



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ Ζ. ΤΣΑΚΡΗΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΠΡΟΚΑΛΟΥΜΕΝΕΣ ΑΠΟ ΣΤΕΛΕΧΗ**

***KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΥΝ ΚΡΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΗ:**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ, ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ**

**ΟΛΥΜΠΙΑ ΖΑΡΚΩΤΟΥ**

**ΙΑΤΡΟΣ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ, 2012**



Ημερομηνία αίτησης:	06/02/2009
Ημερομηνία ορισμού τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής:	23/04/2009
Δήλωση τριμελούς επιτροπής σχετικά με καθορισμό θέματος:	10/07/2009
Ημερομηνία κατάθεσης της διδακτορικής διατριβής:	12/12/2012

**Μέλη τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής:**

1. Αθανάσιος Τσακρής (επιβλέπων) Καθηγητής
2. Γεωργία Βρυώνη Επίκουρος Καθηγήτρια
3. Νικήτας Καποτάς Επίκουρος Καθηγητής

**Μέλη επταμελούς εξεταστικής επιτροπής:**

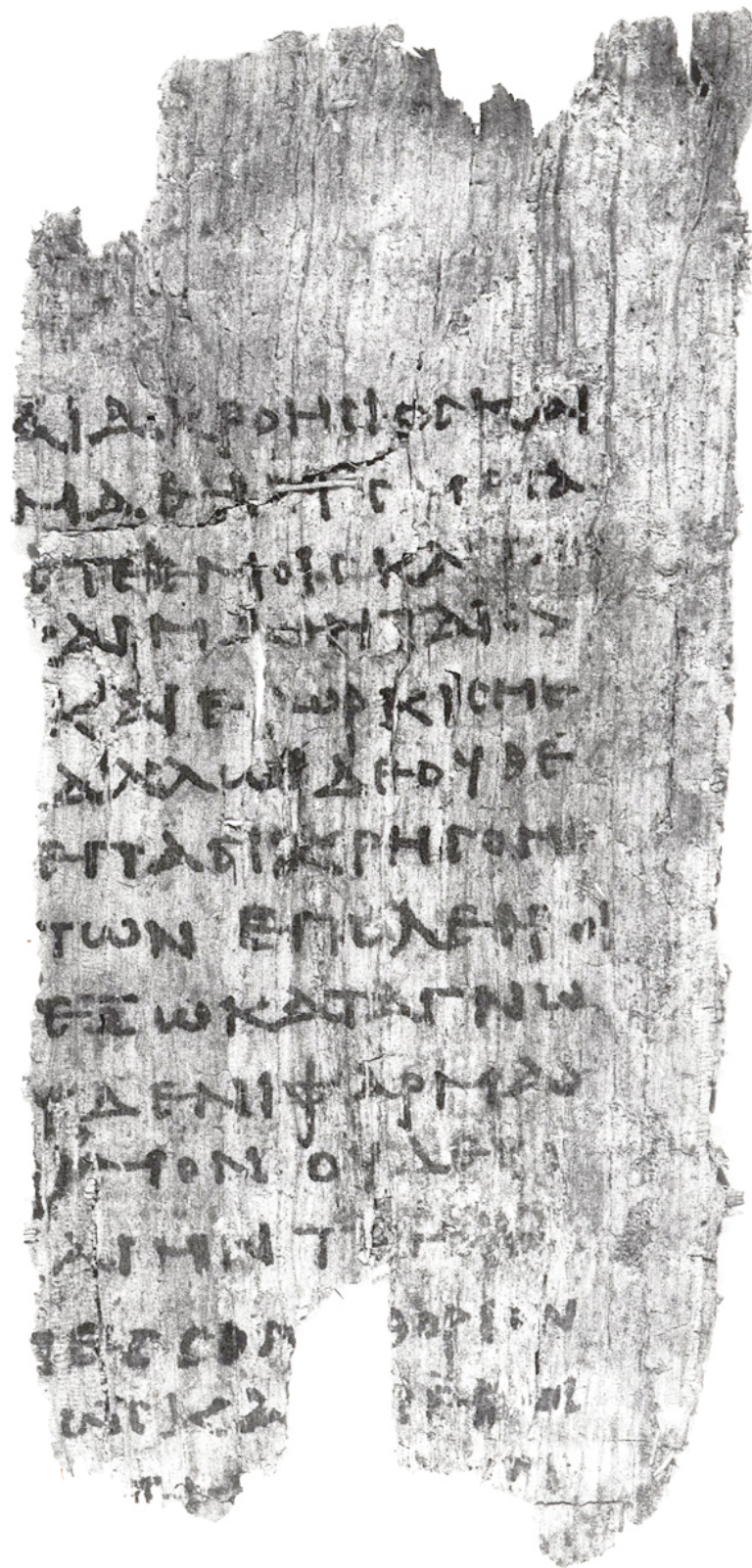
1. Αθανάσιος Τσακρής Καθηγητής
2. Γεωργία Βρυώνη Επίκουρος Καθηγήτρια
3. Νικήτας Καποτάς Επίκουρος Καθηγητής
4. Σπυρίδων Πουρνάρας Αναπληρωτής Καθηγητής
5. Βιολέτα Καψιμάλη Επίκουρος Καθηγήτρια
6. Ιωσήφ Παπαπαρασκευάς Επίκουρος Καθηγητής
7. Νικόλαος Σπανάκης Επίκουρος Καθηγητής

**Ημερομηνία έγκρισης από την επταμελή εξεταστική επιτροπή: 21/12/2012**

**Βαθμός: Άριστα**

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἴστορας ποιεύμενος, ἐπιτελέα ποιήσιν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν ὄρκον τόνδε καὶ ξυγγραφὴν τήνδε. Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετὰδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωυτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξιν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ξυγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετὰδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοισι τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί. Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξιν. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενί αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. Ὅμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἄγνῶς δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιώντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε. Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπείης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἕξω, σιγήσομαι, ἄρρήτα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ ξυγγέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιорκοῦντι, τάναντία τουτέων.



Τμήμα του Όρκου του Ιπποκράτη (Oxyrhynchus Papyrus 2547).

Βρέθηκε στην Οξύρρυγχο της Αιγύπτου και χρονολογείται από το 275 μΧ.

Βρίσκεται στο Wellcome Institute Library, London

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Γ.Ν. Πειραιά «Τζάνειο» και στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών, κατά το χρονικό διάστημα 2009-2012. Μέρος του μοριακού ελέγχου των βακτηριακών στελεχών πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου της Αμβέρσας.

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Αθανάσιο Τσακρή, αφενός για την εμπιστοσύνη που επέδειξε αναθέτοντάς μου την παρούσα διδακτορική διατριβή και αφετέρου για τις επιστημονικές γνώσεις, το αμέριστο ενδιαφέρον και την πολύτιμη καθοδήγησή του, ασκώντας ουσιαστική επίβλεψη καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της. Με τη βαθιά του γνώση και εμπειρία καθώς και το οξύτατο πνεύμα του με βοήθησε να ξεπεράσω τις δυσκολίες που παρουσιάστηκαν στην πορεία αυτή και αποτέλεσε πηγή έμπνευσης για την επιστημονική μου πορεία γενικότερα. Η αστείρευτη και ειλικρινής διάθεσή του για υψηλού επιπέδου ακαδημαϊκή καθοδήγηση, διάλογο και δημιουργική κριτική καθώς και η ευρύτητα της σκέψης του ήταν καθοριστικές για την ολοκλήρωση του παρόντος πονήματος.

Επίσης θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες και στα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής, την Επίκουρο Καθηγήτρια κα Γεωργία Βρυώνη για την αμέριστη συμπαράσταση και συνεχή ενθάρρυνση που μου παρείχε, τις συμβουλές της και την πολύτιμη φιλία της, καθώς και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ν. Καποτά.

Ιδιαίτερη μνεία πρέπει να γίνει στην απλόχερη βοήθεια που μου προσέφερε ο Αναπληρωτής Καθηγητής κ. Σπύρος Πουρνάρας, η συμβολή του οποίου ήταν καθοριστική. Τον ευχαριστώ θερμά για τον χρόνο που διέθεσε, την μετάγγιση ερευνητικής γνώσης και ζήλου, επιμονής, υπομονής και μεθοδικότητας και επίσης για την καίρια επιστημονική συνεισφορά του, τις εύστοχες παρατηρήσεις του, τις πολύτιμες συμβουλές του και την άψογη συνεργασία μας.

Επίσης ευχαριστώ την Επίκουρο Καθηγήτρια κα Β. Καψιμάλη και τους Επίκουρους Καθηγητές κ. Ι. Παπαπαρασκευά και κ. Ν. Σπανάκη για την προθυμία τους να συμμετάσχουν στην αξιολόγηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής ως μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής.

Οφείλω να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου πρωτίστως στον Professor Herman Goossens αλλά και στην Dr Surbhi Malhotra-Kumar, στην Christine Lammens κα-

θώς και στους λοιπούς συνεργάτες του Πανεπιστημίου της Αμβέρσας για την υλικοτεχνική υποδομή και τις γνώσεις που μου προσέφεραν και επιπλέον διότι με περιέβαλαν με εμπιστοσύνη και με τίμησαν με τη φιλία τους. Η επιστημονική αρτιότητα, ο επαγγελματισμός, η μεθοδικότητα, ο τρόπος σκέψης και η ποιότητα της ερευνητικής τους εργασίας αποτελούν για μένα φωτεινό παράδειγμα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τη Διευθύντρια του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου του Γ.Ν. Πειραιά «Τζάνειο» Δρ Κ. Θέμελη-Διγαλάκη για την παρότρυνση και την ένθερμη υποστήριξη που μου παρείχε και παρέχει, την εμπιστοσύνη που μου δείχνει καθώς και τις γόνιμες συμβουλές της. Το αμείωτο ενδιαφέρον και η συνεχής ενθάρρυνση από μέρους της για κάθε ερευνητική δραστηριότητα αποτελούν ένα συνεχές κίνητρο.

Οφείλω επίσης να ευχαριστήσω τους ιατρούς της ΜΕΘ και ιδιαίτερα το Διευθυντή Δρ Α. Πρεκατέ και τη Δρ. Π. Τσελιώτη για την ουσιαστική βοήθειά τους στην συλλογή των κλινικών δεδομένων των ασθενών καθώς και για τις γόνιμες συζητήσεις μας, που βοήθησαν να απαντηθούν σημαντικά κλινικά ερωτήματα.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους λοιμωξιολόγους Δρ Δ. Βουτσινά, Δρ Γ. Χρύσο, Σ. Δριμή και Δ. Καραγεωργόπουλο και τη νοσηλεύτρια της ΕΝΛ Ε. Κουσούλη για την ουσιαστική συμβολή τους καθώς και τους λοιπούς συναδέλφους του Γ.Ν. Πειραιά «Τζάνειο» για το πνεύμα συνεργασίας που επέδειξαν.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας μελέτης για διδακτορική διατριβή ήταν η εργαστηριακή, κλινική και επιδημιολογική διερεύνηση των λοιμώξεων από στελέχη *Klebsiella pneumoniae* που παράγουν KPC καρβαπενεμάση.

Μελετήθηκαν προοπτικά, για χρονικό διάστημα 2,5 ετών (5/08-10/10), όλοι οι ασθενείς Τριτοβάθμιου Νοσοκομείου από τους οποίους απομονώθηκε τουλάχιστον ένα στέλεχος *K. pneumoniae* με μοριακά επιβεβαιωμένη παραγωγή KPC καρβαπενεμάσης (KPC-KP). Αναλύθηκαν τα κλινικά και επιδημιολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών και διερευνήθηκαν οι παράγοντες κινδύνου για εμφάνιση κλινικής λοίμωξης. Μελετήθηκε η κλινική και μικροβιολογική έκβαση των λοιμώξεων, καθορίστηκαν οι παράγοντες που σχετίζονται με δυσμενή έκβαση στους ασθενείς με βακτηραιμία και συγκρίθηκαν τα χρησιμοποιηθέντα σχήματα αντιμικροβιακών. Διερευνήθηκαν οι παράγοντες κινδύνου για λοίμωξη ή αποικισμό από ανθεκτικό στην κολιστίνη στέλεχος καθώς και η επίδραση της αντοχής στην έκβαση. Επίσης, πραγματοποιήθηκε έλεγχος ορθικής φορέας και αναλύθηκαν τα αποτελέσματα, ενώ επιπλέον αξιολογήθηκε και ένας νέος φαινοτυπικός αλγόριθμος για την ειδική ανίχνευση των στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες τύπου KPC ή/και MBL από τις καλλιέργειες ορθικών επιχρισμάτων. Ο έλεγχος των απομονωθέντων στελεχών περιελάμβανε τον καθορισμό του προφίλ ευαισθησίας, τον φαινοτυπικό και μοριακό έλεγχο για την παρουσία του *bla*<sub>KPC</sub> γονιδίου και άλλων γονιδίων β-λακταμασών και τη μοριακή τυποποίηση τους.

Κατά το χρονικό διάστημα της μελέτης απομονώθηκαν 414 στελέχη KPC-KP από 185 ασθενείς. Η επίπτωση των περιπτώσεων με απομόνωση KPC-KP στελέχους παρουσιάζει στατιστικά σημαντική αύξηση ( $p < 0,001$ ) το 2009 σε σύγκριση με το 2008, τόσο στο σύνολο των νοσηλευτικών τμημάτων (από 31,09 σε 74,35 περιπτώσεις ανά 100.000 ασθενονήμερες), όσο και στη ΜΕΘ (από 8,86 σε 18,03 περιπτώσεις ανά 1000 ασθενονήμερες). Το συνηθέστερο κλινικό υλικό απομόνωσης ήταν οι καλλιέργειες αίματος (25,6%). Η πλειονότητα των KPC-KP στελεχών απομονώθηκε από ασθενείς που νοσηλεύονταν στη ΜΕΘ (62,1%). Ο έλεγχος της ευαισθησίας έδειξε ότι υψηλότερη *in vitro* δραστηριότητα εμφάνισαν η τιγκεκυκλίνη (95,4%), η φωσφομυκίνη (93,8%), η γενταμικίνη (86,7%) και η κολιστίνη (79,5%). Από τη μελέτη συγκριτικής αξιολόγησης των μεθόδων ελέγχου ευαισθησίας στην τιγκεκυκλίνη προέκυψε σημαντικός βαθμός ασυμφωνίας



μεταξύ του Vitek 2 και της μεθόδου αναφοράς, με τάση για ψευδή αντοχή. Όλα τα στελέχη έφεραν το *bla*<sub>KPC-2</sub> γονίδιο. Ο έλεγχος παρουσίας γονιδίων άλλων καρβαπενεμασών έδειξε ότι 21 στελέχη έφεραν και το γονίδιο *bla*<sub>VIM-1</sub>. Η μοριακή τυποποίηση με τη μέθοδο MLST ανέδειξε 5 ST τύπους (ST258, ST383, ST147, ST36 και ST340) με επικρατούντα τον ST258 (82,3%). Η μελέτη της αξιολόγησης του φαινοτυπικού αλγορίθμου για τις καλλιέργειες ορθικών επιχρισμάτων έδειξε ότι η μέθοδος παρουσίασε 97,1% ευαισθησία και 100% ειδικότητα για την ανίχνευση στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάση, ενώ η ταυτοποίηση του είδους της καρβαπενεμάσης ήταν ακριβής για όλα τα KPC-θετικά στελέχη.

Μελετήθηκαν 175 ασθενείς για τους οποίους συγκεντρώθηκαν πλήρη στοιχεία. Κλινική λοίμωξη εμφάνισαν οι 95, με συχνότερη τη βακτηριαμία (62 ασθενείς). Ανεξάρτητοι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση κλινικής λοίμωξης ήταν η ηλικία [ $p=0,03$ , OR=1,02 (1,002-1,04)] και η προηγηθείσα χορήγηση αντιμυκητιακών [ $p=0,043$ , OR=3,14 (1,04-9,50)]. Έλεγχος αποικισμού με λήψη ορθικού επιχρίσματος, κατά την εισαγωγή και ανά εβδομάδα νοσηλείας, πραγματοποιήθηκε σε 81 ασθενείς της μελέτης και από αυτούς οι 60 (74,1%) βρέθηκαν αποικισμένοι στο γαστρεντερικό με KPC-KP στέλεχος, πριν την απομόνωση σε κλινικό δείγμα. Όταν στο μοντέλο εισήχθησαν και τα δεδομένα του ελέγχου ορθικής φορέας, ο προηγηθείς της απομόνωσης σε κλινικό δείγμα αποικισμός στο γαστρεντερικό ήταν ο μοναδικός ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου [ $p=0,001$ , OR=6,40 (2,05-19,98)]. Η ολική θνητότητα ήταν 36% για το σύνολο των ασθενών και βρέθηκε σημαντικά υψηλότερη στους ασθενείς με κλινική λοίμωξη (50,1%,  $p<0,001$ ). Η θνητότητα της λοίμωξης ήταν 32,6%. Μικροβιολογική εκκρίζωση σημειώθηκε στο 43,4% των ασθενών.

Στη μελέτη των παραγόντων που σχετίζονται με την έκβαση στους ασθενείς με βακτηριαμία η ηλικία [ $p=0,025$ , OR=1,39 (1,04-1,86)], το APACHE II score κατά την έναρξη της λοίμωξης [ $p=0,012$ , OR=1,41 (1,08-1,84)] και η μη χορήγηση κατάλληλης αντιμικροβιακής αγωγής [ $p=0,026$ , OR=0,01 (0,0002-0,57)] αναδείχτηκαν ως ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες για δυσμενή έκβαση. Η χορήγηση συνδυασμών δραστικών αντιμικροβιακών (N=23) οδήγησε σε κλινική επιτυχία για το σύνολο των ασθενών, ενώ η θνητότητα της λοίμωξης στην ομάδα των ασθενών που χορηγήθηκε δραστική μονοθεραπεία (N=20) ήταν σημαντικά υψηλότερη (40%,  $p=0,001$ ).

Κατά τη διάρκεια της μελέτης, συνολικά 34 ασθενείς έφεραν ανθεκτικά στην κολιστίνη στελέχη (CR) KPC-KP. Η διερεύνηση των παραγόντων κινδύνου για λοίμωξη ή αποικισμό από στέλεχος CR KPC-KP δεν ανέδειξε συσχέτιση με την προηγηθείσα χορήγηση κολιστίνης και τη διάρκεια χορήγησης της, ενώ μοναδικός ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου ήταν η προηγηθείσα ορθική φορεία CR KPC-KP. Από τον έλεγχο της κλωνικότητας των στελεχών προέκυψε ότι όλα τα στελέχη ανήκαν στον ίδιο κλώνο.

Η κατά κύριο λόγο κλωνική φύση της επιδημίας αναδεικνύει τον πρωταρχικό ρόλο των μέτρων ελέγχου των λοιμώξεων για τον περιορισμό της περαιτέρω διασποράς των KPC-KP στελεχών. Σημαντική συνιστώσα των στρατηγικών παρέμβασης είναι ο έλεγχος φορείας, που επιπλέον παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τους ασθενείς που βρίσκονται σε κίνδυνο για ανάπτυξη κλινικής λοίμωξης. Στη μελέτη αξιολογήθηκε ένας νέος φαινοτυπικός αλγόριθμος που επιτρέπει την ταχεία και ειδική για τον τύπο της καρβαπενεμάσης ανίχνευση στις καλλιέργειες ορθικών επιχρισμάτων, με χαμηλό κόστος και ευκολία στην εφαρμογή. Οι λοιμώξεις από στελέχη KPC-KP παρουσιάζουν υψηλή επίπτωση και συνοδεύονται από υψηλή θνητότητα. Στην παρούσα μελέτη επιχειρήθηκε να απαντηθούν ερωτήματα που τίθενται στην κλινική πράξη, αναφορικά με την κλινική επιδημιολογία των λοιμώξεων και την καλύτερη θεραπευτική τους προσέγγιση. Στο πλαίσιο αυτό, αναδείχτηκε για πρώτη φορά η σημαντική υπεροχή της συνδυαστικής αντιμικροβιακής αγωγής αλλά και η αδυναμία του αυτοματοποιημένου συστήματος Vitek 2 να ανιχνεύσει αξιόπιστα την ευαισθησία στην τιγκεκυκλίνη.

## ABSTRACT

The aim of the study was the clinical, laboratory and epidemiological investigation of infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* (KPC-KP).

A prospective observational cohort study was conducted between May 2008 and October 2010, in a tertiary care hospital in Athens, Greece. All consecutive patients with at least one clinical sample positive for molecularly-confirmed KPC-KP were identified and followed up until their discharge or death. Rectal screening was also performed. A simple phenotypic algorithm for direct and specific detection of KPC and/or MBL producers directly from rectal swabs' cultures was also evaluated. Patients' clinical and epidemiological characteristics were studied and risk factors for clinical infection were investigated. Clinical and microbiological outcomes were defined. Predictors of infection mortality were examined in patients with documented BSI and the treatment regimens used were assessed. The factors associated with colistin-resistant (CR) KPC-KP acquisition were also studied and its impact on patients' outcome was investigated. The study isolates were phenotypically screened for carbapenemase production and their susceptibility profile was determined. The presence of *bla*<sub>KPC</sub> and other carbapenemases genes was detected by PCR and sequencing. Genetic relatedness of the isolates was examined by MLST.

During the study period, a total of 414 KPC-KP isolates were recovered from clinical samples of 185 patients. Medical records were available for evaluation for 175 of them. The most common site of isolation was blood cultures (25.6%). The majority of KPC-KP isolates was derived from ICU patients (62.1%). A statistically significant increase in incidence of KPC-KP isolations was observed in 2009, compared to 2008 (31.09 versus 74.35 per 100,000 patients-days,  $p < 0.001$ ). The same increasing trend was noted for ICU (8.86 versus 18.03 per 1000 patients-days,  $p < 0.001$ ). Susceptibility testing showed higher *in vitro* activity for tigecycline (95.4%), fosfomycin (93.8%), gentamicin (86.7%) and colistin (79.5%). Comparative evaluation of tigecycline susceptibility testing methods revealed significant discrepancies between Vitek2 and reference broth microdilution, with Vitek2 producing higher MICs, resulting in false resistance. PCR detected the concomitant presence of *bla*<sub>VIM-1</sub> and *bla*<sub>KPC-2</sub> gene in 21 isolates. MLST classified the isolates into 5 sequence types (ST258, ST383, ST147, ST36, and ST340). The predominant type was ST258 (82.3%). The culture-based phenotypic algorithm for rectal screen-

ing exhibited 97.1% sensitivity and 100% specificity for detecting KPC and/or MBL producers in surveillance swabs. This method accurately detected the type of carbapenemase for all KPC-producing isolates.

The study population consisted of 175 patients either infected (95) or colonized (80) with KPC-KP isolates. The most common infection type was BSI (62 patients). Independent risk factors for clinical infection was patients' age [ $p=0.03$ , OR=1.02 (1.002-1.04)] and prior exposure to antifungals [ $p=0.043$ , OR=3.14 (1.04-9.50)]. A total of 81 patients were screened for rectal colonization at admission and they were also repeatedly tested during hospitalization. Rectal screening was positive for KPC-KP prior to isolation from clinical sample in 60 patients (74.1%). After introduction of rectal screening data into the multivariate model, prior rectal colonization remained the only independent predictor of clinical infection [ $p=0.001$  OR=6.40 (2.05-19.98)]. Overall mortality was 36%, being significantly higher for clinically infected patients (50.1%,  $p < 0.001$ ). Infection mortality was 32.6%. Microbiological response was noted for 43.4% of the patients.

In the cohort of 62 patients with BSI, age [ $p=0.025$ , OR=1.39 (1.04-1.86)], APACHE II score at infection onset [ $p=0.012$  OR=1.41 (1.08-1.84)] and inappropriate antimicrobial treatment [ $p=0.026$ , OR=0.01 (0.0002-0.57)] were identified as independent predictors of infection mortality. All 23 patients that received combination schemes had favourable infection outcome; in contrast, infection mortality was significantly higher among patients treated with appropriate monotherapy (40%,  $p= 0.001$ ).

A total of 34 patients infected or colonized with colistin-resistant (CR) KPC-KP isolates were identified. Investigation of risk factors for CR KPC-KP acquisition showed that colistin resistance was not associated with colistin administration, and duration of colistin treatment. The only independent predictor was prior rectal colonization with CR KPC-KP isolate. Molecular typing showed that both CR and CS isolates of the study belonged to the same clone, indicating horizontal dissemination.

Containment of KPC-producing bacteria is a key priority. The dominance of a single KPC-producing clone, highly efficient for cross-transmission in the hospital setting, highlights the potential of rigorous infection control strategies for successful control of the outbreak. An important component of such interventional strategies is rectal screening, which also provides useful information about patients at risk for clinical infection and guidance for empirical treatment. In this context, a new low-cost phenotypic algorithm

for direct and specific detection of carbapenemase producers from surveillance cultures has been proposed. Infections caused by KPC-KP isolates are increasingly prevalent in our settings and they are associated with high mortality rates; however the optimal treatment has not yet been documented. This study investigated clinical and therapeutic issues and demonstrated the superiority of combination regimens in the treatment of KPC-infections. It also revealed the shortcomings of Vitek2 for tigecycline susceptibility testing, the inaccuracies of which may falsely restrict the available treatment options.

**“Science never solves a problem without creating ten more”**

**George Bernard Shaw**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή.....	8
1. Καρβαπενέμες, χημική δομή και μηχανισμός δράσης.....	8
2. Μηχανισμοί αντοχής των Gram-αρνητικών βακτηριδίων στις καρβαπενέμες.....	11
3. Καρβαπενεμάσες .....	13
3.1 Σχήματα ταξινόμησης.....	14
3.1.1 Τάξη A κατά Ambler.....	18
3.1.2 Τάξη B κατά Ambler.....	20
3.1.3 Τάξη C κατά Ambler.....	25
3.1.4 Τάξη D κατά Ambler.....	26
4. KPC καρβαπενεμάσες.....	29
4.1 Κατάταξη, δομή και μηχανισμός δράσης.....	29
4.2 Ιδιότητες.....	30
4.3 Παραλλαγές των KPC καρβαπενεμασών.....	31
4.4 Μηχανισμοί οριζόντιας μεταφοράς.....	33
4.5 Παράγοντες που σχετίζονται με το επίπεδο αντοχής στις καρβαπενέμες....	34
4.6 Επιδημιολογία.....	35
4.6.1 Διασπορά KPC καρβαπενεμασών σε στελέχη διαφόρων ειδών Εντεροβακτηριακών.....	35
4.6.2 Διασπορά KPC καρβαπενεμασών σε στελέχη αζυμωτικών.....	39
4.6.3 Παγκόσμια διασπορά στελεχών <i>Klebsiella pneumoniae</i> που παράγουν KPC καρβαπενεμάση.....	40
4.6.3.1 ΗΠΑ.....	40
4.6.3.2 Puerto Rico.....	41
4.6.3.3 Καναδάς.....	42
4.6.3.4 Νότιος Αμερική.....	42
4.6.3.5 Ασία.....	43
4.6.3.6 Αυστραλία.....	45
4.6.3.7 Αφρική.....	45

4.6.3.8	Ισραήλ.....	45
4.6.3.9	Ευρώπη.....	46
4.6.4	Διασπορά στελεχών <i>Klebsiella pneumoniae</i> που παράγουν ΚΡC καρβαπενεμάση στην Ελλάδα.....	51
4.6.5	Συμπεράσματα από τις μελέτες μοριακής επιδημιολογίας: διασπορά κλώνων.....	53
4.7	Εργαστηριακή ανίχνευση.....	55
4.7.1	Hodge test .....	57
4.7.2	Παράγωγα του βορονικού οξέος.....	57
4.7.3	Φασματοφωτομετρία.....	59
4.7.4	Φασματομετρία μάζας. ....	59
4.7.5	Άλλες μη μοριακές μέθοδοι.....	60
4.7.6	Μοριακές μέθοδοι.....	60
5.	Λοιμώξεις από στελέχη <i>Klebsiella pneumoniae</i> που παράγουν ΚΡC καρβαπενεμάση.....	61
5.1	Παράγοντες κινδύνου.....	62
5.2	Θνητότητα.....	63
5.3	Θεραπεία.....	64
5.3.1	<i>In vitro</i> ευαισθησία.....	64
5.3.2	<i>In vitro</i> μελέτες συνέργειας και φαρμακοδυναμικές μελέτες.....	65
5.3.3	Κλινική εμπειρία.....	65
6.	Έλεγχος αποικισμού από στελέχη <i>Klebsiella pneumoniae</i> που παράγουν ΚΡC καρβαπενεμάση.....	69
6.1	Μέθοδοι ελέγχου αποικισμού.....	72
6.1.1	Μη εμπορικά διαθέσιμες καλλιεργητικές μέθοδοι.....	72
6.1.2	Χρωμογόνα υλικά.....	73
6.1.3	Μοριακές μέθοδοι.....	74
6.2	Παράγοντες κινδύνου.....	75
7.	Στρατηγικές παρέμβασης για τον περιορισμό της διασποράς στελεχών <i>Klebsiella pneumoniae</i> που παράγουν ΚΡC καρβαπενεμάση.....	76



## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

<b>ΣΚΟΠΟΣ</b> .....	80
<b>ΥΛΙΚΟ</b> .....	81
1. Βακτηριακά στελέχη.....	81
2. Δεδομένα ασθενών.....	81
3. Ορισμοί.....	82
3.1 Ορισμοί λοιμώξεων.....	82
3.2 Λοιποί ορισμοί.....	83
<b>ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	86
1. Απομόνωση-Ταυτοποίηση.....	86
2. Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιμικροβιακά.....	86
2.1 Μελέτη συγκριτικής αξιολόγησης των μεθόδων ελέγχου ευαισθησίας στην τιγκεκυκλίνη.....	88
3. Όρια ευαισθησίας - Χαρακτηρισμός των στελεχών.....	89
4. Φαινοτυπικές δοκιμασίες παραγωγής καρβαπενεμασών.....	90
5. Μοριακός έλεγχος παραγωγής καρβαπενεμασών.....	91
5.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) .....	91
5.2 Εκχύλιση DNA.....	92
5.3 Πολυπλεκτική PCR για την ανίχνευση γονιδίων καρβαπενεμασών.....	93
6. Μοριακή τυποποίηση.....	95
7. Έλεγχος αποικισμού με λήψη ορθικού επιχρίσματος.....	97
8. Μέτρα ελέγχου των λοιμώξεων.....	99
9. Συλλογή δεδομένων ασθενών.....	100
10. Μελέτες ασθενών-μαρτύρων.....	100
10.1 Παράγοντες κινδύνου για εμφάνιση κλινικής λοίμωξης.....	101
10.2 Παράγοντες κινδύνου για ορθική φορεία σε ασθενείς Παθολογικού Τμήματος.....	101
10.3 Παράγοντες κινδύνου για δυσμενή έκβαση σε ασθενείς με βακτηραιμία.....	102
10.4 Παράγοντες κινδύνου για εμφάνιση λοίμωξης ή αποικισμού από ανθεκτικό στην κολιστίνη στέλεχος.....	102

11. Στατιστική ανάλυση.....	103
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>105</b>
1. Στελέχη.....	105
1.1 Κατανομή ανά κλινικό υλικό και νοσηλευτικό τμήμα.....	105
1.2 Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας.....	107
1.2.1 Αποτελέσματα μελέτης συγκριτικής αξιολόγησης των μεθόδων ελέγχου ευαισθησίας στην τιγκεκυκλίνη.....	108
1.3 Αποτελέσματα φαινοτυπικού ελέγχου παρουσίας καρβαπενεμασών.....	110
1.4 Αποτελέσματα μοριακού ελέγχου παρουσίας καρβαπενεμασών.....	110
1.5 Αποτελέσματα μοριακού ελέγχου παρουσίας ESBL.....	113
1.6 Αξιολόγηση του νέου φαινοτυπικού αλγορίθμου για τον έλεγχο ορθικής φο- ρείας.....	114
1.7 Αποτελέσματα μοριακής τυποποίησης.....	115
2. Ασθενείς.....	117
2.1 Επιδημική καμπύλη, επίπτωση, επιπολασμός.....	117
2.2 Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά.....	121
2.3 Προηγηθείσα χορήγηση αντιμικροβιακών.....	122
2.4 Παρεμβατικές πράξεις.....	124
2.5 Προηγηθείσα έκθεση στο νοσοκομειακό περιβάλλον.....	124
2.6 Αποτελέσματα ελέγχου αποικισμού.....	125
2.6.1 Αποτελέσματα προοπτικής μελέτης ελέγχου αποικισμού σε ασθενείς Παθολογικού Τμήματος.....	126
2.7 Κλινικό υλικό πρώτης απομόνωσης και πρώτο επεισόδιο λοίμωξης.....	128
2.8 Παράγοντες κινδύνου για εμφάνιση κλινικής λοίμωξης.....	129
2.9 Έκβαση.....	132
3. Κλινικές λοιμώξεις από στελέχη <i>Klebsiella pneumoniae</i> που παράγουν KPC καρβα- πενεμάση.....	132
3.1 Βακτηριαίμιες.....	132
3.1.1 Παράγοντες που σχετίζονται με τον ασθενή, το βακτηριακό στέλεχος και τη θεραπεία.....	132

3.1.2	Έκβαση.....	138
3.1.3	Αντιμικροβιακή αγωγή.....	139
3.1.4	Παράγοντες κινδύνου για δυσμενή έκβαση.....	141
3.2	Λοιμώξεις ουροποιητικού.....	142
3.2.1	Παράγοντες που σχετίζονται με τον ασθενή, το βακτηριακό στέλεχος και τη θεραπεία.....	142
3.2.2	Αντιμικροβιακή αγωγή.....	146
3.2.3	Έκβαση.....	146
3.3	Άλλες λοιμώξεις.....	147
3.3.1	Παράγοντες που σχετίζονται με τον ασθενή, το βακτηριακό στέλεχος, τη λοίμωξη και τη θεραπεία.....	147
3.3.2	Αντιμικροβιακή αγωγή.....	150
3.3.3	Έκβαση.....	151
3.4	Λοιμώξεις από ανθεκτικά στην κολιστίνη στελέχη <i>Klebsiella pneumoniae</i> που παράγουν KPC καρβαπενεμάση.....	151
3.4.1	Λοίμωξη ή αποικισμός από ανθεκτικό στην κολιστίνη στέλεχος.....	151
3.4.2	Παράγοντες κινδύνου για εμφάνιση λοίμωξης ή αποικισμού από ανθεκτικό στην κολιστίνη στέλεχος.....	153
3.4.3	Κατάλληλη αντιμικροβιακή αγωγή.....	158
3.4.4	Έκβαση.....	159
3.4.5	Μοριακή τυποποίηση.....	159
	<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>162</b>
	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>184</b>
	<b>ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ.....</b>	<b>229</b>



## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## Εισαγωγή

Την τελευταία δεκαετία, η εξάπλωση τόσο Gram-θετικών αλλά κυρίως Gram-αρνητικών βακτηρίων, τα οποία εμφανίζουν αντοχή στα περισσότερα διαθέσιμα αντιβιοτικά, έχει λάβει παγκόσμιες διαστάσεις και αναδεικνύεται μείζον πρόβλημα δημόσιας υγείας (1, 2). Οι επιπτώσεις είναι πολλαπλές: περιορίζονται δραματικά οι θεραπευτικές επιλογές, αυξάνεται η θνητότητα και η νοσηρότητα καθώς και ο χρόνος νοσηλείας, ενώ το κόστος στις υπηρεσίες υγείας πολλαπλασιάζεται (3, 4). Τα πολυανθεκτικά βακτήρια δεν περιορίζονται πλέον στο νοσοκομειακό περιβάλλον αλλά έχουν αναδυθεί και στην κοινότητα. Ταυτόχρονα εμφανίζονται αναφορές για λοιμώξεις προκαλούμενες από πανανθεκτικά στελέχη (5). Η συνεχής εξέλιξη της αντοχής, σε συνδυασμό με την έλλειψη ανάπτυξης νέων αντιμικροβιακών έχει εγείρει ανησυχία για επιστροφή στην προ των αντιβιοτικών εποχή (4, 6).

Για τα Gram-αρνητικά βακτήρια, το κυρίαρχο πρόβλημα είναι η παραγωγή καρβαπενεμασών από στελέχη Εντεροβακτηριακών (κυρίως *Klebsiella pneumoniae*), *Pseudomonas aeruginosa* και *Acinetobacter baumannii* (7, 8). Τα Εντεροβακτηριακά αποικίζουν το γαστρεντερικό σωλήνα και αποτελούν σημαντικά αίτια τόσο νοσοκομειακών όσο και λοιμώξεων της κοινότητας.

Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων τα κλινικά σημαντικά παθογόνα αποκτούν αντοχή στα αντιβιοτικά, καθώς και ο τρόπος διασποράς τους, έχουν αποτελέσει αντικείμενο εντατικής μελέτης. Γονίδια αντοχής παρόντα σε μια πληθώρα μεταθετών γενετικών στοιχείων μεταβιβάζονται σε στελέχη του ίδιου ή διαφορετικών ειδών οδηγώντας στη διασπορά της αντοχής και της πολυαντοχής και κάποιοι πολυανθεκτικοί κλώνοι εξαπλώνονται παγκοσμίως με αξιοσημείωτη επιτυχία (1). Η ανάπτυξη στρατηγικών αντιμετώπισης της παγκόσμιας αυτής απειλής αποτελεί προτεραιότητα της διεθνούς επιστημονικής κοινότητας και των αρμοδίων φορέων.

### 1. Καρβαπενέμες, χημική δομή και μηχανισμός δράσης

Οι καρβαπενέμες κατέχουν κυρίαρχη θέση στη θεραπευτική των λοιμώξεων. Διαθέτουν το ευρύτερο φάσμα μεταξύ όλων των β-λακταμικών αντιβιοτικών, τόσο έναντι των Gram-θετικών, όσο και έναντι των Gram-αρνητικών βακτηρίων και κατά συνέπεια χρη-

σιμοποιούνται ως «τελευταίας γραμμής» αντιβιοτικά σε σοβαρές λοιμώξεις σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς (9). Δυστυχώς, η ανάδυση των πολυανθεκτικών παθογόνων, απειλεί πλέον τη χρησιμότητα των καρβαπενεμών (8). Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον για τις καρβαπενέμες ανανεώνεται, εστιάζοντας στο ρόλο τους σε σχέση με τους αναστολείς των β-λακταμασών, στα πλαίσια της επιτακτικής ανάγκης για ανάπτυξη νέων φαρμάκων (10).

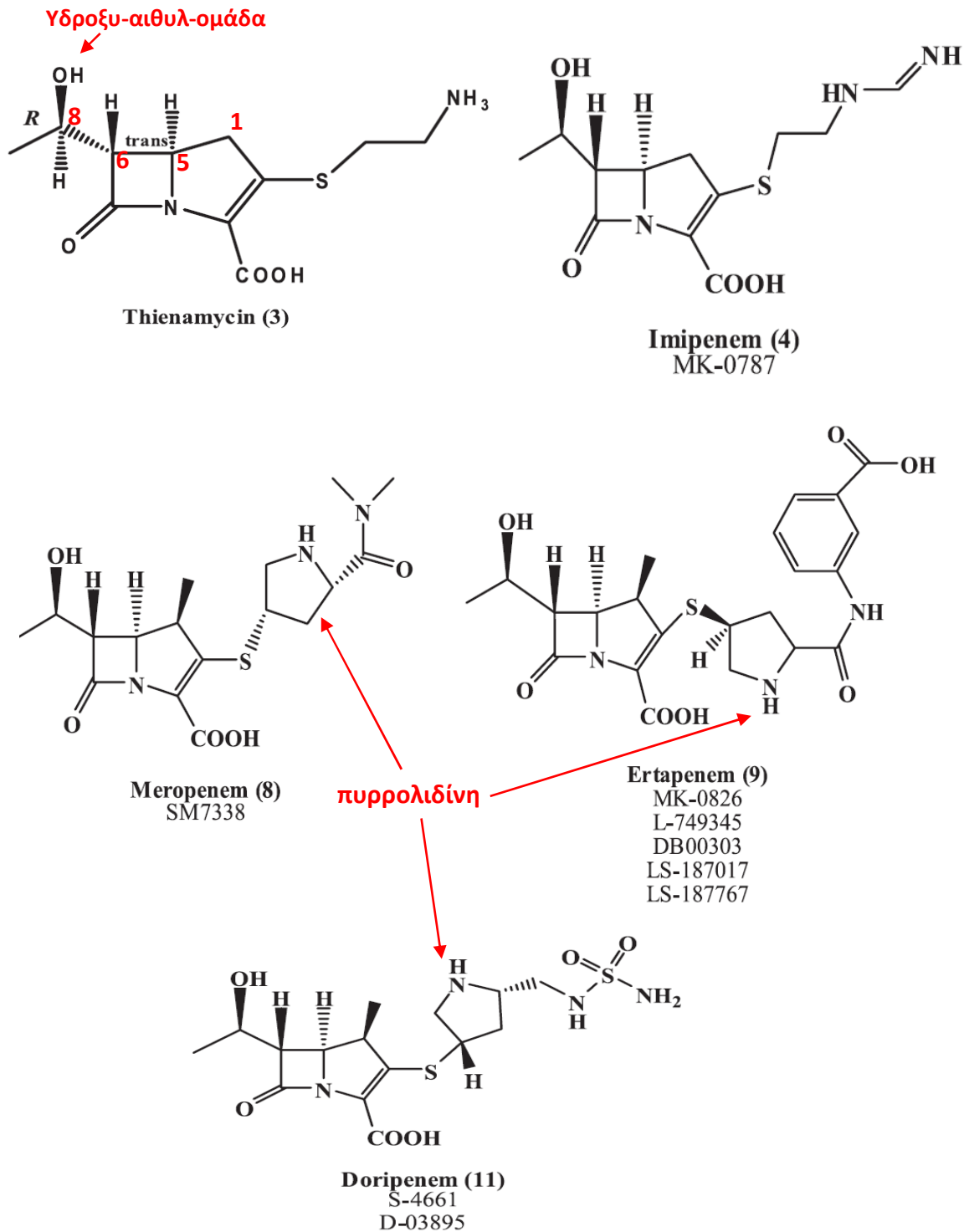
Η πρώτη «καρβαπενέμη» ήταν η θειαναμυκίνη, η οποία αποτελεί φυσικό προϊόν προερχόμενο από τον *Streptomyces cattleya* και αποτέλεσε τη μητρική ένωση για τη σύνθεση των καρβαπενεμών. Η ανακάλυψη της θειαναμυκίνης επήλθε στα πλαίσια της έρευνας για ουσίες που δρουν ως αναστολείς β-λακταμασών και ανακοινώθηκε το 1976 (11, 12). Πράγματι, κατέδειξε εκτός από ευρύ φάσμα αντιμικροβιακής δράσης και δραστηριότητα αναστολέα β-λακταμασών. Η βιοσυνθετική της οδός προσδιορίστηκε, όμως η απόδοση από τη διεργασία καθαρισμού ήταν χαμηλή. Η θειαναμυκίνη αποδείχτηκε ασταθής σε υδατικά διαλύματα και ευάλωτη στην υδρόλυση σε ήπια αλκαλικό περιβάλλον (9). Έτσι, συνέχισε η έρευνα για ανακάλυψη σταθερότερων παραγώγων. Η ιμιπενέμη αποτέλεσε την πρώτη θεραπευτικά διαθέσιμη καρβαπενέμη (1985) και ακολούθησαν και άλλες ουσίες, όπως η μεροπενέμη, η ερταπενέμη και η δοριπενέμη (Εικόνα 1). Δεδομένου ότι η ιμιπενέμη αδρανοποιείται από τη δεϋδροπεπτιδάση I (DHP-I) της ψηκτροειδούς παρυφής των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων, απαιτείται συγχορήγηση ενός αναστολέα, της σιλαστατίνης (13). Σημαντική πρόοδος στη συνθετική διεργασία ήταν η προσθήκη μιας μεθυλομάδας στη θέση 1-β. Αυτή η τροποποίηση προσφέρει προστασία στην υδρόλυση από DHP-I (14).

