής του ενζύμου μεταξύ των δισκίων κεφοξιτίνης και κεφοταξίμης και κεφοταξιδίμης Εικόνα 20.



Εικόνα 20. Επαγωγή του ενζύμου και επιπέδωση της ζώνης της κεφοταξίμης.

Η ασθενής έλαβε εμπειρική αγωγή με κεφουροξίμη και μετά από 41 μέρες προσήλθε εκ νέου λόγω επιμονής των δυσουρικών της συμπτωμάτων. Από την καλλιέργεια ούρων απομονώθηκε *K.pneumoniae* με τα ίδια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά με το προηγούμενο στέλεχος και τον ίδιο φαινότυπο αντοχής. Χορηγήθηκε μονοθεραπεία με αμικασίνη.

Η ασθενής προσήλθε στα τακτικά εξωτερικά ιατρεία μετά από χρονικό διάστημα 2,5 ετών με δυσουρικά ενοχλήματα. Από την καλλιέργεια ούρων απομονώθηκε στέλεχος *K.pneumoniae* με αντοχή στις πενικιλίνες και στους συνδιασμούς τους με αναστολείς, στις κεφαμυκίνες ενώ παρέμενε ευαίσθητο στις καρβαπενέμες (MIC ιμιπενέμη 0,75 mg/L, μεροπενέμη 0,5 mg/L, ερταπενέμη 0,38 mg/L) και στην αζτρεονάμη. Παράλληλα παρουσίαζε αντοχή στην σιπροφλοξασίνη, τριμεθοπρίμη-σουλφομεθοξαζόλη, τετρακυκλίνη και τομπραμυκίνη. Ο αρχικός φαινοτυπικός έλεγχος με το MHT, το τεστ συνδιασμένων δισκίων για παραγωγή καρβαπενεμάσης τάξης A ή B και το τροποποιημένο CLSI-ESBL τεστ ήταν αρνητικά. Τα φαινοτυπικά τεστ για την ανίχνευση AmpC β-λακταμασών με υποστρώματα την κεφοταξίμη και κεφοτετάνη και αναστολείς PBA και κλοξασιλίνη και το φαινόμενο επαγωγής του ενζύμου μεταξύ των δισκίων κεφοξιτίνης και κεφοταξίμης, κεφταζιδίμης παρέμεναν θετικά.

2.3.2. Αποτελέσματα μοριακού ελέγχου.

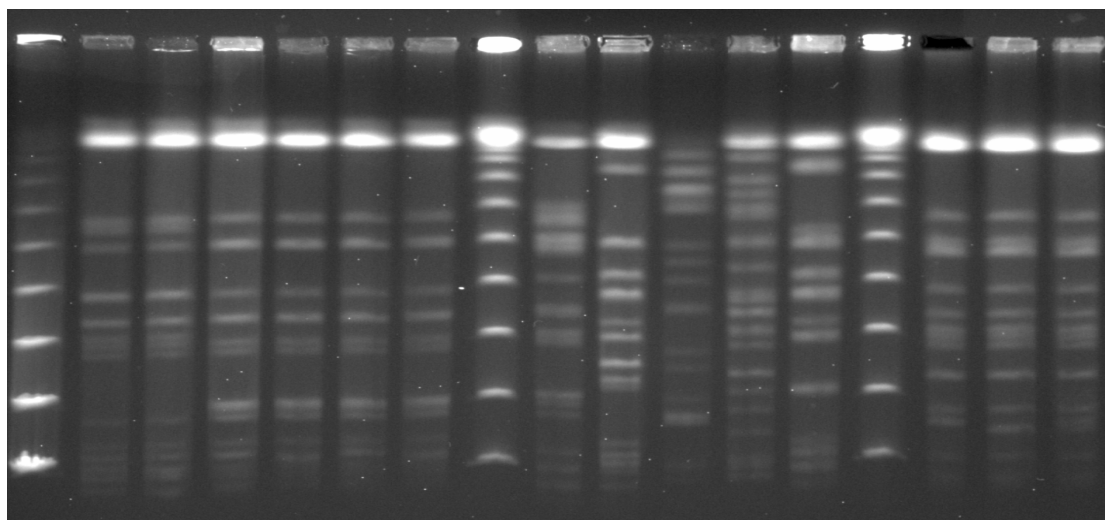
Η μοριακή διερεύνηση ανέδειξε την παρουσία του *bla*_{OXA-162} γονιδίου καθώς και του *bla*_{OXA-1} και του *bla*_{DHA-1} στα δύο αρχικά στελέχη ενώ το τελευταίο στέλεχος δεν έφερε το *bla*_{OXA-162} γονίδιο. Η μελέτη του γενετικού περιβάλλοντος του OXA-162 γονιδίου πιστοποίησε την παρουσία του IS1999 πριν το γονίδιο, σχηματίζοντας το μεταθετό στοιχείο Tn1999. Η ανάλυση αλληλουχιών των γονιδίων των μεμβρανικών

πρωτεϊνών *ompK35* και *ompK36* και στα τρία στελέχη δεν ανέδειξε μεταλλάξεις σχετιζόμενες με προβλήματα διαβατότητας.

2.3.3. MLST, PFGE, πειράματα σύζευξης και πλασμιδιακή ανάλυση.

Η MLST αντιστοίχησε τα στελέχη στο ST11. Η PFGE ομαδοποίησε τα στελέχη σε ένα διακριτό κλώνο, παράλληλα έγινε συγκριτική εκτίμηση με αρχαιακά στελέχη ST11, συγκεκριμένα τα στελέχη των δύο προηγούμενων επιδημιών φέροντα τα *bla*_{NDM-1} και *bla*_{OXA-48} και παρατηρήθηκε ότι ανήκουν σε συγγενικούς υπότυπους (Εικόνα 21). Η πλασμιδιακή ανάλυση έδειξε την ύπαρξη δύο μεγάλων πλασμιδίων ~140kb και ~62kb καθώς και ενός μικρότερου μεγέθους 2kb στα δύο πρώτα στελέχη, ενώ στο τελευταίο απουσίαζε το 62kb πλασμίδιο. Τα πειράματα σύζευξης που πραγματοποιήθηκαν και με τα τρία στελέχη, με δέκτη το *E.coli* 26R793 (*lac*⁻, Rif^R) και έλεγχο σε τρυβλία MC με αμπικιλίνη (100mg/L) δεν οδήγησαν στην δημιουργία διασυζευκτών.

M 1 2 3 4 5 6 M 7 8 9 10 11 M 12 13 14



Εικόνα 21. Συγκριτική εκτίμηση στελεχών *K.pneumoniae* με NDM-1, OXA-48 και OXA-162 καρβαπενεμάσες και χαρακτηριστικών αρχαιακών στελεχών (KPC, VIM, KPC/VIM) καθώς και του στελέχους DHA-1. Στήλες 1-2 : NDM-1, στήλες 3-5: OXA-162, στήλη 6: DHA-1 στέλεχος, στήλη 7: OXA-48 θετικό στέλεχος ελέγχου

NZTCC 13442, στήλη 8 KPC/VIM, στήλη 9 KPC/VIM/OXA-48/OXA-162 αρνητικό στέλεχος, στήλη 10 KPC, στήλη 11 VIM και στήλες 12-14 OXA-48. Στήλες M: Δείκτης μοριακού βάρους (multimers of phage lambda DNA (48.5 kb) molecular mass marker).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η συνύπαρξη β-λακταμασών αποτελεί μια από τις τρέχουσες διαγνωστικές προκλήσεις στο χώρο της εργαστηριακής μικροβιολογίας. Δεδομένου ότι η ταυτόχρονη έκφραση τέτοιων ενζύμων αποτελεί πλέον ένα καθεστώς στην καθημερινή εργαστηριακή ιατρική κρίνεται επιτακτική η ανάγκη θεμελίωσης διαδικασιών και μεθόδων που να προσφέρουν αξιόπιστους και αποτελεσματικούς τρόπους ανίχνευσης και τυποποίησης αυτών των ενζύμων. Οι AmpC και οι ESBL β-λακταμάσες αποτελούν μια από τις συνιστώσες που χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης (Pitout et al., 2010; Poulou et al., 2014).

Όσον αφορά τις AmpC β-λακταμάσες η εκτίμηση της μειωμένης ευαισθησίας ή αντοχής στην FOX και μόνο, σε περιοχές όπου ένζυμα όπως η ACC-1 δεν είναι ενδημικά αποτελεί ένα επαρκή προγνωστικό δείκτη για την πιθανή παρουσία αυτών των ενζύμων. Οι μοριακές τεχνικές διάγνωσης παραμένουν το gold standard, όμως η εφαρμογή τους δεν είναι εύκολη καθώς απαιτεί πόρους και εξειδικευμένο προσωπικό (Zahar et al., 2009). Αντιθέτως η χρήση μεθόδων που βασίζονται σε αναστολείς των ενζύμων και είναι εύκολα εφαρμόσιμες αλλά και οικονομικές αποτελεί μια ρεαλιστική προοπτική.

Επιχειρήθηκε η συγκριτική εκτίμηση των διαθέσιμων από την βιβλιογραφία αναστολέων (CLOX, PBA και APBA) καθώς και ενός επιπλέον παραγώγου, του APA, επί τεσσάρων υποστρωμάτων (FOX, CTT, CAZ και CTX) για στελέχη που έφεραν πλασμιδιακές AmpC β-λακταμάσες με ή χωρίς ταυτόχρονη παραγωγή ESBL και VIM/OXA-162 καρβαπενεμασών (Coudron, 2005; Peter-Getzlaff et al., 2011; Polsfuss et al., 2011; Tan et al., 2009; Yagi et al., 2005). Θέτοντας ως κριτήριο για θετικό αποτέλεσμα μια αύξηση $\geq 5\text{mm}$ στην ζώνη αναστολής σε κάθε υπόστρωμα όπως προκύπτει μετά την προσθήκη του αναστολέα, παρατηρήθηκε ότι ο συνδιασμός

της FOX και του APA ως αναστολέα, ανεξάρτητα από την παρουσία επιπλέον λακταμασών, επέτρεπε την αναγνώριση του μεγαλύτερου αριθμού AmpC θετικών στελεχών (57/59). Τα δύο στελέχη στα οποία δεν παρατηρήθηκε αύξηση της διαμέτρου αναστολής $\geq 5\text{mm}$ αφορούσαν μία *K.pneumoniae* με CMY-2, CTX-M-15 και VIM και ένα *E.coli* με CMY-2. Όσον αφορά το πρώτο στέλεχος κανένας συνδιασμός δεν έδωσε φαινοτυπική θετική δοκιμασία ενώ για το δεύτερο με την χρήση της FOX και των CLOX, PBA και APBA οι δοκιμασίες ήταν θετικές. Στην παρούσα μελέτη δεν επιβεβαιώθηκαν τα υψηλά ποσοστά ευαισθησίας με την χρήση της CTT σε σχέση με την FOX που σημειώνονται σε άλλες εργασίες (Pitout et al., 2010). Το γεγονός αυτό ενδέχεται να οφείλεται σε δύο βασικές παραμέτρους, καταρχάς τα διαφορετικά AmpC ένζυμα που έχουν περιληφθεί στην κάθε εργασία, δεδομένου ότι η μεγάλη ευαισθησία της CTT αφορά συλλογές κυρίως με CMY-like ένζυμα και το γεγονός ότι σημαντικό ποσοστό των στελεχών της παρούσας μελέτης ήταν μετρίως ευαίσθητα ή ευαίσθητα στην CTT (41/59). Εκκρεμεί η συγκριτική εκτίμηση της ειδικότητας, ευαισθησίας, PPV και NPV με την εφαρμογή σε στελέχη που δεν φέρουν πλασμιδιακές AmpC για την τελική ολοκληρωμένη εκτίμηση της μεθόδου.