Αναφορικά με τη χημική τους δομή (Εικόνα 1), το άτομο άνθρακα (αντί για θείο) στη θέση 1 του δακτυλίου της θειαζολιδίνης, παίζει σημαντικό ρόλο στη δραστηριότητα, το αντιμικροβιακό φάσμα και τη σταθερότητα έναντι β-λακταμασών (15). Επίσης η στρατηγικά τοποθετημένη υδροξυ-αιθυλ-πλευρική αλυσίδα R2 βοηθά στην αντίσταση στην υδρόλυση από τις β-λακταμάσες. Οι καρβαπενέμες με R διαμόρφωση στη θέση C-8 εμφανίζουν υψηλή δραστηριότητα. Η *trans* διαμόρφωση του β-λακταμικού δακτυλίου στις θέσεις C-5 και C-6 οδηγούν σε σταθερότητα έναντι β-λακταμασών. Όπως και η θειαναμυκίνη, οι κλινικά διαθέσιμες καρβαπενέμες εμφανίζουν R διαμόρφωση στη θέση C-8 και *trans* στο δεσμό C-5-C-6. Οι καρβαπενέμες που φέρουν την ομάδα της

πυρρολιδίνης (μεροπενέμη, ερταπενέμη, δοριπενέμη) εμφανίζουν ευρύτερο φάσμα (16).

### Εικόνα 1. Χημική δομή των καρβαπενεμών

(προσαρμοσμένο από Papp-Wallace KM et al [10])





Οι καρβαπενέμες εισέρχονται στα Gram-αρνητικά βακτήρια μέσω πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης (OMPs), που είναι γνωστές ως πορίνες. Υπερέχουν στη διαπερατότητα μέσω της εξωτερικής μεμβράνης έναντι των άλλων β-λακταμών, δεδομένου ότι είναι μικρά μόρια και εμφανίζουν αμφοτερική φύση (9). Ο μηχανισμός δράσης τους δεν διαφέρει από αυτόν των υπόλοιπων β-λακταμικών αντιβιοτικών. Αφού διασχίσουν τον περιπλασμικό χώρο, ακυλιώνουν με μη αναστρέψιμο τρόπο τις PBPs (τρανσγλυκοζιλάσες, τρανσπεπτιδάσες και καρβοξυπεπτιδάσες), οι οποίες καταλύουν τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης για το σχηματισμό του κυτταρικού τοιχώματος. Σημαντικός παράγοντας για τη μεγαλύτερη δραστικότητα των καρβαπενεμών έναντι άλλων β-λακταμικών είναι η ικανότητά τους να συνδέονται με διαφορετικές PBPs (17). Διαθέτουν υψηλή χημική συγγένεια για τις PBP-2, PBP-4, PBP-3 και PBP-1β (9). Δεδομένου ότι ο σχηματισμός της πεπτιδογλυκάνης είναι μια δυναμική διαδικασία σύνθεσης και ауτόλυσης, η αναστολή των PBPs οδηγεί στην ауτόλυση, η πεπτιδογλυκάνη εξασθενεί και το κύτταρο οδηγείται σε ωσμωτική λύση.

## **2. Μηχανισμοί αντοχής των Gram-αρνητικών βακτηριδίων στις καρβαπενέμες**

Οι μηχανισμοί αντοχής στις καρβαπενέμες περιλαμβάνουν την παραγωγή β-λακταμασών, την υπερέκφραση αντλιών εκροής, μεταλλάξεις που τροποποιούν την έκφραση ή/και τη λειτουργία των πορινών και μεταβολές στις PBPs (Εικόνα 2). Συνδυασμοί των παραπάνω μηχανισμών μπορεί να συνυπάρχουν σε συγκεκριμένα βακτηριακά είδη, οδηγώντας σε υψηλού επιπέδου αντοχή (10).

Οι υποκείμενοι μηχανισμοί αντοχής διαφέρουν μεταξύ Gram-θετικών κόκκων και Gram-αρνητικών βακτηριδίων. Στους Gram-θετικούς κόκκους η αντοχή στις καρβαπενέμες είναι κατά κύριο λόγο αποτέλεσμα μεταλλάξεων που οδηγούν σε υποκαταστάσεις αμινοξέων στη νουκλεοτιδική αλληλουχία των PBPs ή απόκτησης γονιδίων που κωδικοποιούν νέες PBPs με χαμηλή χημική συγγένεια σύνδεσης (18). Αντίθετα, όλοι οι προαναφερθέντες μηχανισμοί έχουν σχετιστεί με την αντοχή στις καρβαπενέμες στα Gram-αρνητικά βακτηρίδια με προεξάρχουσα την παραγωγή καρβαπενεμασών (19). Ειδικότερα στα Εντεροβακτηριακά, η αντοχή μπορεί να οφείλεται σε ελαττωμένη διαπερατότητα μέσω της εξωτερικής μεμβράνης σε συνδυασμό με υπερέκφραση

β-λακταμασών που διαθέτουν ασθενή δραστικότητα καρβαπενεμάσης ή σε παραγωγή καρβαπενεμασών.

Ο πρώτος μηχανισμός έχει πολύ μικρότερη επιδημιολογική σημασία από την παραγωγή καρβαπενεμασών, διότι η αντοχή δεν είναι μεταβιβάσιμη, όπως συμβαίνει με τις περισσότερες καρβαπενεμάσες και αφετέρου η διαταραχή στις πορίνες μπορεί να έχει σημαντικό «fitness cost» για το μικρόβιο (20). Τα στελέχη αυτά έχουν πολύ περιορισμένη κλωνική διασπορά (21). Η αντοχή αφορά συχνότερα στην ερταπενέμη και έχει αναφερθεί για στελέχη *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* και *Enterobacter aerogenes*, με τροποποίηση ή απώλεια σημαντικών, μη ειδικών πορινών ή αυξημένη έκφραση αντλιών εκροής (22, 23, 24, 25, 26).

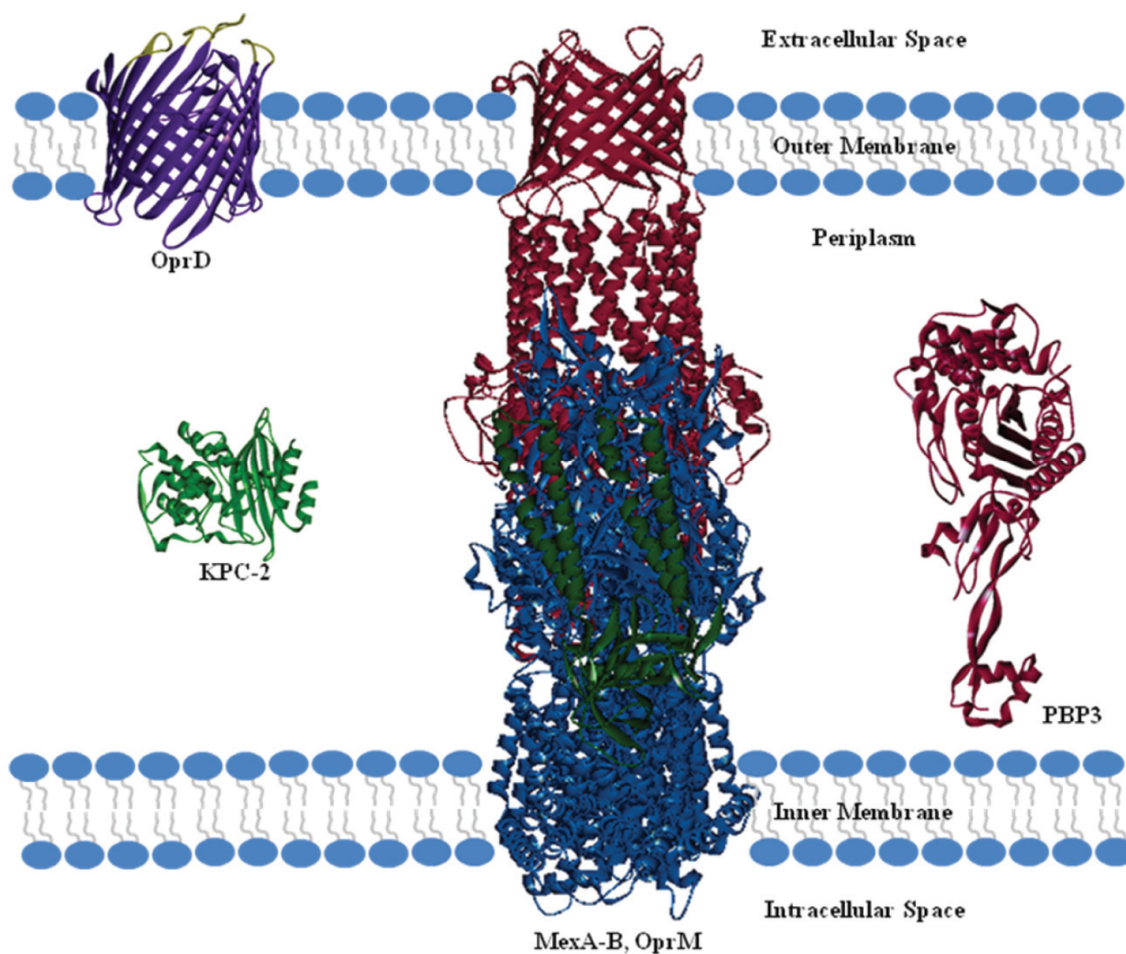
Από μελέτη που διερεύνησε 171 ανθεκτικά στην ερταπενέμη στελέχη *Klebsiella* και *Enterobacter* spp. που εστάλησαν σε εργαστήριο αναφοράς του Ηνωμένου Βασιλείου μεταξύ Ιουνίου 2004 και Απριλίου 2006, βρέθηκε ότι στην πλειονότητα των στελεχών η αντοχή οφειλόταν σε παρουσία ESBLs ή AmpC-β-λακταμασών σε συνδυασμό με διαταραχή της διαπερατότητας (27). Ανάλογη μεταγενέστερη μελέτη (2006-2007), κατέδειξε μια ποικιλία μηχανισμών που οδηγούσαν σε απώλεια της έκφρασης των πορινών (OmpK35 ή OmpK36 στα στελέχη *Klebsiella* και OmpC ή OmpF στα στελέχη *Enterobacter* spp). Οι μηχανισμοί που ανευρέθηκαν περιελάμβαναν ελλείμματα (deletions), σημειακές μεταλλάξεις, αλληλουχίες εισδοχής και μεταλλάξεις στην περιοχή του προαγωγέα. Τα στελέχη *Klebsiella* spp έφεραν SHV ή/και CTX-M β-λακταμάσες και τα στελέχη *Enterobacter* spp εμφάνιζαν υπερέκφραση AmpC-β-λακταμασών. Ο μηχανισμός αυτός επηρεάζει κατά κύριο λόγο την αντοχή στην ερταπενέμη, δεδομένου ότι η ερταπενέμη διέρχεται με βραδύτερο ρυθμό, λόγω του μεγέθους του μορίου της και του αρνητικού της φορτίου, μέσω των ελασσόνων πορινών που αναλαμβάνουν όταν οι μείζονες πορίνες χάνονται (28).

Η αντοχή στις καρβαπενέμες αν και σχετικά συχνή μεταξύ των Gram-αρνητικών αζιμωτικών βακτηρίων, σε παγκόσμια βάση παρέμενε σπάνια στα Εντεροβακτηριακά. Όμως από τις αρχές της πρώτης δεκαετίας του 2000, επιδημίες από στελέχη Εντεροβακτηριακών που παράγουν καρβαπενεμάσες αναφέρονται με αυξανόμενη συχνότητα, ενώ η εμφάνισή τους είναι ενδημική σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές, μεταξύ των οποίων και η χώρα μας (29). Η διασπορά στελεχών, κλώνων και μεταθετών γενετικών

στοιχείων που φέρουν γονίδια καρβαπενεμασών διαμόρφωσε την παρούσα κατάσταση με την αντοχή στις καρβαπενέμες να συνιστά παγκόσμια απειλή.

## Εικόνα 2. Μηχανισμοί αντοχής στις καρβαπενέμες

(Papp-Wallace KM, et al [10])



### 3. Καρβαπενεμάσες

Οι καρβαπενεμάσες ανήκουν στις β-λακταμάσες και διαθέτουν το ευρύτερο φάσμα υδρόλυσης μεταξύ αυτών. Πρόκειται για ένζυμο που διαθέτουν ικανότητα υδρόλυσης για τις καρβαπενέμες. Το επίπεδο αντοχής στις καρβαπενέμες εξαρτάται από το είδος του ενζύμου και το γενετικό υπόβαθρο του βακτηρίου-ξενιστή (7). Αν και έχει επικρατήσει ο όρος καρβαπενεμάση, τα περισσότερα από αυτά τα ένζυμα αναγνωρίζουν υδρολυτικά σχεδόν όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά και οι καρβαπενέμες αποτελούν

μόνο ένα μέρος του φάσματος υδρόλυσής τους (30). Περιλαμβάνουν ένζυμα που ανήκουν στις μοριακές τάξεις A, B και D κατά Ambler. Επίσης, σπάνιες χρωμοσωμικές κεφαλοσπορινάσες της τάξης C, που παράγονται από Εντεροβακτηριακά, μπορεί να διαθέτουν ασθενή δραστικότητα καρβαπενεμάσης, αν και η κλινική τους σημασία παραμένει άγνωστη (29).

Ανάλογα με τον υδρολυτικό μηχανισμό στο ενεργό κέντρο τους διακρίνονται σε ένζυμα που φέρουν τουλάχιστον ένα άτομο ψευδαργύρου στο ενεργό κέντρο (μεταλλο-β-λακταμάσες) και σε ένζυμα που φέρουν σερίνη στο ενεργό κέντρο.

Δεδομένου ότι η σύνθεση των καρβαπενεμών βασίστηκε στο φυσικό παράγωγο θειαναμυκίνη από τον *Streptomyces cattleya*, είναι αναμενόμενο γονίδια καρβαπενεμασών να υπάρχουν σε περιβαλλοντικά βακτήρια, όπως φάνηκε για τον *Bacillus cereus* και την *Stenotrophomonas maltophilia* (30). Μέχρι το 1990 οι καρβαπενεμάσες περιγράφονταν ως ειδικές για το είδος, χρωμοσωμικές β-λακταμάσες. Τη χρονιά αυτή απομονώνεται από την Ιαπωνία η πρώτη πλασμιδιακή καρβαπενεμάση IMP-1, που εξακολουθεί να αποτελεί το κυρίαρχο ένζυμο στη χώρα αυτή (31). Η πρώτη καρβαπενεμάση στα Εντεροβακτηριακά ήταν η NmcA, που περιγράφηκε το 1993 σε στέλεχος *Enterobacter cloacae* (32). Έκτοτε και ιδιαίτερα από τις αρχές της νέας χιλιετίας, μια μεγάλη ποικιλία καρβαπενεμασών που ανήκουν και στις 3 τάξεις β-λακταμασών κατά Ambler (A, B και D) έχει ανιχνευθεί σε στελέχη Εντεροβακτηριακών (1, 7, 20, 21). Η παρουσία γονιδίων καρβαπενεμασών σε πλασμίδια, ιντεγκρόνια και τρανσποζόνια καθώς και η παγκόσμια διασπορά επιτυχημένων κλώνων ευνόησε την ταχεία εξάπλωσή τους.

Η ταχεία διασπορά και η μεγάλη ποικιλότητα των β-λακταμασών γενικότερα (πάνω από 1000 β-λακταμάσες έχουν περιγραφεί [[www.lahey.org/Studies/](http://www.lahey.org/Studies/)]) και των καρβαπενεμασών ειδικότερα, απαιτεί μια συστηματική προσέγγιση για την περιγραφή και την κατανόησή τους.

### 3.1 Σχήματα ταξινόμησης

Έχουν προταθεί διάφορα σχήματα ταξινόμησης των β-λακταμασών με βάση τα λειτουργικά τους χαρακτηριστικά ή τη δομή τους (33, 34). Πριν καταστεί εφικτή η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των γονιδίων, μια νέα β-λακταμάση αναλυόταν βιοχημικά με απομόνωση της πρωτεΐνης και προσδιορισμό του ισοηλεκτρικού σημείου και ακολουθούσαν ενζυμικές μελέτες ώστε να καθοριστεί η υδρόλυση των υποστρω-

μάτων και τα χαρακτηριστικά αναστολής (30). Η λειτουργική αυτή ταξινόμηση εξελίχθηκε με την πάροδο του χρόνου σε ένα ευρέως αποδεκτό σχήμα, το οποίο προτάθηκε από την Bush το 1989 (35), επεκτάθηκε το 1995 (36) και επικαιροποιήθηκε το 2010 (37). Η ταξινόμηση βασίζεται στην υδρολυτική ικανότητα των ενζύμων έναντι συγκεκριμένων β-λακταμών και στην αναστολή τους από αναστολείς β-λακταμασών. Με βάση το σχήμα αυτό, οι β-λακταμάσες κατατάσσονται σε 4 μεγάλες λειτουργικές ομάδες (ομάδες 1 έως 4) με την ομάδα 2 να υποδιαιρείται σε διάφορες υποομάδες. Στο σχήμα αυτό λειτουργικής ταξινόμησης οι καρβαπενεμάσες βρίσκονται κυρίως στις ομάδες 2f και 3. Παρότι η δομική ταξινόμηση είναι απλούστερη, η λειτουργική ταξινόμηση παρέχει τη δυνατότητα συσχέτισης των ενζύμων με την κλινική τους σημασία, δηλαδή την αντοχή που προσδίδουν σε συγκεκριμένες β-λακτάμες.

Με τη δομική ταξινόμηση η οποία βασίζεται στην ομολογία αμινοξέων, οι β-λακταμάσες κατατάσσονται σε 4 τάξεις: A, B, C και D. Οι μοριακές Τάξεις A, C και D περιλαμβάνουν ένζυμα που φέρουν σερίνη στο ενεργό τους κέντρο και εμφανίζουν δομικές ομοιότητες, ενώ τα ένζυμα της Τάξης B (MBLs) φέρουν ένα ή δύο ιόντα ψευδαργύρου σε συνεργασία με τις θέσεις His/Cys/Asp στο ενεργό κέντρο. Οι καρβαπενεμάσες περιλαμβάνουν ένζυμα από τις τάξεις A, B και D.

Τα σχήματα ταξινόμησης των β-λακταμασών παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Η ταξινόμηση και τα κυριότερα χαρακτηριστικά των καρβαπενεμασών παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

**Πίνακας 1. Σχήματα ταξινόμησης β-λακταμασών**

(προσαρμοσμένο από Drawz SM and Bonomo RA [38])

Τάξη κατά Amber	Τάξη κατά Bush-Jacoby-Medeiros	Προτιμώμενα υποστρώματα	Αναστολή από κλαβουλανικό	Αντιπροσωπευτικά ένζυμα
A (σερίνη πενικιλινάσες)	2a	Πενικιλίνες	+	PC1 από <i>S. aureus</i>
	2b	Πενικιλίνες, στενού φάσματος κεφαλοσπορίνες	+	TEM-1, TEM-2, SHV-1
	2be	Πενικιλίνες, στενού και ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες	+	SHV-2 έως SHV-6, TEM-3 έως TEM-26, CTX-Ms
	2br	Πενικιλίνες	-	TEM-30, SHV-72
	2c	Πενικιλίνες, καρβενικιλίνες	+	PSE-1
	2e	Ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες	+	FEC-1, CepA
B (μέταλλο-β-λακταμάσες)	2f	Πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες	±	KPC-2, SME-1, NMC-A
	3	Τα περισσότερα β-λακταμικά, συμπεριλαμβανομένων των καρβαπενεμών	-	IMP-1, VIM-1, CcrA και BclI (B1), CphA (B2), L1(B3)
C (κεφαλοσπορινάσες)	1	Κεφαλοσπορίνες, κεφαμυκίνες	-	AmpC, CMY-2, ACT-1, FOX-1, MIR-1
D (οξακιλλινάσες)	2d	Πενικιλίνες, κλοξακιλίνη	±	OXA-1, OXA-10
Δεν περιλαμβάνεται	4			

**Πίνακας 2. Ταξινόμηση και κυριότερα χαρακτηριστικά των καρβαπενεμασών**  
(προσαρμοσμένο από Canton R et al [1])

Μοριακή Τάξη <sup>1</sup> (Λειτουργική ομάδα <sup>2</sup> )	Ενζυμα	Αναστολή από		ATM	Μικροοργανισμοί	Θέση Γονιδίου	Επιδημιολογική σημασία
		CLA	EDTA				
A (2f)	SME-1 έως SME-3, IMI-1 έως IMI-3, NmcA, SFC-1	±	-	R	<i>Serratia marcescens</i> <i>Enterobacter cloacae</i>	Ch	±
	KPC-2 <sup>3</sup> έως KPC-13	±	-	R	Enterobacteriaceae , <i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i>	PI	++++
	GES-1 έως GES-20	+	-	S/R	Enterobacteriaceae , <i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i>	PI	+
B (3)	IMP-1 έως IMP-33, VIM-1 έως VIM-33, NDM-1 έως NDM-6, SPM-1, SIM, GIM, IND-1 έως IND-7, AIM, DIM, KHM	-	+	S	Enterobacteriaceae , <i>P. aeruginosa</i> , Άλλα GNNFB	PI/Ch	±/+++
D (2df) <sup>4</sup>	OXA-23 group (OXA-23, OXA-27, OXA-49) OXA-24 group (OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-40, OXA-72) OXA-40 group (OXA-40, OXA-143) OXA-58 OXA-48 group (OXA-48, OXA-54, OXA-181)	±	- <sup>5</sup>	S	<i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , Enterobacteriaceae	PI/Ch	++

ATM, αζτρεονάμη, Ch, χρωμοσωμικό, CLA, κλαβουλανικό οξύ, GNNFB, αζιμωτικά Gram αρνητικά, PI, πλασμιδιακό, R, ανθεκτικό, S, ευαίσθητο.

<sup>1</sup> Ταξινόμηση κατά Ambler.

<sup>2</sup> Ταξινόμηση κατά Bush, Jacoby και Medeiros.

<sup>3</sup> Η KPC-1 βρέθηκε ότι είναι ταυτόσημη με την KPC-2.

<sup>4</sup> Περιλαμβάνονται μόνο οι αντιπροσωπευτικές καρβαπενεμάσες Τάξης D για κάθε ομάδα.

<sup>5</sup> Μερικά OXA ένζυμα μπορεί να αναστέλλονται ελαφρώς από το EDTA.

### 3.1.1 Τάξη A κατά Ambler

Τα ένζυμα της Τάξης A συνήθως αναστέλλονται από τους εμπορικά διαθέσιμους αναστολείς β-λακταμασών (κλαβουλανικό, ταζομπακτάμη και σε μικρότερο βαθμό σουλμπακτάμη) με εξαίρεση τις KPC καρβαπενεμάσες (39). Περιλαμβάνουν ένζυμα τύπου TEM και SHV, καθώς και CTX-M (38). Φαίνεται ότι τα ένζυμα της Τάξης A είναι οι ευρύτερα διαδεδομένες β-λακταμάσες, δεδομένου ότι γονίδια που τις κωδικοποιούν έχουν βρεθεί σε διάφορα βακτηριακά φύλα (40).

Στις σερίνη-καρβαπενεμάσες της Τάξης A περιλαμβάνονται 3 κύριες μεγάλες ομάδες: NMC/IMI (“not metalloenzyme carbapenemase” και “imipenem-hydrolyzing β-lactamase”), SME (“*Serratia marcescens* enzyme”) και KPC (“*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase”). Μια τέταρτη ομάδα είναι οι GES β-λακταμάσες (“Guiana extended spectrum”). Αρχικά ταυτοποιήθηκαν ως ESB, αλλά στη συνέχεια βρέθηκαν ποικιλίες των GES με χαμηλή, αλλά μετρήσιμη ικανότητα υδρόλυσης για την ιμιπενέμη (30). Στην Τάξη A περιλαμβάνονται επίσης οι SFC-1 και BIC-1. Η πρώτη αποτελεί χρωμοσωμικό ένζυμο που βρέθηκε σε περιβαλλοντικό στέλεχος *Serratia fonticola* (41). Η BIC-1 περιγράφηκε σε στελέχη *Pseudomonas fluorescens* που απομονώθηκαν από δείγματα ληφθέντα από τον ποταμό Σηκουάνα. Το αντίστοιχο γονίδιο έχει επίσης χρωμοσωμική εντόπιση (42). Οι KPC, αποτελούν τα πλέον σημαντικά ένζυμα της Τάξης A από επιδημιολογική άποψη, λόγω της παγκόσμιας διασποράς τους (1, 7, 29).

Ο υδρολυτικός μηχανισμός των καρβαπενεμασών της Τάξης A απαιτεί την παρουσία σερίνης στη θέση 70 στο ενεργό κέντρο. Διαθέτουν ικανότητα υδρόλυσης για πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, αζτρεονάμη και καρβαπενέμες. Τα βακτήρια που εκφράζουν αυτά τα ένζυμα παρουσιάζουν μειωμένη ευαισθησία στην ιμιπενέμη, αλλά οι τιμές MIC ποικίλουν (29, 30). Σύμφωνα με τη σύστημα λειτουργικής ταξινόμησης κατατάσσονται στην ομάδα 2f.

Στην οικογένεια των GES έχουν περιγραφεί μέχρι τώρα 22 ένζυμα ([www.lahey.org/Studies/](http://www.lahey.org/Studies/)) μερικά από τα οποία (όπως η GES-2, GES-4, GES-5, GES-6, GES-11, GES-14) διαθέτουν ικανότητα υδρόλυσης για τις καρβαπενέμες. Η GES-1 περιγράφηκε σε στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* που απομονώθηκε σε νοσοκομείο του Παρισιού από βρέφος με προηγούμενη νοσηλεία στη Γαλλική Γουιάνα, από όπου προήλθε και η ονομασία αυτών των ενζύμων (43). Η GES-1 εμφάνιζε πολύ χαμηλή δραστηριότητα καρβαπενεμάσης και έτσι αρχικά θεωρήθηκε ESB. Η GES-2 διαφέρει από την GES-1



κατά μια υποκατάσταση (Gly170Asn) στη θέση 170 που εδράζεται στο Ω-loop της καταλυτικής περιοχής και έτσι υδρολύει και τις καρβαπενέμες, αν και σε χαμηλό βαθμό (44). Τα ένζυμα της ομάδας GES έχουν βρεθεί κυρίως σε στελέχη *Pseudomonas aeruginosa*, αλλά και σε στελέχη Εντεροβακτηριακών και *Acinetobacter baumannii* (40, 45, 46). Αναφέρονται από διάφορες γεωγραφικές περιοχές, μεταξύ των οποίων και η χώρα μας (30, 47). Στις περισσότερες περιπτώσεις πρόκειται για σποραδικές εμφανίσεις ή μικρού εύρους νοσοκομειακές επιδημίες (30, 48, 49). Οι GES κωδικοποιούνται από γονίδια που φέρονται σε ιντεγκρόνια, τα περισσότερα των οποίων βρίσκονται σε πλασμίδια, αν και έχουν περιγραφεί περιπτώσεις όπου το ιντεγκρόνιο έχει ενσωματωθεί στο χρωμόσωμα (40).

Οι NMC-A, IMI-1 και SME κωδικοποιούνται από γονίδια που εδράζονται στο χρωμόσωμα, γεγονός που εξηγεί και τη σπανιότητά τους. Τα SME ένζυμα έχουν περιγραφεί αποκλειστικά σε στελέχη *Serratia marcescens*. Η SME-1 ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά σε στελέχη που απομονώθηκαν στην Αγγλία το 1982 και ακολούθησαν σποραδικές αναφορές από τις ΗΠΑ, Καναδά και Ελβετία (50, 51, 52, 53, 54, 55). Οι τρεις παραλλαγές των SME ενζύμων διαφέρουν κατά ένα ή δύο αμινοξέα (56). Χαρακτηριστικό είναι ότι η ανίχνευση του ενζύμου προηγήθηκε της κλινικής χρήσης της ιμιπενέμης. Τα IMI και NMC-A ένζυμα έχουν σπάνια ανιχνευθεί σε στελέχη *Enterobacter* spp σε ΗΠΑ, Γαλλία και Αργεντινή (57, 58, 59, 60). Τα ένζυμα αυτά παρουσιάζουν 97% ομολογία αμινοξέων και σχετίζονται με τη SME-1, με 70% ομολογία (30). Η IMI-2 περιγράφηκε σε κλωνικά σχετιζόμενα στελέχη *Enterobacter asburiae* που απομονώθηκαν από ποταμούς των ΗΠΑ, αναδεικνύοντας ένα περιβαλλοντικό reservoir γονιδίων καρβαπενεμασών. Το υπεύθυνο γονίδιο βρέθηκε σε αυτομεταβιβαζόμενο πλασμίδιο και η έκφραση της IMI-2 ήταν επαγόμενη (61). Παρουσία του *bla*<sub>IMI-2</sub> γονιδίου περιγράφηκε και σε πλασμίδιο από στέλεχος *Enterobacter cloacae* από την Κίνα (62).

Ένα μοναδικό χαρακτηριστικό των καρβαπενεμασών της Τάξης A (KPC, SME, NmcA) είναι η παρουσία δισουλφιδικού δεσμού μεταξύ των Cys69 και Cys238 (σύστημα αρίθμησης κατά Ambler). Αυτός ο δεσμός μεταβάλλει το σχήμα του ενεργού κέντρου, τροποποιώντας τις αποστάσεις στην περιοχή αυτή. Η απόσταση μεταξύ Ser70 και Thr237 είναι μικρότερη, το μήκος του ενεργού κέντρου ελαττώνεται, όπως φαίνεται από την απόσταση μεταξύ Glu166 και Thr237 και το διάστημα μεταξύ Asn132 και Asn170 αυξάνεται σε σύγκριση με τις SHV-1 και TEM-1. Επιπρόσθετα, υπάρχουν διαφορετικά αμινο-

ξέα σε πολλές θέσεις (πχ Thr/Ser237, His/Trp105, Arg220 και Glu276). Αυτές οι σημαντικές δομικές μεταβολές ελαττώνουν το στερεοχημικό εμπόδιο που προκαλείται από την hydroxyethyl πλευρική αλυσίδα των καρβαπενεμών, η παρουσία της οποίας είναι καθοριστική στην αναστολή της δράσης των υπόλοιπων β-λακταμασών της Τάξης A που δεν ανήκουν στις καρβαπενεμάσες. Οι μεταβολές αυτές επιτρέπουν στις καρβαπενεμάσες Τάξης A να υδρολύουν την ιμιπενέμη με  $k_{cat}=10-1000\text{ s}^{-1}$ . Μελέτες μεταλλαξιογένεσης για τις SME-1 και KPC-2 έχουν αναδείξει διάφορες θέσεις που μπορεί να είναι απαραίτητες για την αντοχή στις καρβαπενεμές (10).

Η φυλογενετική ανάλυση των καρβαπενεμασών της Τάξης A, σε σύγκριση με άλλες β-λακταμάσες της Τάξης αυτής από βακτήρια που ανήκουν σε διαφορετικά φύλα, δείχνει ότι οι καρβαπενεμάσες σχηματίζουν 6 κλάδους με μακρινή συνάφεια και οι ομάδες εμφανίζουν ομολογία στην αμινοξική αλληλουχία που κυμαίνεται από 32% έως 70%. Η μεγάλη απόκλιση μεταξύ των ομάδων των καρβαπενεμασών της Τάξης A υποδηλώνει ότι οι ομάδες μπορεί να προέρχονται από διαφορετικούς προγόνους (40).

### 3.1.2 Τάξη B κατά Ambler

Στην Τάξη B κατά Ambler ανήκουν οι μεταλλο-β-λακταμάσες (MBLs) οι οποίες εμφανίζουν τη μεγαλύτερη μοριακή ποικιλομορφία μεταξύ των καρβαπενεμασών και συνιστούν σημαντικότερη κλινική απειλή. Οι MBL διαθέτουν ικανότητα υδρόλυσης για τις καρβαπενεμές, δεν αναστέλλονται από τους αναστολείς των β-λακταμασών και αναστέλλονται, λόγω του μηχανισμού δράσης τους, από χηλικούς παράγοντες, όπως το EDTA (30).

Διαφέρουν λειτουργικά από τις σερίνη-καρβαπενεμάσες δεδομένου ότι η υδρολυτική τους δράση βασίζεται στην παρουσία ιόντων ψευδαργύρου στο ενεργό τους κέντρο. Οι MBLs χρησιμοποιούν την υδροξυλική ομάδα ενός μορίου νερού σε συνεργασία με τα ιόντα ψευδαργύρου ώστε να υδρολύσουν τον αμιδικό δεσμό της β-λακτάμης (38). Ο συγκεκριμένος μηχανισμός υδρόλυσης είναι σημαντικός διότι οι MBL δεν σχηματίζουν ένα σταθερό ομοιοπολικό ενδιάμεσο, δηλαδή δεν συνδέονται με το β-λακταμικό υπόστρωμα και έτσι διαφεύγουν της δράσης των αναστολέων των β-λακταμασών (7). Τα τελευταία χρόνια τόσο η έρευνα των φαρμακευτικών εταιριών όσο και η ακαδημαϊκή έρευνα έχουν εστιάσει στο σχεδιασμό αναστολέων των MBL (63).

Με βάση την εξάρτησή τους από τα ιόντα  $Zn^{+2}$  υποδιαιρούνται σε 3 ομάδες: B1, B2 και B3. Τα ένζυμα της ομάδας B1 εμφανίζουν πλήρη δραστηριότητα τόσο με ένα, όσο και με δύο ιόντα  $Zn^{+2}$ . Στην ομάδα αυτή ανήκουν τα επίκτητα ένζυμα VIM, IMP, GIM, SPM, SIM, AIM, DIM και NDM καθώς και τα χρωμοσωμικά ένζυμα BclI του *Bacillus cereus* και CcrA του *Bacteroides fragilis*. Τα ένζυμα της ομάδας B2 χρησιμοποιούν ένα ιόν  $Zn^{+2}$  και αναστέλλονται από τη σύνδεση ενός επιπλέον ιόντος. Στη B2 ομάδα κατατάσσονται η CphA της *Aeromonas* και η Sfh-1 της *Serratia fonticola*. Τέλος η ομάδα B3 απαιτεί την παρουσία δύο ιόντων  $Zn^{+2}$ . Στην ομάδα αυτή ανήκει η L1 της *Stenotrophomonas maltophilia* (38).

Υδρολύουν όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά εκτός από την αζτρεονάμη, αν και πολλά κλινικά στελέχη φέρουν και άλλες β-λακταμάσες με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν αντοχή και στην αζτρεονάμη (7).

Οι πρώτες MBL που ανιχνεύθηκαν και μελετήθηκαν ήταν χρωμοσωμικά ένζυμα που βρέθηκαν σε περιβαλλοντικά βακτήρια και ευκαιριακά παθογόνα όπως *Bacillus cereus*, *Aeromonas* spp. και *Stenotrophomonas maltophilia* (64, 65, 66).

Σε αντίθεση με τα χρωμοσωμικά ένζυμα, οι επίκτητες MBL παρουσιάζουν εκτεταμένη εξάπλωση. Από τα ένζυμα αυτά οι VIM και IMP παρουσιάζουν παγκόσμια διασπορά με σημαντική τάση μετακίνησης από την *P. aeruginosa* προς τα Εντεροβακτηριακά. Το ενδιαφέρον της παγκόσμιας κοινότητας μετά το 2010 έχει εστιαστεί στην ταχύτατη διασπορά των NDM. Τα υπόλοιπα ένζυμα δεν έχουν διασπαρεί εκτός των χωρών προέλευσής τους (7).

Το 1988 απομονώθηκε στην Ιαπωνία στέλεχος *P. aeruginosa* με μεταβιβάσιμη αντοχή στην ιμιπενέμη λόγω παραγωγής MBL (31). Ακολούθησε η περιγραφή παρόμοιας MBL, που ονομάστηκε IMP-1, σε συζευκτικό πλασμίδιο από στέλεχος *Serratia marcescens* (67). Η IMP-1 εξακολουθεί να αποτελεί το κυρίαρχο ένζυμο στην Ιαπωνία (68). Η IMP-4 φαίνεται ότι είναι η προεξάρχουσα MBL στην Κίνα, αν και η ανυπαρξία ενός εθνικού συστήματος επιτήρησης δυσχεραίνει την εκτίμηση της κατάστασης (69). Η IMP-4 έχει επίσης ανιχνευθεί σε στελέχη Εντεροβακτηριακών και *P. aeruginosa* από την Αυστραλία, ως αποτέλεσμα πιθανής διασποράς από τη Νοτιανατολική Ασία (70). Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ετερογένεια στη διασπορά των MBL στην Κίνα: IMP-1, IMP-7, IMP-10 και VIM-2 σε στελέχη *P. aeruginosa* (71). Στην Ευρώπη, το πρώτο ένζυμο τύπου IMP (IMP-2) αναφέρεται το 2000 από την Ιταλία. Το *bla*<sub>IMP</sub> γονίδιο βρέθηκε σε δομή

ιντεγκρονίου Τάξης 1, σε στέλεχος *Acinetobacter baumannii* (72). Έχουν ανιχνευθεί 29 ένζυμα τύπου IMP σε τουλάχιστον 26 διαφορετικά είδη Gram-αρνητικών παθογόνων από 24 διαφορετικές χώρες. Τα περισσότερα από τα  $bla_{IMP}$  γονίδια φέρονται σε ιντεγκρόνια Τάξης 1, τα οποία βρίσκονται συνήθως ενσωματωμένα σε τρανσποζόνια ή/και πλασμίδια, ερμηνεύοντας την οριζόντια μεταφορά τους και την παγκόσμια κατανομή τους (73). Παρόλα αυτά τα ένζυμα τύπου IMP δεν έχουν κυριαρχήσει στην παγκόσμια σκηνή των MBL (7).

Οι MBL τύπου VIM παρουσιάζουν την ευρύτερη διασπορά μεταξύ των μεταλλο-β-λακταμασών. Το πρώτο VIM ένζυμο βρέθηκε σε στέλεχος *P. aeruginosa* που απομονώθηκε το 1997 στη Βερόνα της Ιταλίας, από όπου πήρε και το όνομα του (Verona integron-encoded metallo-β-lactamase). Το στέλεχος έφερε το  $bla_{VIM-1}$  γονίδιο σε δομή ιντεγκρονίου Τάξης I (74). Ακολούθησε η περιγραφή του  $bla_{VIM-2}$  γονιδίου, που βρέθηκε σε στέλεχος *P. aeruginosa* που απομονώθηκε το 1996 στη Γαλλία (75).