Όσον αφορά την ανίχνευση ESBL ενζύμων, στην παρούσα εργασία, το CLSI ESBL τεστ με την εκτίμηση της CTX και της CAZ πέτυχε να ανιχνεύσει σωστά 85,7% (50/59) στελέχη που παρήγαγαν ESBL β-λακταμάσες ταυτόχρονα με τις πλασμιδιακές AmpC β-λακταμάσες. Στην περίπτωση κατά την οποία δεν γινόταν ταυτόχρονη εκτίμηση και των δύο υποστρωμάτων η ευαισθησία της μεθόδου παρουσίαζε σημαντική πτώση, δίνοντας ποσοστά της τάξης του 74,3% και 28,6% για την CAZ και την CTX, ανάλογα με το ESBL ένζυμο που παρήγαγαν τα στελέχη. Η μεγαλύτερη ευαισθησία με την CAZ, είναι αναμενόμενη δεδομένου ότι η

πλειονότητα των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν παράγουν SHV-τύπου β-λακταμάσες, είναι όμως και ενδεικτική της αναγκαιότητας συνεκτίμησης και των δύο υποστρωμάτων υδρόλυσης.

Με την εφαρμογή του τροποποιημένου CLSI ESBL τεστ εκτός από την συγκριτική εκτίμηση με το κλασσικό CLSI ESBL τεστ έγινε και παράλληλη μελέτη της αποδοτικότητας τεσσάρων αναστολέων (CLOX, PBA, APBA και APA). Συγκριτικά με το κλασσικό CLSI ESBL τεστ, το τροποποιημένο υπερείχε σημαντικά σε ευαισθησία, ειδικότητα, PPV και NPV με την χρήση της CLOX, του PBA και του APBA. Συνολικά καλύτερα αποτελέσματα επιτεύχθηκαν με την χρήση του PBA με την ευαισθησία της μεθόδου να αγγίζει το 100% με ειδικότητα 75%. Στην περίπτωση του APBA δεν υπήρχε καμία διαφορά στην απόδοση της μεθόδου μεταξύ των δύο συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν (300μg και 600μg αντίστοιχα), γεγονός που είναι ενδεικτικό του ότι το τεστ αποδίδει εξίσου καλά και σε μικρή συγκέντρωση του αναστολέα σημειώνοντας ευαισθησία και ειδικότητα 97,1% και 72,7% και στις δύο συγκεντρώσεις. Το APA αποτυγχάνει να λειτουργήσει ικανοποιητικά στο τροποποιημένο CLSI ESBL τεστ δίνοντας χαμηλή ευαισθησία στην μέθοδο (54,3%) λόγω πιθανώς της μεγαλύτερης αναστολής του AmpC ενζύμου που επιτυγχάνεται.

Όσον αφορά τα ένζυμα τα οποία ανιχνεύθηκαν η νουκλεοτιδική αλληλούχιση επιβεβαίωσε την διασπορά προϋπαρχόντων γνωστών πλασμιδικών AmpC για τον Ελλαδικό χώρο, επιτεύχθηκε όμως και η ταυτοποίηση νεότερων νέο-εισαχθέντων γονιδίων. Επικρατέστερο ένζυμο αποτέλεσε η MOX-2 β-λακταμάση του *Aeromonas* γκρουπ σε στελέχη *K.pneumoniae* και *E.coli*, και ακολούθως η CMY-2 σε στελέχη *E.coli* και ένα στέλεχος *P.mirabilis*. Σε μικρότερη συχνότητα βρέθηκαν η CMY-4, CMY-13 και CMY-31 που έχουν ανευρεθεί στο παρελθόν στην Ελληνική επικράτεια

καθώς και τρία πρωτοεμφανιζόμενα στην περιοχή ένζυμα η DHA-1 και δύο νεότερες β-λακταμάσες μια CMY-4-like και μία MIR-2-like.

Οι καρβαπενέμες αποτελούν τον δεύτερο άξονα της παρούσας εργασίας. Η τάξη αυτή των β-λακταμικών αντιβιοτικών είναι πλέον μια 'έσχατη' λύση για την αντιμετώπιση λοιμώξεων από στελέχη τα οποία εκφράζουν φαινότυπο αντοχής σε πολλαπλές τάξεις αντιβιοτικών (Nordmann et al., 2012a). Η αποτελεσματικότητά τους όμως έχει υποστεί την τελευταία δεκαετία ένα σοβαρό πλήγμα λόγω της εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών περιορίζοντας δραστικά την θεραπευτική τους χρησιμότητα (Cantón et al., 2012; Nordmann et al., 2012a). Η αντοχή αυτή, για την οικογένεια των Εντεροβακτηριακών, έχει συνδεθεί κυρίως με την απόκτηση συγκεκριμένων γονιδίων υπεύθυνων για την παραγωγή ενζύμων με υδρολυτική δραστηριότητα έναντι της τάξης, καθώς και δευτερευόντως με ελαττωμένη πρόσληψη των αντιβιοτικών λόγω ταυτόχρονης συνύπαρξης προβλημάτων διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης σε συνδιασμό με την παρουσία ESBL β-λακταμασών ή με την υπερέκφραση AmpC β-λακταμασών (Cornaglia and Rossolini, 2010; Nordmann et al., 2012a; Poirel et al., 2012). Οι καρβαπενεμάσες έχουν ομαδοποιηθεί με βάση στην ομοιογένεια τους όσον αφορά την δομή και τις αλληλουχίες τους, σε τρεις βασικές ομάδες A, B και C κατά Ambler, με τα KPC, VIM, NDM, IMP και OXA-48-like ένζυμα να εμφανίζουν παγκόσμια διασπορά (Ambler, 1980; Bush et al., 1995; Queenan and Bush, 2007).

Όσον αφορά το μέτωπο των NDM τύπου ενζύμων η σταδιακή επιτυχής διασπορά τους αποτελεί αυτή την στιγμή ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα στην αντιμετώπιση στελεχών με αντοχή στις καρβαπενέμες (Bushnell et al., 2013; Johnson and Woodford, 2013; Nordmann et al., 2011b; Patel and Bonomo, 2013). Η αρχική ανίχνευση του ενζύμου το 2008, σε δείγμα ούρων Σουηδού ασθενή, έπειτα από

νοσηλεία στην Ινδία σηματοδότησε την επιτυχή πορεία του ενζύμου (Yong et al., 2009).

Οι αντιδράσεις που σημειώθηκαν λόγω του συσχετισμού του ενζύμου με την Ινδική-Πακιστανική χερσόνησο και η επιλογή του ονόματος με αναφορά στην περιοχή, (New Delhi Metallo β-lactamase -NDM), δεν μπόρεσαν να κλονίσουν την σαφή επιδημιολογική προέλευση του ενζύμου (Bushnell et al., 2013; Johnson and Woodford, 2013; Kumarasamy et al., 2010). Η ινδική χερσόνησος προσφέρει ένα ιδιαίτερα πρόσφορο περιβάλλον για την ανάδυση νέων γονιδίων αντοχής καθώς συγκεντρώνει ένα σύνολο παραγόντων όπως υποτυπώδεις αποχετευτικές υποδομές, απουσία καθαρού πόσιμου νερού, τριτοκοσμικές συνθήκες διαβίωσης και κατάχρηση κατανάλωσης αντιβιοτικών (Walsh and Toleman, 2012; Walsh et al., 2011). Η περιοχή των Βαλκανίων αποτέλεσε μια δεύτερη περιοχή που έχριζε ιδιαίτερης προσοχής καθώς υπήρχαν ενδείξεις που συνέκλιναν προς την κατεύθυνση ότι υπέκρυπτε ένα δεύτερο θύλακα διασποράς (Bogaerts et al., 2011; Göttig et al., 2010; Johnson and Woodford, 2013; Nordmann et al., 2011a; Poirel et al., 2014; Struelens et al., 2010).

Αναφορές πάντως σημειώνουν τον επιπολασμό των γονιδίων αυτών στην κοινότητα με συνέπεια η παγκόσμια διασπορά τους να σχετίζεται όχι μόνο με περιπτώσεις ιατρικού τουρισμού αλλά και με ταξίδια τουριστικού ενδιαφέροντος (van der Bij and Pitout, 2012; Bushnell et al., 2013; Kumarasamy et al., 2010; Poirel et al., 2010b). Οι δύο επιδημίες που αναφέρουμε στην Ελλάδα, διαφέρουν από τις προηγούμενες αναφορές του Ευρωπαϊκού χώρου, καθώς δεν τεκμηριώθηκε η εισαγωγή του γονιδίου με την μεταφορά ασθενών από ενδημικές περιοχές (Bogaerts et al., 2011; Bushnell et al., 2013; Kumarasamy et al., 2010; Nordmann et al., 2011b). Επίσης η ύπαρξη περιστατικών με σαφή προέλευση από την κοινότητα ενισχύει την άποψη που

πρεσβεύει την ύπαρξη μιας λανθάνουσας εστίας που συντηρεί την αυτόχθονα πρόσληψη και διασπορά του γονιδίου κυρίως δεδομένου ότι ασυμπτωματικοί εποικισμοί μπορούν να έχουν πολύμηνη διάρκεια (D'Andrea et al., 2011; Denis et al., 2012; Johnson and Woodford, 2013).

Μέχρι σήμερα τα στελέχη *K.pneumoniae* που έχουν απομονωθεί από τις λοιπές βαλκανικές χώρες ανήκουν στο ST15 που αποτελεί μια SLV (single locus variant) των ST14 και ST25 (Bogaerts et al., 2011; Halaby et al., 2012; Mazzariol et al., 2012; Poirel et al., 2011c). Οι αναφορές από τον υπόλοιπο Ευρωπαϊκό χώρο εμπλέκουν μια μεγαλύτερη ποικιλία ST, όπως ST11, ST14, ST15, ST16, ST37, ST147, ST231 και ST340 (Bogaerts et al., 2011; Bushnell et al., 2013; Giske et al., 2012; Poirel et al., 2011a). Παρά το γεγονός για την NDM καρβαπενεμάση δεν έχει χαρακτηριστεί ένας προεξάρχων κλώνος, οι ST11, ST14 και ST147 που αποτελούν επιτυχείς ενδημικούς κλώνους φαίνονται να είναι συχνοί φορείς του ενζύμου (Giske et al., 2012; Johnson and Woodford, 2013; Poirel et al., 2011a).