Στην Ελλάδα, η πρώτη επιδημία από στελέχη *P. aeruginosa* με παραγωγή VIM-1 σημειώνεται κατά τα έτη 1996-1998 και αποδίδεται σε κλωνική διασπορά (76). Το ίδιο έτος αναφέρεται στέλεχος *P. aeruginosa* που έφερε το  $bla_{VIM-2}$  γονίδιο σε ιντεγκρόνιο εντοπισμένο στο χρωμόσωμα (77). Έκτοτε σημειώνεται εκτεταμένη διασπορά τέτοιων στελεχών, που πλέον είναι ενδημικά στα Ελληνικά νοσοκομεία. Ταυτόχρονα παρατηρείται επιδημική εμφάνιση στελεχών *Klebsiella pneumoniae* που φέρουν καρβαπενεμάσες τύπου VIM, με προεξάρχουσα τη VIM-1 (78). Τα πρώτα τέτοια στελέχη απομονώθηκαν το 2002 και το  $bla_{VIM-1}$  γονίδιο βρέθηκε σε δομή ιντεγκρονίου Τάξης 1 σε συζευκτικά πλασμίδια (79). Παραγωγή καρβαπενεμασών τύπου VIM έχει αναφερθεί και από άλλα είδη Εντεροβακτηριακών με σποραδική εμφάνιση (*E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Providencia stuartii*). Παραγωγή καρβαπενεμασών τύπου VIM έχει επίσης αναφερθεί και από στελέχη τόσο *P. aeruginosa* όσο και *Klebsiella pneumoniae* υπεύθυνα για λοιμώξεις σχετιζόμενες με τις υπηρεσίες υγείας που έχουν έναρξη στην κοινότητα (80, 81).

Έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία 31 τύποι VIM ενζύμων σε τουλάχιστον 23 είδη Gram-αρνητικών βακτηρίων από περισσότερες από 40 χώρες (82). Η ομολογία στην αμινοξική αλληλουχία μεταξύ αυτών κυμαίνεται από 72,9 έως 99,6%. Τα περισσότερα  $bla_{VIM}$  γονίδια φέρονται σε ιντεγκρόνια Τάξης 1, μια γενετική πλατφόρμα που διαθέτει ικανότητα να αποκτά και να εκφράζει γενετικές κασέτες. Τα ιντεγκρόνια είναι συνήθως

ενσωματωμένα σε τρανσποζόνια τα οποία με τη σειρά τους φέρονται σε πλασμίδια. Τα ιντεγκρόνια παρουσιάζουν σημαντική ποικιλία με τουλάχιστον 110 διαφορετικές δομές να έχουν περιγραφεί. Στις περισσότερες περιπτώσεις συνυπάρχουν και άλλα γονίδια αντοχής (83).

Η πλέον ανησυχητική εξέλιξη των τελευταίων ετών, όπως αναφέρθηκε, είναι η ανάδυση των MBL στα Εντεροβακτηριακά. Σε παγκόσμιο επίπεδο, δύο είναι οι περιοχές όπου η εξάπλωση των MBL στα Εντεροβακτηριακά έχει λάβει ανησυχητικές διαστάσεις: η λεκάνη της Μεσογείου (ειδικά η Ελλάδα και η Τουρκία και σε μικρότερη έκταση η Ιταλία και η Ισπανία), καθώς και η Ινδική χερσόνησος. Τα υπεύθυνα ένζυμα είναι η VIM-1 και η NDM αντίστοιχα.

Το επίκεντρο της επιδημίας των NDM (New Delhi metallo-β-lactamases) είναι η Ινδική χερσόνησος. Το γονίδιο *bla*<sub>NDM-1</sub> χαρακτηρίστηκε το 2009 και κανείς δεν μπορούσε να προβλέψει το μέγεθος της διασποράς του και την παρούσα συχνότητα του. Μέχρι τώρα έχουν περιγραφεί 6 ποικιλίες του ενζύμου και έχουν κατατεθεί 7 αλληλουχίες (84). Η πρώτη αναφορά αφορούσε σε ασθενή από τη Σουηδία, ινδικής καταγωγής, που είχε επισκεφτεί την Ινδία και προσεβλήθη από λοίμωξη του ουροποιητικού. Το γονίδιο *bla*<sub>NDM-1</sub> βρέθηκε σε διαφορετικά πλασμίδια σε στέλεχος *K. pneumoniae* που απομονώθηκε από τα ούρα, αλλά και σε στέλεχος *E. coli* από τα κόπρανα του ασθενούς (85). Σύμφωνα με δεδομένα της μελέτης SENTRY, στελέχη που παράγαν NDM είχαν διασπαρεί στην Ινδία από το 2006 (86).

Σε μελέτη που διερευνήθηκε ο επιπολασμός της NDM-1 σε πολυανθεκτικά στελέχη Εντεροβακτηριακών από την Ινδία, το Πακιστάν και το Ηνωμένο Βασίλειο, βρέθηκε ευρεία διασπορά στελεχών που παράγουν NDM-1 σε πολλές περιοχές της Ινδίας, στο Πακιστάν και στο Bangladesh. Στις περισσότερες περιπτώσεις επρόκειτο για στελέχη *K. pneumoniae* και *E. coli*, αν και παραγωγή NDM-1 ανιχνεύθηκε και σε άλλα είδη (*Enterobacter cloacae*, *Proteus* spp, *Citrobacter freundii* και *Klebsiella oxytoca*). Το πιο ανησυχητικό εύρημα ήταν ότι η πλειονότητα των στελεχών από την Ινδία προέρχονταν από λοιμώξεις ουροποιητικού της κοινότητας. Οι περισσότεροι από τους ασθενείς του Ηνωμένου Βασιλείου που έφεραν τα NDM-θετικά στελέχη είχαν επισκεφτεί την Ινδία το τελευταίο έτος και αρκετοί από αυτούς είχαν υποβληθεί σε κοσμητική επέμβαση. Τα στελέχη δεν βρέθηκε να είναι κλωνικά σχετιζόμενα, με εξαίρεση μια περιοχή της Ινδίας, όπου σημειώθηκε διασπορά ενός κλώνου. Το *bla*<sub>NDM-1</sub> γονίδιο στις περισσότερες περι-

πτώσεις βρέθηκε σε πλασμίδια μεγέθους 50 - >500 kb, ενώ σε τρία στελέχη το γονίδιο εντοπίστηκε στο χρωμόσωμα. Τα πλασμίδια ήταν συνηθέστερα συζευκτικά και κατά τη μεταφορά παρατηρήθηκαν γεγονότα ανασυνδυασμού με απώλεια συνήθως DNA (87). Παρουσία του *bla*<sub>NDM-1</sub> γονιδίου έχει αναφερθεί συνηθέστερα σε στελέχη *K. pneumoniae* και *E. coli* αλλά και σε πολλά άλλα είδη Εντεροβακτηριακών (*Enterobacter cloacae*, *Proteus spp*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morgannii*, *K. oxytoca*, *Providencia spp*). Παραγωγή καρβαπενεμασών σπάνια αναφέρεται από στελέχη *E. coli*, το οποίο είναι ευρέως διαδεδομένο στο περιβάλλον και στο νερό και αποτελεί σημαντικό βακτήριο της εντερικής χλωρίδας του ανθρώπου. Μεταφέρεται εύκολα από άτομο σε άτομο με τα χέρια, το νερό ή το άψυχο περιβάλλον. Αποτελεί το αίτιο πολλών λοιμώξεων της κοινότητας, όπως λοιμώξεις του ουροποιητικού ή διάρροια. Έτσι η διασπορά των NDM σε στελέχη *E. coli*, αποτελεί μια επιπλέον πηγή ανησυχίας λόγω του κινδύνου ταχείας εξάπλωσης στην κοινότητα (88).

Πρόσφατα παρουσία του *bla*<sub>NDM</sub> γονιδίου αναφέρθηκε και σε στελέχη *Acinetobacter spp* (*A. baumannii* και *A. pittii* από την Ευρώπη και Κίνα) μια απόδειξη για τη γενετική επιδεξιότητα των πλασμιδίων που το μεταφέρουν (89, 90, 91, 92). Επιπλέον έχουν απομονωθεί στη Σερβία και στελέχη *P. aeruginosa* που φέρουν το *bla*<sub>NDM</sub> γονίδιο (93). Αποδεικνύεται λοιπόν ότι έχει διασπαρεί σε όλα τα είδη κλινικά σημαντικών Gram-αρνητικών, ξεπερνώντας το φραγμό του γένους.

Δεδομένων των ιστορικών δεσμών μεταξύ Ινδίας και Μεγάλης Βρετανίας, ήταν αναμενόμενο η Μεγάλη Βρετανία να αποτελέσει την πρώτη Ευρωπαϊκή χώρα με σημαντική εξάπλωση των NDM. Στελέχη που παράγουν NDM έχουν απομονωθεί από πολλές γεωγραφικές περιοχές στις περισσότερες ηπείρους, ως αποτέλεσμα της οικονομικής παγκοσμιοποίησης, των μετακινήσεων αλλά και της γενετικής πλαστικότητας του πλασμιδίου. Ο αριθμός των Ινδών/Πακιστανών της διασποράς υπολογίζεται σε 20 εκατομμύρια άτομα σε 110 χώρες. Υπολογίζεται ότι ο αριθμός των τουριστών στις δύο αυτές χώρες για το 2008 ήταν 5 εκατομμύρια άτομα (88). Σημαντικό ρόλο στη διασπορά κατέχει και ο ιατρικός τουρισμός στην Ινδία (7). Τέτοια στελέχη έχουν αναφερθεί, εκτός από τη Μεγάλη Βρετανία, από πολλές άλλες Ευρωπαϊκές χώρες (Αυστρία, Ελβετία, Γερμανία, Γαλλία, Βέλγιο, Ολλανδία, Σουηδία, Φινλανδία, Ισπανία), ΗΠΑ, Καναδά, Αυστραλία, Νέα Ζηλανδία, χώρες της Μέσης Ανατολής, Αφρικής και Νοτιοανατολικής Ασίας (Κίνα, Hong Kong, Σιγκαπούρη, Ταϊβάν, Ιαπωνία). Στις περισσότερες περιπτώσεις οι ασθενείς

είχαν νοσηλευτεί στην Ινδία, το Πακιστάν ή το Bangladesh, ήταν Νοτιοασιατικής καταγωγής ή είχαν ταξιδεύσει πρόσφατα σε αυτές τις περιοχές (1, 88).

Η Ινδική Χερσόνησος, αντιπροσωπεύει ένα *reservoir* 1,3 δισεκατομμυρίων ατόμων. Υπάρχει η εκτίμηση ότι η γονιδιακή δεξαμενή στην Νότια Ασία (φορεία στη φυσιολογική χλωρίδα) μπορεί να φτάνει το 20% (94). Παράγοντες που συνετέλεσαν στην επιλογή και διευκόλυνση της εξάπλωσης των στελεχών που παράγουν NDM στην περιοχή αυτή, είναι η εκτεταμένη χρήση αντιβιοτικών ειδικά στην κοινότητα και συχνά χωρίς συνταγογράφηση, το θερμό κλίμα, το πρόβλημα της παροχής καθαρού νερού και ο υπερπληθυσμός συνδυαζόμενος με τις πτωχές συνθήκες υγιεινής. Επιπλέον η έλλειψη πολιτικής ελέγχου των λοιμώξεων διευκολύνει τη διασπορά (7, 88, 95). Φαίνεται ότι στην Ινδία η εξάπλωση των NDM αποτελεί κατά κύριο λόγο πρόβλημα της κοινότητας με σημαντική διασπορά στο περιβάλλον, και πιθανά στα νοσοκομεία βρίσκεται μόνο η κορυφή του παγόβουνου (94). Ένας επιπλέον παράγοντας είναι η πίεση επιλογής από την ευρεία χρήση καρβαπενεμών για τη θεραπεία πολλών λοιμώξεων, συμπεριλαμβανομένων και των λοιμώξεων ουροποιητικού, εξαιτίας του πολύ υψηλού ποσοστού στελεχών *E. coli* που παράγουν CTX-M (70%, σύμφωνα με μελέτη του 2007).

Πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει Βαλκανικές χώρες (Μαυροβούνιο, Σερβία, Κόσσοβο) και χώρες της Μέσης Ανατολής (Οσμάν και Ιράκ) ως δευτερεύουσες δεξαμενές του γονιδίου (88, 94, 96).

Έχουν επίσης αναφερθεί και λίγα αυτόχθονα περιστατικά, μεταξύ των οποίων και λοίμωξη ουροποιητικού της κοινότητας από ανθεκτικό στην κολιστίνη στέλεχος, σε περιοχή της Γαλλίας (97).

Έχουν εκφραστεί φόβοι ότι βρισκόμαστε μπροστά σε μια νέα πανδημία και απαιτούνται αποφασιστικές δράσεις σε διεθνές επίπεδο με ανάπτυξη συστημάτων επιτήρησης, αυστηρή δέσμευση στην τήρηση των μέτρων ελέγχου των λοιμώξεων και προώθηση της έρευνας για την ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών (98).

### **3.1.3 Τάξη C κατά Ambler**

Οι β-λακταμάσες Τάξης C γενικά δεν κατατάσσονται στις καρβαπενεμάσες. Τα περισσότερα ένζυμα αυτής της Τάξης διαθέτουν ασθενή δραστικότητα έναντι των καρβαπενεμών ( $k_{cat} < 4 \text{ s}^{-1}$ ) ή καμία δραστικότητα. Αντοχή στις καρβαπενέμες μπορεί να προκύψει όταν συνυπάρχουν άλλοι μηχανισμοί αντοχής, όπως ήδη αναφέρθηκε.

Έχουν περιγραφεί σπάνια ένζυμα της Τάξης C που μπορεί να προσδώσουν αντοχή στις καρβαπενέμες, με κυριότερη την CMY-10. Στο ένζυμο αυτό μια απαλοιφή τριών αμινοξέων στο R2 loop διευρύνει σημαντικά το τμήμα του ενεργού κέντρου στο οποίο συνδέονται οι R2 πλευρικές αλυσίδες των καρβαπενεμών. Η διεύρυνση αυτή είναι υπεύθυνη για την επέκταση του φάσματος των υποστρωμάτων (10).

#### 3.1.4 Τάξη D κατά Ambler

Την Τάξη αυτή απαρτίζουν οι OXA-β-λακταμάσες (oxacillin-hydrolyzing), που όταν τοποθετήθηκαν σε ξεχωριστή μοριακή Τάξη, χαρακτηρίστηκαν λειτουργικά ως πενικιλινάσες που υδρολύουν την οξακιλλίνη και την κλοξακιλλίνη. Παρουσιάζουν πτωχή αναστολή από τους αναστολείς των β-λακταμασών (κλαβουλανικό οξύ, ταζομπακτάμη σουλμπακτάμη, αν και υπάρχουν κάποιες εξαιρέσεις) και το EDTA. Το NaCl σε συγκεντρώσεις >50-75 mM αναστέλλει κάποια ένζυμα τύπου OXA (38). Εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία αναφορικά με την αμινοξική τους αλληλουχία (30). Έχουν κατατεθεί 252 αλληλουχίες OXA-β-λακταμασών ([www.lahey.org/Studies/](http://www.lahey.org/Studies/)), αρκετές από τις οποίες εμφανίζουν δραστικότητα καρβαπενεμάσης.

Η πρώτη OXA-β-λακταμάση με δραστικότητα καρβαπενεμάσης, περιγράφηκε το 1993 σε στέλεχος *Acinetobacter baumannii* που είχε απομονωθεί το 1985 από ασθενή από τη Σκωτία. Ονομάστηκε ARI-1 ("*Acinetobacter* resistant to imipenem") και αργότερα βρέθηκε ότι το αντίστοιχο γονίδιο βρισκόταν σε πλασμίδιο (99). Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας έδειξε ότι ανήκε στην οικογένεια των OXA και αργότερα ονομάστηκε OXA-23 (100) Οι περισσότερες από τις επίκτητες OXA καρβαπενεμάσες έχουν περιγραφεί σε στελέχη *Acinetobacter baumannii*, αν και τα τελευταία χρόνια καρβαπενεμάσες τύπου OXA απομονώνονται με αυξανόμενη συχνότητα από στελέχη Εντεροβακτηριακών και κυρίως *K. pneumoniae*. Επίσης έχει αποδειχτεί πρόσφατα ότι αρκετά είδη Gram-αρνητικών φέρουν στο γονιδίωμα τους γονίδια που κωδικοποιούν OXA-β-λακταμάσες (101).

Οι OXA-β-λακταμάσες με ικανότητα υδρόλυσης για τις καρβαπενέμες (CHDLs) κατατάσσονται σε 5 ομάδες: ομάδα OXA-23 (OXA-23 και OXA-27), ομάδα OXA-24/40 (OXA-25, OXA-26, OXA-40 και OXA-72), ομάδα OXA-143, ομάδα OXA-58 και ομάδα OXA-48. Κανένα από αυτά τα ένζυμα δεν υδρολύει σημαντικά τις ευρέως φάσματος



κεφαλοσπορίνες, ενώ το επίπεδο υδρόλυσης για τις καρβαπενέμες παραμένει χαμηλό (101).

Η OXA-23 παρουσιάζει παγκόσμια διασπορά και βρίσκεται σχεδόν αποκλειστικά σε στελέχη *Acinetobacter* spp. Το γονίδιο *bla*<sub>OXA-40</sub> (με εντόπιση είτε χρωμοσωμική είτε πλασμιδιακή) εμφανίζει περισσότερο περιορισμένη γεωγραφική κατανομή με επικράτηση στην Ευρώπη (Ισπανία, Πορτογαλία) και ΗΠΑ. Η OXA-58 έχει μέχρι τώρα βρεθεί αποκλειστικά σε στελέχη *Acinetobacter* spp, είναι στις περισσότερες περιπτώσεις πλασμιδιακή και έχει σχετιστεί με πολλές νοσοκομειακές επιδημίες παγκοσμίως, συμπεριλαμβανομένης της χώρας μας (7, 101). Στην Ελλάδα, στελέχη *Acinetobacter baumannii* με χαμηλού επιπέδου αντοχή στις καρβαπενέμες άρχισαν να αναδύονται το 2000 και στα επόμενα χρόνια στελέχη που έφεραν το γονίδιο *bla*<sub>OXA-58</sub> επικράτησαν στα Ελληνικά νοσοκομεία (102, 103). Από το 2010, περιγράφεται και εξάπλωση στελεχών που φέρουν το γονίδιο *bla*<sub>OXA-23</sub> (104).

Οι OXA-48 εμφανίζουν <50% ομολογία στην αμινοξική αλληλουχία με τα υπόλοιπα OXA ένζυμα. Βρίσκονται σε στελέχη Εντεροβακτηριακών. Το πρώτο στέλεχος με παραγωγή OXA-48 ήταν στέλεχος *K. pneumoniae* που απομονώθηκε στην Τουρκία το 2001 (105). Ακολούθησαν πολλαπλές αναφορές από την Τουρκία για νοσοκομειακές επιδημίες από τέτοια στελέχη (107). Η παγκόσμια κατανομή τους περιλαμβάνει Ευρωπαϊκές χώρες (με αυξητικές τάσεις και πρόκληση νοσοκομειακών επιδημιών σε Γαλλία, Γερμανία, Ισπανία, Ολλανδία και Ηνωμένο Βασίλειο μέσω μεταφοράς από τις ενδημικές περιοχές), χώρες της Νοτιανατολικής Μεσογείου και της Βορείου Αφρικής (Αίγυπτος, Αλγερία, Λιβύη, Τυνησία και Μαρόκο) (1, 29). Η πρώτη νοσοκομειακή επιδημία από τη χώρα μας αναφέρεται το 2012 και τα στελέχη ανήκαν στον κλώνο ST11 (108). Πρόσφατα περιγράφεται παραγωγή OXA-48 καρβαπενεμάσης και σε στελέχη *K. pneumoniae* από τις ΗΠΑ που είχαν συλλεχθεί στα πλαίσια της μελέτης SMART (109). Η OXA-181, που διαφέρει κατά 4 αμινοξέα από την OXA-48, έχει βρεθεί κυρίως στην Ινδία ή σε περιπτώσεις με προέλευση την Ινδία (86, 110). Πρόσφατα επίσης περιγράφηκαν από την Ισπανία και οι OXA-244 και OXA-245 (111). Τα στελέχη που παράγουν OXA-48 ανήκουν σε διάφορους κλώνους και η διασπορά έχει σχετιστεί με ένα πλασμίδιο μεγέθους 62,5 kb (29).

Οι OXA-48/OXA-181 υδρολύουν ασθενώς τις καρβαπενέμες και τις ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες. Αν και η παρουσία τους έχει περιγραφεί σε διάφορα είδη Εντεροβα-

κτηριακών (*Citrobacter freundii*, *Providencia* spp, *Enterobacter cloacae*), βρίσκονται συνηθέστερα σε στελέχη *K. pneumoniae* και *E. coli* και το επίπεδο αντοχής στις καρβαπενέμες είναι υψηλότερο όταν συνυπάρχουν ESBL ή διαταραχή στη διαπερατότητα των καρβαπενεμών. Η εργαστηριακή ανίχνευση αυτού του τύπου των καρβαπενεμασών είναι η δυσκολότερη, ενώ καμία φαινοτυπική δοκιμασία δεν είναι ενδεικτική της παρουσίας τους. Κατά συνέπεια, ο πραγματικός επιπολασμός τους μπορεί να έχει υποεκτιμηθεί (29, 101).

Η υδρόλυση των β-λακταμών από τις OXA-β-λακταμάσες διαφέρει από αυτή των ενζύμων της Τάξης A και C. Τα ένζυμα της ομάδας OXA αποτελούν ένα ετερογενή πληθυσμό β-λακταμασών που έχουν εξελιχθεί μέσω πολλαπλών μηχανισμών. Οι τιμές  $k_{cat}$  για την ιμπενέμη είναι  $< 5 \text{ s}^{-1}$ . Στην ομάδα OXA-24/40 μια νέα διαμόρφωση των Tyr112 και Met223, οι οποίες σχηματίζουν ένα υδρόφοβο “τούνελ” κοντά στο ενεργό κέντρο, θεωρείται ότι κατέχει κεντρικό ρόλο στο μηχανισμό δράσης έναντι των καρβαπενεμών. Η παρουσία του “τούνελ” συρρικνώνει το ενεργό κέντρο με αποτέλεσμα να μπορούν να συνδεθούν μικρότερα της οξακιλλίνης μόρια, όπως οι καρβαπενέμες. Η OXA-48 μοιάζει με την OXA-10. Αλλαγές στην His109, Thr213, Arg214 και Arg244 φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στις λειτουργικές διαφορές μεταξύ OXA-48 και OXA-10. Ο προσανατολισμός και το μέγεθος του β5-β6 loop είναι όμοια μεταξύ OXA-24/40 και OXA-48 υποδεικνύοντας ότι η θέση αυτή είναι σημαντική για τη δράση έναντι των καρβαπενεμών. Βέβαια διαφέρει η ειδικότητα των υποστρωμάτων μεταξύ των δύο ομάδων: οι OXA-48 υδρολύουν την ιμπενέμη, ενώ οι OXA-24/40 παρουσιάζουν προτίμηση για τη μεροπενέμη (10).

## 4. KPC καρβαπενεμάσες

### 4.1 Κατάταξη, δομή και μηχανισμός δράσης

Οι KPC καρβαπενεμάσες ανήκουν στην Τάξη A κατά Ambler, ενώ σύμφωνα με το σύστημα λειτουργικής ταξινόμησης κατατάσσονται στην ομάδα 2f. Αποτελούν τις σημαντικότερες καρβαπενεμάσες της Τάξης A από κλινική και επιδημιολογική άποψη. Φυλογενετικά, τα συγγενέστερα ένζυμα είναι η SFC-1 με ομολογία 63% και ακολουθούν η SME-1 (ομολογία 57%) και η NmcA/IMI-1 (ομολογία 55%) (39).

Όπως και άλλα ένζυμα της Τάξης A, διαθέτουν έναν αποτελεσματικό μηχανισμό υδρόλυσης που περιλαμβάνει την παρουσία σερίνης στη θέση 70 του ενεργού κέντρου (S70). Η S70 εμπλέκεται στην πυρηνοφιλική επίθεση στον άνθρακα του καρβονυλίου του υποστρώματος, οδηγώντας στη διάσπαση του δεσμού με το άζωτο του β-λακταμικού δακτυλίου. Ένα μόριο νερού χρησιμοποιείται για την απελευθέρωση του β-λακταμικού υποστρώματος από το ενεργό κέντρο με αποακυλίωση. Τόσο η ακυλίωση όσο και η αποακυλίωση περιλαμβάνουν νουκλεοφιλική προσβολή, η οποία διευκολύνεται από μια σωστά τοποθετημένη σπή οξυανιόντος που σχηματίζεται από τα άτομα αζώτου των καταλοίπων 70 και 237 (10).

Η σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας και της κρυσταλλικής δομής της KPC-2 σε σύγκριση με άλλες β-λακταμάσες της Τάξης A (CTX-M-1, SHV-1, TEM-1) δείχνει ότι 9 κατάλοιπα κοντά στο ενεργό κέντρο είναι μοναδικά ή βρίσκονται σε διακριτές θέσεις (W105, S130, N132, N170, R220, K234, T235, T237, H274) (112). Πέντε από αυτά τα αμινοξέα (S130, N132, N170, K234, T235) βρίσκονται στα ακόλουθα 4 συντηρημένα στοιχεία: SSFK motif (θέσεις Ambler 70 με 73), SDN loop (κατάλοιπα 130 με 132), omega loop (θέσεις 164 με 179) και KTG motif (θέσεις 234 έως 236) (113).

Η μελέτη του ενεργού κέντρου της KPC-2 σε σύμπλοκο με ένα μόριο bicine [N,N-Bis(2-hydroxyethyl)glycine] αποκαλύπτει ότι η bicine αλληλεπιδρά μέσω της καρβοξυλομάδας της με τα συντηρημένα κατάλοιπα του ενεργού κέντρου S130, K234, T235 και T237. Το μόριο αυτό με το καρβοξύλιο του καταλαμβάνει ένα χώρο που πιθανά εμπλέκεται στην αναγνώριση του καρβοξυλίου των β-λακταμών. Η σύγκριση της δομής της KPC-2 με μη-καρβαπενεμάσες της Τάξης A, αλλά και με τις NMC-A και SME-1, δείχνει αρκετές τροποποιήσεις στην τοπολογία του ενεργού κέντρου που θα μπορούσαν να αποσαφηνίσουν τη δομική βάση της δραστηριότητας έναντι των καρβαπενεμών. Μια

φαινομενικά ανεπαίσθητη μετατόπιση προς τα έξω του καταλυτικού υπολείμματος S70 (0,5 – 0,8 Å) καθιστά το ενεργό κέντρο πιο αβαθές, πιθανόν επιτρέποντας την ευκολότερη πρόσβαση ογκωδέστερων υποστρωμάτων. Περισσότερος χώρος, ίσως, παρέχεται από μετατοπίσεις των θέσεων N132 και N170 επιπρόσθετα με τις μετακινήσεις στη θέση σύνδεσης του καρβοξυλίου, που πιθανά επιτρέπει στα υποστρώματα να συνδέονται με μια ελαφρώς διαφορετική γωνία, ξεπερνώντας τα στερεοχημικά εμπόδια (112). Πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει τη σημασία της Trp105 του ενεργού κέντρου της KPC-2 στην ειδικότητα των υποστρωμάτων. Η Trp105 βρίσκεται στην είσοδο του ενεργού κέντρου και κατέχει σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις τόσο με τα υποστρώματα όσο και με τους αναστολείς των β-λακταμασών (114).

Επιπρόσθετα, η T237 της KPC-2 είναι απαραίτητη για τη διατήρηση δραστηριότητας καρβαπενεμάσης και κεφαλοσπορινάσης και επίσης εμπλέκεται στη συμπεριφορά της KPC-2 έναντι του κλαβουλανικού οξέος και των αναστολέων της σουλφόνης (113).

## 4.2 Ιδιότητες

Οι KPC-β-λακταμάσες διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων που περιλαμβάνει όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά: πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, κεφαμυκίνες, αζτρεονάμη, καρβαπενέμες αλλά και τους αναστολείς των β-λακταμασών (39, 115). Η ικανότητα υδρόλυσης των αναστολέων είναι πολύ σπάνια για τα ένζυμα που ανήκουν στην Τάξη A (39).

Όπως έδειξε η ανάλυση των κινητικών παραμέτρων για τις KPC-1/2, πιο αποτελεσματική υδρόλυση παρατηρείται για την νιτροσεφίνη, κεφαλοθίνη, κεφαλοριδίνη, πενικιλίνη, αμπικιλίνη και πιπερακιλλίνη. Η υψηλότερη τιμή  $k_{cat}$  παρατηρήθηκε για την κεφαλοριδίνη. Η ιμιπενέμη, η μεροπενέμη, η κεφοταξίμη και η αζτρεονάμη υδρολύονται 10 φορές λιγότερο αποτελεσματικά από τις πενικιλίνες και τις παλαιότερες κεφαλοσπορίνες. Η μεροπενέμη εμφάνισε τιμή  $k_{cat}$  4 φορές μικρότερη από την ιμιπενέμη. Η υδρολυτική ικανότητα για την ιμιπενέμη και τη μεροπενέμη ( $k_{cat}/k_m$ ) ήταν 26 και 42% της υδρολυτικής ικανότητας για την κεφαλοριδίνη. Ασθενής αλλά μετρήσιμη υδρόλυση παρατηρήθηκε για την κεφαζιδίμη και τη κεφοξιτίνη, με υδρολυτική ικανότητα 250 και 500 φορές αντίστοιχα χαμηλότερη από την κεφαλοριδίνη (30, 116, 117).

Αντίστοιχες κινητικές μελέτες για την KPC-3 έδειξαν παρόμοιο προφίλ αν και η καταλυτική ικανότητα της KPC-3 φάνηκε να είναι κάπως υψηλότερη για μερικά από τα υπο-

στρώματα, όπως οι οξειμινοκεφαλοσπορίνες και οι καρβαπενέμες. Μια από τις σημαντικότερες διαφορές στη συμπεριφορά αυτού του ενζύμου παρατηρήθηκε για την κεφταζιδίμη. Η  $k_{cat}$  για την κεφταζιδίμη ( $3.0 \text{ s}^{-1} \pm 0,01$ ) ήταν περίπου 30 φορές υψηλότερη από την αντίστοιχη τιμή για τις KPC-1/2, με αποτέλεσμα η KPC-3 να είναι 30 φορές περισσότερο αποτελεσματική έναντι αυτού του υποστρώματος. Επίσης η KPC-3 παρουσίασε μικρότερη χημική συγγένεια για την κεφοξιτίνη (118).

Η μελέτη της υδρολυτικής δραστηριότητας των KPC-4 και KPC-5 έδειξε ότι η KPC-2 ήταν δραστικότερη έναντι της ιμιπενέμης, με ρυθμούς υδρόλυσης περίπου 6 και 3,5 φορές υψηλότερους από τις KPC-4 και KPC-5 αντίστοιχα. Επίσης σημειώθηκε μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα έναντι της κεφταζιδίμης για τις KPC-4 και KPC-5, σε σχέση με την KPC-2 (119).

Οι κινητικές μελέτες για την KPC-9 έδειξαν ότι δεν διέφερε σημαντικά από την KPC-2 ως προς το προφίλ των υποστρωμάτων και την υδρολυτική ικανότητα (120). Το κινητικό προφίλ της KPC-9 ήταν παρόμοιο με της KPC-3 για την πιπερακιλλίνη, κεφτριαξόνη και ερταπενέμη. Η καταλυτική ικανότητα της KPC-3 για την ιμιπενέμη ήταν υψηλότερη σε σύγκριση με την KPC-9, η οποία όμως υδρολύει την κεφταζιδίμη πιο αποτελεσματικά (121).

### 4.3 Παραλλαγές των KPC καρβαπενεμασών

Μέχρι τώρα έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία 11 παραλλαγές των KPC ενζύμων (με συχνότερες τις KPC-2 και KPC-3), ενώ έχουν κατατεθεί 13 αλληλουχίες ([www.lahey.org/Studies/](http://www.lahey.org/Studies/)). Οι παραλλαγές διαφέρουν μεταξύ τους σε 1-4 νουκλεοτιδικές θέσεις.

Η KPC-1 περιγράφηκε το 2001 και ανιχνεύτηκε σε ανθεκτικό στις καρβαπενέμες στέλεχος *K. pneumoniae* που είχε απομονωθεί το 1996 στη Βόρεια Καρολίνα των ΗΠΑ και είχε συλλεχθεί στα πλαίσια του προγράμματος επιτήρησης ICARE (116). Η KPC-2 περιγράφηκε για πρώτη φορά το 2003 σε στελέχη *K. pneumoniae* που είχαν απομονωθεί στη Βαλτιμόρη (Maryland, ΗΠΑ) κατά το διάστημα 1998-1999. Τα στελέχη αυτά παρουσίαζαν μειωμένη ευαισθησία στην ιμιπενέμη και μεροπενέμη και αντοχή στην ερταπενέμη (122). Μέσα στο 2003, ακολούθησαν άλλες δύο αναφορές για την παρουσία του  $bla_{KPC-2}$  γονιδίου: σε στέλεχος *Salmonella enterica*, που είχε απομονωθεί επίσης από την περιοχή του Maryland το 1998 (123) και σε στέλεχος *Klebsiella oxytoca* που επίσης είχε συλλεχθεί στα πλαίσια του προγράμματος ICARE και είχε απομονωθεί από την περιοχή

της Νέας Υόρκης το 1998 (117). Το 2008 ανακοινώθηκε ότι είχε ανιχνευθεί ένα σφάλμα στο γονίδιο της KPC-1: το κωδικόνιο στη θέση 174 (νουκλεοτιδικές θέσεις 650-652), το οποίο είχε αναφερθεί ως AGC που κωδικοποιεί για τη σερίνη, διορθώθηκε σε GGC που κωδικοποιεί για τη γλυκίνη. Έτσι, το *bla*<sub>KPC-1</sub> είναι ταυτόσημο με το *bla*<sub>KPC-2</sub> (124).

Η KPC-3 αναφέρθηκε το 2004 και ανιχνεύθηκε σε στελέχη *K. pneumoniae* που αποτέλεσαν το αίτιο επιδημίας σε νοσοκομείο της Νέας Υόρκης κατά το διάστημα 2000-2001. Η KPC-3 διαφέρει από την KPC-2 κατά ένα αμινοξύ: στη θέση 272 η ιστιδίνη έχει αντικατασταθεί από τυροσίνη (125).

Η KPC-4 ανιχνεύτηκε σε στέλεχος *Enterobacter spp* που απομονώθηκε στη Σκωτία το 2003 και διαφέρει κατά δύο αμινοξέα από την KPC-2 (θέσεις 103 και 239).

Η KPC-5 αναφέρθηκε το 2009 και ανιχνεύθηκε σε στέλεχος *P. aeruginosa* που απομονώθηκε στο Puerto Rico το 2006. Διαφέρει κατά ένα αμινοξύ από την KPC-2: στη θέση 103 η προλίνη έχει αντικατασταθεί από την αργινίνη (119).

Η KPC-6 επίσης διαφέρει από την KPC-2 κατά ένα αμινοξύ (στη θέση 239 η βαλίνη έχει αντικατασταθεί με γλυκίνη) (120).

Η KPC-8 περιγράφηκε σε στελέχη *K. pneumoniae* που απομονώθηκαν από το Puerto Rico το 2008 (126).

Η KPC-9 περιγράφηκε σε στελέχη *K. pneumoniae* και *E. coli* που απομονώθηκαν από τον ίδιο ασθενή το 2008 στο Ισραήλ. Διαφέρει από την KPC-3 στη θέση 239 όπου φέρει αλανίνη αντί για γλυκίνη (121).

Η KPC-10 ανιχνεύθηκε σε στέλεχος *Acinetobacter baumannii* που απομονώθηκε το 2009 στο Puerto Rico (127).

Η KPC-11 ανιχνεύθηκε σε στελέχη *K. pneumoniae* που απομονώθηκαν από την Ελλάδα το 2009. Τα στελέχη είχαν συγκεντρωθεί στα πλαίσια της μελέτης SMART και ελέγχθηκαν με τεχνολογία μικροσυστοιχιών (Check-KPC ESB). Η KPC-11 διαφέρει από την KPC-2 κατά ένα αμινοξύ στη θέση 103 (P103L) (128).

#### 4.4 Μηχανισμοί οριζόντιας μεταφοράς

Η μεγάλη εξάπλωση των *bla*<sub>KPC</sub> γονιδίων σχετίζεται με διασπορά στελεχών, πλασμιδίων και τρανσποζονίων (115).

Τα *bla*<sub>KPC</sub> γονίδια βρίσκονται σε ένα ευρύ φάσμα πλασμιδίων, γεγονός που εξηγεί και την ταχεία διασπορά τους. Τα πλασμίδια αυτά διαφέρουν ως προς το μέγεθος και τη δομή και ανήκουν σε διάφορες ομάδες ασυμβατότητας (incompatibility groups): IncFII, IncN, IncL/M, IncX3. Σε αρκετά από αυτά τα πλασμίδια έχει προσδιοριστεί μερικώς ή πλήρως η νουκλεοτιδική αλληλουχία (129, 130, 131, 132, 133, 134). Στις περισσότερες περιπτώσεις είναι αυτομεταβιβαζόμενα τουλάχιστον στην *Escherichia coli*. Υπάρχουν αναφορές και για πιθανή *in vivo* μεταβίβαση των πλασμιδίων που φέρουν το *bla*<sub>KPC</sub> γονίδιο μεταξύ διαφορετικών ειδών Εντεροβακτηριακών (135, 136, 137). Στα ίδια πλασμίδια συνήθως φέρονται και άλλα γονίδια αντοχής: άλλες β-λακταμάσες, γονίδια αντοχής για αμινογλυκοσίδες, κινολόνες (QnrA, QnrB) κα. Μεταξύ των β-λακταμασών συχνά ανευρίσκονται γονίδια ESBL (*bla*<sub>CTX-M</sub> και *bla*<sub>SHV</sub>) (129, 131, 132, 134, 138, 139, 140). Έχει περιγραφεί στέλεχος που έφερε 7 διαφορετικές β-λακταμάσες μαζί με την KPC καρβαπενεμάση (141). Η ύπαρξη διαφορετικών γονιδίων αντοχής στο ίδιο πλασμίδιο παρουσιάζει τον κίνδυνο επιλογής από πολλαπλά αντιβιοτικά. Σε στέλεχος *P. aeruginosa* το *bla*<sub>KPC</sub> γονίδιο εντοπίστηκε τόσο στο χρωμόσωμα, όσο και σε πλασμίδιο (142).

Οι μελέτες της γενετικής δομής που περιβάλλει τα *bla*<sub>KPC</sub> γονίδια έχουν εντοπίσει ένα Tn3-based τρανσποζόνιο, το Tn4401. Η παρουσία του *bla*<sub>KPC</sub> γονιδίου σε δομή τρανσποζονίου είναι υπεύθυνη για την ευρεία διασπορά του. Το Tn4401 είναι μεγέθους 10 kb και οριοθετείται από 2 ατελείς ανεστραμμένες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες 39 bp. Εκτός από το *bla*<sub>KPC</sub> γονίδιο, φέρει γονίδια τρανσποζάσης (*tnpA*) και ρεσολβάσης (*tnpR*) καθώς και δύο αλληλουχίες εισδοχής, τις ISKrn6 και ISKrn7 (143). Επίσης, το Tn4401 φέρει μια πολυμορφική μη συντηρημένη περιοχή που βρίσκεται ανοδικά του *bla*<sub>KPC</sub> γονιδίου, δημιουργώντας διαφορετικές ισομορφές του τρανσποζονίου. Η περιοχή αυτή εμπλέκεται στην έκφραση του *bla*<sub>KPC</sub> γονιδίου. Αρχικά χαρακτηρίστηκαν 3 ισομορφές του Tn4401 (a, b, c), που διαφέρουν κατά ένα έλλειμμα (deletion) 100-bp (Tn4401a) και 215-bp (Tn4401c) ανοδικά του *bla*<sub>KPC-2</sub>. Η ισομορφή Tn4401b δεν φέρει αυτό το έλλειμμα. Η παρουσία του ελλείμματος στο Tn4401a πλησίον της περιοχής του προαγωγέα του *bla*<sub>KPC</sub> γονιδίου οδηγεί σε μια διαφορετική αλληλουχία -35 προαγωγέα:

TGGAGA αντί της αλληλουχίας CTGATT που βρίσκεται στο Tn4401b (130). Δύο ακόμη ισομορφές περιγράφηκαν πρόσφατα: με ένα έλλειμμα 68-bp και 255-bp (144). Επίσης το 2012 περιγράφεται η ισομορφή Tn4401f που περιέχει μια κατατετημημένη tnpA και στερείται των tnpR, ISKpn7 και Tn4401 IRL-1 που είναι συντηρημένα σε άλλα Tn4401 τρανσποζόνια (145). Το Tn4401 έχει εντοπιστεί σε στελέχη με διαφορετική γεωγραφική προέλευση, διαφορετικών ST τύπων, τόσο σε στελέχη Εντεροβακτηριακών, όσο και σε στελέχη *P. aeruginosa* (129, 131, 133, 143). Διαφορετικές αλληλουχίες εισδοχής βρέθηκαν ανοδικά του *bla*<sub>KPC</sub> γονιδίου σε στελέχη *P. aeruginosa*, όμως οι αλληλουχίες καθοδικά του γονιδίου είναι ταυτόσημες, υποδηλώνοντας την ύπαρξη ενός κοινού σκελετού (119, 146). Έχουν περιγραφεί στελέχη που φέρουν περισσότερα αντίγραφα του Tn4401, καθώς επίσης και παρουσία του *bla*<sub>KPC</sub> γονιδίου σε διαφορετικά πλασμίδια στο ίδιο στέλεχος (130).