Η επιτυχής διαδρομή του ST11 στον Ελλαδικό χώρο, όπου έχει πλέον εδραιώσει την παρουσία του ως κυκλοφορούντας κλώνος, ενισχύεται και από την καταγραφή των *K.pneumoniae* στελεχών που φέρουν την OXA-48 και την OXA-162 β-λακταμάση. Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει το γεγονός ότι οι ST11 κλώνοι που μελετήθηκαν παρόλο που φέρουν διαφορετικές καρβαπενεμάσες (NDM, OXA-48 και OXA-162) φάνηκαν μέσω PFGE να έχουν φυλογενετική συγγένεια ανήκοντας σε διαφορετικούς υπότυπους του ίδιου κυκλοφορούντος κλώνου, τονίζοντας την δεκτικότητα του συγκεκριμένου ST στην επιτυχή πρόσληψη και διασπορά νέων γονιδίων αντοχής σε ένα περιβάλλον όπου παρουσιάζεται προϋπάρχουσα ενδημικότητα. Το γεγονός αυτό ενδέχεται να εξηγεί μερικώς γιατί στον υπόλοιπο Ευρωπαϊκό χώρο η OXA-48 β-λακταμάση έχει συνδεθεί κυρίως με άλλα ST (ST496, ST395, ST392, ST152, ST147,

ST101, ST17 και ST14), ενώ με το ST11 μόνο προσφάτως με στελέχη *K.pneumoniae* OXA-48 στην Ισπανία καθώς και με την OXA-181 καρβαπενεμάση (Dimou et al., 2012; Glupczynski et al., 2012; Göttig et al., 2010; Oteo et al., 2013; Pitart et al., 2011; Poirel et al., 2012; Potron et al., 2011b).

Η ανίχνευση της εισαγωγής των νεωτέρων αυτών καρβαπενεμασών (*bla*_{NDM-1}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-162}) στον Ελλαδικό χώρο έρχεται να δώσει έμφαση σε δύο εξαιρετικά σημαντικές παραμέτρους. Καταρχάς στην περίπτωση των NDM-1 *K.pneumoniae* διαφαίνεται η πιθανότητα νέα ένζυμα να σημειώσουν εκτεταμένη διασπορά χωρίς να γίνουν εγκαίρως αντιληπτά σε περιοχές με προϋπάρχουσα ενδημικότητα κυκλοφορούντων καρβαπενεμασών της ίδιας τάξης. Η έγκυρη φαινοτυπική μελέτη, για τα ένζυμα τάξης B κατά Ambler, δίνει πληροφορίες σε σχέση με την τάξη των ενζύμων αλλά αδυνατεί να παράσχει περαιτέρω πληροφορίες σε μοριακό επίπεδο. Επιπλέον, για τις τάξεις D καρβαπενεμάσες οι φαινοτυπικές μέθοδοι ανίχνευσης παραμένουν ανεπαρκείς με συνέπεια τα ένζυμα αυτά να αποτελούν μια ιδιαίτερη διαγνωστική πρόκληση για την οποία απαιτείται η αυξημένη ευαισθητοποίηση των εργαστηρίων ώστε στελέχη με ύποπτα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά να παραπέμπονται για συμπληρωματική διερεύνηση μέσω μοριακών τεχνικών (Poirel et al., 2012).

Στα πλαίσια της επιτυχούς διαχείρισης επιδημιών από στελέχη που εκφράζουν ένζυμα με δυνατότητα υδρόλυσης των καρβαπενεμών η γρήγορη ανίχνευση και ταυτοποίηση αποτελεί ακρογωνιαίο λίθο και οφείλει να είναι προτεραιότητα των διαγνωστικών εργαστηρίων. Οι διαθέσιμες μη μοριακές τεχνικές ανίχνευσης περιλαμβάνουν το ΜΗΤ, την χρήση αναστολέων, την αξιολόγηση της ευαισθησίας στην τεμοσιλλίνη, την σπεκτρο-φωτομετρία, την MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry) και το Carba-NP τεστ (Hrabák et al.,

2012; Nordmann and Poirel, 2013). Ανάλογα με την μέθοδο υπάρχουν και οι αντίστοιχοι περιορισμοί. Το MHT εμφανίζει χαμηλή ευαισθησία όσον αφορά τα NDM στελέχη, η χρήση αναστολέων και οι τεχνικές με βάση την φωτομέτρηση είναι χρονοβόρες και ακριβές, η ειδικότητα της τεμοσιλλίνης είναι υπό εκτίμηση ενώ όσον αφορά το Carba NP παραμένουν προβλήματα σε στελέχη με χαμηλή υδρολυτική ικανότητα και έντονα βλενώδη χαρακτηριστικά (Doyle et al., 2012; Huang et al., 2014; Nordmann and Poirel, 2013; Nordmann et al., 2012b; Tijet et al., 2013). Παράλληλα η ενσωμάτωση μοριακών τεχνικών PCR, που αποτελούν το gold standard του ακριβούς χαρακτηρισμού των καρβαπενεμασών, στην καθημερινή ρουτίνα δεν είναι εύκολα πραγματοποιήσιμη λόγω έλλειψης διαθέσιμων πόρων και εξειδικευμένου προσωπικού (Nordmann and Poirel, 2013).

Μέχρι στιγμής δεν έχει καταστεί δυνατόν να προταθεί ένας πλήρως αποτελεσματικός και οικονομικός αλγόριθμος που να μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία στην πλειονότητα των εργαστηρίων και να επιτρέπει την ανίχνευση όχι μόνο ήδη τυποποιημένων γονιδίων αλλά και νεοεμφανιζόμενων. Στον ήδη επιβαρυσμένο Ελλαδικό χώρο και ειδικά ενόψει της πρόσφατης ανησυχητικής εμφάνισης και νεότερων στελεχών με προέλευση από τα Βαλκάνια που φέρουν πλέον πολλαπλά γονίδια καρβαπενεμασών (NDM-1, OXA-48) κρίνεται επιτακτική αφ' ενός η ανάγκη για επιτυχή διαχείριση και εφαρμογή των υπαρχόντων επιδημιολογικών πρωτοκόλλων και αφ'ετέρου για συνεχή συνεργασία των περιφερειακών εργαστηρίων με τα κέντρα αναφοράς, (Seiffert et al., 2014).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διατριβή περιστρέφεται γύρω από δύο κεντρικούς άξονες, αφενός την καταγραφή και διερεύνηση πλασμιδιακών AmpC β-λακταμασών σε στελέχη εντεροβακτηριακών, τη συγκριτική εκτίμηση της αποτελεσματικότητας διαφόρων αναστολέων στην ανίχνευση τους, την αξιολόγηση ενός τροποποιημένου CLSI ESBL τεστ και αφετέρου την καταγραφή και διερεύνηση νεωτέρων καρβαπενεμασών που έχουν ανιχνευθεί πρόσφατα στην Ελληνική επικράτεια.

Για την μελέτη των πλασμιδιακών AmpC β-λακταμασών έγινε έλεγχος 105 Εντεροβακτηριακών στελεχών (*K.pneumoniae*, *E.coli*, *K.oxytoca*, *P.mirabilis*) με μειωμένη ευαισθησία ή αντοχή στην κεφοξιτίνη (FOX) ή/και στην κεφοτετάνη (CTT) σε συνδιασμό με αντοχή ή μειωμένη ευαισθησία σε μία τουλάχιστον εκτεταμένου φάσματος κεφαλοσπορίνη. Οι πλασμιδιακές AmpC, ESBL και VIM καρβαπενεμάσες ανιχνεύθηκαν με PCR και προσδιορίστηκαν με νουκλεοτιδική αλληλούχιση. Πραγματοποιήθηκαν τεστ ευαισθησίας με την μέθοδο διάχυσης δισκίων, προσδιορισμός MIC ερταπενέμης με Etest και διερεύνηση κλωνικότητας με ERIC-PCR και REP-PCR. Έγινε συγκριτική εκτίμηση τεσσάρων αναστολέων, της κλοξασιλίνης (CLOX), του φαινύλ-βορονικού οξέος (PBA), του 3-ακετύλ-φαινύλ βορονικού οξέος (APA) και του 3-άμινο-φαινύλ βορονικού οξέως (APBA) το τελευταίο σε δύο συγκεντρώσεις με υποστρώματα την FOX, CTT, κεφταζιδίμη (CAZ) και κεφοταξίμη (CTX). Τέλος εκτιμήθηκε ένα τροποποιημένο CLSI ESBL τεστ με την χρήση των προηγούμενων αναστολέων.

Συνολικά βρέθηκαν 59 στελέχη με πλασμιδιακές AmpC β-λακταμάσες, εκ των οποίων 35 έφεραν και ESBL. Η πλειονότητα των στελεχών έφερε την MOX-2 β-λακταμάση και ακολούθως την CMY-2. Σε μικρότερη συχνότητα βρέθηκαν η CMY-4, CMY-13 και CMY-31 καθώς και τρία πρωτοεμφανιζόμενα στην Ελλάδα ένζυμα η DHA-1 και δύο νεώτερες β-λακταμάσες μια CMY-4-like και μία MIR-2-like. Τα

στελέχη *P.mirabilis* ανήκαν σε ένα κλώνο, οι *K.oxytoca* εμφάνιζαν δύο κλώνους με ένα διακριτό υπότυπο, ενώ οι *E.coli* και *K.pneumoniae* διαχωρίστηκαν σε συνολικά 11 και 8 κλώνους αντίστοιχα.

Η FOX υπερτερούσε σε σχέση με την CTT ως αρχικό screening. Όσον αφορά την επιβεβαιωτική φαινοτυπική μέθοδο η FOX σε συνδιασμό με το APBA δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα αναγνωρίζοντας επιτυχώς 57/59 στελέχη. Το τροποποιημένο CLSI ESBL τεστ υπερείχε σημαντικά σε ευαισθησία και ειδικότητα με την χρήση CLOX (91,4%, 75%), PBA (100%, 75%) ή APBA (97,1%, 79,1%) σε σχέση με το κλασσικό CLSI ESBL τεστ (85,7%, 58,3%). Συνολικά καλύτερα αποτελέσματα επιτεύχθηκαν με την χρήση του PBA. Το APA απέτυχε να λειτουργήσει ικανοποιητικά εμφανίζοντας χαμηλή ευαισθησία (54,3%).

Στην περίπτωση των NDM καρβαπενεμασών συνολικά έγινε έλεγχος 132 Εντεροβακτηριακών στελεχών με αντοχή στις καρβαπενέμες που είχαν συλλεχθεί από τον Ιανουάριο 2010 έως τον Ιούνιο 2013, έδιναν θετικό το τροποποιημένο Hodge τεστ (MHT) και τις φαινοτυπικές δοκιμασίες για παραγωγή μέταλλο-β-λακταμάσης (MBL). Συνολικά 78 στελέχη *K.pneumoniae*, που συγκεντρώθηκαν από 71 ασθενείς έφεραν το *bla*_{NDM-1} γονίδιο. Η πλειονότητα των στελεχών ήταν επίσης θετικά και για τα *bla*_{OXA-1}, *bla*_{CTX-M-15} και *bla*_{TEM-1} γονίδια.. Η πλασμιδιακή ανάλυση έδειξε ότι το *bla*_{NDM-1} γονίδιο φέρεται επί ενός πλασμιδίου μεγέθους ~95kbp και ανήκει στο IncFII γκρουπ ασυμβατότητας. Ανάλυση του γενετικού περιβάλλοντος του *bla*_{NDM-1} γονιδίου έδειξε ότι του γονιδίου προηγείτο ένα μη διακεκομμένο IS*Aba125* στοιχείο ενώ μετά το γονίδιο ακολουθεί το *ble*_{MBL} γονίδιο. Η ERIC-PCR και η PFGE ανέδειξαν ότι όλα τα στελέχη ανήκαν σε ένα διακριτό κλώνο A, με μια υποομάδα A1 και η MLST αντιστοιχίσε τα στελέχη στο τύπο ST11. Μεταφορά της αντοχής στις καρβαπενεμάσες επιτεύχθηκε με πάρα πολύ χαμηλή συχνότητα $\sim 1,3 \times 10^{-7}$

διασυζευτικά στελέχη ανά κύτταρο δότη. Παρατηρήθηκαν δύο επιδημίες, η πρώτη από Νοέμβριο-Δεκέμβριο 2011, με 4 εμπλεκόμενους ασθενείς και η δεύτερη με έναρξη το Μάιο 2012 και συνεχιζόμενη, με τα υπόλοιπα περιστατικά. Για δύο ασθενείς θεμελιώθηκε η αυτόχθονος πρόσληψη των στελεχών από την κοινότητα. Δεν βρέθηκαν συνδετικά στοιχεία που να βεβαιώνουν έκθεση των περιστατικών σε ενδημικές περιοχές.

Από τον Δεκέμβριο 2011 έως το Μάρτιο 2012 13 στελέχη *K.pneumoniae* με αντοχή στην ερταπενέμη, με θετικό ΜΗΤ αλλά αρνητικές φαινοτυπικές δοκιμασίες για παραγωγή MBL και KPC τύπου καρβαπενεμασών, απομονώθηκαν από 9 ασθενείς.

Όλα τα στελέχη έφεραν το *bla*_{OXA-48} γονίδιο καθώς και το *bla*_{OXA-1} και *bla*_{CTX-M-15}. Το *bla*_{OXA-48} γονίδιο εντοπίστηκε επί συζευκτικού πλασμιδίου τάξης IncL/M μεγέθους ~62kb. Η ανάλυση του γενετικού περιβάλλοντος πιστοποίησε την παρουσία του IS1999 πριν το γονίδιο, σχηματίζοντας το μεταθετό στοιχείο Tn1999. Η ανάλυση αλληλουχιών των γονιδίων των μεμβρανικών πρωτεϊνών *ompK35* και *ompK36* δεν ανέδειξε μεταλλάξεις σχετιζόμενες με προβλήματα διαβατότητας. Η PFGE ομαδοποίησε τα στελέχη σε ένα διακριτό κλώνο, με δύο υπότυπους (Ia και Ib) και η MLST αντιστόιχησε τα στελέχη στο ST11.

Σε χρονικό διάστημα περίπου ίσο με 2,5 χρόνια και έναρξη το 2010 από τρία δείγματα ούρων ασθενούς, τα δύο πρώτα εκ των οποίων προσκομίσθηκαν με διαφορά 41 ημερών ενώ το τελευταίο μετά από 2,5 χρόνια, απομονώθηκαν στελέχη *K.pneumoniae* με αντοχή στις κεφαμυκίνες και στις εκτεταμένου φάσματος κεφαλοσπορίνες, θετικά φαινοτυπικά τεστ για παραγωγή AmpC β-λακταμάσης και αρνητικό τροποποιημένο CLSI-ESBL τεστ. Τα δύο αρχικά στελέχη παρουσίαζαν επίσης αντοχή στις καρβαπενέμες, θετικό ΜΗΤ και αρνητικά φαινοτυπικά τεστ για παραγωγή καρβαπενεμάσης τάξης A ή B. Η μοριακή διερεύνηση ανέδειξε την

παρουσία του *bla*_{OXA-162} γονιδίου καθώς και του *bla*_{OXA-1} και του *bla*_{DHA-1} στα δύο αρχικά στελέχη ενώ το τελευταίο ήταν αρνητικό για το *bla*_{OXA-162}. Το IS1999 προηγείτο του *bla*_{OXA-162}. Δεν βρέθηκαν μεταλλάξεις σχετιζόμενες με προβλήματα διαβατότητας. Η πλασμιδιακή ανάλυση έδειξε την ύπαρξη δύο μεγάλων πλασμιδίων ~140kb και ~62kb καθώς και ενός μικρότερου μεγέθους 2kb στα δύο πρώτα στελέχη, ενώ στο τελευταίο απουσίαζε το 62kb πλασμίδιο. Τα πειράματα σύζευξης δεν οδήγησαν στην δημιουργία διασυζευκτών. Η PFGE ομαδοποίησε τα στελέχη σε ένα διακριτό κλώνο και η MLST τα αντιστοίχησε στο ST11.

ABSTRACT

The present study has been focused on two main objectives on the one hand the detection and characterization of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Enterobacteriaceae*, along with an evaluation of the effectiveness of various inhibitors in their detection and an assessment of a modified CLSI-ESBL test and on the other hand the investigation of novel carbapenemase genes which have recently been introduced to the Greek region.

A total of 105 *Enterobacteriaceae* isolates (*K.pneumoniae*, *E.coli*, *K.oxytoca*, *P.mirabilis*) collected over a 9 year period from 2004 to 2012, exhibiting reduced susceptibility or resistance either to cefoxitin (FOX) and/or cefotetan (CTT) along with reduced susceptibility or resistance to at least one extended spectrum cephalosporin were further investigated for the presence of plasmid AmpC β -lactamases. Plasmid-mediated AmpCs, ESBLs and the VIM-type carbapenemases were sought by PCR amplification and subjected to direct sequencing. Susceptibility testing was performed with disk diffusion and ertapenem MICs were evaluated with the Etest method. Clonal relationship was investigated by either enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR) or repetitive sequence based PCR (REP-PCR). Four AmpC inhibitors, cloxacillin (CLOX), phenyl-boronic acid (PBA), 3-acetyl-phenyl-boronic acid (APA) and 3-amino-phenyl-boronic (APBA) acid were evaluated, the latter in two final concentrations (300 and 600 μ g/disk) with FOX, CTT, ceftazidime (CAZ) and cefotaxime (CTX) as substrates. Finally a modified CLSI ESBL test with the use of the aforementioned inhibitors and CTX and CAZ was evaluated.

Altogether 59 isolates harbored plasmid-mediated AmpCs, with 35 also co-producing ESBLs. The MOX-2 β -lactamase was identified with the highest frequency followed by the CMY-2 enzyme. CMY-4, CMY-13 and CMY-31 were also detected along with three novel to the region enzymes, DHA-1 and two new AmpCs a CMY-4-like and a

MIR-2-like. All *P.mirabilis* belonged to one clonal type, *K.oxytoca* isolates presented two distinct clonal types while *K.pneumoniae* and *E.coli* isolates presented 8 and 11 clonal types respectively.

FOX resistance was found to be a discriminating parameter performing better than CTT as an initial screening tool. In regards to the confirmatory phenotypic AmpC disk assay, FOX in combination with APBA produced the best results, successfully identifying 57/59 isolates. The proposed modified CLSI ESBL test provided a significantly better overall performance when performed with CLOX (sensitivity 91,4% and specificity 75%), PBA (100%, 75%) and APBA (97,1%, 79,1%) in comparison to the standard CLSI ESBL test (85,7%, 58,3%). APA as an inhibitor failed to enhance the modified CLSI ESBL test exhibiting a suboptimal sensitivity of 54,3%.

Between January 2010 and June 2013, 132 non-repetitive carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates, which gave positive the modified Hodge test (MHT) and were phenotypically suspected of metallo- β -lactamase production (MBL), were recovered from patients hospitalized in Ioannina University Hospital. Molecular testing verified the presence in 78 *K. pneumoniae* isolates, collected from 71 patients, of the *bla*_{NDM-1} gene. The *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-1} and *bla*_{TEM-1} genes were also present in most isolates. The *bla*_{NDM-1} gene was located on an IncFII type plasmid, of *c.* 95kb, flanked upstream by a non-truncated *ISAbal25* element and downstream by the *ble*_{MBL} gene. Carbapenem resistance was transferable at a very low rate of $\sim 1,3 \times 10^{-7}$. Genotyping clustered all *K. pneumoniae* isolates into a single clonal type with one subtype and MLST assigned them to sequence type ST11. Two outbreaks were noted, the first between November-December 2011 involving four patients and the second initiated in May 2012 and ongoing, involving the remaining patients. All but two

cases were characterized as hospital-acquired. No links to immigration or travel history to endemic areas were established.

From December 2011-March 2012, 13 ertapenem-resistant *K. pneumoniae* isolates, with a positive MHT, and negative phenotypic screening tests for MBL and KPC production, were recovered from nine patients. All isolates harboured the *bla*_{OXA-48} gene along with *bla*_{CTX-M-15} and *bla*_{OXA-1} genes. The *bla*_{OXA-48} gene was located on a self-transferable IncL/M-type plasmid of *c.* 62 kb, which harboured no other resistance genes. *IS1999* was located upstream of *bla*_{OXA-48} gene. Genetic disruptions of the *OmpK35* and *OmpK36* genes associated with permeability defects were not detected. The isolates belonged to a unique PFGE clone and MLST assigned them to sequence type ST11. All cases were characterized as hospital-acquired and none of them was linked to immigration or had a history of travel in endemic areas.

Over a period of approximately 2,5 years initiated in 2010, three *K.pneumoniae* isolates were retrieved from urine samples of a single female patient, of which the first two with an interval of 41 days, exhibiting resistance to cephamycins and extended spectrum cephalosporins, with positive screening tests for AmpC β -lactamase production and a negative modified CLSI-ESBL test. The initial two isolates exhibited carbapenem resistance, gave a positive MHT and negative screening tests for class A and B carbapenemase production.

All isolates harbored the *bla*_{OXA-1} and *bla*_{DHA-1} genes and additionally the first two carried the *bla*_{OXA-162} gene. *IS1999* was located upstream of *bla*_{OXA-162} gene. Genetic disruptions of the *OmpK35* and *OmpK36* genes associated with ertapenem resistance were not detected. Plasmid profiling indicated the presence of three plasmids of ~140kb, ~62kb and 2kb in the first two while the latter lacked 62kb plasmid. Conjugation experiments failed to transfer β -lactam resistance. All *K.pneumoniae* belonged to a unique PFGE clone and MLST assigned them to sequence type ST11.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abdelaziz, M.O., Bonura, C., Aleo, A., El-Domany, R.A., Fasciana, T., and Mammina, C. (2012). OXA-163-producing *Klebsiella pneumoniae* in Cairo, Egypt, in 2009 and 2010. *J. Clin. Microbiol.* *50*, 2489–2491.