Σε δοκιμασία μεταφοράς-σύζευξης (transposition-conjugation assay), το Tn4401 εμφάνισε ικανότητα να μεταθέτει το *bla*<sub>KPC-2</sub> γονίδιο με συχνότητα  $4,4 \times 10^{-6}$ / κύτταρο δέκτη, αποδεικνύοντας ότι είναι ενεργό τρανσποζόνιο με ικανότητα μετάθεσης των *bla*<sub>KPC-2</sub> σε υψηλή συχνότητα (147).

Η ύπαρξη προαγωγέα για το *bla*<sub>KPC</sub> γονίδιο είχε αρχικά προταθεί από τους Yigit και συν (116). Ο ρόλος των ελλειμμάτων και των αλληλουχιών εισδοχής διερευνήθηκε σε πρόσφατη μελέτη. Βρέθηκαν 3 πιθανές αλληλουχίες προαγωγέα (P1, P2, and P3) ανοδικά του γονιδίου, από τις οποίες η P1 (απούσα από τις ισομορφές c και d) και η P2 (παρούσα σε όλες τις ισομορφές) αποδείχτηκε ότι είναι αληθείς ενισχυτές που εμπλέκονται στην έκφραση του γονιδίου. Το υψηλότερο επίπεδο έκφρασης ελήφθη με την ισομορφή a (P1 και P2), ακολουθούμενη από την ισομορφή b (P1, P2, P3) και c (P2). Οι P1 και P2 φάνηκε ότι αποτελούν ισχυρούς εκκινητές, ενώ η P3 είναι ανενεργός, σαν αποτέλεσμα της ύπαρξης αλληλουχιών τερματισμού κατά την αντίστροφη μεταγραφή του mRNA του *bla*<sub>KPC</sub> γονιδίου. Αυτές οι διαφορές στην έκφραση οδηγούν σε μικρές διαφορές στις τιμές MIC για τις καρβαπενέμες. Η δομή της ισομορφής a που συνδέεται με την υψηλότερη έκφραση είναι και η συχνότερη στα Εντεροβακτηριακά (148).

#### **4.5 Παράγοντες που σχετίζονται με το επίπεδο ανοχής στις καρβαπενέμες**

Τα στελέχη Εντεροβακτηριακών που παράγουν KPC καρβαπενεμάση παρουσιάζουν ευρεία διακύμανση στις τιμές MIC στις καρβαπενέμες (0,5- >64 μg/ml), γεγονός που



συχνά καθιστά και την εργαστηριακή τους ανίχνευση προβληματική (29). Η παραγωγή της KPC καρβαπενεμάσης σε συνδυασμό με διαταραχή στην έκφραση της OmpK36 οδηγεί σε υψηλότερες τιμές MIC (149). Επίσης, όπως αναφέρθηκε, οι διαφορετικές ισομορφές του Tn4401 σχετίζονται με διαφορές στην έκφραση του *bla*<sub>KPC</sub> γονιδίου, με δημιουργία διαφορετικών αλληλουχιών προαγωγέων. Επιπρόσθετα τα στελέχη μπορεί να φέρουν πολλαπλά αντίγραφα του γονιδίου στο ίδιο πλασμίδιο ή πολλαπλά αντίγραφα του πλασμιδίου (130). Ο αυξημένος αριθμός των αντιγράφων του γονιδίου οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή ενζύμου και κατά συνέπεια σε αύξηση των τιμών MIC στις καρβαπενέμες.

Σε μελέτη που διερευνήθηκαν οι παράγοντες που συμβάλλουν στο επίπεδο αντοχής στις καρβαπενέμες, αναλύθηκαν 27 στελέχη *K. pneumoniae* που παρήγαγαν KPC καρβαπενεμάση από διαφορετικές περιοχές των ΗΠΑ και παρουσίαζαν τιμές MIC στην ιμιπενέμη ή μεροπενέμη που κυμαίνονταν από <4 - >16 µg/ml. Από τα 14 στελέχη με υψηλού επιπέδου αντοχή, τα 10 παρήγαγαν αυξημένη ποσότητα ενζύμου. Από αυτά, 3 εμφάνισαν αυξημένο αριθμό αντιγράφων του *bla*<sub>KPC</sub> γονιδίου και 7 παρουσίαζαν ελλείμματα ανοδικά του γονιδίου. Η ανάλυση των πορινών έδειξε ότι σε 22/27 στελέχη ανιχνεύτηκε μετάλλαξη στο OmpK35 γονίδιο που οδηγούσε σε μη λειτουργική πρωτεΐνη. Η μετάλλαξη αυτή πιθανά είναι συχνή μεταξύ των στελεχών του κλώνου ST258. Υψηλότερες τιμές MIC βρέθηκαν σε δύο στελέχη με μη λειτουργικές και τις δύο πορίνες (144).

Οι τιμές MIC στις καρβαπενέμες είναι υψηλότερες σε βακτηριακά είδη με αποκαταστολή στην παραγωγή της χρωμοσωμικής τους AmpC, όπως το *Enterobacter* spp (150).

## 4.6 Επιδημιολογία

### 4.6.1 Διασπορά KPC καρβαπενεμασών σε στελέχη διαφόρων ειδών Εντεροβακτηριακών

Τα *bla*<sub>KPC</sub> γονίδια ανευρίσκονται κατά κύριο λόγο σε στελέχη *K. pneumoniae*. Η *K. pneumoniae* εντάχθηκε στη νοσοκομειακή χλωρίδα στην αρχή της δεκαετίας του '70 και έκτοτε παραμένει σταθερά ένα από τα συχνότερα νοσοκομειακά παθογόνα. Χαρακτηριστικό γνώρισμα αυτού του βακτηριακού είδους είναι η ιδιαίτερη ικανότητα του να συγκεντρώνει και να μεταβιβάζει γονίδια αντοχής, όπως φάνηκε για τις ESBL τις προηγούμενες δεκαετίες. Τα τελευταία χρόνια, η *K. pneumoniae* έχει αναδειχτεί ως η κύρια

δεξαμενή πλασμιδιακών γονιδίων καρβαπενεμασών (151). Η πλειοψηφία των στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν KPC καρβαπενεμάση ανήκει στον κλώνο ST258 που παρουσιάζει παγκόσμια διασπορά, αν και σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές έχουν αναγνωρισθεί διάφοροι άλλοι κλώνοι (29, 129).

Παραγωγή KPC καρβαπενεμασών έχει αναφερθεί και από διάφορα άλλα είδη Εντεροβακτηριακών, συννηθέστερα *E. coli* and *E. cloacae*. Ανευρίσκονται κυρίως σε περιβάλλοντα με υψηλό επιπολασμό στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν KPC καρβαπενεμάση και η διασπορά τους είναι πολύ μικρότερη από αυτή των στελεχών *K. pneumoniae*. Νοσοκομειακή διασπορά στελεχών *E. coli* έχει αναφερθεί από τις ΗΠΑ, το Puerto Rico, το Ισραήλ και την Ελλάδα ενώ σποραδικές αναφορές υπάρχουν και από διάφορες άλλες χώρες όπως η Βραζιλία, η Κίνα, η Ιταλία, η Γαλλία και η Ιρλανδία (137, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159). Συχνά τα στελέχη αυτά παρουσιάζουν χαμηλές τιμές MIC στις καρβαπενέμες, καθιστώντας δύσκολη την ανίχνευσή τους και πιθανά το εύρος της διασποράς τους στην κοινότητα είναι δύσκολο να καθορισθεί. Πρόσφατα αναφέρεται η απομόνωση περιβαλλοντικού στελέχους *E. coli* του κλώνου ST410 από ποταμό της Πορτογαλίας, χωρίς να έχει προηγηθεί αναφορά για απομόνωση αντίστοιχου κλινικού στελέχους (160).

Το πρώτο στέλεχος *E. coli* με παραγωγή KPC καρβαπενεμάσης από τις ΗΠΑ αναφέρθηκε το 2005 σε ασθενή που ελάμβανε καρβαπενέμες. Το στέλεχος βρέθηκε ότι παρήγαγε KPC-3 (161). Παραγωγή KPC καρβαπενεμάσης αναφέρθηκε και για τρία στελέχη *E. coli* (από την Νέα Υόρκη και το Ohio) που συγκεντρώθηκαν στα πλαίσια της μελέτης MYSTIC κατά το διάστημα 1999-2005. Στην ίδια μελέτη αναγνωρίστηκαν και 4 στελέχη *Enterobacter* spp που παρήγαγαν KPC καρβαπενεμάση από την περιοχή της Νέας Υόρκης (52). Μελέτη επιτήρησης, βασισμένη σε έλεγχο με PCR, πραγματοποιήθηκε στις αρχές του 2006 σε 8 νοσοκομεία της περιοχής του Brooklyn, μετά την απομόνωση το 2005 του πρώτου στελέχους *E. coli* που έφερε το *bla*<sub>KPC-2</sub> γονίδιο σε πλασμίδιο 23 kb. Το *bla*<sub>KPC-2</sub> γονίδιο βρέθηκε σε 7 στελέχη από 3 νοσοκομεία, υποδεικνύοντας την ανάδυση και στελεχών *E. coli* που παράγουν KPC καρβαπενεμάση σε μια περιοχή με αναγνωρισμένη διασπορά στελεχών *K. pneumoniae* με παραγωγή KPC καρβαπενεμάσης (162). Σε αντίστοιχη μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2009 στην ίδια περιοχή βρέθηκαν 30 στελέχη *E. coli* που έφεραν το *bla*<sub>KPC-2</sub> ή το *bla*<sub>KPC-3</sub> γονίδιο (24 και 6 στελέχη αντίστοιχα). Τα περισσότερα στελέχη (17/30) ανήκαν στον ίδιο ριβότυπο υποδηλώνοντας κλωνική δια-

σπορά (163). Διασπορά τέτοιων στελεχών αναφέρεται και σε Κέντρα Μακροχρόνιας Φροντίδας (LTCF), όπως φαίνεται από μελέτη που περιγράφει 9 στελέχη που απομονώθηκαν από ουροκαλλιέργειες ασθενών 7 διαφορετικών Κέντρων Μακροχρόνιας Φροντίδας κατά το διάστημα 2004-2007 (164). Σε πρόσφατη μελέτη από την περιοχή του Pittsburgh κατά το διάστημα 2008-2011, αναγνωρίστηκαν 13 ασθενείς που έφεραν στελέχη *E. coli* που παρήγαγαν KPC καρβαπενεμάση. Όλοι οι ασθενείς εμφάνιζαν πολλαπλούς προδιαθεσικούς παράγοντες. Τα στελέχη έφεραν το *bla*<sub>KPC</sub> γονίδιο σε διαφορετικά πλασμίδια και 7 από αυτά ανήκαν στον διεθνή επιδημικό κλώνο ST131 (165). Αναφορά για την παρουσία του *bla*<sub>KPC</sub> γονιδίου σε στέλεχος του κλώνου ST131 υπάρχει και από τη Γαλλία και την Ιρλανδία (157, 159). Η παρουσία του *bla*<sub>KPC</sub> γονιδίου σε έναν πολύ επιτυχημένο και παθογόνο κλώνο, που είναι υπεύθυνος για τη διασπορά των CTX-M-15 στην κοινότητα, αποτελεί ιδιαίτερα ανησυχητικό εύρημα. Επίσης από τη Γαλλία αναφέρεται παραγωγή KPC καρβαπενεμάσης από στέλεχος του κλώνου ST101 με προέλευση την Ινδία. Ο κλώνος αυτός αποτελεί τον κύριο κλώνο NDM-θετικών στελεχών στο Πακιστάν και τη Μεγάλη Βρετανία (158).

Σημαντική εξάπλωση στελεχών *E. coli* που παράγουν KPC καρβαπενεμάση παρατηρείται και στο Puerto Rico, όπου, όπως φάνηκε από εξάμηνη μελέτη επιτήρησης που διεξήχθη το 2009, ανιχνεύθηκαν 61 τέτοια στελέχη (166).

Η πρώτη περιγραφή στελεχών με παραγωγή KPC καρβαπενεμάσης εκτός ΗΠΑ και χωρίς εμφανή επιδημιολογική σχέση με τη χώρα αυτή, προέρχεται από το Ισραήλ και αφορά σε στελέχη *E. coli*. Συγκεκριμένα αναφέρονται 4 μη γενετικά σχετιζόμενα στελέχη *E. coli* που έφεραν το *bla*<sub>KPC-2</sub> γονίδιο σε διαφορετικά πλασμίδια. Τα στελέχη απομονώθηκαν το 2005 από μη σχετιζόμενους επιδημιολογικά ασθενείς. Η επιδημιολογική διερεύνηση έδειξε ότι σε 2 ασθενείς τα στελέχη δεν αποκτήθηκαν ενδονοσοκομειακά και πιθανά εισήχθησαν από Κέντρα Μακροχρόνιας Φροντίδας (167). Από το ίδιο νοσοκομείο του Tel Aviv κατά το διάστημα 2005-2008 απομονώθηκαν συνολικά 10 στελέχη *E. coli* που έφεραν το *bla*<sub>KPC-2</sub> γονίδιο και ανήκαν σε 6 κλώνους. Τα στελέχη του ίδιου κλώνου έφεραν όμοια πλασμίδια. Φαίνεται ότι σε αντίθεση με τα στελέχη *K. pneumoniae* του κλώνου ST258 που παρουσιάζουν ευρεία διασπορά, τα στελέχη *E. coli* δεν εξαπλώθηκαν σε σημαντικό βαθμό μετά την ανάδυσή τους το 2005 (168).

Σε πρόσφατη μελέτη από τη χώρα μας, αναφέρονται 10 στελέχη *E. coli* που παρήγαγαν KPC-2 καρβαπενεμάση και απομονώθηκαν από 7 ασθενείς που νοσηλεύτηκαν στο Πα-

νεπιστημιακό Νοσοκομείο της Λάρισας κατά τη διάρκεια ενός έτους (2010-2011). Η εστία της επιδημίας βρέθηκε ότι ήταν ένα Κέντρο Μακροχρόνιας Φροντίδας της ίδιας περιοχής. Ο έλεγχος αποικισμού σε ασθενείς του ιδρύματος έδειξε σημαντική διασπορά βακτηρίων που παράγουν KPC καρβαπενεμάση. Τα περισσότερα στελέχη *E. coli* ανήκαν στον κλώνο ST410 και έφεραν το *bla*<sub>KPC-2</sub> γονίδιο σε πλασμίδια της ομάδας Inc FIIK, που είναι ευρέως διαδεδομένο μεταξύ στελεχών *K. pneumoniae* στην χώρα μας (169).

Η πρώτη απομόνωση στελέχους *Enterobacter* spp που παράγει KPC-2 σημειώνεται στη Βοστώνη το 2001 (170). Στην Νέα Υόρκη, μετά την απομόνωση το 2003 στελέχους που έφερε το *bla*<sub>KPC-3</sub> γονίδιο, πραγματοποιήθηκε έλεγχος στελεχών που είχαν απομονωθεί το 2001 και το 2003 και ανιχνεύθηκαν ακόμη δύο στελέχη (171). Από το Ισραήλ αναφέρεται νοσοκομειακή επιδημία χαμηλής συχνότητας (33 περιπτώσεις κατά τα έτη 2003-2006) από στελέχη που έφεραν το *bla*<sub>KPC-2</sub> γονίδιο και ανήκαν σε 3 διαφορετικούς κλώνους (172). Σποραδικές απομονώσεις έχουν αναφερθεί από τη Γαλλία, Βραζιλία και Κίνα (133, 156, 173). Από την Κίνα αναφέρεται και απομόνωση KPC-θετικών στελεχών *Citrobacter freundii* και *Enterobacter cloacae* από νοσοκομειακά λύματα (174).

Νοσοκομειακή διασπορά κλωνικά σχετιζόμενων στελεχών *Proteus mirabilis* που έφεραν το *bla*<sub>KPC-2</sub> γονίδιο αναφέρεται επίσης από την Κίνα (175). Από την ίδια χώρα περιγράφεται και κλωνική διασπορά στελεχών *Serratia marcescens* που παρήγαγαν KPC-2 καρβαπενεμάση (154).

Η πρώτη αναφορά στην Ευρώπη για στελέχη *Serratia marcescens* που φέρουν το *bla*<sub>KPC-2</sub> γονίδιο, προέρχεται από την χώρα μας. Τα τρία αυτά στελέχη ανήκαν στον ίδιο κλώνο, έφεραν το ίδιο πλασμίδιο και στις δύο από τις τρεις περιπτώσεις είχε προηγηθεί απομόνωση ευαίσθητων στις καρβαπενέμες στελεχών (176). Επίσης από την Ελλάδα προέρχεται η πρώτη περιγραφή στελέχους *Citrobacter koseri* με παραγωγή KPC-2 καρβαπενεμάσης (177).

Παραγωγή KPC καρβαπενεμασών περιγράφεται επίσης από στελέχη *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica* και *Raoultella* spp (178).

#### 4.6.2 Διασπορά KPC καρβαπενεμασών σε στελέχη αζυμωτικών

Η παραγωγή KPC καρβαπενεμασών δεν είναι τόσο συχνή σε στελέχη αζυμωτικών Gram-αρνητικών βακτηρίων και τα στελέχη αυτά παρουσιάζουν σχετικά περιορισμένη γεωγραφική διασπορά.

Η πρώτη περιγραφή στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* που έφεραν το *bla*<sub>KPC-2</sub> γονίδιο προέρχεται από την Κολομβία. Τα 3 αυτά στελέχη απομονώθηκαν το 2006 και σχετίζονταν κλωνικά. Το *bla*<sub>KPC-2</sub> γονίδιο εντοπίστηκε τόσο σε πλασμίδιο όσο και στο χρωμόσωμα (142). Μελέτη που αργότερα διερεύνησε τέτοια στελέχη που απομονώθηκαν από διάφορα νοσοκομεία της Κολομβίας κατά το διάστημα 2006-2010, έδειξε διασπορά διαφορετικών κλώνων αλλά και διαφορετικών πλασμιδίων μεταξύ των στελεχών (146). Το 2010 απομονώθηκε και στέλεχος που έφερε εκτός από το *bla*<sub>KPC-2</sub> και το *bla*<sub>VIM-2</sub> γονίδιο (179).

Σημαντική διασπορά στελεχών *P. aeruginosa* που έφεραν το *bla*<sub>KPC-2</sub> γονίδιο αναφέρεται και από το Puerto Rico. Σε μελέτη που ανέλυσε ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη από την περιοχή του San Juan (2006-2009), βρέθηκε ότι ο επικρατών μηχανισμός αντοχής ήταν η παραγωγή KPC-2 καρβαπενεμάσης. Αναδείχθηκε διασπορά διαφορετικών κλώνων με έναν κλώνο να εμφανίζει ευρύτερη διάδοση σε διαφορετικά νοσοκομεία (180). Σε εξάμηνη μελέτη επιτήρησης που διεξήχθη σε εθνικό επίπεδο το 2009, ανιχνεύτηκαν 99 (4,1%) KPC-θετικά στελέχη *P. aeruginosa* (165). Επιπλέον, πρόσφατα ανιχνεύτηκε στέλεχος που παρήγαγε KPC-2 και IMP-18 καρβαπενεμάση (181).

Στέλεχος *P. aeruginosa* που παρήγαγε KPC καρβαπενεμάση αναφέρεται και από το Trinidad and Tobago. Ο ασθενής δεν είχε ιστορικό ταξιδιού σε άλλες χώρες (182). Το 2009 σημειώνεται απομόνωση KPC-θετικού στελέχους *P. aeruginosa* από τις ΗΠΑ, από την περιοχή της Florida (183). Ακολούθησε περιγραφή τέτοιων στελεχών από την Κίνα. Τα στελέχη προήλθαν από ορθικά επιχρίσματα ή κόπρανα 3 ασθενών και το *bla*<sub>KPC</sub> γονίδιο βρέθηκε να έχει χρωμοσωμική εντόπιση (184). Το 2010 δύο στελέχη αναφέρονται από τη Βραζιλία (185), ενώ από την ίδια χώρα περιγράφεται και στέλεχος *Pseudomonas putida* με παραγωγή KPC-2 καρβαπενεμάσης (186). Το 2012 αναφέρεται από την Αργεντινή κλωνική διασπορά στελεχών *P. aeruginosa* που έφεραν το *bla*<sub>KPC-2</sub> γονίδιο. Τα στελέχη προέρχονταν από νοσοκομεία διαφόρων περιοχών της χώρας και ανήκαν στον κλώνο ST654. Η πρώτη απομόνωση σημειώθηκε το 2006 (187).

Στελέχη *Acinetobacter baumannii* που έφεραν  $bla_{KPC}$  γονίδια έχουν περιγραφεί από το Puerto Rico. Τα 10 αυτά στελέχη εντοπίστηκαν κατά τη διάρκεια μελέτης επιτήρησης που πραγματοποιήθηκε το 2009 και περιελάμβανε 17 νοσοκομεία από όλο το νησί. Βρέθηκαν οι ακόλουθες παραλλαγές του ενζύμου: KPC-3 (7 στελέχη) και KPC-2, KPC-4 και KPC-10, που αναφέρθηκε για πρώτη φορά (127).

#### **4.6.3 Παγκόσμια διασπορά στελεχών *Klebsiella pneumoniae* που παράγουν KPC καρβαπενεμάση**

Η εξάπλωση των στελεχών *Klebsiella pneumoniae* που παράγουν KPC καρβαπενεμάσες είναι ευρεία και εξελίχθηκε με μεγάλη ταχύτητα την τελευταία δεκαετία. Η γεωγραφική κατανομή ποικίλει σημαντικά ανά την υφήλιο. Αν και απομόνωση τέτοιων στελεχών σημειώνεται από τις περισσότερες χώρες, διακρίνονται δύο διαφορετικά επιδημιολογικά μοντέλα: περιοχές στις οποίες σημειώνονται σποραδικές απομονώσεις ή μικρού εύρους διασπορά και περιοχές οι οποίες θεωρούνται ενδημικές. Στις ενδημικές περιοχές συγκαταλέγονται οι ΗΠΑ και το Puerto Rico, η Ελλάδα, η Κίνα και το Ισραήλ.

##### **4.6.3.1 ΗΠΑ**

Μέχρι το 2000 οι απομονώσεις βακτηρίων που παρήγαγαν KPC-1/2 ήταν σπάνιες (116, 117, 122, 123). Ταχεία και εκτεταμένη διασπορά KPC-θετικών στελεχών *Klebsiella pneumoniae* σημειώνεται στις Βορειοανατολικές περιοχές των ΗΠΑ από το 2000, με επίκεντρο την περιοχή της Νέας Υόρκης. Ανάδυση 19 στελεχών *Klebsiella* spp (18/19 *Klebsiella pneumoniae*) με μειωμένη ευαισθησία στις καρβαπενέμες σημειώνεται κατά το διάστημα 1997-2001 από 7 νοσοκομεία (περιοχές Brooklyn και Queens). Τα στελέχη έφεραν το  $bla_{KPC-2}$  γονίδιο και στην πλειονότητα τους (12 στελέχη) ανήκαν σε έναν ριβότυπο που είχε διασπαρεί σε όλα τα νοσοκομεία (188). Ακολουθεί αναφορά επιδημίας που σημειώθηκε σε νοσοκομείο της Νέας Υόρκης κατά το διάστημα Απριλίου 2000-2001 και αφορούσε 24 ασθενείς ΜΕΘ. Τα στελέχη έφεραν το γονίδιο  $bla_{KPC-3}$  και 19/24 ανήκαν στον ίδιο παλσότυπο (125). Ανίχνευση στελεχών που παράγουν KPC καρβαπενεμάση (κυρίως KPC-2) σημειώνεται με αυξανόμενη συχνότητα τα επόμενα έτη, λαμβάνοντας επιδημικές διαστάσεις. Μεταξύ στελεχών που εστάλησαν σε κεντρικό ερευνητικό εργαστήριο αναφοράς από 10 νοσοκομεία του Brooklyn (Αύγουστος 2003-Ιούνιος 2004) βρέθηκαν 95 στελέχη που παρήγαγαν KPC-2 καρβαπενεμάση και το 80%

ανήκαν σε ένα ριβότυπο (189). Σε δίμηνη μελέτη επιτήρησης που πραγματοποιήθηκε το 2004 και συμμετείχαν 4 νοσοκομεία του Brooklyν αναγνωρίστηκαν 62 στελέχη (24%, 62/257) που έφεραν το γονίδιο *bla*<sub>KPC</sub> (στην πλειονότητα τους KPC-2) και το 88% αυτών ανήκαν στον ίδιο ριβότυπο (190). Αντίστοιχη τρίμηνη μελέτη επιτήρησης του 2006, με συμμετοχή 15 νοσοκομείων, ανέδειξε ότι το 38% από τα 997 στελέχη που ελέγχθηκαν παρήγαγαν KPC καρβαπενεμάση (191). Η ίδια μελέτη επαναλήφθηκε το 2009 και έδειξε στατιστικά σημαντική μείωση του ποσοστού απομόνωσης KPC-θετικών στελεχών (29%, 302/1024). Τα στελέχη ανήκαν στην πλειοψηφία τους σε δύο ριβότυπους που ήταν ενδημικοί στην περιοχή. Τα νοσοκομεία στα οποία σημειώθηκε ελάττωση είχαν μικρότερο μέσο χρόνο νοσηλείας, ενώ στο νοσοκομείο με τη μεγαλύτερη ελάττωση είχε εφαρμοστεί πρόγραμμα ενεργητικής επιτήρησης φορέων (192).

Εκτός από την περιοχή της Νέας Υόρκης, σταδιακά παρατηρείται ευρύτερη εξάπλωση των στελεχών που παράγουν KPC καρβαπενεμάση στις γειτονικές περιοχές, κατά μήκος της Ανατολικής Ακτής, αλλά και σε πολλές πολιτείες των ΗΠΑ (52, 193, 194, 195, 196, 197). Όπως προκύπτει από στοιχεία του CDC για το 2011, αναφορά τέτοιων στελεχών σημειώνεται από 38 πολιτείες (198). Η διασπορά αφορά σε όλες τις συνιστώσες του συστήματος υγείας, συμπεριλαμβανόμενων και των κέντρων μακροχρόνιας φροντίδας (199).

#### 4.6.3.2 Puerto Rico

Σημαντική διασπορά στελεχών που παράγουν KPC καρβαπενεμάσες διαφόρων τύπων και ανήκουν σε διαφορετικά είδη κλινικά σημαντικών Gram-αρνητικών παθογόνων παρατηρείται στο Puerto Rico. Η πρώτη επιδημία από στελέχη *K. pneumoniae* σημειώνεται το 2008 (126). Σε εξάμηνη μελέτη επιτήρησης που πραγματοποιήθηκε σε εθνικό επίπεδο το 2009 και περιελάμβανε 17 νοσοκομεία, ανιχνεύτηκαν 333 στελέχη *K. pneumoniae* (12%). Διάφοροι παράγοντες πιθανά ενοχοποιούνται για την ευρεία διάδοση αυτών των στελεχών: το μικρό μέγεθος του νησιού σε συνδυασμό με μεγάλη πυκνότητα πληθυσμού, η μετακίνηση ασθενών μεταξύ διαφορετικών νοσοκομείων, τα συχνά ταξίδια προς τις ηπειρωτικές ΗΠΑ, η εκτεταμένη χρήση ευρέως φάσματος αντιβιοτικών λόγω του υψηλού επιπολασμού στελεχών που παράγουν ESBL, η ακατάλληλη χρήση αντιβιοτικών, καθώς και τα χαλαρά μέτρα ελέγχου των λοιμώξεων (166).

#### 4.6.3.3 Καναδάς

Η πρώτη απομόνωση 3 στελεχών *K. pneumoniae* που παρήγαγαν KPC καρβαπενεμάση σημειώνεται στην Οττάβα το 2008. Στις δύο περιπτώσεις υπήρξε ενδονοσοκομειακή μετάδοση, ενώ ο τρίτος ασθενής είχε διακομιστεί από νοσοκομείο της Florida, όπου ενδεχομένως απέκτησε το στέλεχος (200). Δύο ακόμα στελέχη αναφέρονται από το Τορόντο (201). Όπως προκύπτει από πολυκεντρική μελέτη επιτήρησης που πραγματοποιήθηκε για ένα έτος (2009-2010) με συμμετοχή 20 νοσοκομείων από όλη τη χώρα, η απομόνωση τέτοιων στελεχών είναι σπάνια. Αναγνωρίστηκαν 4 στελέχη *K. pneumoniae* που έφεραν το γονίδιο *bla*<sub>KPC-3</sub> και ανήκαν στους κλώνους ST513 (3/4 στελέχη) και ST258. Επίσης το *bla*<sub>KPC-3</sub> γονίδιο βρέθηκε σε ακόμα 3 στελέχη Εντεροβακτηριακών (*K. oxytoca*, *E. coli*, *Serratia marcescens*) (202).

#### 4.6.3.4 Νότιος Αμερική

Η πρώτη χώρα της Νοτίου Αμερικής στην οποία αναφέρεται διασπορά στελεχών *Klebsiella pneumoniae* που παράγουν KPC καρβαπενεμάση ήταν η Κολομβία, μια χώρα στην οποία καταγράφεται υψηλός επιπολασμός στελεχών που παράγουν ESBL. Τα δύο πρώτα στελέχη έφεραν το γονίδιο *bla*<sub>KPC-2</sub>, απομονώθηκαν το 2005 από ασθενείς διαφορετικών νοσοκομείων και δεν βρέθηκε επιδημιολογική συσχέτιση με τις ΗΠΑ (203). Το 2008 σημειώνεται σε νοσοκομείο της Κολομβίας επιδημία από στελέχη *Klebsiella pneumoniae* που παρήγαγαν KPC-3 καρβαπενεμάση. Η πηγή της επιδημίας βρέθηκε ότι ήταν ασθενής που μεταφέρθηκε από το Ισραήλ για μεταμόσχευση ήπατος. Κατά τη διάρκεια της επιδημίας ανιχνεύθηκαν και στελέχη που ανήκαν σε διαφορετικό κλώνο και παρήγαγαν KPC-2 καρβαπενεμάση (204). Στη χώρα αυτή, όπως αναφέρθηκε, σημειώνεται εκτεταμένη διασπορά στελεχών *P. aeruginosa* που παράγουν KPC καρβαπενεμάση.

Ανάδυση στελεχών *K. pneumoniae* και άλλων Εντεροβακτηριακών που παράγουν KPC καρβαπενεμάση σημειώνεται από το 2006 στην Αργεντινή, ενώ από το 2009 παρατηρείται σημαντική αύξηση της συχνότητας απομόνωσης και αναφέρονται νοσοκομειακές επιδημίες με κυρίως κλωνική διασπορά στελεχών του ST258 (205, 206).

Πολλαπλές αναφορές υπάρχουν από τη Βραζιλία. Τα 4 πρώτα αναφερθέντα στη βιβλιογραφία στελέχη *K. pneumoniae* που παρήγαγαν KPC-2 καρβαπενεμάση απομονώθηκαν το 2006 από ασθενείς ΜΕΘ στη Βορειοανατολική Βραζιλία και τα τρία από αυτά α-



νήκαν στον ίδιο παλσότυπο (207). Ακολούθησε αναδρομική έρευνα από την νοτιοανατολική Βραζιλία για το διάστημα 2003-2008 που αποκάλυψε ένα προγενέστερα απομονωθέν στέλεχος (2005) καθώς και ένα στέλεχος που απομονώθηκε το 2008. Τα στελέχη δεν σχετίζονταν κλωνικά (208). Από δύο νοσοκομεία του Rio de Janeiro αναφέρονται 6 στελέχη που απομονώθηκαν κατά το διάστημα 2007-2008 και ανήκαν σε δύο παλσότυπους (209). Μεταγενέστερη μελέτη παρουσιάζει ευρεία διασπορά σε διάφορες περιοχές της Βραζιλίας. Τα στελέχη ανήκαν σε διαφορετικούς κλώνους (ST258, ST11, ST437, ST44, ST48) με προεξάρχοντα τον ST258 και έφεραν το *bla*<sub>KPC-2</sub> γονίδιο σε μια ευρεία ποικιλία πλασμιδίων. Επίσης καταγράφεται νοσοκομειακή επιδημία από στελέχη του κλώνου ST258 (133). Το 2010 παρατηρείται περαιτέρω αύξηση της εξάπλωσης στελεχών που φέρουν το γονίδιο *bla*<sub>KPC</sub> σε πολλά νοσοκομεία σε όλη την έκταση της χώρας. Πρόσφατη μελέτη μοριακής επιδημιολογίας που ανέλυσε στελέχη που απομονώθηκαν το 2010 από 12 περιοχές της Βραζιλίας αναδεικνύει 22 διαφορετικούς κλώνους με προεξάρχοντες τους ST11, ST437 και ST340 (75% των στελεχών) (210).

Η πρώτη αναφορά για απομόνωση KPC-θετικού στελεχούς *K. pneumoniae* από τη Χιλή παρουσιάζεται το 2012. Επρόκειτο για ασθενή που προήλθε από την Ιταλία (211).

#### 4.6.3.5 Ασία

Η Κίνα κατατάσσεται στις ενδημικές περιοχές για βακτήρια που παράγουν KPC καρβαπενεμάσες. Υπάρχουν πολλαπλές αναφορές τόσο για στελέχη *K. pneumoniae*, όσο και για διάφορα άλλα είδη Εντεροβακτηριακών (*Proteus mirabilis*, *Enterobacter* spp., *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella oxytoca* και *E. coli*). Το επίκεντρο της επιδημίας θεωρείται η επαρχία Zhejiang της νοτιοανατολικής Κίνας (198). Η ακριβής εκτίμηση της διασποράς είναι δύσκολη, δεδομένου ότι δεν υπάρχει ακριβές σύστημα καταγραφής και επιτήρησης σε εθνικό επίπεδο (178). Απομόνωση στελεχούς *K. pneumoniae* που έφερε το *bla*<sub>KPC-2</sub> γονίδιο σημειώνεται το 2004. Η εμφάνιση τέτοιων στελεχών ήταν σποραδική μέχρι το 2005 (212). Το διάστημα 2006-2007 καταγράφεται ανάδυση στελεχών *K. pneumoniae*, *S. marcescens* και *E. coli* στις ΜΕΘ νοσοκομείου της περιοχής Zhejiang. Η διασπορά των στελεχών *K. pneumoniae* ήταν κλωνική (154). Μελέτη που ανέλυσε στελέχη διαφόρων ειδών Εντεροβακτηριακών που απομονώθηκαν σε 8 νοσοκομεία 6 πόλεων της ανατολικής Κίνας το διάστημα 2006-2007, ανέδειξε διαφορετικούς παλσότυπους με κυρίως

κλωνική διασπορά στο κάθε νοσοκομείο, αλλά και διανοσοκομειακή διασπορά ορισμένων κλώνων (213). Μελέτη μοριακής επιδημιολογίας που εξέτασε 95 ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *K. pneumoniae* που απομονώθηκαν από 13 νοσοκομεία σε 9 πόλεις κατά το διάστημα 2006-2009, κατέδειξε ότι όλα τα στελέχη έφεραν το *bla*<sub>KPC-2</sub> γονίδιο και ο κυρίαρχος κλώνος ήταν ο ST11 (61/95 στελέχη), που αποτελεί single locus variant (SLV) του ST258. Η μελέτη επιβεβαίωσε διασπορά και εκτός της επαρχίας Zhejiang (214). Στελέχη *K. pneumoniae* που έφεραν τα γονίδια *bla*<sub>KPC-2</sub> και *bla*<sub>IMP-4</sub> σε διαφορετικά πλασμίδια απομονώθηκαν από 4 παιδιατρικούς ασθενείς κατά το διάστημα 2008-2009 (215).

Η πρώτη απομόνωση από την Taiwan σημειώνεται το 2010 και αφορούσε σε ασθενή που είχε νοσηλευθεί σε ΜΕΘ της περιοχής Zhejiang (216). Το ίδιο έτος σε διαφορετικό νοσοκομείο απομονώθηκαν ακόμη 4 στελέχη από δύο συν-νοσηλευόμενους ασθενείς. Ο πρώτος ασθενής είχε επίσης προηγούμενη νοσηλεία σε νοσοκομείο της Κίνας. Τα στελέχη ανήκαν στον κλώνο ST11, που κυριαρχεί στην Κίνα. Τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *K. pneumoniae* ήταν γενικά σπάνια στη χώρα αυτή και εκφράστηκαν φόβοι για διασπορά από τη γειτονική Κίνα, λόγω των δεσμών μεταξύ των δύο χωρών (217). Το 2011 πραγματοποιήθηκε τετράμηνη πολυκεντρική μελέτη που περιελάμβανε 11 νοσοκομεία από διαφορετικές περιοχές. Συγκεντρώθηκαν όλα τα ανθεκτικά στην ερταπενέμη στελέχη Εντεροβακτηριακών και διαπιστώθηκε ενδονοσοκομειακή και διανοσομειακή διασπορά στελεχών *K. pneumoniae* (16 στελέχη, 7,3%) που παρήγαγαν KPC καρβαπενεμάση. Όλα τα στελέχη ανήκαν στον κλώνο ST11 (218).

Το πρώτο στέλεχος από τη Νότιο Κορέα αναφέρεται το 2010 και ανήκε στον κλώνο ST11 που κυριαρχεί στη χώρα αυτή μεταξύ των στελεχών που παράγουν ESBL. Το στέλεχος εμφάνιζε αντοχή στην κολιστίνη και μειωμένη ευαισθησία στην τιγκεκυκλίνη (219).

Στη Σιγκαπούρη η αντοχή στις καρβαπενέμες για την *K. pneumoniae* είναι < 1%. Τα πρώτα στελέχη που έφεραν το *bla*<sub>KPC-2</sub> γονίδιο απομονώθηκαν το 2011 από 4 μη επιδημιολογικά σχετιζόμενους ασθενείς από δύο νοσοκομεία. Τα στελέχη ανήκαν στον κλώνο ST11 και έφεραν δομή τρανσποζονίου όμοια με αυτή που έχει περιγραφεί σε στέλεχη από την Κίνα. Κανένας ασθενής δεν ανέφερε ιστορικό ταξιδιού το προηγούμενο έτος (220).

Στην Ινδία, όπου ενδημούν τα βακτήρια που παράγουν NDM καρβαπενεμάσες, δεν υπάρχουν στοιχεία για τη διασπορά των KPC καρβαπενεμασών, αν και έχει αναφερθεί στη Γαλλία περίπτωση με προέλευση την Ινδία (158). Στέλεχος *K. pneumoniae* που έφερε τα γονίδια *bla*<sub>KPC-2</sub> και *bla*<sub>NDM-1</sub> σε διαφορετικά πλασμίδια, απομονώθηκε το 2010 (221).

Στην Ιαπωνία, όπου κυριαρχούν οι IMP καρβαπενεμάσες, οι απομονώσεις KPC-θετικών στελεχών είναι πολύ σπάνιες. Σε μελέτη επιτήρησης που πραγματοποιήθηκε το 2010, βρέθηκαν 2 τέτοια στελέχη απομονωθέντα από τον ίδιο ασθενή που είχε ιστορικό νοσηλείας στο εξωτερικό (222).

#### **4.6.3.6 Αυστραλία**

Σποραδικές απομονώσεις έχουν αναφερθεί από την Αυστραλία και τη Νέα Ζηλανδία και στις περισσότερες περιπτώσεις επρόκειτο για ασθενείς που είχαν ταξιδεύσει σε ενδημικές περιοχές. Το πρώτο στέλεχος *K. pneumoniae* που παρήγαγε KPC καρβαπενεμάση στην Αυστραλία απομονώθηκε από ασθενή που είχε νοσηλευθεί στην Ελλάδα, ενώ αντίστοιχα στη Νέα Ζηλανδία το πρώτο στέλεχος προήλθε από ασθενή που επαναπατρίστηκε από νοσοκομείο της Κίνας (198).

#### **4.6.3.7 Αφρική**

Τα πρώτα στελέχη από την Αφρικανική ήπειρο απομονώθηκαν στη Νότιο Αφρική το 2011. Πρόκειται για ένα στέλεχος *E. cloacae* και τρία στελέχη *K. pneumoniae* που προήλθαν από τον ίδιο ασθενή (223).

#### **4.6.3.8 Ισραήλ**

Στο Ισραήλ οι πρώτες απομονώσεις στελεχών που παρήγαγαν KPC καρβαπενεμάσες αφορούσαν σε μικρό αριθμό πολυκλωνικών στελεχών *Enterobacter* spp (2003-2006) και *E. coli* (2005) που έφεραν το *bla*<sub>KPC-2</sub> γονίδιο (167, 172). Σε πολυκεντρική έρευνα που πραγματοποιήθηκε το διάστημα 2004-2005 δεν βρέθηκαν στελέχη *K. pneumoniae* και *E. coli* που να φέρουν γονίδια καρβαπενεμασών (224).

Στην περιγραφή της πρώτης νοσοκομειακής επιδημίας από το Τελ-Αβίβ, η ανάδυση στελέχους *K. pneumoniae* σημειώνεται στο τέλος του 2005 και το στέλεχος παρήγαγε KPC-2 καρβαπενεμάση. Όμως το 2006 παρατηρείται σημαντική αύξηση στη συχνότητα

απομόνωσης ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών. Αναγνωρίστηκαν 12 διαφορετικοί κλώνοι. Τα περισσότερα στελέχη (60%) παρήγαγαν KPC-3 και ανήκαν στον κλώνο Q, ενώ τα στελέχη που παρήγαγαν KPC-2 ανήκαν σε πολλαπλούς κλώνους (225). Ακολούθησε διασπορά του συγκεκριμένου κλώνου σε διάφορα νοσοκομεία της χώρας (226). Όπως φάνηκε από πολυκεντρική μελέτη του 2006 στην οποία συμμετείχαν 8 νοσοκομεία και 5 κέντρα χρόνιας φροντίδας καλύπτοντας όλο το εύρος της χώρας, όλα τα στελέχη που ελέγχθηκαν έφεραν το *bla*<sub>KPC-3</sub> γονίδιο και ανήκαν στον υπερενδημικό κλώνο Q. Τα στελέχη του κλώνου Q αποδείχτηκε ότι ήταν κλωνικά ταυτόσημα ή παρουσίαζαν μεγάλο ποσοστό ομοιότητας με στελέχη που σχετίζονταν με επιδημίες στη Νέα Υόρκη. Η πλασμιδιακή ανάλυση έδειξε ότι τα στελέχη του Ισραήλ έφεραν τα ίδια πλασμίδια (pKpQIL), ενώ τα στελέχη της Νέας Υόρκης έφεραν πλασμίδια ποικίλου μεγέθους (227). Η μοριακή τυποποίηση με τη μέθοδο MLST, έδειξε ότι τα στελέχη ανήκαν στον πανδημικό κλώνο ST258 (228). Από δεδομένα που συγκεντρώθηκαν σε εθνικό επίπεδο φαίνεται ότι ο αριθμός των νέων απομονώσεων ανθεκτικών στις καρβαπενέμες Εντεροβακτηριακών (στην πλειοψηφία τους *K. pneumoniae*) αυξήθηκε απότομα το δεύτερο εξάμηνο του 2006 και το πρώτο τετράμηνο του 2007, όπου σημειώνονται 185 απομονώσεις σε 27 νοσοκομεία το μήνα Μάρτιο (55,5 περιπτώσεις ανά 100.000 ασθενοημέρες). Το μήνα αυτό τέθηκε σε εφαρμογή ένα εθνικό σχέδιο παρέμβασης για τον περιορισμό της διασποράς, το οποίο οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση της επίπτωσης (229). Πρόσφατα περιγράφεται στη βιβλιογραφία τοπική επικράτηση του κλώνου ST512, σε νοσοκομείο της Ιερουσαλήμ κατά τα έτη 2006-2009, μετά την αρχική εισαγωγή του επιδημικού κλώνου ST258 το 2005 (230). Παράλληλα έχει αναγνωριστεί ότι τα ΚΜΦ συνιστούν σημαντική δεξαμενή διασποράς, καθιστώντας δύσκολη την εκρίζωση (231).

#### **4.6.3.9 Ευρώπη**

Το πρώτο KPC-θετικό στέλεχος που αναφέρθηκε εκτός ΗΠΑ ήταν στέλεχος *K. pneumoniae* που απομονώθηκε το 2005 στη Γαλλία από ασθενή με πρόσφατο ιστορικό νοσηλείας σε νοσοκομείο της Νέας Υόρκης (232). Η διασπορά των βακτηρίων που παράγουν KPC καρβαπενεμάσες στην Ευρώπη παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ των χωρών, με κάποιες χώρες, όπως η Ελλάδα, να παρουσιάζουν ενδημική εμφάνιση και κάποιες άλλες να αναφέρουν σποραδικές περιπτώσεις, μεμονωμένες επιδημίες ή

ευρύτερη εξάπλωση, αντανακλώνοντας εν μέρει τις διαφορετικές πολιτικές χρήσης των αντιβιοτικών και εφαρμογής μέτρων ελέγχου των λοιμώξεων. Σημαντικός ρόλος αποδίδεται στην εισαγωγή των ανθεκτικών στελεχών με τη μεταφορά ασθενών, τα ταξίδια και τον ιατρικό τουρισμό. Το 2011 παρατηρείται μια δραματική αύξηση στην εμφάνιση ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών στη Ευρώπη (1).

Στην Ιταλία, το πρώτο στέλεχος απομονώθηκε το 2008 και έφερε το *bla*<sub>KPC-3</sub> γονίδιο. Ο ασθενής δεν εμφάνιζε ιστορικό ταξιδιού και η επιδημιολογική διερεύνηση έδειξε ότι η πιθανή πηγή μπορεί να ήταν εκπαιδευόμενος ιατρός από το Ισραήλ που είχε αναλάβει τη φροντίδα του ασθενούς (233). Ακολουθεί ταχεία και εκτεταμένη διάδοση τέτοιων στελεχών με πολλές αναφορές για νοσοκομειακές επιδημίες (234, 235, 236, 237). Σε εξάμηνη μελέτη επιτήρησης σε μεγάλο νοσοκομείο κατά το 2010, βρέθηκαν 56 KPC-θετικά στελέχη με την πλειονότητα τους (45/56) να φέρει το *bla*<sub>KPC-3</sub> γονίδιο (238). Το 2010 σημειώνεται σε δύο νοσοκομεία της Σικελίας επιδημία από ανθεκτικά στην κολιστίνη, κλωνικά σχετιζόμενα στελέχη, που έφεραν το *bla*<sub>KPC-3</sub> γονίδιο. Όλα τα στελέχη ανήκαν στον κλώνο ST258 (239). Πολυκλωνική επιδημία ανθεκτικών στην κολιστίνη στελεχών *K. pneumoniae* σημειώνεται στην ίδια περιοχή το 2011. Η πλειονότητα των στελεχών έφερε το *bla*<sub>KPC-3</sub> γονίδιο και ανήκε στον κλώνο ST258. Τα υπόλοιπα στελέχη δεν έφεραν γονίδια καρβαπενεμασών (240). Το 2010 σημειώνεται απομόνωση στελέχους που έφερε το *bla*<sub>KPC-2</sub> γονίδιο και ανήκε στον κλώνο ST101 (241). Υψηλά ποσοστά αντοχής στην κολιστίνη μεταξύ στελεχών που έφεραν το *bla*<sub>KPC-3</sub> γονίδιο και επικράτηση των κλώνων ST512 και ST258 αναφέρεται σε πρόσφατη πολυκεντρική μελέτη από τη Ρώμη (242). Η σημαντική διασπορά στην Ιταλία αντανακλάται και στην αύξηση του ποσοστού ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *K. pneumoniae* από 1-2% το διάστημα 2006–2009 σε 15% το 2010 και 26,7 το 2011 (EARS-net, [ecdc.europa.eu/en/publications/](http://ecdc.europa.eu/en/publications/)).

Το πρώτο στέλεχος που αναφέρθηκε από την Ελβετία απομονώθηκε το 2010 από ασθενή που μεταφέρθηκε από νοσοκομείο της Σικελίας. Το στέλεχος έφερε το *bla*<sub>KPC-2</sub> γονίδιο και εμφάνιζε αντοχή στην κολιστίνη (243). Σχεδόν ταυτόχρονα αναφέρονται ακόμη 4 στελέχη από μη επιδημιολογικά σχετιζόμενους ασθενείς. Τα στελέχη απομονώθηκαν κατά το διάστημα 2009-2010 και ήταν εισαγόμενα, τα 3 από την Ιταλία (2 KPC-3 και ένα KPC-2) και το τέταρτο από την Ελλάδα (KPC-2) (244).

Το πρώτο στέλεχος από την Κροατία απομονώθηκε το 2011, έφερε το *bla*<sub>KPC-2</sub> γονίδιο και ανήκε στον κλώνο ST37 (245).

Στέλεχος που παρήγαγε KPC-2 και ανήκε στον κλώνο ST258 απομονώθηκε στην Τσεχία το 2009, από ασθενή που είχε νοσηλευθεί στην Ελλάδα (246). Το 2011, ανιχνεύτηκαν 11 στελέχη σε 5 νοσοκομεία της Πράγας. Τα 6 από αυτά προήλθαν από επιδημία σε ένα νοσοκομείο, με πιθανή πηγή ασθενή που επέστρεψε από την Ιταλία. Από τα υπόλοιπα στελέχη, τα τρία σχετίζονταν με προηγούμενη νοσηλεία στην Ελλάδα (1).

Στην Ουγγαρία, το διάστημα 2008–2009 σημειώνεται επιδημία από ανθεκτικά στην κολιστίνη στελέχη *K. pneumoniae* που παρήγαγαν KPC-2 καρβαπενεμάση και ανήκαν στον κλώνο ST258. Πηγή έναρξης της επιδημίας ήταν ασθενής που είχε νοσηλευτεί στην Ελλάδα (247).

Στελέχη Εντεροβακτηριακών που παράγουν KPC καρβαπενεμάση έχουν πρόσφατα ανιχνευθεί και στη Ρουμανία (1).

Σύμφωνα με τα δεδομένα του Εθνικού Κέντρου Αναφοράς της Πολωνίας, τα περισσότερα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη Εντεροβακτηριακών παράγουν KPC καρβαπενεμάση. Τα πρώτα KPC-θετικά στελέχη *K. pneumoniae* απομονώθηκαν το Μάιο του 2008 στη Βαρσοβία από ασθενή που δεν ανέφερε ιστορικό ταξιδιού και ανήκαν στον κλώνο ST258 (248). Στη συνέχεια όλα τα ύποπτα στελέχη από διάφορα νοσοκομεία στέλνονταν στο Κέντρο Αναφοράς και μέχρι το τέλος του 2008, επιβεβαιώθηκαν 33 στελέχη (30 *K. pneumoniae* και 3 *K. oxytoca*).

Τα στελέχη αυτά προέρχονταν από 5 νοσοκομεία της Βαρσοβίας και σε 3 από αυτά σημειώθηκαν επιδημίες. Αύξηση των περιστατικών παρατηρείται το 2009 με απομόνωση και από 3 εξωτερικούς ασθενείς και έναν ασθενή ΚΜΦ. Στελέχη που παρήγαγαν KPC καρβαπενεμάση επίσης ανιχνεύθηκαν σε άλλες 6 πόλεις, στις περισσότερες περιπτώσεις μετά από μεταφορά ασθενών από τη Βαρσοβία και σε μια περίπτωση από τη Νέα Υόρκη. Η μοριακή μελέτη των στελεχών που απομονώθηκαν το διάστημα 2008–2009 έδειξε ότι το 97,4% των στελεχών *K. pneumoniae* ανήκαν στον κλώνο ST258, ενώ επίσης ανιχνεύθηκαν και οι κλώνοι ST11 και ST23. Όλα τα στελέχη έφεραν το *bla*<sub>KPC-2</sub> γονίδιο με εξαίρεση δύο στελέχη που έφεραν το *bla*<sub>KPC-3</sub> γονίδιο (το ένα από αυτά είχε προέλθει τη Νέα Υόρκη) (136). Περαιτέρω αύξηση της διασποράς καταγράφεται το 2010, ενώ σημειώνεται και επιδημία εκτός της περιοχής της Βαρσοβίας. Η επίταση των μέτρων ελέγχου των λοιμώξεων οδήγησε σε μείωση των περιστατικών το 2011. Φαίνε-

ται ότι η διασπορά των βακτηρίων που παράγουν KPC καρβαπενεμάση αποτελεί σημαντικό πρόβλημα στην Πολωνία. Ο συνολικός αριθμός που έχει δηλωθεί στο κέντρο αναφοράς για το διάστημα 2008-2011 είναι 371 περιπτώσεις και προέρχονται από 58 νοσοκομεία σε 34 περιοχές, συνιστώντας μια σημαντική δεξαμενή διασποράς (1).

Στις Σκανδιναβικές χώρες τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες βακτήρια είναι σπάνια. Στα περισσότερα νοσοκομεία εφαρμόζεται έλεγχος φορέας σε ασθενείς με ιστορικό νοσηλείας στο εξωτερικό. Από το 2009, έχουν αναφερθεί 14 περιστατικά από τη Νορβηγία, 14 από τη Σουηδία, 5 από τη Φινλανδία και 3 από τη Δανία. Τα περισσότερα στελέχη βρέθηκε ότι παρήγαγαν KPC-2 και ανήκαν στον κλώνο ST258. Η πλειονότητα των περιστατικών σχετίστηκε με εισαγωγή στελεχών από την Ελλάδα, το Ισραήλ, τις ΗΠΑ ή την Ιταλία, αν και σημειώνεται και μικρής έκτασης επιδημία με ενδονοσοκομειακή διασπορά (249, 250, 251, 252).

Στο Βέλγιο, ο αριθμός των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες Εντεροβακτηριακών αυξήθηκε σημαντικά από το 2010, κυρίως λόγω της εξάπλωσης της OXA-48 καρβαπενεμάσης αλλά και της ανάδυσης στελεχών που παράγουν NDM, ενώ τα στελέχη που παράγουν KPC καρβαπενεμάση είναι σπανιότερα. Τα πρώτα 3 περιστατικά σημειώνονται το 2009 και αφορούσαν σε ασθενείς που μεταφέρθηκαν από νοσοκομεία της Ελλάδας. Τα στελέχη ανήκαν στον κλώνο ST258. Δεν παρατηρήθηκε ενδονοσοκομειακή διασπορά λόγω της έγκαιρης εφαρμογής μέτρων ελέγχου των λοιμώξεων (253). Παρόμοια κατάσταση επικρατεί και στην Ολλανδία. Στέλεχος του ST258 απομονώθηκε από ασθενή που είχε νοσηλευτεί στην Ελλάδα (254).

Και στη Γερμανία παρατηρείται επικράτηση των καρβαπενεμασών τύπου OXA στα Εντεροβακτηριακά, αν και οι επιδημίες που έχουν αναφερθεί οφείλονται σε στελέχη που παράγουν KPC καρβαπενεμάση. Σύμφωνα με τα στοιχεία του Εθνικού Κέντρου Αναφοράς πολυανθεκτικών Gram-αρνητικών βακτηρίων από τα 111 ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *K. pneumoniae* το 46% βρέθηκε ότι παρήγαγε KPC καρβαπενεμάση (23% KPC-2 και 23% KPC-3) (1).

Η πρώτη επιδημία στη Γερμανία σημειώνεται το 2008. Τα στελέχη παρήγαγαν KPC-2 καρβαπενεμάση και ανήκαν στον ίδιο κλώνο. Πηγή της επιδημίας θεωρήθηκε ασθενής που είχε νοσηλευτεί στην Ελλάδα (255). Το 2010 καταγράφεται επιδημία από στελέχη *K. pneumoniae* που έφεραν τα γονίδια  $bla_{KPC-2}$  και  $bla_{VIM-1}$  και ήταν κλωνικά σχετιζόμε-

να. Η πηγή προέλευση πιθανολογήθηκε ότι ήταν ασθενής από την Ελλάδα που είχε νοσηλευτεί λίγους μήνες πριν την εμφάνιση του πρώτου περιστατικού (256).

Από την Αυστρία αναφέρεται πεντάμηνης διάρκειας επιδημία από ΚΡC-θετικά στελέχη *Klebsiella oxytoca*. Η επιδημία ξεκίνησε το 2009 και συνολικά ανιχνεύθηκαν 31 στελέχη από 5 ασθενείς. Τα στελέχη εμφάνιζαν ομοιότητα 99% (257).

Μετά την πρώτη αναφορά στελέχους *K. pneumoniae* που παρήγαγε ΚΡC καρβαπενεμάση από τη Γαλλία ακολούθησαν αρκετές αναφορές στις οποίες τα στελέχη ήταν εισαγόμενα από τις ΗΠΑ (*E. cloacae* με ΚΡC-3, απομόνωση το 2005), το Ισραήλ (*E. coli* και *E. cloacae* με ΚΡC-2, απομόνωση το 2002) και την Ελλάδα (*K. pneumoniae* με ΚΡC-2, 2007) (156, 258, 259). Αν και έχουν αναφερθεί λίγες νοσοκομειακές επιδημίες δεν σημειώνεται σημαντική διανοσοκομειακή διασπορά. Σε γενικές γραμμές τα στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν ΚΡC καρβαπενεμάση παραμένουν σπάνια και οι αναφερθείσες επιδημίες έχουν συνδεθεί επιδημιολογικά με ασθενείς που μεταφέρθηκαν από ενδημικές περιοχές. Μία τέτοια επιδημία που αφορούσε σε 13 ασθενείς σημειώθηκε το 2009 σε δύο νοσοκομεία του Παρισιού και ο πρώτος ασθενής είχε νοσηλευτεί στην Ελλάδα. Η μετάδοση σε 7/13 ασθενείς έγινε με χρήση μολυσμένου ενδοσκοπίου (260). Ακόμα μια επιδημία (4 ασθενείς) καταγράφεται το 2009 σε ηπατολογικό κέντρο του Παρισιού με πηγή επίσης ασθενή που μεταφέρθηκε από την Κρήτη. Τα στελέχη έφεραν το *bla*<sub>KPC-2</sub> γονίδιο και ανήκαν στον κλώνο ST258 (261). Πρόσφατα αναφέρεται επιδημία από στελέχη που έφεραν το *bla*<sub>KPC-3</sub> γονίδιο και η πηγή ήταν ασθενής που μεταφέρθηκε από την Ιταλία (262).

Στην Ισπανία ανευρίσκονται κυρίως στελέχη που παράγουν μέταλλο-β-λακταμάσες. Το 2009 σημειώνεται η πρώτη επιδημία (8 ασθενείς) από ΚΡC-θετικά στελέχη *K. pneumoniae* σε νοσοκομείο της Μαδρίτης. Τα στελέχη παρήγαγαν ΚΡC-3 καρβαπενεμάση και 11/12 ανήκαν στον κλώνο ST384, ενώ ένα στέλεχος ανήκε στον ST388. Οι συγκεκριμένοι κλώνοι δεν είχαν σχετιστεί με ΚΡC-θετικά στελέχη. Ο ST388 κυκλοφορούσε στο συγκεκριμένο νοσοκομείο από το 1998 και έφερε το *bla*<sub>CTX-M-10</sub> γονίδιο. Το *bla*<sub>KPC-3</sub> γονίδιο βρέθηκε σε δομή τρανσποζονίου Tn4401a (263). Επίσης σε γειτονικό νοσοκομείο αναφέρονται τρία στελέχη *Citrobacter freundii* που παρήγαγαν ΚΡC-2 καρβαπενεμάση. Τα στελέχη ήταν κλωνικά σχετιζόμενα, αλλά δεν αναδείχτηκε καμία εμφανής επιδημιολογική συσχέτιση μεταξύ των ασθενών (264).



Στη Μεγάλη Βρετανία από το 2008 και μετά καταγράφεται σημαντική αύξηση στην απομόνωση ανθεκτικών στις καρβαπενέμες Εντεροβακτηριακών με κυρίαρχο είδος την *K. pneumoniae*. Το επικρατών ένζυμο για το 2011 ήταν η KPC καρβαπενεμάση, όμως σημειώνεται ταχύτατη αύξηση στην απομόνωση στελεχών που παράγουν NDM (1). Η άφιξη των KPC-θετικών στελεχών αναφέρεται το 2008. Πρόκειται για δύο στελέχη *K. pneumoniae* που απομονώθηκαν το 2007 και 2008, με 5 μήνες διαφορά, σε δύο διαφορετικά νοσοκομεία (Σκωτία και Λονδίνο). Ο πρώτος ασθενής δεν είχε ιστορικό ταξιδιού, ενώ ο δεύτερος είχε νοσηλευθεί σε νοσοκομείο του Ισραήλ. Τα στελέχη έφεραν το *bla*<sub>KPC-3</sub> γονίδιο και ο έλεγχος κλωνικότητας έδειξε ότι ανήκαν στον κλώνο Q που επικρατούσε στο Ισραήλ (265). Φαίνεται ότι στη Μεγάλη Βρετανία παρατηρείται διασπορά πλασμιδίων rKpQIL-like που φέρουν το *bla*<sub>KPC-2</sub> γονίδιο, κυρίως στη βορειοδυτική Αγγλία. Τα στελέχη που αποστέλλονται στο κέντρο αναφοράς προέρχονται σε μεγάλο ποσοστό από αυτή την περιοχή και πολλά από αυτά τα στελέχη αντιπροσωπεύουν ορθική φορεία παρά λοιμώξεις (1). Το 2011 αναφέρονται δύο στελέχη *K. pneumoniae* που παρήγαγαν KPC-2 καρβαπενεμάση και ανήκαν στον κλώνο ST11. Ο πρώτος ασθενής είχε νοσηλευθεί σε νοσοκομείο του Cuiçao της Καραϊβικής (266). Το πρώτο στέλεχος *K. pneumoniae* με παραγωγή KPC-2 καρβαπενεμάσης από την Ιρλανδία απομονώθηκε το 2008 από ασθενή που δεν εμφάνιζε ιστορικό ταξιδιού (267). Το 2011 σημειώνεται η πρώτη επιδημία (9 ασθενείς σε δύο νοσοκομεία) από στελέχη που έφεραν το *bla*<sub>KPC-2</sub> γονίδιο και ανήκαν στον κλώνο ST258. Αναφέρεται ότι τέτοια στελέχη εμφανίζουν σημαντική διασπορά στην περιοχή αυτή της Ιρλανδίας, καθιστώντας δύσκολο τον περιορισμό της επιδημίας (268).

#### **4.6.4 Διασπορά στελεχών *Klebsiella pneumoniae* που παράγουν KPC καρβαπενεμάση στην Ελλάδα**

Στην Ελλάδα, η αντοχή στις καρβαπενέμες για τα στελέχη *K. pneumoniae* συνιστά μείζον πρόβλημα δημόσιας υγείας. Σύμφωνα με τα στοιχεία του EARS-net το ποσοστό αντοχής το 2010 για διεισδυτικά στελέχη ήταν 49,1%, ενώ το ποσοστό είναι υψηλότερο για τα στελέχη που προέρχονται από ασθενείς ΜΕΘ. Για το 2011 το ποσοστό αντοχής είναι εντυπωσιακά υψηλότερο και φτάνει το 68,2% (EARS-net, <http://ecdc.europa.eu/en/publications/>). Μέχρι το 2007 το πρόβλημα εντοπιζόταν στην πολυκλωνική διασπορά στελεχών που παρήγαγαν καρβαπενεμάσες τύπου VIM. Από το τέλος του 2007, ση-

μειώνεται παράλληλη επιδημική εμφάνιση στελεχών που παράγουν KPC-2 καρβαπενεμάση, που πλέον ενδημούν στα ελληνικά νοσοκομεία και έχουν επικρατήσει έναντι των VIM-θετικών στελεχών.

Το πρώτο τέτοιο στέλεχος αναφέρθηκε στη βιβλιογραφία το 2008 και είχε απομονωθεί από νοσοκομείο της Βόρειας Ελλάδας. Ταυτόχρονα, προτάθηκε η φαινοτυπική ανιχνεύση των στελεχών που παράγουν KPC καρβαπενεμάσες με χρήση δίσκων καρβαπενεμών με βορονικό οξύ (269).

Η πρώτη νοσοκομειακή επιδημία περιγράφηκε στην Κρήτη, όπου είχαν νοσηλευτεί και οι δύο ασθενείς στις αναφορές για την πρώτη εμφάνιση KPC-θετικών στελεχών στη Γαλλία και τη Σουηδία. Η επιδημία ξεκίνησε το Μάιο του 2007 και σε ένα χρόνο ανιχνεύθηκαν 23 περιπτώσεις. Κανένας ασθενής δεν εμφάνιζε ιστορικό ταξιδιού στις ενδημικές περιοχές. Ο έλεγχος κλωνικότητας με PFGE έδειξε ότι όλα τα στελέχη ανήκαν στον ίδιο παλσότυπο (270). Ακολουθεί αναφορά για επιδημία στη Θεσσαλονίκη, όπου κατά τη διάρκεια ενός έτους (Οκτώβριος 2007- Σεπτέμβριος 2008) ανιχνεύθηκαν 47 ασθενείς. Η πλειονότητα των στελεχών ανήκε σε έναν κλώνο, με τον συχνότερο υπότυπο αυτού να είναι ταυτόσημος με τον υπερενδημικό κλώνο που είχε αναφερθεί από το Ισραήλ και τη Νέα Υόρκη (271). Μια ακόμη επιδημία αναφέρεται από την Αθήνα. Ο έλεγχος κλωνικότητας έδειξε ότι το 82% των στελεχών ανήκε στον ίδιο παλσότυπο, ενώ ανιχνεύθηκαν ακόμη τρεις κλωνικοί τύποι. Η επιδημία ξεκίνησε το Σεπτέμβριο του 2007 με σποραδικές απομονώσεις και το Φεβρουάριο του επόμενου έτους εισήχθη το επιδημικό στέλεχος του κύριου κλώνου από ασθενή που μεταφέρθηκε από άλλο νοσοκομείο και ήταν ήδη αποικισμένος κατά την εισαγωγή (272).

Πολυκεντρική μελέτη, που διοργανώθηκε από το ΚΕΕΛΠΝΟ σε συνεργασία με το Ελληνικό κέντρο για την επιτήρηση της μικροβιακής αντοχής, ξεκίνησε το Φεβρουάριο του 2008 με στόχο να εκτιμήσει την έκταση της διασποράς των στελεχών που παράγουν KPC καρβαπενεμάση στα Ελληνικά νοσοκομεία. Στη μελέτη συμμετείχαν 40 νοσοκομεία από όλη τη χώρα. Σε διάστημα 10 μηνών (Φεβρουάριος-Δεκέμβριος του 2008) βρέθηκαν 173 στελέχη που έφεραν το *bla*<sub>KPC-2</sub> γονίδιο από 18 νοσοκομεία (Αττική, Θεσσαλονίκη, Κρήτη). Τα στελέχη της μελέτης ανήκαν σε 5 παλσότυπους με τον κύριο παλσότυπο να περιλαμβάνει το 96% των στελεχών. Δύο παλσότυποι βρέθηκαν αποκλειστικά στην Κρήτη. Επίσης βρέθηκαν και δύο στελέχη που έφεραν εκτός από το *bla*<sub>KPC-2</sub> γονίδιο και το γονίδιο *bla*<sub>VIM-1</sub> (273). Η μελέτη αυτών των στελεχών έδειξε ότι έφεραν τα δύο

γονίδια σε διαφορετικά πλασμίδια και παρουσίαζαν > 95% ομοιότητα με στέλεχος που παρήγαγε VIM-1 και κυκλοφορούσε στα νοσοκομεία της Αθήνας από το 2003, υποδεικνύοντας πιθανή πρόσφατη απόκτηση του πλασμιδίου που έφερε το *bla*<sub>KPC-2</sub> γονίδιο από το ήδη εγκατεστημένο στέλεχος (274). Η ανάδυση στελεχών που φέρουν ταυτόχρονα γονίδια καρβαπενεμασών τύπου VIM και KPC σε διαφορετικά πλασμίδια σε συνδυασμό με γονίδια άλλων β-λακταμασών αναφέρεται και από άλλες μελέτες (275, 276). Ένα τέτοιο στέλεχος βρέθηκε ότι ανήκε στο νέο κλώνο ST383 (277).

Η εξέλιξη της επιδημίας των βακτηρίων που παράγουν KPC καρβαπενεμάση στη χώρα μας για τα έτη 2009-2010 παρουσιάζεται σε πολυκεντρική μελέτη με συμμετοχή 40 νοσοκομείων. Η επιδημία παραμένει κυρίως κλωνική με επικράτηση των στελεχών του κλώνου ST258 (85,2% των στελεχών), ενώ ανιχνεύθηκαν άλλοι 10 STs. Τα στελέχη που έφεραν συγχρόνως τα γονίδια *bla*<sub>KPC-2</sub> και *bla*<sub>VIM-1/4</sub> δεν παρουσίαζαν ευρεία εξάπλωση (4,8%) και ανήκαν στους κλώνους ST147, ST323 και ST383. Όλα τα στελέχη εκτός από αυτά του κλώνου ST340 έφεραν το *bla*<sub>KPC-2</sub> γονίδιο σε δομή τρανσποζονίου Tn4401a (278).

Επίσης αναφέρονται και επιδημίες από ανθεκτικά στην κολιστίνη στελέχη (279, 280).

#### **4.6.5 Συμπεράσματα από τις μελέτες μοριακής επιδημιολογίας: διασπορά κλώνων**

Η πρώτη μελέτη στην οποία διερευνήθηκε η μοριακή επιδημιολογία των στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν KPC καρβαπενεμάση από τις ΗΠΑ δημοσιεύθηκε το 2009. Μελετήθηκαν στελέχη που είχαν αποσταλεί στο CDC για έλεγχο ευαισθησίας στα αντιμικροβιακά από το 1996 έως το 2008. Όσα στελέχη έφεραν το *bla*<sub>KPC</sub> γονίδιο υποβλήθηκαν σε PFGE και προέκυψε μια βάση δεδομένων 248 ηλεκτροφορητικών προτύπων. Από αυτά το 69,3% παρουσίαζε > 80% ομοιότητα. Αντιπροσωπευτικά στελέχη τυποποιήθηκαν με τη μέθοδο MLST. Τα στελέχη με > 80% ομοιότητα στα ηλεκτροφορητικά πρότυπα βρέθηκε ότι ανήκουν σε ένα νέο κλώνο που χαρακτηρίστηκε ως ST258. Άλλοι κλώνοι που ανευρέθησαν ήταν: ST257, ST259, ST14, ST21, ST37, ST45, ST101, ST228, ST234. Στον ST258 ανήκε και στέλεχος από το Ισραήλ που επίσης μελετήθηκε. Τα στελέχη του κυρίαρχου κλώνου ST258 έφεραν είτε το *bla*<sub>KPC-2</sub>, είτε το *bla*<sub>KPC-3</sub> γονίδιο. Η πλασμιδιακή ανάλυση έδειξε ότι στελέχη του ίδιου κλώνου μπορεί να έφεραν διαφορετικά πλασμίδια, ενώ στελέχη διαφορετικών κλώνων παρουσίαζαν όμοιο πλασμιδιακό προφίλ. Τα στελέχη του κύριου αυτού κλώνου προέρχονταν από περιοχές σε όλη την

έκταση της χώρας (βορειοανατολικές, μεσοδυτικές, δυτικές και νότιες πολιτείες). Ο κλώνος ST14 παρουσίασε διασπορά στις μεσοδυτικές πολιτείες (281). Ο κλώνος ST258 είχε ήδη αναφερθεί από τις Σκανδιναβικές χώρες σαν αποτέλεσμα εισαγωγής στελεχών από την Ελλάδα και το Ισραήλ (250).

Ακολούθησαν πολλές μελέτες στις οποίες καθορίστηκε η ανάδυση και διασπορά των κλώνων σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές. Από τις μελέτες αυτές διαπιστώνεται παγκόσμια εξάπλωση του κλώνου ST258, αν και παρουσιάζεται ποικιλία άλλων κλώνων με επικράτηση σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές. Στελέχη του κλώνου ST258 ενοχοποιούνται για την ενδημική εμφάνιση των στελεχών που παράγουν KPC καρβαπενεμάσες στο Ισραήλ (KPC-3) και την Ελλάδα (KPC-2) (228, 278). Ο κλώνος αυτός αναφέρεται και από πολλές Ευρωπαϊκές χώρες (Ιταλία, Γαλλία, Βέλγιο, Ολλανδία, Μεγάλη Βρετανία, Ιρλανδία, Τσεχία, Ουγγαρία, Πολωνία) κυρίως σαν αποτέλεσμα της εισαγωγής στελεχών από τις ενδημικές περιοχές (ΗΠΑ, Ισραήλ, Ελλάδα) αλλά και από την Ιταλία. Διαφορετικοί κλώνοι με μικρότερη εξάπλωση έχουν επίσης αναφερθεί από την Ελλάδα, το Ισραήλ, την Κροατία, την Πολωνία και την Ισπανία.

Εκτός από τον ST258, ευρεία διάδοση παρουσιάζει και ο γενετικά σχετιζόμενος με αυτόν ST11 (Single Locus Variant του ST258). Αποτελεί τον επικρατούντα κλώνο στην Κίνα και έχει διασπαρεί και στις γειτονικές χώρες (Ταϊβάν, Κορέα, Σιγκαπούρη). Ο κλώνος ST11 έχει επίσης ανιχνευτεί και από Ευρωπαϊκές χώρες.

Ποικιλία διαφορετικών κλώνων μεταξύ των οποίων και οι ST11 και ST258 έχει αναφερθεί από τις χώρες της Νότιας Αμερικής (ST11, ST340, ST437, ST14, ST338 ST339) (129).

Στελέχη του κλώνου ST11 έχουν σχετιστεί και με παραγωγή καρβαπενεμασών τύπου OXA και NDM, ενώ στελέχη του ST147 έχουν επιπλέον σχετιστεί με παραγωγή ενζύμων τύπου VIM (109).

Φαίνεται λοιπόν ότι εκτός από την παγκόσμια εξάπλωση του ST258 και σε μικρότερο βαθμό του ST11, παρατηρείται διασπορά πλασμιδίων που φέρουν τα *bla*<sub>KPC</sub> γονίδια σε μια ποικιλία κλώνων.

Η πανδημική εξάπλωση του ST258 αναδεικνύει την ικανότητα του συγκεκριμένου κλώνου να αποκτά και να διατηρεί τα γονίδια αντοχής. Η αναγνώριση της κλωνικής κυρίως φύσης της επιδημίας, είναι ένα σημαντικό βήμα προς την ανάπτυξη στοχευμένων στρατηγικών για τον περιορισμό της περαιτέρω διασποράς (281).

#### 4.7 Εργαστηριακή ανίχνευση

Η εργαστηριακή ανίχνευση των στελεχών Εντεροβακτηριακών που παράγουν KPC καρβαπενεμάσες αποτελεί πρόκληση για τα κλινικά εργαστήρια. Η έγκαιρη και έγκυρη ανίχνευση κατέχει θεμελιώδη ρόλο στην επιλογή του κατάλληλου θεραπευτικού σχήματος, αλλά και στην ταχεία εφαρμογή μέτρων ελέγχου των λοιμώξεων.

Αρχικά απαιτείται προσεκτική ανάγνωση των αποτελεσμάτων του ελέγχου ευαισθησίας. Οι τιμές MIC για τις καρβαπενέμες παρουσιάζουν ευρεία διακύμανση (0,5- >64 µg/ml) και σε αρκετές περιπτώσεις παρατηρείται μόνο ελαφρά μείωση της ευαισθησίας (29). Σε πολλές μελέτες πριν το 2010, τονίζεται η δυσκολία στην ανίχνευση με συνακόλουθη υποεκτίμηση του πραγματικού επιπολασμού των KPC-θετικών στελεχών, αλλά και ο κίνδυνος που προκύπτει για τη διασπορά.

Τα αυτοματοποιημένα συστήματα σε μεγάλο βαθμό αποτύγχαναν να αναγνωρίσουν αυτά τα στελέχη (282). Από το 2005 και μετά πραγματοποιήθηκαν τροποποιήσεις στο λογισμικό των συστημάτων αυτών και στα panel που χρησιμοποιούνται. Σε μελέτη που αξιολόγησε τα εμπορικά διαθέσιμα panels στις ΗΠΑ, το 2010, βρέθηκε ότι χρησιμοποιώντας την τιμή MIC της μεροπενέμης για το Vitek2 και της ερταπενέμης σε συνδυασμό με ιμιπενέμη ή μεροπενέμη για το BD Phoenix, εμφανίζεται υψηλή ευαισθησία (97%) στην ανίχνευση των στελεχών (283). Στις μεθόδους διάχυσης σημειώνεται δυσκολία στην ανάγνωση λόγω της ύπαρξης ετεροανθεκτικών πληθυσμών (115).

Το 2008 προτάθηκε από το CLSI η εκτέλεση screening test (Hodge test) σε στελέχη Εντεροβακτηριακών με τιμές MIC 2-4 µg/ml. Όμως επικρατούσε αρκετή σύγχυση αναφορικά με το χαρακτηρισμό ευαισθησίας των στελεχών που εμφάνιζαν τιμές MIC εντός των τότε ορίων ευαισθησίας αλλά παρήγαγαν KPC καρβαπενεμάση.

Με αυτά τα δεδομένα, το CLSI προχώρησε τον Ιούνιο του 2010 σε αναθεώρηση των ορίων ευαισθησίας για τις καρβαπενέμες στα Εντεροβακτηριακά, στοχεύοντας στη βελτίωση της ικανότητας ανίχνευσης. Προτείνεται η λήψη των θεραπευτικών αποφάσεων να γίνεται μόνο με βάση τις τιμές MIC, ενώ οι επιβεβαιωτικές δοκιμασίες συστήνεται να τελούνται για λόγους επιδημιολογικής επιτήρησης και εφαρμογής μέτρων ελέγχου των λοιμώξεων (284). Τα όρια ευαισθησίας του CLSI είναι πλέον αυστηρότερα από αυτά του EUCAST (285).

Ένας σημαντικός προβληματισμός είναι το σε ποιό βαθμό οι συνήθεις μέθοδοι ελέγχου ευαισθησίας εμφανίζουν ακρίβεια. Εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη μεθοδολογία που χρησιμοποιείται και από το άτομο που τις εκτελεί.

Έχει παρατηρηθεί ασυμφωνία των αποτελεσμάτων μεταξύ του Etest και του Vitek2, αλλά και διαφόρων αυτοματοποιημένων συστημάτων και του Etest συγκρινόμενα με μεθόδους αναφοράς στον προσδιορισμό των τιμών MIC στις καρβαπενέμες (286, 287). Με τη μέθοδο του Etest, σημαντικός αριθμός KPC-θετικών στελεχών βρέθηκαν ευαίσθητα στην ιμιπενέμη και τη μεροπενέμη σε μελέτη αξιολόγησης της χρήσης των νέων ορίων ευαισθησίας (288). Χαρακτηριστική είναι η αποτυχία σημαντικού αριθμού εργαστηρίων να χαρακτηρίσουν σωστά στέλεχος *K. pneumoniae* του κλώνου ST258 σε πρόσφατη αποστολή του οργανισμού εξωτερικού ποιοτικού ελέγχου UK NEQAS. Η ανίχνευση του μηχανισμού αντοχής είναι απαραίτητη ώστε να ενημερωθεί ο κλινικός ιατρός ότι το στέλεχος εμφανίζει μηχανισμό αντοχής σημαντικό για τη δημόσια υγεία και αν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί καρβαπενέμη να δοθεί ως συνδυαστική αγωγή και να παρακολουθηθεί στενά ο ασθενής (286). Δεν υπάρχει σημαντική κλινική εμπειρία για τη χρήση καρβαπενεμών θεραπευτικά σε αυτές τις περιπτώσεις και επιπλέον υπάρχει η πιθανότητα επιλογής μεταλλακτών με αυξημένες τιμές MIC στις καρβαπενέμες. Επίσης σημαντικό ρόλο παίζει το μέγεθος του ενοφθαλμίσματος στο σημείο της λοίμωξης (20). Μεταξύ των καρβαπενεμών, φαίνεται ότι η ερταπενέμη παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ευαισθησία για την ανίχνευση των στελεχών, δεδομένου ότι οι τιμές MIC των περισσότερων στελεχών για την ερταπενέμη είναι υψηλότερες από τις άλλες καρβαπενέμες (289). Όμως η χρήση της ερταπενέμης ως αντιβιοτικού-δείκτη για την παραγωγή KPC καρβαπενεμάσης στερείται ειδικότητας διότι αντοχή στην ερταπενέμη μπορεί να προκύψει και από άλλους μηχανισμούς (27).

Διχογνωμία υπάρχει σχετικά με το όριο MIC το οποίο πρέπει να χρησιμοποιείται για την επιλογή των στελεχών που θα υποβληθούν σε έλεγχο παραγωγής καρβαπενεμάσης. Οι περισσότεροι συγγραφείς προτείνουν ότι στελέχη με τιμές MIC στην ιμιπενέμη ή τη μεροπενέμη  $\geq 1$   $\mu\text{g/ml}$  και στην ερταπενέμη  $\geq 0,5$   $\mu\text{g/ml}$  θα πρέπει να θεωρούνται ύποπτα για την παραγωγή καρβαπενεμάσης και να ελέγχονται περαιτέρω. Διάφορες πρακτικές έχουν χρησιμοποιηθεί με ποικίλη απόδοση.

#### 4.7.1 Hodge test

Το CLSI προτείνει ως επιβεβαιωτική δοκιμασία τη χρήση του Hodge test (cloverleaf test / modified Hodge test, MHT). Η συγκεκριμένη δοκιμασία στηρίζεται στην υδρόλυση καρβαπενέμης από το στέλεχος που παράγει καρβαπενεμάση, επιτρέποντας σε ένα ευαίσθητο στέλεχος-δείκτη να επεκτείνει την ανάπτυξη του προς ένα δίσκο καρβαπενέμης κατά μήκος της γραμμής εμβολιασμού του υπό εξέταση στελέχους.