Abraham, E.P., and Chain, E. (1988). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Rev. Infect. Dis.* *10*, 677–678.

Agabou, A., Pantel, A., Ouchenane, Z., Lezzar, N., Khemissi, S., Satta, D., Sotto, A., and Lavigne, J.-P. (2014). First description of OXA-48-producing *Escherichia coli* and the pandemic clone ST131 from patients hospitalised at a military hospital in Algeria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* *33*, 1641–1646.

Ageevets, V.A., Partina, I.V., Lisitsyna, E.S., Ilina, E.N., Lobzin, Y.V., Shlyapnikov, S.A., and Sidorenko, S.V. (2014). Emergence of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Saint Petersburg, Russia. *Int. J. Antimicrob. Agents* *44*, 152–155.

Ambler, R.P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *289*, 321–331.

Ambler, R.P., Coulson, A.F., Frère, J.M., Ghuyssen, J.M., Joris, B., Forsman, M., Levesque, R.C., Tiraby, G., and Waley, S.G. (1991). A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem. J.* *276 (Pt 1)*, 269–270.

Aubert, D., Naas, T., Héritier, C., Poirel, L., and Nordmann, P. (2006). Functional characterization of IS1999, an IS4 family element involved in mobilization and expression of beta-lactam resistance genes. *J. Bacteriol.* *188*, 6506–6514.

Azucena, E., and Mobashery, S. (2001). Aminoglycoside-modifying enzymes: mechanisms of catalytic processes and inhibition. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* *4*, 106–117.

Balm, M.N.D., Ngan, G., Jureen, R., Lin, R.T.P., and Teo, J.W.P. (2013a). OXA-181-producing *Klebsiella pneumoniae* establishing in Singapore. *BMC Infect. Dis.* *13*, 58.

Balm, M.N.D., La, M.-V., Krishnan, P., Jureen, R., Lin, R.T.P., and Teo, J.W.P. (2013b). Emergence of *Klebsiella pneumoniae* co-producing NDM-type and OXA-181 carbapenemases. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*

Bauernfeind, A., Wagner, S., Jungwirth, R., Schneider, I., and Meyer, D. (1997). A novel class C beta-lactamase (FOX-2) in *Escherichia coli* conferring resistance to cephamycins. *Antimicrob. Agents Chemother.* *41*, 2041–2046.

Bauernfeind, A., Schneider, I., Jungwirth, R., Sahly, H., and Ullmann, U. (1999). A novel type of AmpC beta-lactamase, ACC-1, produced by a *Klebsiella pneumoniae* strain causing nosocomial pneumonia. *Antimicrob. Agents Chemother.* *43*, 1924–1931.

Beesley, T., Gascoyne, N., Knott-Hunziker, V., Petursson, S., Waley, S.G., Jaurin, B., and Grundstrom, T. (1983). The inhibition of class C beta-lactamases by boronic acids. *Biochem. J.* *209*, 229–233.

Bennett, P.M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br. J. Pharmacol.* *153 Suppl 1*, S347–S357.

Van der Bij, A.K., and Pitout, J.D.D. (2012). The role of international travel in the worldwide spread of multiresistant Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob. Chemother.* *67*, 2090–2100.

Black, J.A., Moland, E.S., and Thomson, K.S. (2005). AmpC disk test for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in Enterobacteriaceae lacking chromosomal AmpC beta-lactamases. *J. Clin. Microbiol.* *43*, 3110–3113.

Bogaerts, P., Bouchahrouf, W., de Castro, R.R., Deplano, A., Berhin, C., Piérard, D., Denis, O., and Glupczynski, Y. (2011). Emergence of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Belgium. *Antimicrob. Agents Chemother.* *55*, 3036–3038.

Bush, K. (2013). The ABCD's of β -lactamase nomenclature. *J. Infect. Chemother. Off. J. Jpn. Soc. Chemother.* *19*, 549–559.

Bush, K., and Jacoby, G.A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* *54*, 969–976.

Bush, K., Freudenberg, J.S., and Sykes, R.B. (1982). Interaction of azthreonam and related monobactams with beta-lactamases from gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* *22*, 414–420.

Bush, K., Jacoby, G.A., and Medeiros, A.A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* *39*, 1211–1233.

Bushnell, G., Mitrani-Gold, F., and Mundy, L.M. (2013). Emergence of New Delhi metallo- β -lactamase type 1-producing enterobacteriaceae and non-enterobacteriaceae: global case detection and bacterial surveillance. *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* *17*, e325–e333.

Cantón, R., Akóva, M., Carmeli, Y., Giske, C.G., Glupczynski, Y., Gniadkowski, M., Livermore, D.M., Miriagou, V., Naas, T., Rossolini, G.M., et al. (2012). Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *18*, 413–431.

Carattoli, A. (2009). Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* *53*, 2227–2238.

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

Castanheira, M., Deshpande, L.M., Mathai, D., Bell, J.M., Jones, R.N., and Mendes, R.E. (2011). Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing

Enterobacteriaceae in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 1274–1278.

Clinical and laboratory Standards Institute. 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing : Twenty second informational supplement. CLSI document M100-S22. CLSI, Wayne, PA, USA, 2012

Clinical and laboratory Standards Institute. 2013. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing : Twenty third informational supplement. CLSI document M100-S23. CLSI, Wayne, PA, USA, 2013

Collis, C.M., and Hall, R.M. (1992). Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. *Mol. Microbiol.* 6, 2875–2885.

Cornaglia, G., and Rossolini, G.M. (2010). The emerging threat of acquired carbapenemases in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 16, 99–101.

Costa, D., Poeta, P., Sáenz, Y., Vinué, L., Rojo-Bezares, B., Jouini, A., Zarazaga, M., Rodrigues, J., and Torres, C. (2006). Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum β -lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 1311–1312.

Coudron, P.E. (2005). Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4163–4167.

Couturier, M., Bex, F., Bergquist, P.L., and Maas, W.K. (1988). Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol. Rev.* 52, 375–395.

D'Andrea, M.M., Venturelli, C., Giani, T., Arena, F., Conte, V., Bresciani, P., Rumpianesi, F., Pantosti, A., Narni, F., and Rossolini, G.M. (2011). Persistent carriage and infection by multidrug-resistant *Escherichia coli* ST405 producing NDM-1 carbapenemase: report on the first Italian cases. *J. Clin. Microbiol.* 49, 2755–2758.

Darley, E., Weeks, J., Jones, L., Daniels, V., Wootton, M., MacGowan, A., and Walsh, T. (2012). NDM-1 polymicrobial infections including *Vibrio cholerae*. *Lancet* 380, 1358.

Datta, N., and Hedges, R.W. (1971). Compatibility groups among *fi* - R factors. *Nature* 234, 222–223.

Datta, N., and Hughes, V.M. (1983). Plasmids of the same Inc groups in Enterobacteria before and after the medical use of antibiotics. *Nature* 306, 616–617.

Decousser, J.W., Jansen, C., Nordmann, P., Emirian, A., Bonnin, R.A., Anais, L., Merle, J.C., and Poirel, L. (2013). Outbreak of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in France, January to May 2013. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* 18.

- Denis, C., Poirel, L., Carricajo, A., Grattard, F., Fascia, P., Verhoeven, P., Gay, P., Nuti, C., Nordmann, P., Pozzetto, B., et al. (2012). Nosocomial transmission of NDM-1-producing *Escherichia coli* within a non-endemic area in France. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *18*, E128–E130.
- Diancourt, L., Passet, V., Verhoef, J., Grimont, P.A.D., and Brisse, S. (2005). Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J. Clin. Microbiol.* *43*, 4178–4182.
- Dimou, V., Dhanji, H., Pike, R., Livermore, D.M., and Woodford, N. (2012). Characterization of Enterobacteriaceae producing OXA-48-like carbapenemases in the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* *67*, 1660–1665.
- Donskey, C.J., Hanrahan, J.A., Hutton, R.A., and Rice, L.B. (2000). Effect of parenteral antibiotic administration on the establishment of colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in the mouse gastrointestinal tract. *J. Infect. Dis.* *181*, 1830–1833.
- Dortet, L., Poirel, L., and Nordmann, P. (2014). Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. *BioMed Res. Int.* *2014*, 249856.
- Doumith, M., Ellington, M.J., Livermore, D.M., and Woodford, N. (2009). Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* *63*, 659–667.
- Doyle, D., Peirano, G., Lascols, C., Lloyd, T., Church, D.L., and Pitout, J.D.D. (2012). Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. *J. Clin. Microbiol.* *50*, 3877–3880.
- Drawz, S.M., and Bonomo, R.A. (2010). Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. *Clin. Microbiol. Rev.* *23*, 160–201.
- Dunny, G.M., Leonard, B.A., and Hedberg, P.J. (1995). Pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*: interbacterial and host-parasite chemical communication. *J. Bacteriol.* *177*, 871–876.
- Eliopoulos, G.M., Farber, B.F., Murray, B.E., Wennersten, C., and Moellering, R.C. (1984). Ribosomal resistance of clinical enterococcal to streptomycin isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* *25*, 398–399.
- Ellis, C., Chung, C., Tijet, N., Patel, S.N., Desjardins, M., Melano, R.G., and Toye, B. (2013). OXA-48-like carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Ottawa, Canada. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* *76*, 399–400.
- Flateau, C., Janvier, F., Delacour, H., Males, S., Ficko, C., Andriamanantena, D., Jeannot, K., Merens, A., and Rapp, C. (2012). Recurrent pyelonephritis due to NDM-1 metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in a patient returning from Serbia, France, 2012. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* *17*.

Gaibani, P., Ambretti, S., Berlingeri, A., Cordovana, M., Farruggia, P., Panico, M., Landini, M.P., and Sambri, V. (2011). Outbreak of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in northern Italy, July to August 2011. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* *16*, 20027.

Gazouli, M., Tzouvelekis, L.S., Vatopoulos, A.C., and Tzelepi, E. (1998). Transferable class C beta-lactamases in *Escherichia coli* strains isolated in Greek hospitals and characterization of two enzyme variants (LAT-3 and LAT-4) closely related to *Citrobacter freundii* AmpC beta-lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* *42*, 419–425.

Gecaj-Gashi, A., Hasani, A., Bruqi, B., and Mulliqi-Osmani, G. (2011). Balkan NDM-1: escape or transplant? *Lancet Infect. Dis.* *11*, 586.

Ghuysen, J.M. (1991). Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* *45*, 37–67.

Giani, T., Conte, V., Di Pilato, V., Aschbacher, R., Weber, C., Larcher, C., and Rossolini, G.M. (2012). *Escherichia coli* from Italy producing OXA-48 carbapenemase encoded by a novel Tn1999 transposon derivative. *Antimicrob. Agents Chemother.* *56*, 2211–2213.