Η δοκιμασία αυτή δεν διαθέτει ικανότητα διάκρισης του είδους της καρβαπενεμάσης, είναι χρονοβόρος και συχνά παρουσιάζει δυσκολίες στην ερμηνεία, ειδικά σε στελέχη με χαμηλές τιμές MIC για τις καρβαπενέμες (150). Επίσης έχουν αναφερθεί ψευδώς θετικά αποτελέσματα με στελέχη που παράγουν CTX-M-ESBLs ή εμφανίζουν υπερπαραγωγή AmpC-β-λακταμασών (290).

Για τη βελτιστοποίηση της απόδοσης της δοκιμασίας αυτής και τον έλεγχο των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων προτάθηκε τροποποίηση με προσθήκη παραγώνων του βορονικού οξέος και οξακιλλίνη. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατή η διαφοροποίηση των στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες Τάξης A, σε σχέση με άλλες καρβαπενεμάσες. Η μεθοδολογία αυτή αύξησε την ειδικότητα από 77% σε 100% σε σχέση με την κλασσική πρακτική. Η ευαισθησία ήταν 92% (291).

#### 4.7.2 Παράγωγα του βορονικού οξέος

Τα παράγωγα του βορονικού οξέος αποτελούν αναστολείς των σερίνη-β-λακταμασών. Κινητικές μελέτες έχουν δείξει ότι αναστέλλουν αναστρέψιμα τις AmpC-β-λακταμάσες και διάφορες β-λακταμάσες της Τάξης A. Έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση των πλασμιδιακών AmpC-β-λακταμασών. Σε μελέτη αξιολόγησης της χρωμογόνου δοκιμασίας Cica-β-test για την ανίχνευση AmpC, ESBL και MBL β-λακταμασών, παρατηρήθηκε ότι στελέχη που παρήγαγαν KPC καρβαπενεμάση έδιναν ψευδώς θετικό αποτέλεσμα για παραγωγή AmpC (292). Η χρήση του βορονικού οξέος για τη φαινοτυπική ανίχνευση KPC-θετικών στελεχών Εντεροβακτηριακών προτάθηκε από τους Τσακρή και συν, το 2008 (269). Ακολούθησε μελέτη αξιολόγησης των δοκιμασιών συνδυασμού των δίσκων με χρήση δίσκων καρβαπενεμών, κεφοξιτίνης και ευρέως φάσματος κεφαλοσπορινών με ή χωρίς προσθήκη φαινυλβορονικού οξέος (PBA). Ελέγχθηκαν στελέχη *K. pneumoniae* με ποικιλία μηχανισμών αντοχής. Η μέθοδος παρουσίασε 100% ευαισθησία και ειδικότητα με τη χρήση δίσκων ιμιπενέμης και μεροπενέμης στην ανίχνευση KPC-

θετικών στελεχών *K. pneumoniae*. Η προσθήκη PBA οδήγησε σε αύξηση της διαμέτρου της ζώνης αναστολής της μεροπενέμης κατά 8–11 mm για την πλειονότητα των στελεχών, καθιστώντας την ερμηνεία της δοκιμασίας εύκολη, ακόμη και από μη εκπαιδευμένο προσωπικό (293). Στη συνέχεια προτάθηκε τροποποίηση της επιβεβαιωτικής δοκιμασίας του CLSI για την ανίχνευση των ESBL, με χρήση δίσκων κεφταξιμης/κεφταξιμης-κλαβουλανικού και κεφταζιδίμης/κεφταζιδίμης-κλαβουλανικού με και χωρίς προσθήκη PBA. Η μέθοδος εμφάνισε 100% ευαισθησία και ειδικότητα στην ανίχνευση ESBL σε στελέχη διαφόρων ειδών Εντεροβακτηριακών που παράγαν KPC καρβαπενεμάση (138). Κατόπιν παρουσιάστηκε ένας απλός φαινοτυπικός αλγόριθμος με 4 δίσκους μεροπενέμης (μεροπενέμη χωρίς αναστολέα, μεροπενέμη με EDTA, μεροπενέμη με PBA και μεροπενέμη με EDTA και PBA) που επιτρέπει διαφοροποίηση μεταξύ στελεχών Εντεροβακτηριακών που παράγουν MBL (ευαισθησία 100%), KPC (ευαισθησία 100%) ή και τα δύο είδη καρβαπενεμασών (ευαισθησία 94,6%), στο κλινικό εργαστήριο. Διαφορά στη ζώνη αναστολής της μεροπενέμης χωρίς αναστολέα και της μεροπενέμης με τον αντίστοιχο αναστολέα  $\geq 5$  mm ήταν ενδεικτική της παραγωγής της αντίστοιχης καρβαπενεμάσης (294). Επιπλέον, η μέθοδος αυτή είναι απλή στην εφαρμογή και την ερμηνεία της, μπορεί να εφαρμοστεί από την πρώτη μέρα της απομόνωσης του ύποπτου στελέχους και έχει χαμηλό κόστος (292).

Ως αναστολέας έχει προταθεί και το αμινοφαινυλβορονικό οξύ (APBA) σε δοκιμασίες συνδυασμού των δίσκων με καρβαπενέμες και βρέθηκε καλύτερη απόδοση της δοκιμασίας με την ερταπενέμη (295). Στη συνέχεια αξιολογήθηκε σε μικρό αριθμό στελεχών η χρήση τόσο δοκιμασιών συνδυασμού των δίσκων (CD, όριο διαφοράς στη ζώνη αναστολής  $\geq 4$  mm) όσο και δοκιμασιών συνέργειας (DDST) με δίσκους καρβαπενεμών και προσθήκη 300  $\mu$ g APBA, με καλύτερη απόδοση της μεθόδου για τους δίσκους ιμιπενέμης (ευαισθησία 100 και 96%, αντίστοιχα, ειδικότητα 100 και 92%). Στην ίδια μελέτη χρησιμοποιήθηκαν και ταινίες Etest με και χωρίς APBA και όριο τη διαφορά της τιμής MIC κατά  $\geq 3$  αραιώσεις (296). Το APBA έχει επίσης δοκιμαστεί και σε συγκέντρωση 600  $\mu$ g με υψηλή ευαισθησία και στην ίδια μελέτη περιγράφεται και η παρόμοια απόδοση εμπορικά διαθέσιμων ταμπλετών με μεροπενέμη και APBA (Rosco Diagnostica A/S, Taastrup, Denmark) (297).

Τα παράγωγα του βορονικού οξέος μπορεί να δώσουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα σε στελέχη που παράγουν AmpC, όταν χρησιμοποιούνται δίσκοι ερταπενέμης (292).



Μελέτη αξιολόγησης των παραγώνων του βορονικού οξέος (PBA 400 µg, APBA 600 µg και APBA 300 µg) σε μεγάλο αριθμό ΚΡC-θετικών και αρνητικών στελεχών Εντεροβακτηριακών έδειξε ευαισθησία 100%, 96,4% και 77,7% αντίστοιχα με χρήση δίσκων μεροπενέμης. Τα ποσοστά ευαισθησίας ήταν χαμηλότερα για το APBA με χρήση δίσκων ιμιπενέμης, υποδεικνύοντας ότι η μεροπενέμη αποτελεί καλύτερο υπόστρωμα για την ανίχνευση των ΚΡC ανεξάρτητα από το ποιο παράγωγο χρησιμοποιείται. Το PBA αποτελεί πιο αποτελεσματικό αναστολέα των ΚΡC ενζύμων και επίσης παράγει αποτελέσματα πιο εύκολα ερμηνεύσιμα (298).

Πρόσφατα περιγράφηκε και μέθοδος με χρήση τρυβλίων MHA (Mueller-Hinton agar) εμποτισμένα με τους αναστολείς. Η μέθοδος δοκιμάστηκε σε μικρό αριθμό στελεχών (299).

#### **4.7.3 Φασματοφωτομετρία**

Η φασματοφωτομετρία αποτελεί την πιο ακριβή μέθοδο για την ανίχνευση της δραστηκότητας καρβαπενεμάσης και θεωρείται μέθοδος αναφοράς. Βασίζεται στη μέτρηση της υδρόλυσης της ιμιπενέμης σε μήκος κύματος 297 nm. Χρησιμοποιείται εκχύλισμα που λαμβάνεται μετά 18ωρη καλλιέργεια σε ζωμό. Μπορεί να διακρίνει αξιόπιστα τα στελέχη που παράγουν καρβαπενεμάση από αυτά που εμφανίζουν αντοχή στις καρβαπενέμες εξαιτίας άλλων μηχανισμών, αλλά δεν δίνει πληροφορίες σχετικά με το είδος της καρβαπενεμάσης. Η μέθοδος είναι χαμηλότερου κόστους σε σύγκριση με τις μοριακές μεθόδους, όμως εξαιτίας της δυσκολίας στην εφαρμογή της η χρήση της περιορίζεται σε εργαστήρια αναφοράς (20).

#### **4.7.4 Φασματομετρία μάζας**

Η μέθοδος MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry) χρησιμοποιείται σε αρκετά εργαστήρια ως μέθοδος ταυτοποίησης βακτηρίων και μυκήτων. Το 2011 περιγράφηκε η χρήση της για την ανίχνευση δραστηκότητας καρβαπενεμάσης που βασίζεται στην ανάλυση των προϊόντων αποδόμησης ενός μορίου μεροπενέμης. Η μέθοδος διαθέτει το πλεονέκτημα της ταχύτητας στη λήψη του αποτελέσματος, όμως απαιτεί την ύπαρξη του ειδικού εξοπλισμού και δεν διακρίνει τον τύπο της καρβαπενεμάσης. Η εμπειρία με αυτή τη μέθοδο είναι προς το παρόν περιορισμένη (300).

#### 4.7.5 Άλλες μη μοριακές μέθοδοι

Πρόσφατα περιγράφηκε μια ταχεία βιοχημική δοκιμασία (2 ώρες) για την ανίχνευση της παραγωγής καρβαπενεμάσης σε στελέχη Εντεροβακτηριακών χρησιμοποιώντας αποικίες του υπό εξέταση στελέχους (Carba NP test). Βασίζεται στην ανίχνευση της αλλαγής του pH (γίνεται όξινο) που προκύπτει από την *in vitro* υδρόλυση της ιμιπενέμης και κατά συνέπεια στην αλλαγή του χρώματος (301). Η μέθοδος εξελίχθηκε (Carba NP test version II) με την προσθήκη αναστολέων καρβαπενεμασών (EDTA και ταζομπακτάμη) για την επιπλέον ταυτοποίηση του τύπου της καρβαπενεμάσης (Τάξη A, B, D) σε στελέχη τόσο Εντεροβακτηριακών, όσο και *P. aeruginosa*. Είναι χαμηλού κόστους, απλή στην εφαρμογή της και επέδειξε 100% ευαισθησία και ειδικότητα. Η ταχύτητα στη λήψη του αποτελέσματος προσδίδει σημαντικό πλεονέκτημα, όμως προκύπτουν δυσκολίες σε στελέχη που παράγουν περισσότερες από ένα τύπο καρβαπενεμάσης (302).

#### 4.7.6 Μοριακές μέθοδοι

Οι μοριακές μέθοδοι αποτελούν τη μέθοδο αναφοράς για την ακριβή ανίχνευση και ταυτοποίηση των γονιδίων των καρβαπενεμασών.

Οι περισσότερες βασίζονται στην PCR και συνήθως ακολουθεί προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας για ερευνητικούς και επιδημιολογικούς σκοπούς. Διάφορα *in-house* πρωτόκολλα έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία με χρήση ποικίλων εκκινητών. Επίσης έχουν περιγραφεί και *in-house* πρωτόκολλα πολυπλεκτικής PCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση διαφορετικών γονιδίων καρβαπενεμασών στην ίδια αντίδραση (303). Μια εμπορικά διαθέσιμη μέθοδος πολυπλεκτικής PCR αναφέρεται πρόσφατα. Αν και οι κατασκευαστές ισχυρίζονται ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας στο κλινικό δείγμα, η μέθοδος έχει προς το παρόν αξιολογηθεί μόνο σε βακτηριακές αποικίες με ευαισθησία 96,7% (304).

Επιπλέον έχουν αναπτυχθεί αρκετές τεχνικές *real-time* PCR για την ανίχνευση είτε μόνο του *bla<sub>KPC</sub>* γονιδίου είτε περισσότερων γονιδίων καρβαπενεμασών και σε κάποιες μεθόδους υπάρχει δυνατότητα διαφοροποίησης των παραλλαγών της KPC καρβαπενεμάσης καθώς και ταυτόχρονης ανίχνευσης των *bla<sub>KPC</sub>* γονιδίων και ταυτοποίησης του κλώνου ST258 (305, 306, 307, 308, 309). Έχει επίσης περιγραφεί μέθοδος *real-time* PCR για την ανίχνευση του *bla<sub>KPC</sub>* γονιδίου απευθείας από φιάλες αιμοκαλλιιεργειών (310).

Η ταχύτητα στη λήψη του αποτελέσματος (4-6 ώρες ή και < 2 ώρες για τις real-time PCR) καθώς και η άριστη ευαισθησία και ειδικότητα αποτελούν σημαντικά πλεονεκτήματα. Τα κύρια μειονεκτήματα είναι το υψηλό κόστος, η ανάγκη ύπαρξης ειδικού εξοπλισμού και εκπαιδευμένου προσωπικού. Αν και αυτές οι μέθοδοι είναι δύσκολα εφαρμόσιμες στα εργαστήρια ρουτίνας, αρκετά κλινικά εργαστήρια έχουν ενσωματώσει την PCR στη διαγνωστική τους προσέγγιση.

Στις μοριακές μεθόδους έχει πρόσφατα προστεθεί και η τεχνολογία των μικροσυτοιχιών (microarrays), η οποία παρουσιάζει σημαντική εξέλιξη τα τελευταία χρόνια εμφανίζοντας δυνατότητα ανίχνευσης μιας ευρείας ποικιλίας β-λακταμασών αλλά και πολλών άλλων γονιδίων αντοχής (Check-Points assays, Check-Points Health, Wageningen, The Netherlands και Identibac AMR-ve assays, Alere GmbH, Cologne, Germany). Δυνατότητα ανίχνευσης της KPC, καθώς και άλλων καρβαπενεμασών αλλά και πολλαπλών ESBL, παρουσιάζουν οι μέθοδοι Check-Points με πιο πρόσφατη την Check-MDR CT102 assay (που αντικατέστησε την Check-Carba ESBL assay) με ευαισθησία 84,6%-100% και ειδικότητα 100% για τα *bla*<sub>KPC</sub> γονίδια. Οι τεχνικές αυτές χρησιμοποιούν βακτηριακό DNA και έτσι εξακολουθούν να στηρίζονται στις καλλιεργητικές μεθόδους. Παρόλα αυτά η προσέγγιση αυτή διαθέτει σημαντική δυνατότητα για περαιτέρω εξέλιξη ως ταχεία διαγνωστική δοκιμασία που μπορεί να εφαρμοστεί απευθείας στο κλινικό δείγμα. Προσπάθειες για ανάπτυξη τέτοιων μικροσυστημάτων «sample-in-answer-out» είναι σε εξέλιξη στο πλαίσιο Ευρωπαϊκών προγραμμάτων (311).

## **5. Λοιμώξεις από στελέχη *Klebsiella pneumoniae* που παράγουν KPC καρβαπενεμάση**

Το φάσμα των λοιμώξεων από τα στελέχη που παράγουν KPC καρβαπενεμάσες είναι ευρύ και περιλαμβάνει βακτηριαιμίες είτε πρωτοπαθείς είτε σχετιζόμενες με κεντρικούς φλεβικούς καθετήρες, λοιμώξεις κατώτερου αναπνευστικού (συμπεριλαμβανομένης και της πνευμονίας του αναπνευστήρα), λοιμώξεις τραυμάτων και χειρουργικού πεδίου και λοιμώξεις ουροποιητικού. Ποικίλες άλλες λοιμώξεις έχουν αναφερθεί σε μικρότερη συχνότητα: ενδοκοιλιακές λοιμώξεις, ενδοκαρδίτιδα, κ.α.

## 5.1 Παράγοντες κινδύνου

Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που φέρουν στελέχη που παράγουν KPC καρβαπενεμάσες έχουν περιγραφεί σε μελέτες που αναφέρουν επιδημίες, χωρίς όμως να υπάρχει η δυνατότητα ανάδειξης συγκεκριμένων παραγόντων κινδύνου σε σχέση με ομάδες ελέγχου.

Σε μελέτες ασθενών-μαρτύρων έχουν διερευνηθεί οι παράγοντες κινδύνου για απομόνωση ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *K. pneumoniae*, χρησιμοποιώντας ως ομάδα ελέγχου ασθενείς με απομόνωση ευαίσθητων στις καρβαπενέμες αντίστοιχων στελεχών. Ο υποκείμενος μηχανισμός αντοχής δεν διευκρινίζεται πάντα.

Μεταξύ των παραγόντων κινδύνου περιλαμβάνονται η προχωρημένη ηλικία, η βαρύτητα της υποκείμενης νόσου, τα υψηλά APACHE-II scores, ο μηχανικός αερισμός και ποικίλες παρεμβατικές πράξεις, η ανοσοκαταστολή και ο παρατεταμένος χρόνος νοσηλείας. Η προηγηθείσα χορήγηση αντιμικροβιακών αναφέρεται συνήθως ως ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου. Διάφορες ομάδες αντιμικροβιακών έχουν ενοχοποιηθεί με συχνότερα τις καρβαπενέμες και τις κινολόνες. Φαίνεται ότι μεγαλύτερη σημασία έχει ο αριθμός των διαφορετικών ομάδων παρά κάποια συγκεκριμένη ομάδα. Τα αποτελέσματα ποικίλουν μεταξύ των μελετών και εξαρτώνται από τον πληθυσμό της μελέτης και από τη χρήση ομάδας ελέγχου.

Σε μελέτες από τις ΗΠΑ, βρέθηκε ότι η βαρύτητα της υποκείμενης νόσου, η προηγηθείσα χορήγηση κινολονών και ευρέως φάσματος κεφαλοσπορινών σχετίζονταν ανεξάρτητα με την απομόνωση στελέχους *K. pneumoniae* που παρήγαγε KPC καρβαπενεμάση (312), ενώ οι Patel και συν αναφέρουν ως ανεξάρτητους παράγοντες κινδύνου την πρόσφατη μεταμόσχευση, το μηχανικό αερισμό, τον μεγαλύτερο χρόνο νοσηλείας και τη λήψη καρβαπενεμών και κεφαλοσπορινών (313). Η προηγηθείσα χορήγηση κινολονών, καρβαπενεμών, τουλάχιστον μιας ομάδας αντιμικροβιακών και η νοσηλεία σε ΜΕΘ, αναδείχτηκαν ως προγνωστικοί παράγοντες, σε μελέτη από το Ισραήλ (314). Επίσης από το Ισραήλ οι Schwaber και συν σε μοντέλο προσαρμοσμένο στο χρόνο νοσηλείας ανέδειξαν ως ανεξάρτητους παράγοντες κινδύνου την προηγηθείσα χορήγηση αντιβιοτικών, τη χορήγηση κινολονών και τη βαριά γενική κατάσταση του ασθενούς (315). Κατά τη διάρκεια επιδημίας σε νοσοκομείο του Puerto Rico, βρέθηκε ότι ανεξάρτητοι παράγοντες κινδύνου ήταν η μετακίνηση μεταξύ των τμημάτων, η προηγηθείσα χειρουργική επέμβαση και τα τραύματα (126). Σε όλες αυτές τις μελέτες η απομόνωση

του KPC-θετικού στελέχους αφορούσε οποιοδήποτε κλινικό δείγμα και την ομάδα ελέγχου αποτελούσαν ασθενείς με απομόνωση ευαίσθητου στις καρβαπενέμες στελέχους.

Η μεγαλύτερη διάρκεια του χρόνου νοσηλείας βρέθηκε να αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για βακτηριαμία από στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν KPC καρβαπενεμάση αν και ο μικρός αριθμός ασθενών πιθανά δεν επέτρεψε την ανάδειξη άλλων στατιστικά σημαντικών σχέσεων (316).

## 5.2 Θνητότητα

Οι λοιμώξεις από βακτήρια που παράγουν KPC καρβαπενεμάσες εμφανίζουν υψηλή θνητότητα. Ποσοστά που κυμαίνονται από 22-57 % έχουν αναφερθεί (125, 189, 270, 272, 279, 313, 316, 317). Η θνητότητα της λοίμωξης εξαρτάται από το είδος της λοίμωξης και τον πληθυσμό αναφοράς. Η θνητότητα της λοίμωξης φτάνει το 71% σε πρόσφατα μεταμοσχευθέντες (318). Περισσότερο συγκρίσιμα αποτελέσματα λαμβάνονται μελετώντας τη θνητότητα των βακτηριαμιών, αν και το τελικό σημείο της κάθε μελέτης είναι διαφορετικό (θνητότητα 14 ή 30 ημερών, ολική θνητότητα, θνητότητα λοίμωξης). Η αναφερθείσα θνητότητα 30 ημερών κυμαίνεται από 39-50%, ενώ η ολική θνητότητα των ασθενών κυμαίνεται από 32-79% (316, 319, 320, 321, 322).

Η ολική θνητότητα των ασθενών σε αναφορές όπου μελετώνται διάφορα είδη λοιμώξεων είναι επίσης υψηλή, φτάνοντας το 58,8% για ασθενείς ΜΕΘ, αντανakλώντας επιπλέον τη βαριά γενική κατάσταση των ασθενών και την ύπαρξη πολλαπλών υποκείμενων νοσημάτων (172, 271, 272, 312, 313, 315).

Σε διάφορες μελέτες έχει διερευνηθεί η επίδραση της απομόνωσης στελέχους που παράγει KPC καρβαπενεμάση στη θνητότητα. Χρησιμοποιώντας ως ομάδα ελέγχου ασθενείς με απομόνωση ευαίσθητου στις καρβαπενέμες στελέχους και εφαρμόζοντας πολυπαραγοντικά μοντέλα για την εξουδετέρωση συγχυτικών παραγόντων, αρκετές αναφορές επιβεβαιώνουν ότι η απομόνωση KPC-θετικού στελέχους σχετίζεται ανεξάρτητα με τη θνητότητα (172, 312, 315). Σε μελέτη που συγκρίθηκαν βακτηριαμίες από στελέχη *K. pneumoniae* που παρήγαγαν KPC καρβαπενεμάση, VIM καρβαπενεμάση και ευαίσθητα στις καρβαπενέμες, βρέθηκε ότι η παραγωγή KPC καρβαπενεμάσης αποτελούσε ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την ολική θνητότητα, αλλά όχι για τη θνητότητα λοίμωξης (316).

Επίσης έχουν διερευνηθεί οι παράγοντες που σχετίζονται με την έκβαση κυρίως σε ασθενείς με βακτηριαμίες. Η λήψη κατάλληλης αντιμικροβιακής αγωγής και ειδικότερα η χορήγηση συνδυασμών δραστικών αντιμικροβιακών βρέθηκε ότι αποτελεί σημαντικό προγνωστικό παράγοντα για την επιβίωση (317, 319, 320). Η εφαρμογή επιπρόσθετων θεραπευτικών παρεμβάσεων που στοχεύουν στην εξάλειψη της εστίας της λοίμωξης αναφέρεται από τους Patel G και συν ως ο μοναδικός ανεξάρτητος παράγοντας που σχετίζεται με την επιβίωση (313). Παράγοντες που έχουν αναφερθεί ότι παρουσιάζουν ανεξάρτητη συσχέτιση με τη θνητότητα είναι η παρουσία σηπτικής καταπληξίας, η ακατάλληλη εμπειρική ή οριστική αγωγή, τα υψηλά APACHE scores ή Pitt-bacteremia score (317, 319, 322) η νοσηλεία σε ΜΕΘ, η συνύπαρξη αποικισμού με *Acinetobacter baumannii* ή *Pseudomonas aeruginosa* (313, 323) και επίσης η αντοχή στην κολιστίνη (242).

Εκτός από την αυξημένη θνητότητα, έχει επίσης αναφερθεί και υψηλό ποσοστό επανεισαγωγής μέσα στο επόμενο τρίμηνο (322).

### **5.3 Θεραπεία**

#### **5.3.1 *In vitro* ευαισθησία**

Η *in vitro* ευαισθησία του απομονωθέντος στελέχους αποτελεί αποφασιστικό παράγοντα για την επιλογή της κατάλληλης αντιμικροβιακής αγωγής. Τα βακτήρια που παράγουν KPC καρβαπενεμάση, εκτός από το *bla*<sub>KPC</sub> γονίδιο, φέρουν και άλλες β-λακταμάσες, καθώς και άλλα γονίδια αντοχής, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν πολυανθεκτικό φαινότυπο. Όπως προκύπτει από πολυάριθμες μελέτες από διάφορες χώρες η κολιστίνη, η τιγκεκυκλίνη, η γενταμικίνη και η φωσφομυκίνη (που όμως δεν ελέγχεται ευρέως) συνήθως διατηρούν *in vitro* δραστικότητα έναντι των στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν KPC καρβαπενεμάσες. Ωστόσο, αυξάνεται ο αριθμός των αναφορών για ανάδυση και διασπορά ανθεκτικών στελεχών κυρίως στην κολιστίνη με περιγραφές και νοσοκομειακών επιδημιών από διάφορες περιοχές μεταξύ των οποίων και η χώρα μας (239, 240, 242, 247, 279, 280, 322, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332).

Μεγάλη σημασία έχει ο ακριβής και αξιόπιστος έλεγχος της ευαισθησίας και ιδιαίτερα για την κολιστίνη και την τιγκεκυκλίνη, που παραμένουν μεταξύ των ελάχιστων θεραπευτικών επιλογών. Έχει αναφερθεί ασυμφωνία των αποτελεσμάτων του ελέγχου ευαισθησίας για την τιγκεκυκλίνη, όταν χρησιμοποιούνται διαφορετικές μεθοδολογίες

(333). Επιπρόσθετα, δεν υπάρχει εναρμονισμός των ορίων ευαισθησίας μεταξύ CLSI και EUCAST και έτσι ο χαρακτηρισμός ευαισθησίας ποικίλει ανάλογα με τα όρια που εφαρμόζονται. Υψηλά ποσοστά μειωμένης ευαισθησίας αναφέρονται όταν εφαρμόζονται τα όρια ευαισθησίας του EUCAST (272), γεγονός που πιθανά προκύπτει από το μεγάλο αριθμό στελεχών που εμφανίζουν τιμές MIC 1-2 µg/ml.

Οι τιμές MIC στις καρβαπενέμες, όπως αναφέρθηκε, ποικίλουν και εξαρτώνται σημαντικά από τη μεθοδολογία ελέγχου της ευαισθησίας, ενώ ο χαρακτηρισμός ευαισθησίας των στελεχών εξαρτάται επίσης από τα όρια ευαισθησίας που χρησιμοποιούνται. Σημαντικός είναι ο προβληματισμός σχετικά με το αν και σε ποιες περιπτώσεις μπορούν οι καρβαπενέμες να χρησιμοποιηθούν θεραπευτικά και αντικρουόμενες απόψεις έχουν διατυπωθεί (334).

### **5.3.2 *In vitro* μελέτες συνέργειας και φαρμακοδυναμικές μελέτες**

Δεδομένου ότι οι θεραπευτικές επιλογές για αυτές τις λοιμώξεις είναι περιορισμένες, σε αρκετές *in vitro* μελέτες έχει μελετηθεί η συνεργική δράση διαφόρων συνδυασμών αντιμικροβιακών έναντι των στελεχών που παράγουν KPC καρβαπενεμάσες. Συνεργικό αποτέλεσμα έχει αναφερθεί για τους συνδυασμούς πολυμυξίνης Β με ριφαμπικίνη, πολυμυξίνης Β με ριφαμπικίνη και δοριπενέμη, πολυμυξίνης Β με δοξυκυκλίνη, κολιστίνης με τιγκεκυκλίνη και φωσφομυκίνης με καρβαπενέμες. Συνδυασμοί φωσφομυκίνης με γενταμικίνη, μεροπενέμη και κολιστίνη έχει βρεθεί ότι παρεμποδίζουν την ανάπτυξη αντοχής στη φωσφομυκίνη (178).

*In vitro* φαρμακοδυναμικές μελέτες υποδεικνύουν ότι οι καρβαπενέμες σε βελτιστοποιημένα δοσολογικά σχήματα, είτε μόνες είτε σε συνδυασμό με τιγκεκυκλίνη, μπορεί να οδηγήσουν σε σημαντική, αν και παροδική, ελάττωση της βακτηριακής συγκέντρωσης. Η αποτελεσματικότητα των καρβαπενεμών έχει μελετηθεί και σε μοντέλα πειραματικών λοιμώξεων (151).

### **5.3.3 Κλινική εμπειρία**

Η ανασκόπηση των μελετών που παρέχουν δεδομένα για την κλινική αποτελεσματικότητα των διαφόρων σχημάτων αντιμικροβιακών προσφέρει χρήσιμες πληροφορίες για την καλύτερη θεραπευτική προσέγγιση των λοιμώξεων από βακτήρια που παράγουν KPC καρβαπενεμάση. Παρότι τα δεδομένα αυτά προέρχονται από περιγραφές περι-

πτώσεων, αναδρομικές μελέτες και μελέτες παρατήρησης και όχι από προοπτικές συγκριτικές μελέτες με ομάδα ελέγχου, παραθέτουν την υπάρχουσα κλινική εμπειρία στην αντιμετώπιση αυτών των λοιμώξεων.

Πραγματοποιώντας ανασκόπηση της βιβλιογραφίας βρέθηκαν 27 μελέτες στις οποίες περιγράφεται η αντιμικροβιακή αγωγή και η έκβαση της λοίμωξης (Πίνακας 3) (188, 203, 212, 216, 242, 244, 270, 272, 316, 317, 319, 320, 325, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348).

Τα δεδομένα αφορούν σε 363 ασθενείς με σοβαρές λοιμώξεις και συχνότερη αυτών τη βακτηριαμία. Από αυτούς 155 ασθενείς έλαβαν ένα δραστικό αντιβιοτικό, ενώ σε 168 ασθενείς χορηγήθηκε συνδυαστική αγωγή, με σημαντικά καλύτερα αποτελέσματα (δυσμενής έκβαση 25,6%). Συνολικά 40 ασθενείς δεν έλαβαν δραστική αγωγή και η κλινική αποτυχία για αυτή την ομάδα ήταν 70%. Υψηλό όμως ποσοστό κλινικής αποτυχίας παρατηρείται και μεταξύ των ασθενών που έλαβαν δραστική μονοθεραπεία (43,9%).

Στην ομάδα των ασθενών που έλαβαν μονοθεραπεία, το υψηλότερο ποσοστό δυσμενούς έκβασης σημειώνεται για τους ασθενείς που έλαβαν κολιστίνη ή πολυμυξίνη Β (52,7%). Η πτωχή αποτελεσματικότητα των πολυμυξινών, μπορεί να σχετίζεται με υποθεραπευτικά δοσολογικά σχήματα και με τη καθυστέρηση της επίτευξης αποτελεσματικής συγκέντρωσης του αντιβιοτικού (151, 178). Οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες των πολυμυξινών δεν έχουν καθοριστεί με ακρίβεια. Η πολύπλοκη φαρμακοκινητική τους δυσχεραίνει τον καθορισμό του βέλτιστου δοσολογικού σχήματος στους βαρέως πάσχοντες ασθενείς λόγω καταστάσεων που οδηγούν σε μεταβολές στην κατανομή τους (349). Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται στους ασθενείς που υποβάλλονται σε συνεχή φλεβοφλεβική διήθηση, καθώς το φάρμακο αποβάλλεται και πρέπει να χορηγούνται επαρκείς δόσεις. Η χορήγηση δόσης εφόδου και η συνέχιση της θεραπείας με επαρκή συνολική ημερήσια δόση είναι απαραίτητες για την κλινική επιτυχία. Η συλλογή περισσότερων δεδομένων, με έμφαση στην αποσαφήνιση των PK/PD ιδιοτήτων, είναι αναγκαία για την καλύτερη κλινική αξιοποίηση των πολυμυξινών (151).

Μειωμένη κλινική αποτελεσματικότητα παρατηρείται και στην ομάδα της μονοθεραπείας με τιγκεκυκλίνη (50%). Αυτό μπορεί να αποδοθεί εν μέρει στο φαρμακοδυναμικό/φαρμακοκινητικό προφίλ του φαρμάκου. Εμφανίζει κυρίως βακτηριοστατική δράση έναντι των Gram-αρνητικών βακτηρίων και οι συγκεντρώσεις που επιτυγχάνονται σε διάφορες ανατομικές θέσεις είναι χαμηλές. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις στον ορό με το



καθιερωμένο δοσολογικό σχήμα κυμαίνονται μεταξύ 0,6-0,9 μg/ml, ενώ οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις στα ούρα και στους πνεύμονες είναι χαμηλότερες (178). Ο FDA, εξέδωσε πρόσφατα προειδοποίηση για τη χρήση της τιγκεκυκλίνης στη θεραπεία σοβαρών λοιμώξεων. Αναλύοντας δεδομένα από 13 κλινικές μελέτες βρέθηκε αυξημένος κίνδυνος θνητότητας, ιδιαίτερα σε λοιμώξεις σχετιζόμενες με τον αναπνευστήρα και σε βακτηριαμίες. Η αντιμικροβιακή της δράση στην πρωτοπαθή εστία της λοίμωξης, μπορεί να αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την αποτελεσματικότητα της σε περιπτώσεις δευτεροπαθούς βακτηριαμίας. Η αποτελεσματικότητα της στην πρωτοπαθή βακτηριαμία δεν έχει τεκμηριωθεί και προτείνεται η χρήση εναλλακτικών αντιβιοτικών, ειδικά όταν απαιτείται βακτηριοκτόνος δράση, όπως για παράδειγμα σε ουδετεροπενία ή στην ενδοκαρδίτιδα (349). Τα δεδομένα αυτά σε συνδυασμό με τις συνήθεις τιμές MIC των κλινικών στελεχών, υποδεικνύουν ότι η τιγκεκυκλίνη θα πρέπει να χορηγείται με προσοχή και πιθανά στα πλαίσια συνδυαστικής αγωγής σε λοιμώξεις στα παραπάνω προβληματικά διαμερίσματα.

Η μονοθεραπεία με δραστική αμινογλυκοσίδη εμφανίζει το μικρότερο ποσοστό δυσμενούς έκβασης (18,8%), όμως τα διαφορετικά είδη λοιμώξεων και ο μικρός αριθμός ασθενών είναι περιοριστικά για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Επίσης δεν υπάρχουν επαρκή κλινικά δεδομένα για την κλινική αποτελεσματικότητα των καρβαπενεμών ως μονοθεραπεία. Η ανεύρεση ετεροαναθεκτικών στις καρβαπενέμες υποπληθυσμών, που μάλιστα δεν ανιχνεύονται με συνήθεις μεθόδους ελέγχου της ευαισθησίας, θέτει υπό αμφισβήτηση τη χρήση τους ως μονοθεραπεία (350). Οι όψιμες υποτροπές που έχουν παρατηρηθεί ίσως σχετίζονται με αυτό το φαινόμενο (349). Φαίνεται ότι το ποσοστό επιτυχίας εξαρτάται από την τιμή MIC του στελέχους. Η χορήγηση καρβαπενέμης σε παρατεταμένη έγχυση και σε δόση 2 gr κάθε 8 ώρες επιτυγχάνει βακτηριοκτόνο δράση για στελέχη με  $MIC \leq 4 \mu g/ml$ . Τα περισσότερα δεδομένα υποδεικνύουν ότι υπό τις παραπάνω προϋποθέσεις (δοσολογικό σχήμα και τιμή MIC) η χορήγηση καρβαπενέμης στα πλαίσια συνδυαστικής αγωγής αποτελεί λογική θεραπευτική επιλογή (334).

Η θέση της φωσφομυκίνης στη θεραπεία σοβαρών λοιμώξεων δεν έχει αποσαφηνιστεί, δεδομένης της περιορισμένης κλινικής εμπειρίας. Η φωσφομυκίνη αποτελεί φυσικό αντιμικροβιακό παράγοντα με σχεδόν μισό αιώνα ζωής. Ο στόχος δράσης της είναι το κυτταρικό τοίχωμα, όπου αναστέλλει το πρώτο ενζυμικό βήμα στη βιοσύνθεση της πε-

πτιδογλυκάνης. Παρουσιάζει ευρύ φάσμα δράσης έναντι Gram-θετικών κόκκων και Gram-αρνητικών βακτηριδίων. Έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως στη θεραπεία μη επιπλεγμένων λοιμώξεων του ουροποιητικού. Τα τελευταία χρόνια η φωσφομυκίνη επανήλθε στο προσκήνιο για τη θεραπεία τόσο λοιμώξεων του ουροποιητικού όσο και συστηματικών λοιμώξεων προκαλούμενων από πολυανθεκτικά παθογόνα (351). Ο δραματικός περιορισμός των θεραπευτικών επιλογών σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η φωσφομυκίνη συχνά διατηρεί *in vitro* δραστικότητα έναντι των στελεχών που παράγουν KPC καρβαπενεμάση κατέστησε τη φωσφομυκίνη μια δυνητική θεραπευτική επιλογή στα πλαίσια συνδυαστικής θεραπείας (352). Τα κλινικά δεδομένα που αφορούν στη χρήση φωσφομυκίνης σε σοβαρές λοιμώξεις είναι προς το παρόν περιορισμένα. Η δυνητική ανάπτυξη αντοχής κατά τη διάρκεια της θεραπείας και η επιλογή ανθεκτικών μεταλλακτών θέτει ένα σημαντικό προβληματισμό (353). Πρόσφατα αναφέρονται 3 τέτοιες περιπτώσεις σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς με βακτηριαιμία από στελέχη που παράγουν KPC καρβαπενεμάση, όπου σημειώθηκε κλινική και μικροβιολογική υποτροπή (354).

Τα υπάρχοντα κλινικά δεδομένα υποστηρίζουν την σαφή υπεροχή των συνδυαστικών σχημάτων. Κάποιοι συνδυασμοί φαίνεται να πλεονεκτούν έναντι άλλων, όμως ο μικρός αριθμός ασθενών στις διάφορες ομάδες δεν επιτρέπει την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Η χρήση συνδυαστικής αγωγής έχει αναδειχτεί ως στατιστικά σημαντικός παράγοντας που σχετίζεται με την επιβίωση σε ασθενείς με βακτηριαιμία (317, 319, 320). Περισσότερα κλινικά δεδομένα είναι απαραίτητα για τον καθορισμό της βέλτιστης θεραπείας σε λοιμώξεις από βακτήρια που παράγουν KPC καρβαπενεμάση.

**Πίνακας 3. Αντιμικροβιακή αγωγή και έκβαση της λοίμωξης**

Αντιμικροβιακή αγωγή	n	Κλινική αποτυχία	(%)
<b>Συνδυασμοί αντιμικροβιακών</b>	168	43	25,6
Τιγκεκυκλίνη με			
Κολιστίνη/πολυμυξίνη Β	59	14	23,7
αμινογλυκοσίδη	20	6	30,0
κολιστίνη + καρβαπενέμη	18	2	11,1
καρβαπενέμη	5	1	20,0
φωσφομυκίνη	6	2	33,3
αμινογλυκοσίδη + καρβαπενέμη	6	1	16,7
κολιστίνη + αμινογλυκοσίδη	2	0	0
Κολιστίνη/πολυμυξίνη Β με			
αμινογλυκοσίδη	31	14	45,2
καρβαπενέμη	6	1	16,7
φωσφομυκίνη	5	0	0
καρβαπενέμη + αμινογλυκοσίδη	3	0	0
Άλλοι συνδυασμοί	7	2	28,6
<b>Μονοθεραπεία</b>	155	68	43,9
Κολιστίνη/πολυμυξίνη Β	74	39	52,7
τιγκεκυκλίνη	36	18	50,0
αμινογλυκοσίδη	32	6	18,8
καρβαπενέμη	13	5	38,5
<b>Μη δραστική αγωγή</b>	40	28	70,0

#### 6. Έλεγχος αποικισμού από στελέχη *Klebsiella pneumoniae* που παράγουν ΚΡC καρβαπενεμάση

Το κλειδί για την πρόληψη της διασποράς των στελεχών που παράγουν ΚΡC καρβαπενεμάση είναι η ακριβής και έγκαιρη ανίχνευση των αποικισμένων ασθενών. Αυτοί οι ασθενείς αντιπροσωπεύουν τη μεγάλη δεξαμενή της σιωπηλής διασποράς (151, 300, 355). Επιπλέον, εκτός από τη διασπορά του συγκεκριμένου στελέχους, υπάρχει κίνδυνος μεταβίβασης του *bla*<sub>ΚΡC</sub> γονιδίου σε άλλα βακτήρια της εντερικής χλωρίδας του ίδιου ή διαφορετικών ειδών που με τη σειρά τους μπορεί να αποτελέσουν αίτια νέων επιδημιών.

Όπως φαίνεται από αρκετές μελέτες, οι καλλιέργειες των κλινικών δειγμάτων αναγνωρίζουν μόνο ένα ποσοστό των ασθενών που φέρουν ανθεκτικά στις καρβαπενέμες βακτήρια. Επιπρόσθετα, η αναγνώριση γίνεται αφού έχει προηγηθεί πιθανή διασπορά. Σε μελέτη από τις ΗΠΑ, όπου ελέγχθηκε μεγάλος αριθμός ασθενών ΜΕΘ βρέθηκε ότι η πρώτη απομόνωση έγινε στις καλλιέργειες επιτήρησης για το 37% των ασθενών που έφεραν ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *K. pneumoniae* και από αυτούς οι μισοί ήταν αποικισμένοι κατά την εισαγωγή. Ο διάμεσος χρόνος νοσηλείας μέχρι τον αποικισμό ήταν 18 ημέρες. Από τους αποικισμένους ασθενείς το 1/3 εμφάνισε τουλάχιστον ένα επεισόδιο βακτηριαιμίας κατά τη διάρκεια της νοσηλείας τους (356). Ομοίως, σε μελέτη επιπολασμού από νοσοκομείο του Ισραήλ βρέθηκε ότι το ποσοστό φορέας ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *K. pneumoniae* ήταν 5,4% και περίπου το 1/3 αυτών εμφάνισαν θετικές καλλιέργειες κλινικών δειγμάτων (357). Σε μελέτη από τη χώρα μας βρέθηκε ότι κατά την εισαγωγή στη ΜΕΘ το 12,8% των ασθενών ήταν αποικισμένοι με στελέχη *K. pneumoniae* που παράγαν ΚΡΚ καρβαπενεμάση (358).

Οι παράγοντες κινδύνου για την επακόλουθη ανάπτυξη κλινικής λοίμωξης δεν έχουν διερευνηθεί επαρκώς. Δύο τέτοιες μελέτες από το Ισραήλ παρουσιάστηκαν πρόσφατα στη βιβλιογραφία. Και στις δύο μελέτες το ποσοστό των ασθενών που ανέπτυξαν κλινική λοίμωξη ήταν μικρότερο από τα προαναφερθέντα (9%). Οι Borer και συν ως παράγοντες κινδύνου ανέδειξαν τις προηγηθείσες παρεμβατικές πράξεις, τον σακχαρώδη διαβήτη, τους όγκους συμπαγών οργάνων, την τραχειοστομία, την παρουσία ουροκαθητήρα και τη χορήγηση αντιψευδομοναδικών πενικιλινών (359). Οι Schechner και συν μετά από πολυπαραγοντική ανάλυση βρήκαν ότι ανεξάρτητοι παράγοντες κινδύνου ήταν η νοσηλεία σε ΜΕΘ, η παρουσία ΚΦΓ, η προηγηθείσα χορήγηση αντιμικροβιακών και ειδικά κινολονών και ο σακχαρώδης διαβήτης (360). Η αναγνώριση των παραγόντων κινδύνου για επακόλουθη κλινική λοίμωξη μπορεί να προάγει την παρέμβαση σε όσους παράγοντες είναι τροποποιήσιμοι. Τέτοιοι παράγοντες είναι η χορήγηση συγκεκριμένων αντιμικροβιακών και οι παρεμβατικές πράξεις οι οποίες μπορούν να περιοριστούν σε όσες είναι εντελώς απαραίτητες.

Όπως περιγράφεται σε πολλές μελέτες, οι καλλιέργειες ενεργητικής επιτήρησης της φορέας έχουν χρησιμοποιηθεί στα πλαίσια στρατηγικών για το περιορισμό της διασποράς των στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν ΚΡΚ καρβαπενεμάση.

Αν και η μεμονωμένη επίδραση τους είναι δύσκολο να εκτιμηθεί δεδομένου ότι αποτελούν μέρος μιας δέσμης μέτρων, η σημαντικότητα τους είναι αναμφισβήτητη για την επιτυχία των προγραμμάτων παρέμβασης (151, 355). Στο Ισραήλ, οι καλλιέργειες επιτήρησης εφαρμόστηκαν σαν αναπόσπαστο μέρος του εθνικού σχεδίου για τον έλεγχο των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες βακτηρίων. Έχουν ενσωματωθεί σε πολλές κατευθυντήριες οδηγίες, όπως στις οδηγίες του CDC (361), αλλά και στις αντίστοιχες Ευρωπαϊκές.

Πέρα από το όφελος που προκύπτει από επιδημιολογική άποψη, παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για την επιλογή της κατάλληλης εμπειρικής αγωγής σε περίπτωση κλινικής λοίμωξης (151, 355).

Οδηγίες για το ποιού ασθενείς θα πρέπει να ελέγχονται έχουν συσταθεί σε διάφορες χώρες. Οι οδηγίες αυτές διαφέρουν από χώρα σε χώρα και διαφέρει επίσης και ο βαθμός κατά τον οποίο ο έλεγχος είναι υποχρεωτικός (20).

Οι οδηγίες για τον έλεγχο εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τα δεδομένα για το εύρος διασποράς σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές.

Ο έλεγχος αποικισμού θα πρέπει να γίνεται κατά την εισαγωγή στο νοσοκομείο ή σε συγκεκριμένο τμήμα και θα πρέπει να αφορά τουλάχιστον τους ασθενείς υψηλού κινδύνου. Σε αυτή την ομάδα περιλαμβάνονται οι ασθενείς ΜΕΘ, ασθενείς με προηγηθείσες νοσηλίες, ανοσοκατασταλμένοι, ασθενείς που διακομίζονται από άλλα νοσηλευτικά ιδρύματα ή ΚΜΦ, ή μεταφέρονται από χώρες με γνωστό υψηλό επιπολασμό συγκεκριμένων ανθεκτικών στις καρβαπενέμες παθογόνων. Επίσης θα πρέπει να ελέγχονται όλοι οι συν-νοσηλευόμενοι με τους ασθενείς από τους οποίους απομονώνεται τέτοιο στέλεχος από κλινικό δείγμα. Η εβδομαδιαία επανάληψη των καλλιεργειών επιτήρησης, συνιστάται σε περιπτώσεις επιδημιών (151, 300, 355). Χρήσιμο είναι να επαναλαμβάνεται ο έλεγχος κατά την έξοδο από το νοσοκομείο.

Δεδομένου ότι η γαστρεντερική χλωρίδα αποτελεί την κύρια δεξαμενή των Εντεροβακτηριακών, το κατάλληλο δείγμα για τον έλεγχο φορείας είναι το ορθικό επίχρισμα και τα κόπρανα. Μέχρι να καταστούν διαθέσιμα τα αποτελέσματα του ελέγχου, ο ασθενής θα πρέπει να παραμένει σε απομόνωση.

## 6.1 Μέθοδοι ελέγχου αποικισμού

### 6.1.1 Μη εμπορικά διαθέσιμες καλλιεργητικές μέθοδοι

Έχουν περιγραφεί διάφορες καλλιεργητικές μέθοδοι για αυτό το σκοπό, οι οποίες στην πλειονότητα τους ανιχνεύουν στελέχη ανθεκτικά στις καρβαπενέμες και πρέπει να ακολουθήσει η επιβεβαίωση παραγωγής καρβαπενεμάσης και η ταυτοποίηση του είδους της καρβαπενεμάσης.

Η επίστρωση του δείγματος μπορεί να γίνει είτε απευθείας ή μετά από 18-ωρο εμπλουτισμό σε ζωμό που περιέχει ιμιπενέμη ή ερταπενέμη (362). Βήμα εμπλουτισμού περιλαμβάνει και το πρωτόκολλο του CDC (χρήση δίσκων μεροπενέμης ή ερταπενέμης 10 μg σε 5 ml trypticase soy broth). Δεν έχει αποσαφηνιστεί κατά πόσον ο εμπλουτισμός αυξάνει την ευαισθησία δεδομένου ότι υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα μεταξύ των μελετών (362, 363). Σημαντικό μειονέκτημα του εμπλουτισμού είναι η επιπλέον καθυστέρηση για ένα 24ωρο. Στη μέθοδο αυτή, σπουδαίο ρόλο κατέχει η τελική συγκέντρωση της καρβαπενέμης στο ζωμό, ώστε να επιτυγχάνεται η ανίχνευση στελεχών με χαμηλού επιπέδου αντοχή.

Τα καλλιεργητικά υλικά που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι εκλεκτικά υλικά (συνηθέστερα MC άγαρ) είτε με ενσωματωμένη καρβαπενέμη (1 mg/l) ή με τοποθέτηση δίσκων καρβαπενεμών. Ποικίλα όρια στη διάμετρο της ζώνης αναστολής γύρω από τους δίσκους των καρβαπενεμών έχουν εφαρμοστεί. Η ευαισθησία και η ειδικότητα των μεθόδων εξαρτάται από τη συγκριτική μέθοδο που έχει χρησιμοποιηθεί.

Η απευθείας επίστρωση σε MC άγαρ και τοποθέτηση δίσκων ερταπενέμης (όριο 27 mm) παρουσίασε ευαισθησία 97% και ειδικότητα 90,5% συγκρινόμενη με τη διαδικασία εμπλουτισμού σε ζωμό TSB με δίσκο ιμιπενέμης και επακόλουθη καλλιέργεια σε MC άγαρ (ευαισθησία 65,6 και ειδικότητα 49,6 %) (363). Όταν η δεύτερη μέθοδος συγκρίθηκε με εμπλουτισμό σε ζωμό και επίστρωση σε MC άγαρ με δίσκο ιμιπενέμης (όριο 16 mm) εμφάνισε ευαισθησία 100% (362).

Σε άλλες μελέτες, η μέθοδος της απευθείας επίστρωσης με χρήση δίσκων καρβαπενεμών παρουσίασε ευαισθησία 87% και ειδικότητα 100% συγκρινόμενη με απευθείας ανίχνευση του *bla*<sub>KPC</sub> γονιδίου από το στυλεό με real-time PCR (364) και ευαισθησία/ειδικότητα 92,7/95,9% συγκρινόμενη με το CHROMagarKPC (365).

Η χρήση MC με ιμιπενέμη (MC + IMI) σε συγκέντρωση 1 μg/ml εμφάνισε ευαισθησία/ειδικότητα 87,5/99,6 % σε σύγκριση με ανίχνευση του *bla*<sub>KPC</sub> γονιδίου σε ζωμό στον

οποίο είχε ενοφθαλμιστεί ο στυλεός (366). Το MC + IMI (1 µg/ml) βρέθηκε να παρουσιάζει όμοια ευαισθησία με το CHROMagarKPC (84,9%) ενώ πλεονεκτούσε έναντι του MC με δίσκους καρβαπενεμών (όριο 22 mm). Η ειδικότητα του ήταν υψηλότερη έναντι των άλλων μεθόδων (94,3%). Επίσης παρουσίασε ικανότητα ανίχνευσης KPC-θετικών στελεχών με χαμηλές τιμές MIC στην ιμιπενέμη (367).

Πρόσφατα αναπτύχθηκε το υλικό Supercarba, το οποίο βασίζεται στο Drigalski άγαρ και έχει προστεθεί ερταπενέμη (0,25 µg/ml), ZnSO<sub>4</sub> για τη βελτίωση της ικανότητας ανίχνευσης των MBL και κλοξακιλλίνη (250 µg/ml) ως αναστολέας των AmpC-β-λακταμασών. Το υλικό αυτό εμφανίζει χαμηλό όριο ανίχνευσης και υψηλή ευαισθησία (95,6%), ενώ η ειδικότητα ήταν 82,2% σε σύγκριση με το ChromID ESBL (bioMérieux) και το CHROMagar KPC (CHROMagar). Ειδικά για τις καρβαπενεμάσες Τάξης A, εμφάνισε ευαισθησία 100% (368).

Πλεονέκτημα των μη εμπορικά διαθέσιμων μεθόδων είναι το χαμηλότερο κόστος έναντι των χρωμογόνων υλικών.

### **6.1.2 Χρωμογόνα υλικά**

Αρκετά χρωμογόνα υλικά έχουν αναπτυχθεί για την ανίχνευση των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες Εντεροβακτηριακών και είναι εμπορικά διαθέσιμα: CHROMagar KPC (διαθέσιμο και σε τρυβλία έτοιμα για χρήση, Colorex KPC), Brilliance CRE (Oxoid), Hardy CHROM carbapenemase (Hardy Diagnostics, Santa Maria, CA). Τα χρωμογόνα αυτά υλικά ανιχνεύουν ανθεκτικά στις καρβαπενέμες βακτήρια ανεξάρτητα από τον υποκείμενο μηχανισμό αντοχής (παρουσία ή όχι καρβαπενεμάσης) και επίσης δεν διακρίνουν το είδος της καρβαπενεμάσης. Παρέχουν πληροφορία για το βακτηριακό είδος, που βασίζεται στο διαφορετικό χρώμα της αποικίας. Η ικανότητα ανίχνευσης εξαρτάται από το επίπεδο αντοχής του υπό εξέταση στελέχους και το βακτηριακό φορτίο στο δείγμα και ποικίλει μεταξύ των διαφορετικών υλικών.

Επίσης για τον ίδιο σκοπό έχουν χρησιμοποιηθεί και χρωμογόνα υλικά για τις ESBL (chromID ESBL, bioMérieux). Το υλικό αυτό εμφανίζει υψηλή ευαισθησία αλλά στερείται ειδικότητας δεδομένου ότι επιτρέπει και την ανάπτυξη βακτηρίων που παράγουν ESBL (369).

Αντίθετα, το κύριο μειονέκτημα του CHROMagar KPC είναι η μειωμένη ευαισθησία, δεδομένου ότι δεν ανιχνεύει στελέχη με χαμηλού επιπέδου αντοχή. Η απομόνωση αν-

θετικών στις καρβαπενέμες Εντεροβακτηριακών που φέρουν καρβαπενεμάσες τύπου KPC, IMP ή VIM και εμφανίζουν υψηλού επιπέδου αντοχή στις καρβαπενέμες επιτυγχάνεται εύκολα στο CHROMagar KPC με όριο ανίχνευσης μέχρι 14 CFU/ml. Το όριο ανίχνευσης είναι υψηλότερο για στελέχη με τιμές MIC < 4 µg/ml. Σε συγκριτική μελέτη στην οποία ελέγχθηκαν τα ίδια στελέχη με το CHROMagar KPC και το chromID ESBL το όριο ανίχνευσης ήταν χαμηλότερο στο chromID ESBL (10 – 80 CFU/ml). Το CHROMagar KPC /Colorex KPC έχει αξιολογηθεί σε διάφορες μελέτες με ποικίλη ευαισθησία (84,9%-100%) και ειδικότητα (88,7-100%) που εξαρτάται από τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε στη συγκριτική αξιολόγηση. Έτσι για παράδειγμα, ευαισθησία 100%, ανιχνεύθηκε σε μελέτη που ως συγκριτική μέθοδος χρησιμοποιήθηκε μια λιγότερο ευαίσθητη μέθοδος (δίσκοι καρβαπενεμών σε MacConkey άγαρ) (312).

Το ID Carba (bioMérieux, δεν είναι ακόμη εμπορικά διαθέσιμο) έχει σχεδιαστεί για την ανίχνευση στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάση. Σε πρόσφατη μελέτη αξιολόγησης βρέθηκε ευαισθησία 92,4% και ειδικότητα 96,9%, ενώ εμφάνισε όριο ανίχνευσης 48 CFU/ml για στέλεχος *K. pneumoniae* KPC-θετικό με τιμή MIC=2 µg/ml για τη μεροπενέμη, επιδεικνύοντας ικανότητα ανίχνευσης και για στελέχη με χαμηλές τιμές MIC (370). Σε συγκριτική μελέτη μεταξύ του Colorex KPC και του ID Carba, βρέθηκε επίσης υψηλότερη ικανότητα ανίχνευσης για το ID Carba, λόγω της δυσκολίας ανάπτυξης στελεχών με MIC ≤ 4 µg/ml στο Colorex KPC. Ομοίως το ID Carba εμφάνισε υψηλότερη ικανότητα ανίχνευσης για KPC-θετικά στελέχη έναντι των Brilliance CRE και Colorex KPC τόσο σε υψηλό όσο και σε χαμηλό inoculum (371).

### 6.1.3 Μοριακές μέθοδοι

Η απευθείας ανίχνευση του *bla*<sub>KPC</sub> γονιδίου διαθέτει υψηλή ευαισθησία και εμφανίζει το πλεονέκτημα της ταχύτητας στη λήψη του αποτελέσματος. Σε πολλές συγκριτικές μελέτες φάνηκε ότι οι βασισμένες στην PCR μέθοδοι συνήθως πλεονεκτούν ως προς την ευαισθησία σε σχέση με τις καλλιεργητικές μεθόδους. Έχουν περιγραφεί μέθοδοι με απευθείας εκχύλιση του DNA από τον ορθικό στυλεό (αποτέλεσμα σε 2-4 ώρες) ή με προηγηθέντα ενοφθαλμισμό του στυλεού σε εμπλουτιστικό ζωμό (364, 366, 372, 373).

Οι μέθοδοι αυτές δεν είναι ευρέως διαθέσιμες στα κλινικά εργαστήρια και έχουν υψηλό κόστος. Η σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας και η θετική προγνωστική τους αξία



εξαρτάται από τον επιπολασμό στη συγκεκριμένη περιοχή. Πρέπει να σημειωθεί ότι στοχεύουν έναντι συγκεκριμένου γονιδίου καρβαπενεμάσης. Αποβαίνουν χρήσιμες στον ταχύ περιορισμό επιδημιών από ΚΡC-θετικά στελέχη, όμως δεν μπορούν να εφαρμοστούν σε περιοχές που ενδημούν περισσότερες καρβαπενεμάσες. Επίσης δεν παρέχουν τη δυνατότητα για περαιτέρω έλεγχο ευαισθησίας του στελέχους και τυποποίηση, αν και με τη διαδικασία του προηγηθέντος εμπλουτισμού αυτό είναι εφικτό.

## 6.2 Παράγοντες κινδύνου

Ο καθορισμός των ασθενών υψηλού κινδύνου για αποικισμό παίζει σημαντικό ρόλο στο στοχευμένο έλεγχο φορέας κατά την εισαγωγή στο νοσοκομείο και την άμεση εφαρμογή μέτρων ελέγχου των λοιμώξεων μέχρι τα αποτελέσματα του ελέγχου να είναι διαθέσιμα.

Οι παράγοντες κινδύνου για τον αποικισμό έχουν διερευνηθεί σε πρόσφατες μελέτες, που οι περισσότερες προέρχονται από το Ισραήλ. Ως ανεξάρτητους παράγοντες κινδύνου για τον αποικισμό οι Boger και συν αναφέρουν την προηγηθείσα χορήγηση αντιβιοτικών και ιδιαίτερα αμινοπενικιλινών, τον κλινοστατισμό και τη διαβίωση σε γηροκομείο (362), ενώ οι Wiener-Well Y και συν τη χρήση πάνας ενηλίκων, τη μεγαλύτερη διάρκεια νοσηλείας και τη χορήγηση βανκομυκίνης (357). Σε παρόμοια μελέτη από 12 κέντρα χρόνιας φροντίδας (επιπολασμός φορέας 12%) βρέθηκε ότι η παρατεταμένη νοσηλεία, η νοσηλεία στον ίδιο θάλαμο με φορέα, καθώς και ο υψηλός αριθμός φορέων στον ίδιο θάλαμο παρουσίαζαν ανεξάρτητη συσχέτιση με τον αποικισμό. Επίσης με τον αποικισμό σχετίστηκαν η χορήγηση αντιμικροβιακών το προηγούμενο τρίμηνο και η θετική φορεία για άλλο πολυανθεκτικό παθογόνο (231).

Σε μελέτη από την Ελλάδα αναλύθηκαν οι παράγοντες κινδύνου για αποικισμό από ΚΡC-θετικό στέλεχος *K. pneumoniae* κατά την εισαγωγή στη ΜΕΘ. Ως ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες αναδείχθηκαν η διάρκεια της προηγηθείσας νοσηλείας, ο αριθμός των υποκείμενων νοσημάτων και ο αριθμός των αντιμικροβιακών που είχαν χορηγηθεί κατά το προηγούμενο εξάμηνο (358).

Επίσης έχουν περιγραφεί και παράγοντες που σχετίζονται με θετικό αποικισμό στην επόμενη νοσηλεία: χορήγηση αντιμικροβιακών το προηγούμενο τρίμηνο (κινολονών και αμοξυκιλλίνης/κλαβουλανικού), απευθείας διακομιδή από νοσοκομείο ή ίδρυμα και χρονικό διάστημα  $\leq 3$  μηνών μέχρι την επόμενη νοσηλεία (231, 374). Η διάρκεια

του αποικισμού δεν έχει μελετηθεί ευρέως, αλλά όπως φαίνεται από τις μελέτες από το Ισραήλ ο αποικισμός μπορεί να είναι παρατεταμένος αυξάνοντας το δείκτη μετάδοσης. Η μέση διάρκεια του υπολογίζεται ότι είναι 3 μήνες.

#### **7. Στρατηγικές παρέμβασης για τον περιορισμό της διασποράς στελεχών *Klebsiella pneumoniae* που παράγουν KPC καρβαπενεμάση**

Ο σχεδιασμός στρατηγικών παρέμβασης βασίζεται καταρχάς στην ακριβή γνώση για την έκταση της διασποράς στη συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή, υπολογιζόμενη σε όλες τις συνιστώσες του συστήματος υγείας. Η ουσιαστικότερη προϋπόθεση για αυτό, είναι η αξιόπιστη ανίχνευση των μηχανισμών αντοχής.

Η διενέργεια μελετών σημειακού επιπολασμού είναι απαραίτητη για την αποτύπωση του προβλήματος και τον καθορισμό των περαιτέρω δράσεων, τόσο σε τοπικό όσο και σε εθνικό επίπεδο.

Αναγνωρίζοντας ότι η διασπορά των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες Εντεροβακτηριακών συνιστά σημαντικότερη απειλή για την δημόσια υγεία τόσο το CDC, όσο και η ESCMID έχουν καταρτίσει κατευθυντήριες οδηγίες για τον περιορισμό της διασποράς τους.

Σε νοσηλευτικά ιδρύματα όπου ο επιπολασμός είναι χαμηλός θα πρέπει να υιοθετηθούν επιθετικές πρακτικές όταν αναγνωριστούν ασθενείς με λοίμωξη ή αποικισμό από τέτοια στελέχη. Επίσης θα πρέπει να πραγματοποιείται έλεγχος φορέας σε περίπτωση μεταφοράς ασθενών από ιδρύματα/περιοχές υψηλού επιπολασμού και ο ασθενής να νοσηλεύεται σε συνθήκες μόνωσης ή αν αυτό δεν είναι εφικτό να εφαρμόζονται προληπτικά οι προφυλάξεις επαφής μέχρι να ληφθεί το αποτέλεσμα (361)

Στις ενδημικές περιοχές οι στρατηγικές παρέμβασης περιλαμβάνουν μια πολύπλευρη προσέγγιση σε εθνικό επίπεδο, που πρέπει να συντονίζεται από τις υγειονομικές αρχές (375). Κύριες συνιστώσες της προσέγγισης αυτής είναι η επιδημιολογική επιτήρηση των ασθενών με λοίμωξη αλλά και η ενεργητική επιτήρηση των φορέων. Σε περιπτώσεις ανίχνευσης ασθενών με λοίμωξη ή αποικισμό θα πρέπει να ακολουθεί αυστηρή εφαρμογή των μέτρων ελέγχου των λοιμώξεων: νοσηλεία σε συνθήκες μόνωσης ή συν-νοσηλεία, καθορισμός συγκεκριμένων επαγγελματιών υγείας που θα αναλάβουν αποκλειστικά την νοσηλεία του ασθενούς, εφαρμογή προφυλάξεων επαφής, περιορισμός των μετακινήσεων του ασθενούς στις εντελώς απαραίτητες, προαγωγή της εφαρ-

μογής της υγιεινής των χεριών και εκπαίδευση του προσωπικού. Είναι απαραίτητη η στενή συνεργασία του μικροβιολογικού εργαστηρίου με την ομάδα που ασχολείται με τον έλεγχο των λοιμώξεων.

Υπάρχουν πολλαπλές αναφορές για επιτυχή έλεγχο επιδημιών από στελέχη *K. Pneumoniae* που παράγουν ΚΡC καρβαπενεμάση σε τοπικό επίπεδο συγκεκριμένων νοσηλευτικών ιδρυμάτων. Εθνικό σχέδιο παρέμβασης εφαρμόστηκε από το 2007 στο Ισραήλ, μετά την αποτυχία των προσπαθειών σε τοπικό επίπεδο. Το εθνικό αυτό σχέδιο οδήγησε στον έλεγχο της επιδημίας. Η μηνιαία επίπτωση μειώθηκε από 55,5 περιπτώσεις/100.000 ασθενοήμερες το Μάρτιο του 2007 σε 11,7 περιπτώσεις/100.000 ασθενοήμερες το Μάιο του 2008 ( $p=0,001$ ). Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του επιπέδου της συμμόρφωσης με τις κατευθυντήριες οδηγίες για νοσηλεία σε συνθήκες μόνωσης και της επιτυχίας στον περιορισμό της διασποράς (229). Το επιτυχές παράδειγμα του Ισραήλ αναδεικνύει το ρόλο του στρατηγικού σχεδιασμού υπό εθνική εποπτεία και της συνεχούς επαγρύπνησης για την καταπολέμηση της μικροβιακής αντοχής. Ανάλογο εθνικό σχέδιο δράσης τέθηκε σε εφαρμογή και στη χώρα μας από το Νοέμβριο του 2010 («Προκρούστης»). Από το Σεπτέμβριο του 2012, ξεκίνησε η εφαρμογή της δεύτερης φάσης του προγράμματος με έμφαση στην παρέμβαση. Η φάση αυτή περιλαμβάνει τήρηση αρχείου καταγραφής ασθενών με απομόνωση ενός από τα παθογόνα στόχους (λοίμωξη ή αποικισμός), ενημέρωση κλινικών τμημάτων, επιτήρηση της εφαρμογής των μέτρων ελέγχου των λοιμώξεων και πρόληψης της διασποράς και αποστολή δελτίου με συνοπτική περιγραφή της εφαρμογής των προφυλάξεων επαφής. Τα αποτελέσματα του σε εθνικό επίπεδο δεν έχουν ακόμη αξιολογηθεί.

Η επιδημιολογία των στελεχών που παράγουν ΚΡC καρβαπενεμάση παρουσιάζει αξιοσημείωτη γεωγραφική μεταβλητότητα και εξελίσσεται χρονικά, εξαιτίας μιας σύνθετης αλληλεπίδρασης παραγόντων που συμμετέχουν στην επιλογή και διασπορά των στελεχών και των γονιδίων αντοχής. Η ανάδυση, εξάπλωση και παγκοσμιοποίηση της αντοχής επιβάλλει στρατηγικό σχεδιασμό για την αντιμετώπιση του προβλήματος με έμφαση στην έγκαιρη και ακριβή ανίχνευση των μηχανισμών αντοχής, τη γνώση της τοπικής και παγκόσμιας επιδημιολογίας, την εφαρμογή αυστηρών μέτρων ελέγχου των λοιμώξεων, ενεργούς επιδημιολογικής επιτήρησης και πολιτικής χρήσης των αντιβιοτικών. Επιπλέον είναι επιτακτική η ανάγκη ανάπτυξης νέων αντιβιοτικών έναντι των Gram-αρνητικών παθογόνων.



## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα μελέτη αποσκοπούσε στην εργαστηριακή, κλινική και επιδημιολογική διερεύνηση των λοιμώξεων από στελέχη *Klebsiella pneumoniae* που παράγουν KPC καρβαπενεμάση.

Μελετήθηκαν προοπτικά, για χρονικό διάστημα 2,5 ετών, όλοι οι ασθενείς Τριτοβάθμιου Νοσοκομείου από τους οποίους απομονώθηκε τουλάχιστον ένα στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* που παράγει KPC καρβαπενεμάση από κλινικό δείγμα. Αναλύθηκαν τα κλινικά και επιδημιολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών και διερευνήθηκαν οι παράγοντες κινδύνου για εμφάνιση κλινικής λοίμωξης. Μελετήθηκε η έκβαση των λοιμώξεων, η μικροβιολογική έκβαση και η συνολική έκβαση των ασθενών. Καθορίστηκαν οι παράγοντες που σχετίζονται με δυσμενή έκβαση στους ασθενείς με βακτηριαμία, αξιολογήθηκαν τα χρησιμοποιηθέντα αντιμικροβιακά και καθορίστηκε η επίδραση της κατάλληλης αντιμικροβιακής αγωγής στην έκβαση των λοιμώξεων. Ομοίως αναλύθηκαν οι λοιμώξεις ουροποιητικού καθώς και οι λοιπές λοιμώξεις. Διερευνήθηκαν οι παράγοντες κινδύνου για λοίμωξη ή αποικισμό από ανθεκτικό στην κολιστίνη στέλεχος καθώς και η επίδραση της αντοχής στην έκβαση των ασθενών. Επίσης, πραγματοποιήθηκε έλεγχος αποικισμού με λήψη ορθικού επιχρίσματος και αναλύθηκαν τα αποτελέσματα. Αναπτύχθηκε ένας νέος φαινοτυπικός αλγόριθμος για την ειδική ανίχνευση του τύπου της καρβαπενεμάσης στις καλλιέργειες επιτήρησης και αξιολογήθηκε συγκριτικά με άλλες μεθόδους.

Τα απομονωθέντα στελέχη ελέγχθηκαν φαινοτυπικά για παραγωγή καρβαπενεμασών και μοριακά με την τεχνική της PCR για παρουσία του *bla*<sub>KPC</sub> γονιδίου, καθώς και άλλων γονιδίων β-λακταμασών (άλλων καρβαπενεμασών και ESBL). Ακολούθησε ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων της PCR για το γονίδιο *bla*<sub>KPC</sub>. Καθορίστηκε το προφίλ ευαισθησίας των στελεχών στα αντιβιοτικά και πραγματοποιήθηκε συγκριτική αξιολόγηση των μεθόδων ελέγχου ευαισθησίας στην τιγκεκυκλίνη. Τέλος, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της κλωνικότητας με τη μέθοδο MLST.

## ΥΛΙΚΟ

### 1. Βακτηριακά στελέχη

Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν στελέχη *Klebsiella pneumoniae* με μοριακά επιβεβαιωμένη παραγωγή ΚΡC καρβαπενεμάσης (ΚΡC-ΚΡ) που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα ασθενών που νοσηλεύτηκαν στο Γ.Ν. Πειραιά «Τζάνειο». Η χρονική περίοδος της μελέτης εκτείνεται από το Μάιο του 2008 έως το Νοέμβριο του 2010 (2,5 έτη).

Το Γ.Ν. Πειραιά «Τζάνειο» αποτελεί τριτοβάθμιο Νοσοκομείο 470 κλινών και διαθέτει 7 Κλινικές στον Παθολογικό και 8 Κλινικές στο Χειρουργικό Τομέα. Επίσης διαθέτει 2 Μονάδες Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ): Γενική-Αναπνευστική ΜΕΘ και Μονάδα Εμφραγμάτων με 10 ανεπτυγμένες κλίνες η καθεμία. Εξυπηρετεί την ευρύτερη περιοχή του Πειραιά και της Νοτιοδυτικής Αττικής καθώς και μεγάλο μέρος των νησιών. Το νοσοκομείο συμμετέχει στο πρόγραμμα εφημεριών της 2ης ΥΠΕ Πειραιώς και Αιγαίου και κατά το χρονικό διάστημα της μελέτης εφημέρευε κάθε τρεις ημέρες για τα έτη 2008 και 2009 και κάθε τέσσερις ημέρες για το 2010. Ο αριθμός των εισαγωγών ανά έτος υπερβαίνει τις 30.000 για τα έτη 2008 και 2009 με μέση διάρκεια νοσηλείας 4 ημέρες, ενώ το 2010 ο αριθμός των εισαγωγών μειώθηκε στις 19.874. Ειδικά στην Αναπνευστική ΜΕΘ κατά το 2010 σημειώθηκαν 97 εισαγωγές, ο μέσος χρόνος νοσηλείας ήταν 22 ημέρες και η θνητότητα 25%. Ο αριθμός των εξετασθέντων στο Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών κυμαίνεται από 104.933-119.229 κατά το χρονικό διάστημα της μελέτης.

### 2. Δεδομένα ασθενών

Στην μελέτη συμπεριελήφθησαν και μελετήθηκαν προοπτικά όλοι οι ασθενείς από τους οποίους απομονώθηκε τουλάχιστον ένα στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* που παράγει ΚΡC καρβαπενεμάση από κλινικό δείγμα κατά τη χρονική περίοδο της μελέτης. Ασθενείς με απομόνωση ΚΡC-ΚΡ στελέχους μόνο από ορθικό επίχρισμα που ελήφθη για έλεγχο αποικισμού δεν συμπεριελήφθησαν στη μελέτη.

Συγκεντρώθηκαν και μελετήθηκαν τα ακόλουθα στοιχεία για τους ασθενείς με κλινικό δείγμα θετικό για τα υπό μελέτη στελέχη:

- I. Δημογραφικά στοιχεία (ηλικία, φύλο)
- II. Νοσηλευτικό Τμήμα και διάρκεια νοσηλείας

- III. Υποκείμενα νοσήματα
- IV. Προηγηθείσες νοσηλείες και διάρκεια αυτών, παραμονή σε Μονάδα Φροντίδας Ηλικιωμένων, προηγηθείσες χειρουργικές επεμβάσεις κατά το προηγούμενο έτος
- V. Απευθείας διακομιδή από άλλο νοσηλευτικό ίδρυμα ή άλλο νοσηλευτικό τμήμα του νοσοκομείου
- VI. Προηγηθείσα χορήγηση αντιμικροβιακών κατά την παρούσα νοσηλεία και διάρκεια αυτής.
- VII. Παρεμβατικές ιατρικές πράξεις: μηχανική υποστήριξη της αναπνοής, κεντρική φλεβική γραμμή, ουροκαθετήρας, ρινογαστρικός σωλήνας, παρουσία ξένου σώματος, χειρουργικές επεμβάσεις κατά την παρούσα νοσηλεία, άλλες παρεμβατικές πράξεις (φίλτρο αιμοδιήθησης, μεταγγίσεις παραγώγων αίματος και πλάσματος, χορήγηση υπεράνοσης γ-σφαιρίνης)
- VIII. Διάκριση μεταξύ λοίμωξης και αποικισμού σύμφωνα με τους ορισμούς του CDC
- IX. Κλινικά χαρακτηριστικά της λοίμωξης (APACHE II score για τους ασθενείς με βακτηριαιμία, παρουσία σοβαρής σήψης ή σηπτικής καταπληξίας)
- X. Αντιμικροβιακή αγωγή για τη λοίμωξη και διάρκεια αυτής
- XI. Επιπρόσθετες θεραπευτικές παρεμβάσεις
- XII. Έκβαση της λοίμωξης και συνολική έκβαση του ασθενούς: ολική θνητότητα, θνητότητα 15 ημερών, θνητότητα λοίμωξης, ημέρες νοσηλείας από την απομόνωση έως το θάνατο, ημέρες παραμονής στο νοσοκομείο μετά την απομόνωση.

### **3. Ορισμοί**

#### **3.1 Ορισμοί λοιμώξεων**

Για τους ορισμούς των λοιμώξεων εφαρμόστηκαν τα κριτήρια του CDC (376). Ως πρωτοπαθής μικροβιαίμια χαρακτηρίστηκε η απομόνωση του υπό μελέτη παθογόνου σε μία ή περισσότερες αιμοκαλλιέργειες χωρίς συσχέτιση με λοίμωξη σε άλλο σημείο. Ως βακτηριαιμία σχετιζόμενη με κεντρικό φλεβικό καθετήρα ορίστηκε η βακτηριαιμία που εμφανίστηκε μέχρι 48 ώρες μετά την αφαίρεση του κεντρικού αγγειακού καθετήρα και θετική καλλιέργεια με απομόνωση του υπό μελέτη παθογόνου από το άκρο του κεντρικού φλεβικού καθετήρα με μία από τις ακόλουθες μεθόδους:



- i) ημιποσοτική καλλιέργεια κεντρικού αγγειακού καθετήρα >15 CFU
- ii) θετική καλλιέργεια με απομόνωση του ίδιου μικροοργανισμού από πυώδες έκκριμα του σημείου εισόδου του κεντρικού αγγειακού καθετήρα
- iii) χρόνος θετικοποίησης καλλιεργειών αίματος ληφθέντων από τον κεντρικό αγγειακό καθετήρα και περιφερική φλέβα την ίδια χρονική στιγμή (DTP, differential time to positivity): απομόνωση του ίδιου μικροοργανισμού και θετικοποίηση της αιμοκαλλιέργειας από τον κεντρικό αγγειακό καθετήρα τουλάχιστον δύο ώρες νωρίτερα από την καλλιέργεια που ελήφθη από την περιφερική φλέβα.

### 3.2 Λοιποί ορισμοί

Ως έναρξη της εκάστοτε υπό μελέτη λοίμωξης (βακτηριαμία, λοίμωξη ουροποιητικού, άλλες λοιμώξεις) ορίστηκε η ημερομηνία συλλογής του αντίστοιχου κλινικού δείγματος από το οποίο απομονώθηκε στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* που παράγει KPC καρβαπενεμάση.

Η διάκριση μεταξύ λοίμωξης και αποικισμού πραγματοποιήθηκε με βάση τους ορισμούς του CDC, από τους θεράποντες ιατρούς σε συνεργασία με την ομάδα λοιμωξιολόγων του νοσοκομείου.

Η διάκριση μεταξύ πρωτοπαθούς και δευτεροπαθούς βακτηριαμίας έγινε με βάση τα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα σύμφωνα με τους παραπάνω ορισμούς. Ομοίως καθορίστηκε και η πιθανή εστία της δευτεροπαθούς μικροβιαμίας.

Η βαρύτητα της νόσου κατά την εισαγωγή και κατά την έναρξη της λοίμωξης στους ασθενείς με βακτηριαμία εκτιμήθηκε με τη χρήση του APACHE II score (377).

Η προηγηθείσα χορήγηση αντιμικροβιακών αφορούσε στην παρούσα νοσηλεία και οι ημέρες έκθεσης υπολογίστηκαν από την έναρξη χορήγησης του αντιμικροβιακού έως την απομόνωση του υπό μελέτη στελέχους KPC-KP. Ο δείκτης βαρύτητας της έκθεσης σε αντιμικροβιακά υπολογίστηκε από τον αριθμό των διαφορετικών ομάδων αντιμικροβιακών τα οποία χορηγήθηκαν στον ασθενή. Ως υψηλός δείκτης προηγηθείσας έκθεσης σε αντιμικροβιακά ορίστηκε η έκθεση σε περισσότερα από τρία αντιμικροβιακά. Ως υψηλός δείκτης βαρύτητας παρεμβατικών πράξεων ορίστηκε η χρήση μηχανικού αερισμού ή η ταυτόχρονη παρουσία ουροκαθετήρα και κεντρικής φλεβικής γραμμής (315).

Η ανοσοκαταστολή ορίστηκε σύμφωνα με τα παρακάτω κριτήρια:

- i) Ουδετεροπενία (απόλυτος αριθμός ουδετερόφιλων  $< 500/\text{mm}^3$ )
- ii) Λευχαιμία ή λέμφωμα
- iii) HIV και  $\text{CD4} < 200$
- iv) Σπληνεκτομή
- v) Πρόσφατη μεταμόσχευση
- vi) Χημειοθεραπεία με κυτταροτοξικά
- vii) Θεραπεία με υψηλές δόσεις στεροειδών καθημερινά για πάνω από 2 εβδομάδες).

Ως σοβαρή σήψη ορίστηκε η σήψη που συνοδεύεται από ανεπάρκεια ενός τουλάχιστον οργάνου και ως σηπτική καταπληξία η σοβαρή σήψη η οποία συνοδεύεται από συστολική αρτηριακή πίεση  $< 90 \text{ mm Hg}$  για την οποία παρά την επαρκή χορήγηση υγρών απαιτείται η χορήγηση ινοτρόπων/αγγειοσυσπαστικών (378).

Ως κατάλληλη εμπειρική αγωγή ορίστηκε η χορήγηση αντιμικροβιακών με *in vitro* δραστικότητα έναντι του KPC-KP στελέχους εντός 24 ωρών από την έναρξη της λοίμωξης. Κατάλληλη (οριστική) αντιμικροβιακή αγωγή ορίστηκε η χορήγηση αντιμικροβιακών με *in vitro* δραστικότητα έναντι του KPC-KP στελέχους για τουλάχιστον 48 ώρες. Η έγκαιρη χορήγηση κατάλληλης αντιμικροβιακής αγωγής αφορούσε στην έναρξη της χορήγησης εντός τριών ημερών από την έναρξη της λοίμωξης (379).

Ως επιπρόσθετες θεραπευτικές παρεμβάσεις ορίστηκαν οι παρεμβάσεις που στοχεύουν στην καταπολέμηση της εστίας της λοίμωξης: αφαίρεση ή/και αλλαγή κεντρικών φλεβικών γραμμών, αφαίρεση ή/και αλλαγή ουροκαθετήρα, χειρουργικός καθαρισμός τραύματος, χειρουργικές επεμβάσεις, εφαρμογή συσκευής αρνητικής πίεσης σε λοιμώξεις μαλακών μορίων, κλπ.

Η ολική θνητότητα περιελάμβανε όλες τις αιτίες θανάτου κατά τη διάρκεια της νοσηλείας. Η θνητότητα της λοίμωξης αναφέρεται σε θάνατο που αποδίδεται κατά κύριο λόγο στη λοίμωξη και τεκμηριώθηκε από την παρουσία σοβαρής σήψης, σηπτικής καταπληξίας ή/και πολυοργανικής ανεπάρκειας. Η συμβολή της λοίμωξης στο θάνατο κρίθηκε σε συνεργασία με το θεράποντα ιατρό και το λοιμωξιολόγο.