Giani, T., Pini, B., Arena, F., Conte, V., Bracco, S., Migliavacca, R., AMCLI-CRE Survey Participants, Pantosti, A., Pagani, L., Luzzaro, F., et al. (2013). Epidemic diffusion of KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy: results of the first countrywide survey, 15 May to 30 June 2011. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* *18*.

Girlich, D., Naas, T., Bellais, S., Poirel, L., Karim, A., and Nordmann, P. (2000). Biochemical-genetic characterization and regulation of expression of an ACC-1-like chromosome-borne cephalosporinase from *Hafnia alvei*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *44*, 1470–1478.

Giske, C.G., Fröding, I., Hasan, C.M., Turlej-Rogacka, A., Toleman, M., Livermore, D., Woodford, N., and Walsh, T.R. (2012). Diverse sequence types of *Klebsiella pneumoniae* contribute to the dissemination of blaNDM-1 in India, Sweden, and the United Kingdom. *Antimicrob. Agents Chemother.* *56*, 2735–2738.

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

Goffin, C., and Ghuysen, J.M. (1998). Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* *62*, 1079–1093.

Gomez, S., Pasteran, F., Faccione, D., Bettiol, M., Veliz, O., De Belder, D., Rapoport, M., Gatti, B., Petroni, A., and Corso, A. (2013). Inpatient emergence of OXA-247: a novel carbapenemase found in a patient previously infected with OXA-163-

producing *Klebsiella pneumoniae*. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *19*, E233–E235.

Göttig, S., Pfeifer, Y., Wichelhaus, T.A., Zacharowski, K., Bingold, T., Averhoff, B., Brandt, C., and Kempf, V.A. (2010). Global spread of New Delhi metallo- β -lactamase 1. *Lancet Infect. Dis.* *10*, 828–829.

Hakenbeck, R., and Coyette, J. (1998). Resistant penicillin-binding proteins. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *54*, 332–340.

Halaby, T., Reuland, A.E., Al Naiemi, N., Potron, A., Savelkoul, P.H.M., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., and Nordmann, P. (2012). A case of New Delhi metallo- β -lactamase 1 (NDM-1)-producing *Klebsiella pneumoniae* with putative secondary transmission from the Balkan region in the Netherlands. *Antimicrob. Agents Chemother.* *56*, 2790–2791.

Hashimoto, A., Nagamatsu, M., Ohmagari, N., Hayakawa, K., Kato, Y., and Kirikae, T. (2014). Isolation of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* ST101 from an overseas traveler returning to Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* *67*, 120–121.

Hishinuma, A., Yoshida, A., Suzuki, H., Okuzumi, K., and Ishida, T. (2013). Complete sequencing of an IncFII NDM-1 plasmid in *Klebsiella pneumoniae* shows structural features shared with other multidrug resistance plasmids. *J. Antimicrob. Chemother.*

Hrabák, J., Studentová, V., Walková, R., Zemlicková, H., Jakubu, V., Chudácková, E., Gniadkowski, M., Pfeifer, Y., Perry, J.D., Wilkinson, K., et al. (2012). Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* *50*, 2441–2443.

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

Jacoby, G.A. (2009). AmpC beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* *22*, 161–182, Table of Contents.

Jacoby, G.A., and Sutton, L. (1985). beta-Lactamases and beta-lactam resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *28*, 703–705.

Jánvári, L., Damjanova, I., Lázár, A., Rácz, K., Kocsis, B., Urbán, E., and Tóth, A. (2014). Emergence of OXA-162-producing *Klebsiella pneumoniae* in Hungary. *Scand. J. Infect. Dis.* *46*, 320–324.

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

- Kasap, M., Torol, S., Kolayli, F., Dundar, D., and Vahaboglu, H. (2013). OXA-162, a novel variant of OXA-48 displays extended hydrolytic activity towards imipenem, meropenem and doripenem. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* *28*, 990–996.
- Kim, Y., Tesar, C., Mire, J., Jedrzejczak, R., Binkowski, A., Babnigg, G., Sacchettini, J., and Joachimiak, A. (2011). Structure of apo- and monometalated forms of NDM-1-a highly potent carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase. *PloS One* *6*, e24621.
- Knox, J.R. (1995). Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type beta-lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* *39*, 2593–2601.
- Koo, V.S.W., O'Neill, P., and Elves, A. (2012). Multidrug-resistant NDM-1 *Klebsiella* outbreak and infection control in endoscopic urology. *BJU Int.* *110*, E922–E926.
- Kotsakis, S.D., Papagiannitsis, C.C., Tzelepi, E., Tzouvelekis, L.S., and Miriagou, V. (2009). Extended-spectrum properties of CMY-30, a Val211Gly mutant of CMY-2 cephalosporinase. *Antimicrob. Agents Chemother.* *53*, 3520–3523.
- Kumarasamy, K.K., Toleman, M.A., Walsh, T.R., Bagaria, J., Butt, F., Balakrishnan, R., Chaudhary, U., Doumith, M., Giske, C.G., Irfan, S., et al. (2010). Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect. Dis.* *10*, 597–602.
- Lee, C.-H., Chu, C., Liu, J.-W., Chen, Y.-S., Chiu, C.-J., and Su, L.-H. (2007). Collateral damage of flomoxef therapy: in vivo development of porin deficiency and acquisition of blaDHA-1 leading to ertapenem resistance in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* producing CTX-M-3 and SHV-5 beta-lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* *60*, 410–413.
- Lee, K., Lim, Y.S., Yong, D., Yum, J.H., and Chong, Y. (2003). 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.* *41*, 4623–4629.
- Lee, K., Hong, S.G., Park, Y.J., Lee, H.S., Song, W., Jeong, J., Yong, D., and Chong, Y. (2005). Evaluation of phenotypic screening methods for detecting plasmid-mediated AmpC beta-lactamases-producing isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* *53*, 319–323.
- Liu, Y., Wan, L.-G., Deng, Q., Cao, X.-W., Yu, Y., and Xu, Q.-F. (2014). First description of NDM-1-, KPC-2-, VIM-2- and IMP-4-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in a single Chinese teaching hospital. *Epidemiol. Infect.* 1–9.
- Livermore, D.M. (1992). Interplay of impermeability and chromosomal beta-lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *36*, 2046–2048.
- Livermore, D.M. (2001). Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *J. Antimicrob. Chemother.* *47*, 247–250.

- Livermore, D.M. (2003). Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *36*, S11–S23.
- Livermore, D.M. (2009a). beta-Lactamases- the Threat Renews. *Curr. Protein Pept. Sci.* *10*, 397–400.
- Livermore, D.M. (2009b). Has the era of untreatable infections arrived? *J. Antimicrob. Chemother.* *64 Suppl 1*, i29–i36.
- Livermore, D.M., and Woodford, N. (2006). The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. *Trends Microbiol.* *14*, 413–420.
- Livermore, D.M., Chau, P.Y., Wong, A.I., and Leung, Y.K. (1987). beta-Lactamase of Pseudomonas pseudomallei and its contribution to antibiotic resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* *20*, 313–321.
- Lomaestro, B.M., Tobin, E.H., Shang, W., and Gootz, T. (2006). The spread of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing K. pneumoniae to upstate New York. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *43*, e26–e28.
- Lyon, B.R., and Skurray, R. (1987). Antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus: genetic basis. *Microbiol. Rev.* *51*, 88–134.
- Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., et al. (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 3140–3145.
- Majewski, P., Wiczorek, P., Sacha, P.T., Frank, M., Juszczak, G., Ojdana, D., Kłowska, W., Wiczorek, A., Sieńko, A., Michalska, A.D., et al. (2014). Emergence of OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacter cloacae ST89 infection in Poland. *Int. J. Infect. Dis.* *25*, 107–109.
- Mammeri, H., Guillon, H., Eb, F., and Nordmann, P. (2010). Phenotypic and biochemical comparison of the carbapenem-hydrolyzing activities of five plasmid-borne AmpC β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* *54*, 4556–4560.
- Marimuthu, K., Teo, J.W.P., Fong, P.B., Hui Chin, J.O., Qi, K.J., Chien Boon, D.L., Li Ping, A.C., Krishnan, P., and Sze Peng, B.A. (2014). First report of emergence of OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Singapore: proactive or reactive infection control strategy? *Am. J. Infect. Control* *42*, 577–578.
- Mathers, A.J., Hazen, K.C., Carroll, J., Yeh, A.J., Cox, H.L., Bonomo, R.A., and Sifri, C.D. (2013). First clinical cases of OXA-48-producing carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae in the United States: the “menace” arrives in the new world. *J. Clin. Microbiol.* *51*, 680–683.
- Mazzariol, A., Bošnjak, Z., Ballarini, P., Budimir, A., Bedenić, B., Kalenić, S., and Cornaglia, G. (2012). NDM-1-producing Klebsiella pneumoniae, Croatia. *Emerg. Infect. Dis.* *18*, 532–534.

McDowell, T.D., and Reed, K.E. (1989). Mechanism of penicillin killing in the absence of bacterial lysis. *Antimicrob. Agents Chemother.* *33*, 1680–1685.

Medeiros, A.A. (1997). Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *24 Suppl 1*, S19–S45.

Merino, M., Pérez-Llarena, F.J., Kerff, F., Poza, M., Mallo, S., Rumbo-Feal, S., Beceiro, A., Juan, C., Oliver, A., and Bou, G. (2010). Role of changes in the L3 loop of the active site in the evolution of enzymatic activity of VIM-type metallo-beta-lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* *65*, 1950–1954.

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

Morais Cabral, J.H., Jackson, A.P., Smith, C.V., Shikotra, N., Maxwell, A., and Liddington, R.C. (1997). Crystal structure of the breakage-reunion domain of DNA gyrase. *Nature* *388*, 903–906.

Mushi, M.F., Mshana, S.E., Imirzalioglu, C., and Bwanga, F. (2014). Carbapenemase genes among multidrug resistant gram negative clinical isolates from a tertiary hospital in Mwanza, Tanzania. *BioMed Res. Int.* *2014*, 303104.

Neuwirth, C., Siébor, E., Duez, J.M., Péchinot, A., and Kazmierczak, A. (1995). Imipenem resistance in clinical isolates of *Proteus mirabilis* associated with alterations in penicillin-binding proteins. *J. Antimicrob. Chemother.* *36*, 335–342.

Nordmann, P., and Poirel, L. (2013). Strategies for identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob. Chemother.* *68*, 487–489.

Nordmann, P., Poirel, L., Toleman, M.A., and Walsh, T.R. (2011a). Does broad-spectrum beta-lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? *J. Antimicrob. Chemother.* *66*, 689–692.

Nordmann, P., Poirel, L., Walsh, T.R., and Livermore, D.M. (2011b). The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol.* *19*, 588–595.

Nordmann, P., Dortet, L., and Poirel, L. (2012a). Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends Mol. Med.* *18*, 263–272.

Nordmann, P., Gniadkowski, M., Giske, C.G., Poirel, L., Woodford, N., Miriagou, V., and European Network on Carbapenemases (2012b). Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *18*, 432–438.

Novick, R.P. (1987). Plasmid incompatibility. *Microbiol. Rev.* *51*, 381–395.

Nüesch-Inderbinen, M.T., Hächler, H., and Kayser, F.H. (1996). Detection of genes coding for extended-spectrum SHV beta-lactamases in clinical isolates by a molecular

genetic method, and comparison with the E test. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *15*, 398–402.

Osborn, M.J. (1969). Structure and biosynthesis of the bacterial cell wall. *Annu. Rev. Biochem.* *38*, 501–538.

Osborn, M.J., Gander, J.E., Parisi, E., and Carson, J. (1972). Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane. *J. Biol. Chem.* *247*, 3962–3972.

Oteo, J., Delgado-Iribarren, A., Vega, D., Bautista, V., Rodríguez, M.C., Velasco, M., Saavedra, J.M., Pérez-Vázquez, M., García-Cobos, S., Martínez-Martínez, L., et al. (2008). Emergence of imipenem resistance in clinical *Escherichia coli* during therapy. *Int. J. Antimicrob. Agents* *32*, 534–537.

Oteo, J., Hernández, J.M., Espasa, M., Fleites, A., Sáez, D., Bautista, V., Pérez-Vázquez, M., Fernández-García, M.D., Delgado-Iribarren, A., Sánchez-Romero, I., et al. (2013). Emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* and the novel carbapenemases OXA-244 and OXA-245 in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* *68*, 317–321.

Ouellette, M., Bissonnette, L., and Roy, P.H. (1987). Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1 beta-lactamase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 7378–7382.

Pai, H., Lyu, S., Lee, J.H., Kim, J., Kwon, Y., Kim, J.W., and Choe, K.W. (1999). Survey of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: prevalence of TEM-52 in Korea. *J. Clin. Microbiol.* *37*, 1758–1763.

Pantel, A., Boutet-Dubois, A., Jean-Pierre, H., Marchandin, H., Sotto, A., Lavigne, J.-P., and on behalf of the CARB-LR group (2014). French regional surveillance program of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli: results from a 2-year period. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.*

Papagiannitsis, C.C., Giakkoupi, P., Vatopoulos, A.C., Tryfinopoulou, K., Miriagou, V., and Tzouveleki, L.S. (2010). Emergence of *Klebsiella pneumoniae* of a novel sequence type (ST383) producing VIM-4, KPC-2 and CMY-4 β -lactamases. *Int. J. Antimicrob. Agents* *36*, 573–574.

Papagiannitsis, C.C., Tzouveleki, L.S., Kotsakis, S.D., Tzelepi, E., and Miriagou, V. (2011). Sequence of pR3521, an IncB plasmid from *Escherichia coli* encoding ACC-4, SCO-1, and TEM-1 beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* *55*, 376–381.

Papp-Wallace, K.M., Endimiani, A., Taracila, M.A., and Bonomo, R.A. (2011). Carbapenems: Past, Present, and Future. *Antimicrob. Agents Chemother.* *55*, 4943–4960.

Patel, G., and Bonomo, R.A. (2013). “Stormy waters ahead”: global emergence of carbapenemases. *Front. Microbiol.* *4*, 48.

- Peirano, G., Ahmed-Bentley, J., Fuller, J., Rubin, J.E., and Pitout, J.D.D. (2014). Travel-related carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Alberta, Canada: the first 3 years. *J. Clin. Microbiol.* *52*, 1575–1581.
- Perez-Perez, F.J., and Hanson, N.D. (2002). Detection of Plasmid-Mediated AmpC - Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* *40*, 2153–2162.
- Peter-Getzlaff, S., Polsfuss, S., Poledica, M., Hombach, M., Giger, J., Böttger, E.C., Zbinden, R., and Bloemberg, G.V. (2011). Detection of AmpC beta-lactamase in *Escherichia coli*: comparison of three phenotypic confirmation assays and genetic analysis. *J. Clin. Microbiol.* *49*, 2924–2932.
- Pfeifer, Y., Schlatterer, K., Engelmann, E., Schiller, R.A., Frangenberg, H.R., Stiewe, D., Holfelder, M., Witte, W., Nordmann, P., and Poirel, L. (2012). Emergence of OXA-48-type carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in German hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* *56*, 2125–2128.
- Philippon, A., Arlet, G., and Jacoby, G.A. (2002). Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* *46*, 1–11.
- Pitart, C., Solé, M., Roca, I., Fàbrega, A., Vila, J., and Marco, F. (2011). First outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48 beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* *55*, 4398–4401.
- Pitout, J.D., Sanders, C.C., and Sanders, W.E. (1997). Antimicrobial resistance with focus on beta-lactam resistance in gram-negative bacilli. *Am. J. Med.* *103*, 51–59.
- Pitout, J.D.D., Le, P.G., Moore, K.L., Church, D.L., and Gregson, D.B. (2010). Detection of AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp. and *Proteus mirabilis* in a regional clinical microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *16*, 165–170.
- Poirel, L., Héritier, C., Tolün, V., and Nordmann, P. (2004). Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *48*, 15–22.
- Poirel, L., Naas, T., and Nordmann, P. (2010a). Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* *54*, 24–38.
- Poirel, L., Hombrouck-Alet, C., Freneaux, C., Bernabeu, S., and Nordmann, P. (2010b). Global spread of New Delhi metallo- β -lactamase 1. *Lancet Infect. Dis.* *10*, 832.
- Poirel, L., Dortet, L., Bernabeu, S., and Nordmann, P. (2011a). Genetic features of blaNDM-1-positive Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* *55*, 5403–5407.
- Poirel, L., Castanheira, M., Carrër, A., Rodriguez, C.P., Jones, R.N., Smayevsky, J., and Nordmann, P. (2011b). OXA-163, an OXA-48-related class D β -lactamase with extended activity toward expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* *55*, 2546–2551.

- Poirel, L., Schrenzel, J., Cherkaoui, A., Bernabeu, S., Renzi, G., and Nordmann, P. (2011c). Molecular analysis of NDM-1-producing enterobacterial isolates from Geneva, Switzerland. *J. Antimicrob. Chemother.* *66*, 1730–1733.
- Poirel, L., Potron, A., and Nordmann, P. (2012). OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J. Antimicrob. Chemother.* *67*, 1597–1606.
- Poirel, L., Savov, E., Nazli, A., Trifonova, A., Todorova, I., Gergova, I., and Nordmann, P. (2014). Outbreak caused by NDM-1- and RmtB-producing *Escherichia coli* in Bulgaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* *58*, 2472–2474.
- Polsfuss, S., Bloemberg, G.V., Giger, J., Meyer, V., Böttger, E.C., and Hombach, M. (2011). Practical approach for reliable detection of AmpC beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* *49*, 2798–2803.
- Poole, K. (2004). Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *10*, 12–26.
- Potron, A., Nordmann, P., Lafeuille, E., Al Maskari, Z., Al Rashdi, F., and Poirel, L. (2011a). Characterization of OXA-181, a carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *55*, 4896–4899.
- Potron, A., Kalpoe, J., Poirel, L., and Nordmann, P. (2011b). European dissemination of a single OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clone. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *17*, E24–E26.
- Potron, A., Nordmann, P., and Poirel, L. (2013a). Characterization of OXA-204, a carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *57*, 633–636.
- Potron, A., Rondinaud, E., Poirel, L., Belmonte, O., Boyer, S., Camiade, S., and Nordmann, P. (2013b). Genetic and biochemical characterisation of OXA-232, a carbapenem-hydrolysing class D β -lactamase from Enterobacteriaceae. *Int. J. Antimicrob. Agents* *41*, 325–329.
- Poulou, A., Voulgari, E., Vrioni, G., Koumaki, V., Xidopoulos, G., Chatzipantazi, V., Markou, F., and Tsakris, A. (2013). Outbreak caused by an ertapenem-resistant, CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 101 clone carrying an OmpK36 porin variant. *J. Clin. Microbiol.* *51*, 3176–3182.
- Poulou, A., Grivakou, E., Vrioni, G., Koumaki, V., Pittaras, T., Pournaras, S., and Tsakris, A. (2014). Modified CLSI extended-spectrum β -lactamase (ESBL) confirmatory test for phenotypic detection of ESBLs among Enterobacteriaceae producing various β -lactamases. *J. Clin. Microbiol.* *52*, 1483–1489.
- Pournaras, S., Poulou, A., and Tsakris, A. (2010). Inhibitor-based methods for the detection of KPC carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in clinical practice by using boronic acid compounds. *J. Antimicrob. Chemother.* *65*, 1319–1321.
- Queenan, A.M., and Bush, K. (2007). Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* *20*, 440–458, table of contents.

- Raskine, L., Borrel, I., Barnaud, G., Boyer, S., Hanau-Berçot, B., Gravisse, J., Labia, R., Arlet, G., and Sanson-Le-Pors, M.-J. (2002). Novel plasmid-encoded class C beta-lactamase (MOX-2) in *Klebsiella pneumoniae* from Greece. *Antimicrob. Agents Chemother.* *46*, 2262–2265.
- Rasmussen, B.A., and Bush, K. (1997). Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* *41*, 223–232.
- Rice, L.B. (2000). Bacterial monopolists: the bundling and dissemination of antimicrobial resistance genes in gram-positive bacteria. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *31*, 762–769.
- Richmond, M.H., and Sykes, R.B. (1973). The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv. Microb. Physiol.* *9*, 31–88.
- Rozales, F.P., Ribeiro, V.B., Magagnin, C.M., Pagano, M., Lutz, L., Falci, D.R., Machado, A., Barth, A.L., and Zavascki, A.P. (2014). Emergence of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Porto Alegre, Brazil. *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* *25*, 79–81.
- Ruppé, E., Armand-Lefèvre, L., Estellat, C., El-Mniai, A., Boussadia, Y., Consigny, P.H., Girard, P.M., Vittecoq, D., Bouchaud, O., Pialoux, G., et al. (2014). Acquisition of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae by healthy travellers to India, France, February 2012 to March 2013. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* *19*.
- Rybkin, T., Mainardi, J.L., Sougakoff, W., Collatz, E., and Gutmann, L. (1998). Penicillin-binding protein 5 sequence alterations in clinical isolates of *Enterococcus faecium* with different levels of beta-lactam resistance. *J. Infect. Dis.* *178*, 159–163.
- Sacha, P., Wiczorek, P., Hauschild, T., Zórawski, M., Olszańska, D., and Tryniszewska, E. (2008). Metallo-beta-lactamases of *Pseudomonas aeruginosa*--a novel mechanism resistance to beta-lactam antibiotics. *Folia Histochem. Cytobiol. Pol. Acad. Sci. Pol. Histochem. Cytochem. Soc.* *46*, 137–142.
- Samuelsen, Ø., Naseer, U., Karah, N., Lindemann, P.C., Kanestrøm, A., Leegaard, T.M., and Sundsfjord, A. (2013). Identification of Enterobacteriaceae isolates with OXA-48 and coproduction of OXA-181 and NDM-1 in Norway. *J. Antimicrob. Chemother.* *68*, 1682–1685.
- Sawai, T., Mitsuhashi, S., and Yamagishi, S. (1968). Drug resistance of enteric bacteria. XIV. Comparison of beta-lactamases in gram-negative rod bacteria resistant to alpha-aminobenzylpenicillin. *Jpn. J. Microbiol.* *12*, 423–434.
- Schwartz, D.C., and Cantor, C.R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* *37*, 67–75.
- Schwarz, S., and Liebisch, B. (1994). Use of ribotyping, IS200 typing and plasmid analysis for the identification of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium vaccine strain Zoosaloral H and its differentiation from wild type strains of the same serovar. *Zentralblatt Für Bakteriologie. Int. J. Med. Microbiol.* *281*, 442–450.

- Seiffert, S.N., Marschall, J., Perreten, V., Carattoli, A., Furrer, H., and Endimiani, A. (2014). Emergence of *Klebsiella pneumoniae* co-producing NDM-1, OXA-48, CTX-M-15, CMY-16, QnrA and ArmA in Switzerland. *Int. J. Antimicrob. Agents* *44*, 260–262.
- Selander, R.K., Caugant, D.A., Ochman, H., Musser, J.M., Gilmour, M.N., and Whittam, T.S. (1986). Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* *51*, 873–884.
- Sonnevend, A., Al Baloushi, A., Ghazawi, A., Hashmey, R., Girgis, S., Hamadeh, M.B., Al Haj, M., and Pál, T. (2013). Emergence and spread of NDM-1 producer Enterobacteriaceae with contribution of IncX3 plasmids in the United Arab Emirates. *J. Med. Microbiol.* *62*, 1044–1050.
- Spratt, B.G., Jobanputra, V., and Zimmermann, W. (1977). Binding of thienamycin and clavulanic acid to the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob. Agents Chemother.* *12*, 406–409.
- Steward, C.D., Rasheed, J.K., Hubert, S.K., Biddle, J.W., Raney, P.M., Anderson, G.J., Williams, P.P., Brittain, K.L., Oliver, A., McGowan, J.E., Jr, et al. (2001). Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended-spectrum beta-lactamase detection methods. *J. Clin. Microbiol.* *39*, 2864–2872.
- Struelens, M.J., Monnet, D.L., Magiorakos, A.P., Santos O'Connor, F., Giesecke, J., and European NDM-1 Survey Participants (2010). New Delhi metallo-beta-lactamase 1-producing Enterobacteriaceae: emergence and response in Europe. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* *15*.
- Sykes, R.B., and Matthew, M. (1976). The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to beta-lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* *2*, 115–157.
- Székely, E., Damjanova, I., Jánvári, L., Vas, K.E., Molnár, S., Bilca, D.V., Lőrinczi, L.K., and Tóth, A. (2013). First description of bla(NDM-1), bla(OXA-48), bla(OXA-181) producing Enterobacteriaceae strains in Romania. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* *303*, 697–700.
- Tan, T.Y., Ng, L.S.Y., He, J., Koh, T.H., and Hsu, L.Y. (2009). Evaluation of Screening Methods To Detect Plasmid-Mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *53*, 146–149.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., and Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* *33*, 2233–2239.
- Tenover, F.C., Emery, S.L., Spiegel, C.A., Bradford, P.A., Eells, S., Endimiani, A., Bonomo, R.A., and McGowan, J.E. (2009). Identification of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., and proteus species can

potentially improve reporting of cephalosporin susceptibility testing results. *J. Clin. Microbiol.* *47*, 294–299.

Teo, J.W.P., Kurup, A., Lin, R.T.P., and Hsien, K.T. (2013). Emergence of clinical *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-232 carbapenemase in Singapore. *New Microbes New Infect.* *1*, 13–15.

Thomson, K.S. (2010). Extended-spectrum-beta-lactamase, AmpC, and Carbapenemase issues. *J. Clin. Microbiol.* *48*, 1019–1025.

Thomson, K.S., and Sanders, C.C. (1992). Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob. Agents Chemother.* *36*, 1877–1882.

Tijet, N., Boyd, D., Patel, S.N., Mulvey, M.R., and Melano, R.G. (2013). Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *57*, 4578–4580.

Tsai, Y.-K., Liou, C.-H., Fung, C.-P., Lin, J.-C., and Siu, L.K. (2013). Single or in combination antimicrobial resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* contribute to varied susceptibility to different carbapenems. *PloS One* *8*, e79640.

Tsakris, A., Poulou, A., Themeli-Digalaki, K., Voulgari, E., Pittaras, T., Sofianou, D., Pournaras, S., and Petropoulou, D. (2009). Use of boronic acid disk tests to detect extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of KPC carbapenemase-possessing enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* *47*, 3420–3426.

Tsakris, A., Poulou, A., Pournaras, S., Voulgari, E., Vrioni, G., Themeli-Digalaki, K., Petropoulou, D., and Sofianou, D. (2010). A simple phenotypic method for the differentiation of metallo-beta-lactamases and class A KPC carbapenemases in Enterobacteriaceae clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* *65*, 1664–1671.

Tsakris, A., Poulou, A., Markou, F., Pitiriga, V., Piperaki, E.-T., Kristo, I., and Pournaras, S. (2011). Dissemination of clinical isolates of *Klebsiella oxytoca* harboring CMY-31, VIM-1, and a New OXY-2-type variant in the community. *Antimicrob. Agents Chemother.* *55*, 3164–3168.

Tzelepi, E., Magana, C., Platsouka, E., Sofianou, D., Paniara, O., Legakis, N.J., Vatopoulos, A.C., and Tzouvelekis, L.S. (2003). Extended-spectrum beta-lactamase types in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in two Greek hospitals. *Int. J. Antimicrob. Agents* *21*, 285–288.

Urwin, R., and Maiden, M.C.J. (2003). Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol.* *11*, 479–487.

Versalovic, J., Koeth, T., and Lupski, J.R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* *19*, 6823–6831.

- Villa, J., Viedma, E., Brañas, P., Mingorance, J., and Chaves, F. (2014). Draft Whole-Genome Sequence of OXA-48-Producing Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* KP_ST11_OXA-48. *Genome Announc.* 2.
- Villa, L., Poirel, L., Nordmann, P., Carta, C., and Carattoli, A. (2012). Complete sequencing of an IncH plasmid carrying the blaNDM-1, blaCTX-M-15 and qnrB1 genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 1645–1650.
- Voulgari, E., Gartzonika, C., Vrioni, G., Politi, L., Priavali, E., Levidiotou-Stefanou, S., and Tsakris, A. (2014). The Balkan region: NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 clonal strain causing outbreaks in Greece. *J. Antimicrob. Chemother.*
- Walsh, T.R., and Toleman, M.A. (2012). The emergence of pan-resistant Gram-negative pathogens merits a rapid global political response. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 1–3.
- Walsh, T.R., Toleman, M.A., Poirel, L., and Nordmann, P. (2005). Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 306–325.
- Walsh, T.R., Weeks, J., Livermore, D.M., and Toleman, M.A. (2011). Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect. Dis.* 11, 355–362.
- Wang, Q., Cheng, J., Chen, Y., Ye, Y., Li, J.-B., and Zhang, X.-J. (2008). Characterization of a novel AmpC-type plasmid-mediated beta-lactamase from an *Escherichia coli* strain isolated in China. *Curr. Microbiol.* 57, 558–563.
- Wang, S.-J., Chiu, S.-H., Lin, Y.-C., Tsai, Y.-C., and Mu, J.-J. (2013). Carbapenem resistant Enterobacteriaceae carrying New Delhi metallo- β -lactamase gene (NDM-1) in Taiwan. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 76, 248–249.
- Waxman, D.J., and Strominger, J.L. (1983). Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 825–869.
- Weber, D.A., and Sanders, C.C. (1990). Diverse potential of beta-lactamase inhibitors to induce class I enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 156–158.
- Wehrli, W. (1983). Rifampin: mechanisms of action and resistance. *Rev. Infect. Dis.* 5 *Suppl* 3, S407–S411.
- Woodford, N., Tierno, P.M., Young, K., Tysall, L., Palepou, M.-F.I., Ward, E., Painter, R.E., Suber, D.F., Shungu, D., Silver, L.L., et al. (2004). Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Producing a New Carbapenem-Hydrolyzing Class A β -Lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 4793–4799.
- Wrenn, C., O'Brien, D., Keating, D., Roche, C., Rose, L., Ronayne, A., Fenelon, L., Fitzgerald, S., Crowley, B., and Schaffer, K. (2014). Investigation of the first outbreak of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in Ireland. *J. Hosp. Infect.* 87, 41–46.

- Yagi, T., Wachino, J., Kurokawa, H., Suzuki, S., Yamane, K., Doi, Y., Shibata, N., Kato, H., Shibayama, K., and Arakawa, Y. (2005). Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* *43*, 2551–2558.
- Yan, J.-J., Hsueh, P.-R., Ko, W.-C., Luh, K.-T., Tsai, S.-H., Wu, H.-M., and Wu, J.-J. (2001). Metallo- β -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.
- Yan, J.-J., Ko, W.-C., Jung, Y.-C., Chuang, C.-L., and Wu, J.-J. (2002). Emergence of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing inducible DHA-1 beta-lactamase in a university hospital in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* *40*, 3121–3126.
- Ye, Y., Xu, X.-H., and Li, J.-B. (2010). Emergence of CTX-M-3, TEM-1 and a new plasmid-mediated MOX-4 AmpC in a multiresistant *Aeromonas caviae* isolate from a patient with pneumonia. *J. Med. Microbiol.* *59*, 843–847.
- Yong, D., Toleman, M.A., Giske, C.G., Cho, H.S., Sundman, K., Lee, K., and Walsh, T.R. (2009). Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob. Agents Chemother.* *53*, 5046–5054.
- Zahar, J.-R., Lortholary, O., Martin, C., Potel, G., Plesiat, P., and Nordmann, P. (2009). Addressing the challenge of extended-spectrum beta-lactamases. *Curr. Opin. Investig. Drugs Lond. Engl.* *2000 10*, 172–180.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Δημοσιεύσεις αποτελεσμάτων διατριβής σε διεθνή περιοδικά.

1. Voulgari E, Gartzonika C, Vrioni G, Politi L, Priavali E, Levidiotou-Stefanou S, Tsakris A. The Balkan region: NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 clonal strain causing outbreaks in Greece. *J Antimicrob Chemother.* 2014 Aug;69(8):2091-7. doi: 10.1093/jac/dku105. Epub 2014 Apr 15.
2. Voulgari E, Zarkotou O, Ranellou K, Karageorgopoulos DE, Vrioni G, Mamali V, Themeli-Digalaki K, Tsakris A. Outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece involving an ST11 clone. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Jan;68(1):84-8. doi: 10.1093/jac/dks356. Epub 2012 Sep 3.