Η μικροβιολογική έκβαση καθορίστηκε ως ακολούθως:

- i) Μικροβιολογική ανταπόκριση (εκρίζωση): το υπό μελέτη παθογόνο (KPC-KP) δεν απομονώθηκε σε επαναλαμβανόμενες καλλιέργειες που ελήφθησαν κατά τη διάρκεια ή μετά το πέρας της θεραπείας

- ii) Μικροβιολογική αποτυχία: το υπό μελέτη παθογόνο (KPC-KP) απομονώθηκε σε επαναλαμβανόμενες καλλιέργειες που ελήφθησαν τουλάχιστον 48 ώρες μετά τη έναρξη της θεραπείας
- iii) Ακαθόριστη: δεν υπήρχαν διαθέσιμες καλλιέργειες για την εκτίμηση της μικροβιολογικής έκβασης (δεν ελήφθησαν ή ο ασθενής απεβίωσε ή εξήλθε από το νοσοκομείο)

## ΜΕΘΟΔΟΙ

### 1. Απομόνωση-Ταυτοποίηση

Οι καλλιέργειες των κλινικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν με τις κλασσικές μικροβιολογικές μεθόδους.

Τα δείγματα καλλιεργειών αίματος εμβολιάστηκαν σε φιάλες αιμοκαλλιεργειών και επώαστηκαν στο αυτοματοποιημένο σύστημα αιμοκαλλιεργειών BACTEC 9240 (Becton and Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Το λογισμικό του ίδιου συστήματος χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του χρόνου θετικοποίησης (DTP) ώστε να τεθεί η διάγνωση της σχετιζόμενης με καθετήρα βακτηριαϊμίας στις περιπτώσεις που ήταν διαθέσιμα δείγματα καλλιεργειών αίματος ληφθέντα ταυτόχρονα από κεντρική γραμμή και περιφερική φλέβα.

Οι καλλιέργειες των άκρων των κεντρικών αγγειακών καθετήρων έγιναν με την ημιοσοτική μέθοδο κατά Maki. Το όριο για το θετικό αποτέλεσμα ήταν οι 15 αποικίες.

Η ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους έγινε με το αυτοματοποιημένο σύστημα Vitek 2 Compact (bioMérieux, Marcy l' Etoile, France) με χρήση της κάρτας GN ID Card.

### 2. Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιμικροβιακά

Ο προκαταρκτικός έλεγχος ευαισθησίας στα αντιμικροβιακά και ο προσδιορισμός των τιμών MIC έγινε με το αυτοματοποιημένο σύστημα Vitek 2 Compact (bioMérieux) και χρήση των καρτών AST N103 και AST EXN5 ή EXN8.

Ελέγχθηκε η ευαισθησία σε 38 αντιβιοτικά: Amikacin, Amoxicillin/Clavulanic acid, Ampicillin, Ampicillin/Sulbactam, Aztreonam, Cefalotin, Cefepime, Cefixime, Cefotaxime, Cefoxitin, Ceftazidime, Ceftriaxone, Cefuroxime, Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Colistin, Doripenem, Ertapenem, Gentamicin, Imipenem, Levofloxacin, Meropenem, Minocycline, Moxifloxacin, Nalidixic Acid, Netilmicin, Nitrofurantoin, Norfloxacin, Ofloxacin, Piperacillin, Piperacillin/Tazobactam, Tetracycline, Ticarcillin, Ticarcillin/Clavulanic Acid, Tigecycline, Tobramycin, Trimethoprim, Trimethoprim/ Sulfamethoxazole.

Οι τιμές MIC στις καρβαπενέμες προσδιορίστηκαν επιπλέον και με ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιβιοτικών σε Mueller-Hinton II άγαρ (Mast Group Ltd, UK), οι

οποίες χρησιμοποιήθηκαν και αναγνώστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας (Etest, bioMérieux).

Ο έλεγχος ευαισθησίας στην τιγκεκυκλίνη πραγματοποιήθηκε επιπλέον με ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιβιοτικών (Etest, bioMérieux και MIC Test Strip, Liofilchem SRL, Italy). Το εύρος των τιμών MIC που λαμβάνονται με τη χρήση των ταινιών είναι 0,016-256 µg/ml. Ως μέθοδος αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος μικροαραίωσης σε ζωμό (BMD). Πραγματοποιήθηκε με χρήση εμπορικά διαθέσιμων πλακών μικροαραίωσης σε ξηρά μορφή που διαθέτουν έγκριση από τον FDA και ζωμό Mueller-Hinton ρυθμισμένης συγκέντρωσης κατιόντων με ρυθμιστικό διάλυμα TES (Sensititre JustOne for tigecycline, TREK Diagnostic Systems, Cleveland, OH). Το εύρος των τιμών MIC που ελέγχθηκαν ήταν 0,06-64 µg/ml. Τα panels ενοφθαλμίστηκαν δια χειρός και αναγνώστηκαν με οπτική ανάγνωση της μικροβιακής ανάπτυξης. Η διαδικασία συνοπτικά έχει ως εξής: επιλέχθηκαν 3-5 αποικίες από καθαρό καλλιέργημα και αναμείχθηκαν σε αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό, ώστε να προκύψει εναιώρημα θολερότητας 0,5 της πρότυπης κλίμακας McFarland. Μετά από καλή ανάμιξη, μεταφέρθηκαν 50 µl του εναιωρήματος σε ένα σωληνάριο ζωμού Mueller-Hinton για το σχηματισμό ενοφθαλμίσματος  $5 \times 10^5$  CFU/ml. Το σωληνάριο ανακινήθηκε 8-10 φορές. Μεταφέρθηκαν 100 µl του εναιωρήματος σε κάθε βύθισμα της ταινίας JustOne με χειροκίνητη πιπέτα. Η ταινία καλύφθηκε με το ειδικό αυτοκόλλητο και ακολούθησε επώαση στους 34-36°C σε επωαστικό κλίβανο χωρίς CO<sub>2</sub> για 16-20 ώρες. Ως τιμή MIC καταγράφηκε η χαμηλότερη συγκέντρωση του αντιμικροβιακού παράγοντα που ανέστειλε την ορατή ανάπτυξη του μικροοργανισμού (380)

Η αντοχή στην κολιστίνη επιβεβαιώθηκε με χρήση ταινιών διαβαθμισμένης συγκέντρωσης (Etest, bioMérieux). Ως μέθοδος αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος αραίωσης του αντιβιοτικού σε άγαρ. Συγκεκριμένα παρασκευάστηκαν τρυβλία Mueller-Hinton II άγαρ (Mast Group Ltd, UK) που περιείχαν υποδιπλάσιες συγκεντρώσεις κολιστίνης (0,25 - 128 µg/ml). Χρησιμοποιήθηκε σκόνη θειικής κολιστίνης (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), όπως ενδείκνυται για τον έλεγχο της ευαισθησίας. Τα τρυβλία ενοφθαλμίστηκαν με μικροβιακό εναιώρημα  $10^4$  -  $10^5$  CFU (10 µl από αραίωση 1 : 100 εναιωρήματος θολερότητας 0,5 της πρότυπης κλίμακας McFarland). Ακολούθησε επώαση στους 34-36°C για 16-20 ώρες. Ως τιμή MIC καταγράφηκε η χαμηλότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που δεν επέτρεψε την ορατή ανάπτυξη του μικροοργανισμού.

Ο έλεγχος της ευαισθησίας στη φωσφομυκίνη έγινε με ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιβιοτικών (MIC Test Strip, Liofilchem SRL, Italy).

Όλες οι εμπορικές μέθοδοι πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες της εκάστοτε κατασκευάστριας εταιρίας. Ως στέλεχος ποιοτικού ελέγχου σε όλες τις μεθόδους ελέγχου ευαισθησίας χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *Escherichia coli* ATCC 25922.

## **2.1 Μελέτη συγκριτικής αξιολόγησης των μεθόδων ελέγχου ευαισθησίας στην τιγκεκυκλίνη**

Αξιολογήθηκαν 3 μέθοδοι ρουτίνας (ένα αυτοματοποιημένο σύστημα και δύο ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης) για τον έλεγχο της ευαισθησίας στην τιγκεκυκλίνη: Vitek 2 (bioMérieux, Marcy l' Etoile, France), Etest (bioMérieux) και MIC Test Strip (MTS, Liofilchem SRL, Italy) σε σύγκριση με τη μέθοδο αναφοράς (BMD). Οι 4 μέθοδοι εφαρμόστηκαν σε 86 στελέχη που παρήγαγαν KPC καρβαπενεμάση (από αυτά τα 13 παρήγαγαν εκτός από KPC καρβαπενεμάση και VIM καρβαπενεμάση). Η επιλογή των στελεχών έγινε έτσι ώστε να αντιπροσωπεύουν διαφορετικούς ST τύπους και ποικίλα επίπεδα τιμών MIC στην τιγκεκυκλίνη σύμφωνα με τον αρχικό έλεγχο με το Vitek 2.

Η μέθοδος μικροαραίωσης σε ζωμό πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφηκε παραπάνω. Όλες οι μέθοδοι πραγματοποιήθηκαν ταυτόχρονα από το ίδιο βακτηριακό ελαιώρημα. Το *E. coli* ATCC 25922 χρησιμοποιήθηκε ως στέλεχος ποιοτικού ελέγχου σε όλα τα πειράματα. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων ελέγχου της ευαισθησίας πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τα όρια ευαισθησίας τόσο του FDA (381) όσο και του EUCAST (285), δεδομένου ότι δεν υπάρχει εναρμονισμός των ορίων. Τα αποτελέσματα του ελέγχου ευαισθησίας με την κάθε μέθοδο συγκρίθηκαν με αυτά που προέκυψαν από τη μέθοδο αναφοράς. Καθορίστηκαν οι MIC<sub>50</sub> και MIC<sub>90</sub> για κάθε μέθοδο. Υπολογίστηκε το ποσοστό συμφωνίας στην κατηγοριοποίηση, τα ποσοστά σφαλμάτων (μέγιστα, μείζονα και ελάσσονα) καθώς και η βασική συμφωνία μεταξύ των μεθόδων. Ως ποσοστό συμφωνίας στην κατηγοριοποίηση (Categorical agreement, CA) ορίστηκε το ποσοστό των στελεχών που κατετάγησαν στην ίδια κατηγορία ευαισθησίας (ευαίσθητο, μετρίως ευαίσθητο, ανθεκτικό) με τη μέθοδο αναφοράς και με την υπό εκτίμηση μέθοδο. Οι ασυμφωνίες στη κατηγοριοποίηση ταξινομήθηκαν ως εξής: α) μέγιστα σφάλματα (very major errors, VME), περιπτώσεις στις οποίες η μέθοδος BMD κατέδειξε αντοχή ενώ η υπό εκτίμηση μέθοδος ευαισθησία β) μείζονα σφάλματα (major errors, ME), περιπτώσεις

στις οποίες η μέθοδος BMD κατέδειξε ευαισθησία ενώ η υπό εκτίμηση μέθοδος αντοχή γ) ελάσσονα σφάλματα (minor errors, mE), περιπτώσεις στις οποίες η μια μέθοδος κατατάσσει το στέλεχος ως μετρίως ευαίσθητο και η άλλη μέθοδος ως ευαίσθητο ή ως ανθεκτικό (381). Ως βασική συμφωνία (Essential agreement, EA) ορίστηκε το ποσοστό των αποτελεσμάτων των τιμών MIC που διέφεραν κατά μία υποδιπλάσια αραίωση από την τιμή MIC που προσδιορίστηκε με τη μέθοδο BMD (382).

Η αποδεκτή απόδοση των μεθόδων εκτιμήθηκε σύμφωνα με τα κριτήρια που καθορίστηκαν από το Διεθνή Οργανισμό International Organization for Standardization ως ακολούθως:  $\geq 90\%$  για τη βασική συμφωνία ή τη συμφωνία στην κατηγοριοποίηση,  $\leq 3\%$  για τα μέγιστα ή μείζονα σφάλματα και  $\leq 7\%$  για το άθροισμα των μειζόνων και ελασσόνων σφαλμάτων (383).

### **3. Όρια ευαισθησίας - Χαρακτηρισμός των στελεχών**

Για την κατηγοριοποίηση της ευαισθησίας των στελεχών στα αντιβιοτικά (ευαίσθητα, μετρίως ευαίσθητα, ανθεκτικά) εφαρμόστηκαν τα όρια ευαισθησίας του CLSI (384). Δεδομένου ότι η πλειονότητα του υλικού της μελέτης συγκεντρώθηκε πριν την αναθεώρηση των ορίων ευαισθησίας στις καρβαπενέμες από το CLSI, οι περισσότερες αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ως μεταβλητή την τιμή MIC στη μεροπενέμη  $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ . Επίσης ως κατάλληλη χαρακτηρίστηκε η αντιμικροβιακή αγωγή με καρβαπενέμες (ιμιπενέμη, μεροπενέμη, δοριπενέμη) όταν η τιμή MIC του μικροβιακού στελέχους ήταν  $\leq 4 \mu\text{g/ml}$  δεδομένου ότι η θεραπευτική χρήση καρβαπενεμών σε συνδυαστικές θεραπείες σε αυτές τις περιπτώσεις υποστηρίζεται βιβλιογραφικά (151, 334).

Για την τιγκεκυκλίνη δεν υπάρχουν διαθέσιμα όρια ευαισθησίας από το CLSI και εφαρμόστηκαν τα όρια που έχουν εγκριθεί από το FDA (US Food and Drug Administration 384): ευαίσθητο,  $\text{MIC} \leq 2 \mu\text{g/ml}$ , ανθεκτικό,  $\text{MIC} \geq 8 \mu\text{g/ml}$  (381). Στη συγκριτική μελέτη αξιολόγησης των μεθόδων ελέγχου της ευαισθησίας στην τιγκεκυκλίνη οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν τόσο με τα όρια ευαισθησίας του FDA, όσο και με τα όρια ευαισθησίας που διατίθενται από το EUCAST (ευαίσθητο,  $\text{MIC} \leq 1 \mu\text{g/ml}$ , ανθεκτικό,  $\text{MIC} > 2 \mu\text{g/ml}$ ), δεδομένου ότι δεν υπάρχει εναρμονισμός των ορίων ευαισθησίας (285, 381).

Επίσης το CLSI δεν παρέχει όρια ευαισθησίας για την κολιστίνη έναντι στελεχών Εντεροβακτηριακών. Εφαρμόστηκαν τα όρια ευαισθησίας που παρέχονται από το EUCAST: ευαίσθητο, MIC  $\leq$  2  $\mu\text{g/ml}$ , ανθεκτικό, MIC  $>$  2  $\mu\text{g/ml}$  (285).

#### **4. Φαινοτυπικές δοκιμασίες παραγωγής καρβαπενεμασών**

Όλα τα κλινικά στελέχη *Klebsiella pneumoniae* τα οποία κατά τον προκαταρκτικό έλεγχο ευαισθησίας εμφάνισαν αντοχή στις κεφαλοσπορίνες γ' γενιάς και τιμή MIC σε οποιαδήποτε καρβαπενέμη  $\geq$  1  $\mu\text{g/ml}$  υποβλήθηκαν σε φαινοτυπικό έλεγχο παραγωγής καρβαπενεμασών. Ο φαινοτυπικός έλεγχος περιελάμβανε το τροποποιημένο Hodge Test για την ανίχνευση της υδρόλυσης των καρβαπενεμών και τη δοκιμασία συνδυασμού των δίσκων καρβαπενεμών με αναστολείς καρβαπενεμασών (EDTA και φαινυλβορονικό οξύ) (294).

Το τροποποιημένο Hodge Test πραγματοποιήθηκε και ερμηνεύτηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του CLSI.

Για την δοκιμασία συνδυασμού των δίσκων καρβαπενεμών με τους αναστολείς καρβαπενεμασών εναιώρημα του μικροβιακού στελέχους σε φυσιολογικό ορό με θολερότητα 0,5 της πρότυπης κλίμακας McFarland επιστρώθηκε σε τρυβλίο Mueller-Hinton άγαρ και τοποθετήθηκαν 4 δίσκοι μεροπενέμης των 10  $\mu\text{g}$ : μεροπενέμη χωρίς αναστολείς, μεροπενέμη με 10  $\mu\text{l}$  EDTA 0,1 M (αναστολέας μέταλλο-β-λακταμασών), μεροπενέμη με 20  $\mu\text{l}$  φαινυλβορονικό οξύ 20  $\text{mg/ml}$  (PBA, αναστολέας KPC καρβαπενεμασών) και μεροπενέμη με τους δύο αναστολείς. Ακολούθησε επώαση στους 34-36°C για 16-20 ώρες. Η ανάγνωση του αποτελέσματος βασίστηκε σε διαφορά  $\geq$  5 mm μεταξύ της ζώνης αναστολής της μεροπενέμης χωρίς αναστολέα και τη ζώνη αναστολής της μεροπενέμης με τον αντίστοιχο αναστολέα, η οποία θεωρήθηκε ενδεικτική της παραγωγής της αντίστοιχης καρβαπενεμάσης.

Το διάλυμα EDTA 0,1 M παρασκευάστηκε από αρχικό διάλυμα 0,5 M EDTA με αραιώση 1: 5 (0,5 ml 0,5 M EDTA και 2 ml αποσταγμένο νερό)

Το διάλυμα φαινυλβορονικού οξέος 20  $\text{mg/ml}$  παρασκευάστηκε διαλύοντας 120  $\text{mg}$  phenylboronic acid σε 3 ml DMSO (dimethyl sulfoxide, Sigma) και προστέθηκαν 3 ml αποσταγμένο νερό.



## **5. Μοριακός έλεγχος παραγωγής καρβαπενεμασών**

### **5.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)**

Η PCR είναι μια ταχεία τεχνική που χρησιμοποιείται για να πολλαπλασιαστεί με ακρίβεια ένα τμήμα DNA που βρίσκεται μεταξύ δύο περιοχών με γνωστή νουκλεοτιδική αλληλουχία.

Στην παρούσα μελέτη η τεχνική της PCR εφαρμόστηκε για την ανίχνευση γονιδίων καρβαπενεμασών και ευρέως φάσματος β-λακταμασών (ESBL). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για αυτό το σκοπό παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία των προϊόντων προσδιορίστηκε στο VIB Department of Molecular Genetics, του Πανεπιστημίου της Αμβέρσας. Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Lasergene (DNASTAR, Madison, WI, USA). Οι ποικιλίες των υπό μελέτη γονιδίων ταυτοποιήθηκαν με το πρόγραμμα BLAST στον ιστότοπο του National Center for Biotechnology (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Επίσης η τεχνική της PCR χρησιμοποιήθηκε στην τυποποίηση με τη μέθοδο MLST, όπως περιγράφεται παρακάτω.

Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων έγινε σε γέλη αгарόζης 1,5% σε 150 Volt για 30 λεπτά.

**Πίνακας 1. Εκκινητές για την ανίχνευση καρβαπενεμασών και ESBL**

Γονίδια	Αλληλουχία εκκινητή (5' 3') →	Μέγεθος προϊόντος	Συνθήκες PCR
<i>bla<sub>KPC</sub></i>	KPC F: TCGCTAAACTCGAACAGG KPC R: TTA CTGCCCCGTTGACGCCCAATCC	780 bp	Denaturation 95° C 5 min 35 cycles 94° C 45 sec 54° C 45 sec 72° C 1 min Elongation 72° C 10 min
<i>bla<sub>VIM</sub></i>	VIM F: ATGGTGT TTGGTCGCATATC VIM R: TGGGCCATT CAGCCAGATC	509 bp	Denaturation 95° C 5 min 35 cycles 94° C 1 min 54° C 1 min 72° C 1 min Elongation 72° C 10 min
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	SHV F: TGGTTATGCGTTATATTCGCC SHV R: GGTTAGCGTTGCCAGTGCT	868 bp	Denaturation 95° C 5 min 35 cycles 94° C 45 sec 54° C 45 sec 72° C 1 min Elongation 72° C 10 min
<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	CTX-M F: TCTTCCAGAATAAGGAATCCC CTX-M R: CCGTTTCCGCTATTACAAAC	909 bp	Denaturation 95° C 5 min 35 cycles 94° C 45 sec 54° C 45 sec 72° C 1 min Elongation 72° C 10 min

## 5.2 Εκχύλιση DNA

Η εκχύλιση του DNA πραγματοποιήθηκε με το kit QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA).

Δύο έως τρεις μεμονωμένες αποικίες εναιωρούνται σε 180 μl λυτικού διαλύματος (ATL Buffer) με ανάδευση για 15sec. Στη συνέχεια προστίθενται 20 μl Proteinase K, γίνεται ανάδευση και επώαση στους 56° C για 2 ώρες και ενδιάμεση ανάδευση έτσι ώστε στο

διάστημα αυτό να επιτυγχάνεται η λύση. Μετά το τέλος της επώασης προστίθενται 200 ml λυτικού διαλύματος (AL Buffer) για να αποδεσμευτούν οι πρωτεΐνες. Σημαντική είναι η ομογενοποίηση του μείγματος με ανάδευση. Ακολουθεί επώαση στους 70<sup>0</sup> C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθενται 200 ml απόλυτης αιθανόλης και το μείγμα αναδεύεται για 15sec. Το ομογενοποιημένο νέο δείγμα μεταφέρεται σε ειδική στήλη εκχύλισης (QIAamp Spin column), η οποία έχει τοποθετηθεί σε ένα σωληνάριο των 2 ml. Η στήλη φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 8000 rpm. Η στήλη μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο και προστίθεται διάλυμα πλύσεως (AW1 και AW2, 500 μl έκαστο) και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 8000 rpm και 3 λεπτά στις 13000 rpm αντίστοιχα. Με μία επιπλέον φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 14000 rpm απομακρύνουμε τα υπολείμματα των διαλυμάτων έκπλυσης. Στο τέλος της διαδικασίας στη στήλη προστίθενται 200 μl διαλύματος έκπλυσης (AE Buffer). Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά, φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 8000 rpm και μεταφορά σε σωληνάριο τύπου Eppendorf και συντήρηση στους -20<sup>0</sup> C μέχρι τη χρήση τους.

### 5.3 Πολυπλεκτική PCR για την ανίχνευση γονιδίων καρβαπενεμασών

Σε επιλεγμένα στελέχη, αντιπροσωπευτικά της συλλογής, πραγματοποιήθηκε πολυπλεκτική PCR για την ανίχνευση γονιδίων καρβαπενεμασών. Η τεχνική αυτή επιτρέπει την ταυτόχρονη ταχεία ανίχνευση διαφορετικών γονιδίων κλινικά σημαντικών καρβαπενεμασών. Συγκεκριμένα περιλαμβάνει 3 αντιδράσεις. Στην πρώτη αντίδραση ανιχνεύονται τα γονίδια *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, στη δεύτερη τα γονίδια *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>BIC</sub> και στην τρίτη τα γονίδια *bla*<sub>AIM</sub>, *bla*<sub>GIM</sub>, *bla*<sub>SIM</sub>, *bla*<sub>DIM</sub> (303). Σε γεωγραφικές περιοχές όπου κάποια από τα παραπάνω γονίδια είναι ενδημικά η τεχνική αυτή μπορεί να εφαρμοστεί με πραγματοποίηση καταρχήν της αντίδρασης που περιλαμβάνει τα αναμενόμενα γονίδια και εκτέλεση των υπολοίπων αντιδράσεων σε περίπτωση που ο αρχικός έλεγχος αποβεί αρνητικός. Σε μη ενδημικές περιοχές η τεχνική επιτρέπει τη διαλογή των στελεχών με μειωμένη ευαισθησία στις καρβαπενέμες.

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκαν και οι τρεις αντιδράσεις. Στη χώρα μας ενδημούν τα γονίδια *bla*<sub>VIM</sub> και *bla*<sub>KPC</sub>. Η παραπάνω τεχνική επέτρεψε και τον έλεγχο των στελεχών για την αναδυόμενη NDM καρβαπενεμάση καθώς και την OXA-48 που ενδημεί σε γειτονικές χώρες, αλλά δεν είχε περιγραφεί στη χώρα μας μέχρι πρόσφατα.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην πολυπλεκτική PCR παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

**Πίνακας 2. Εκκινητές για την ανίχνευση καρβαπενεμασών με πολυπλεκτική PCR**

Γονίδια	Αλληλουχία εκκινητή (5' 3') →	Μέγεθος προϊόντος	Συνθήκες PCR
<i>bla<sub>IMP</sub></i>	IMP-F GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC IMP-R GGTTTAAAYAAAACAACCACC	232 bp	94°C 10 min
<i>bla<sub>SPM</sub></i>	SPM-F AAAATCTGGGTACGCAAACG SPM-R ACATTATCCGCTGGAACAGG	271 bp	36 cycles
<i>bla<sub>AIM</sub></i>	AIM-F CTGAAGGTGTACGGAAACAC AIM-R GTTCGGCCACCTCGAATTG	322 bp	94°C 30 sec
<i>bla<sub>VIM</sub></i>	VIM-F GATGGTGTGGTCGCATA VIM-R CGAATGCGCAGCACCCAG	390 bp	60°C 40 sec 72°C 50 sec
<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	OXA-F GCGTGGTTAAGGATGAACAC OXA-R CATCAAGTTCAACCCAACCG	438 bp	
<i>bla<sub>GIM</sub></i>	GIM-F TCGACACACCTTGGTCTGAA GIM-R AACTTCCAACCTTGCCATGC	477 bp	72°C 5 min
<i>bla<sub>BIC</sub></i>	BIC-F TATGCAGCTCCTTTAAGGGC BIC-R TCATTGGCGGTGCCGTACAC	537 bp	
<i>bla<sub>SIM</sub></i>	SIM-F TACAAGGGATTTCGGCATCG SIM-R TAATGGCCTGTTCCCATGTG	570 bp	
<i>bla<sub>NDM</sub></i>	NDM-F GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC NDM-R CGGAATGGCTCATCACGATC	621 bp	
<i>bla<sub>DIM</sub></i>	DIM-F GCTTGTCTTCGCTTGCTAACG DIM-R CGTTCGGCTGGATTGATTTG	699 bp	
<i>bla<sub>KPC</sub></i>	KPC-Fm CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG KPC-Rm CTTGTCATCCTTGTAGGCG	798 bp	

## 6. Μοριακή τυποποίηση

Ο έλεγχος της κλωνικότητας των στελεχών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο MLST (385), η οποία βασίζεται στην ανάλυση των πολυμορφισμών εσωτερικών τμημάτων της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας επτά housekeeping γονιδίων: *groB* (beta-subunit of RNA polymerase), *gapA* (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), *mdh* (malate dehydrogenase), *pgi* (phosphoglucose isomerase), *phoE* (phosphorine E), *infB* (translation initiation factor 2) και *tonB* (periplasmic energy transducer).

Η μέθοδος διαθέτει υψηλή διακριτική ικανότητα και επιτρέπει τη σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών κέντρων και χωρών. Η μέθοδος αυτή σε συνδυασμό με κλινικά δεδομένα παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τη διασπορά των στελεχών που παράγουν KPC καρβαπενεμάση. Πλεονεκτεί έναντι της ηλεκτροφόρησης σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE), η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατά κύριο λόγο για διερεύνηση επιδημιών σε τοπικό επίπεδο, δεδομένου ότι δύσκολα επιτυγχάνεται διεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα.

Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR και την ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (Πίνακας 3) παραγγέλθηκαν από το Ινστιτούτο Pasteur και τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Ινστιτούτου (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html>). Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν τα χρωματογραφήματα και των δύο αλληλουχιών. Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Lasergene (DNASTAR, Madison, WI, USA). Ο προσδιορισμός του ST τύπου έγινε με εισαγωγή των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών για κάθε γονίδιο στον παραπάνω ιστότοπο.

Η μέθοδος MLST εφαρμόστηκε σε επιλεγμένα μοναδικά για τον ασθενή στελέχη. Σε μικρό αριθμό ασθενών πραγματοποιήθηκε ανάλυση διαδοχικών απομονώσεων, ώστε να διερευνηθεί η ανεύρεση όμοιων ή διαφορετικών ST τύπων. Η επιλογή των στελεχών έγινε έτσι ώστε να προέρχονται από κλινικά σημαντικές λοιμώξεις και να αντιπροσωπεύονται όλα τα νοσηλευτικά τμήματα και όλη η χρονική περίοδος της μελέτης.

**Πίνακας 3. Εκκινητές για την τυποποίηση με τη μέθοδο MLST**

Γονίδια	Αλληλουχία εκκινητή	Μέγεθος προϊόντος
<b>rpoB</b>	<i>rpoB</i> : F : Vic3 : oF : GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGGCGAAATGGCWGAGAACCA <i>rpoB</i> : R : Vic2 : oR : TTGTGAGCGGATAACAATTTTCGAGTCTTCGAAGTTGTAACC	501 bp
<b>gapA</b>	<i>gapA</i> : F : 173 : oF : GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTATGAAATATGACTCCACTCACGG <i>gapA</i> : R : 181 : oR : TTGTGAGCGGATAACAATTTCTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT	450 bp
<b>mdh</b>	<i>mdh</i> : F : 130 : oF : GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACCCAACCTCGCTTCAGGTTTCAG <i>mdh</i> : R : 867 : oR : TTGTGAGCGGATAACAATTTCCCGTTTTTCCCCAGCAGCAG	477 bp
<b>pgi</b>	<i>pgi</i> : F : 1R : oF : GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC <i>pgi</i> : R : 1F : oR : TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT	432 bp
<b>phoE</b>	<i>phoE</i> : F : 604.1 : oF : GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG <i>phoE</i> : R : 604.2 : oR : TTGTGAGCGGATAACAATTTCTGATCAGAAGTGGTAGGTGAT	420 bp
<b>infB</b>	<i>infB</i> : 1F : oF : GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACTCGCTGCTGGACTATATTCG <i>infB</i> : 1R : oR : TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGCTTTCAGCTCAAGAACTTC	318 bp
<b>tonB</b>	<i>tonB</i> : 1F : oF : GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACTTTATACCTCGGTACATCAGGTT <i>tonB</i> : 2R : oR : TTGTGAGCGGATAACAATTTTCATTTCGCCGGCTGRGCRGAGAG	414 bp
<b>Sequenc</b>	Universal sequencing primers	
<b>ing</b>	Forward strand : primer oF : GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA	
<b>primers</b>	Reverse strand : primer oR : TTGTGAGCGGATAACAATTTTC	

**Πίνακας 4. Συνθήκες PCR για την τυποποίηση με τη μέθοδο MLST**

Συνθήκες PCR		
95°C	2 min	
95°C	1 min	
50°C	1 min	30 cycles
72°C	2 min	
72°C	10 min	

## 7. Έλεγχος αποικισμού με λήψη ορθικού επιχρίσματος

Έλεγχος αποικισμού με λήψη ορθικού επιχρίσματος πραγματοποιήθηκε από τον Αύγουστο του 2008 σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο:

- i) Σε όλους τους ασθενείς κατά την εισαγωγή στη ΜΕΘ
- ii) Μία φορά την εβδομάδα στους ασθενείς της ΜΕΘ που το αποτέλεσμα ήταν αρνητικό για ανθεκτικά στις καρβαπενέμες Gram-αρνητικά παθογόνα στον προηγούμενο έλεγχο
- iii) Περιοδικά στους υπόλοιπους ασθενείς της ΜΕΘ για τους οποίους ελήφθη θετικό αποτέλεσμα και νοσηλεύτηκαν επί μακρόν: κάθε εβδομάδα για τον πρώτο μήνα νοσηλείας, κάθε 2 εβδομάδες για τον 2<sup>ο</sup> και 3<sup>ο</sup> μήνα και κάθε μήνα από τον 4ο μήνα και μετά
- iv) Στους ασθενείς που εξήλθαν από τη ΜΕΘ και διακομίστηκαν σε νοσηλευτικά τμήματα του νοσοκομείου
- v) Σε ασθενείς που εισάγονται σε νοσηλευτικά τμήματα και παρουσιάζουν παράγοντες κινδύνου για αποικισμό από πολυανθεκτικά παθογόνα (νοσηλεία πάνω από 2 μέρες τις τελευταίες 90 ημέρες, νοσηλεία σε ΜΕΘ, απευθείας διακομιδή από άλλο νοσοκομείο, διαμονή σε οίκο ευγηρίας, γνωστός αποικισμός από προηγούμενη νοσηλεία στο νοσοκομείο)
- vi) Σε ασθενείς νοσηλευτικών τμημάτων με θετικό κλινικό δείγμα για στέλεχος *K. pneumoniae* με μειωμένη ευαισθησία στις καρβαπενέμες

Επίσης πραγματοποιήθηκε για ένα εξάμηνο (Νοέμβριος 2008 - Απρίλιος 2009) μελέτη ελέγχου φορέας κατά την εισαγωγή σε όλους τους ασθενείς που εισήχθησαν σε μία Παθολογική Κλινική του Νοσοκομείου ανεξαρτήτως παραγόντων κινδύνου για αποικισμό από πολυανθεκτικά παθογόνα. Όλοι οι ασθενείς επανελέγχονταν ανά εβδομάδα νοσηλείας έως την έξοδό τους από το νοσοκομείο.

Σκοπός της προοπτικής αυτής μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της συχνότητας αποικισμού από βακτήρια που παράγουν KPC καρβαπενεμάση και η διερεύνηση των παραγόντων κινδύνου για τον αποικισμό.

Η καλλιέργεια των ορθικών δειγμάτων για απομόνωση Gram-αρνητικών παθογόνων με μειωμένη ευαισθησία στις καρβαπενέμες έγινε σε MC agar με δίσκους ερταπενέμης 10 μg. Επίσης εφαρμόστηκε και αξιολογήθηκε μια νέα μέθοδος που παρέχει ένα απλό φαινοτυπικό αλγόριθμο για την ειδική ανίχνευση του τύπου της καρβαπενεμάσης (KPC

ή/και MBL) χρησιμοποιώντας MC agar με δίσκους μεροπενέμης 10 μg και αναστολείς καρβαπενεμασών.

**i) MC agar με δίσκους ερταπενέμης**

Πραγματοποιήθηκε απευθείας επίστρωση από τον στυλεό σε MC agar με την τεχνική των ενδιάμεσων αραιώσεων και τοποθετήθηκαν δίσκοι ερταπενέμης μεταξύ πρώτης και δεύτερης καθώς και δεύτερης και τρίτης αραιώσης. Ακολούθησε επώαση στους 34-36<sup>0</sup>C για 16-20 ώρες.

Ανάγνωση αποτελέσματος:

Μελετήθηκαν οι αποικίες των βακτηρίων που ζυμώνουν τη λακτόζη [Iac (+)]. Το αποτέλεσμα θεωρήθηκε αρνητικό αν οι Iac (+) αποικίες αναπτύσσονταν σε ζώνη  $\geq 27$  mm γύρω από το δίσκο της ερταπενέμης (263).

Σε θετικό αποτέλεσμα [Iac (+) αποικίες σε ζώνη <27 mm γύρω από το δίσκο της ερταπενέμης] ανακαλλιεργήθηκαν όλες οι διαφορετικές μορφολογικά Iac (+) αποικίες και πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση, έλεγχος ευαισθησίας με τη μέθοδο διάχυσης των δίσκων και φαινοτυπικός έλεγχος παραγωγής καρβαπενεμασών (όπως περιγράφηκε παραπάνω), δεδομένου ότι η μέθοδος δεν παρέχει πληροφορίες για το είδος της καρβαπενεμάσης. Η τυχόν αντοχή στην κολιστίνη επιβεβαιώθηκε με τη μέθοδο των ταινιών διαβαθμισμένης συγκέντρωσης (Etest, bioMérieux).

**ii) MC agar με δίσκους μεροπενέμης και αναστολείς καρβαπενεμασών (MC 4d)**

Έγινε εναιώρηση του στυλεού σε 1 ml φυσιολογικό ορό. Από το εναιώρημα πραγματοποιήθηκε ενοφθαλμισμός σε MC agar (με την τεχνική που ακολουθείται για τη μέθοδο διάχυσης των δίσκων) και τοποθετήθηκαν 4 δίσκοι μεροπενέμης: δίσκος χωρίς αναστολέα, δίσκος με 10 μl EDTA, δίσκος με 20 μl phenylboronic acid (BOR) και δίσκος και με τους 2 αναστολείς. Ακολούθησε επώαση στους 34-36<sup>0</sup>C για 16-20 ώρες.

Ανάγνωση αποτελέσματος:

Μετρήθηκαν οι ζώνες αναστολής γύρω από τους 4 δίσκους για τις Iac (+) αποικίες. Διαφορά στη ζώνη αναστολής  $\geq 5$  mm μεταξύ της μεροπενέμης χωρίς αναστολέα και της μεροπενέμης με αναστολέα (EDTA/ BOR/EDTA+BOR) θεωρήθηκε ενδεικτική της παραγωγής της αντίστοιχης καρβαπενεμάσης (MBL, KPC, MBL+KPC, αντίστοιχα).

Το αποτέλεσμα θεωρήθηκε αρνητικό αν η ζώνη αναστολής της μεροπενέμης χωρίς αναστολέα ήταν  $\geq 27$  mm.



Προκειμένου να αξιολογηθεί η μέθοδος, σε θετικό αποτέλεσμα ανακαλλιεργήθηκαν όλες οι διαφορετικές μορφολογικά Ιac (+) αποικίες από την παρυφή της ζώνης αναστολής της μεροπενέμης με τον αναστολέα και ακολουθήθηκε η παραπάνω διαδικασία για επιβεβαίωση του αποτελέσματος. Επιπλέον ακολούθησε μοριακή επιβεβαίωση του φαινοτυπικού ελέγχου του στελέχους με PCR. Πραγματοποιήθηκε συγκριτική αξιολόγηση της παραπάνω μεθόδου σε σχέση με την απευθείας ανίχνευση των γονιδίων καρβαπενεμασών *bla<sub>KPC</sub>* και *bla<sub>VIM</sub>* από τον ορθικό στυλεό και με τη φαινοτυπική μέθοδο των δίσκων ερταπενέμης, όπου το θετικό αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε επίσης με PCR. Ως αληθώς αρνητικά θεωρήθηκαν τα δείγματα στα οποία τόσο η PCR από τον ορθικό στυλεό, όσο και οι καλλιεργητικές μέθοδοι ήταν αρνητικές για παρουσία καρβαπενεμασών. Ως αληθώς θετικά με τις καλλιεργητικές μεθόδους θεωρήθηκαν τα δείγματα στα οποία ο μοριακός έλεγχος της ύποπτης αποικίας με PCR ήταν θετικός για παρουσία γονιδίου καρβαπενεμάσης. Ως ψευδώς θετικά με τις καλλιεργητικές μεθόδους θεωρήθηκαν τα δείγματα στα οποία ο μοριακός έλεγχος της ύποπτης αποικίας με PCR ήταν αρνητικός για παρουσία γονιδίου καρβαπενεμάσης. Ως ψευδώς αρνητικά με τις καλλιεργητικές μεθόδους θεωρήθηκαν τα δείγματα στα οποία η PCR από τον ορθικό στυλεό ήταν θετική για γονίδια καρβαπενεμασών και η καλλιεργητική μέθοδος δεν ήταν ενδεικτική παρουσίας καρβαπενεμάσης. Ως ψευδώς αρνητικά με την PCR από τον ορθικό στυλεό θεωρήθηκαν τα δείγματα στα οποία η PCR από την ύποπτη αποικία ήταν θετική για γονίδια καρβαπενεμασών και η PCR από τον ορθικό στυλεό αρνητική. Το θετικό ή αρνητικό αποτέλεσμα για αποικισμό από βακτήρια που παράγουν καρβαπενεμάση κοινοποιήθηκε την επόμενη ημέρα δεδομένου ότι στον έλεγχο αποικισμού είναι σημαντική η ταχύτητα κοινοποίησης του θετικού ή αρνητικού αποτελέσματος για τη λήψη των απαραίτητων μέτρων.

## **8. Μέτρα ελέγχου των λοιμώξεων**

Το θετικό αποτέλεσμα της καλλιέργειας κλινικού δείγματος ή/και του ελέγχου φορέας για τους νοσηλεύομενους στα νοσηλευτικά τμήματα εκτός ΜΕΘ γνωστοποιήθηκε στην Επιτροπή Νοσοκομειακών Λοιμώξεων (ΕΝΛ) για τη λήψη κατάλληλων μέτρων ελέγχου των λοιμώξεων (CDC, 2012 CRE Toolkit) :

- i) Νοσηλεία σε μόνωση, όπου ήταν εφικτό ή συν-νοσηλεία (cohorting)

- ii) Ενημέρωση ιατρικού, νοσηλευτικού και λοιπού προσωπικού που ασχολείται με τη φροντίδα του ασθενούς για αυστηρή εφαρμογή βασικών προφυλάξεων και προφυλάξεων επαφή καθόλη τη διάρκεια νοσηλείας του ασθενούς. Θεωρήθηκε ότι οι προφυλάξεις επαφής πρέπει να αίρονται μετά από 3 αρνητικά δείγματα για αποικισμό
- iii) Περιορισμός των μετακινήσεων του ασθενούς στις εντελώς απαραίτητες
- iv) Περιορισμός επισκεπτών καθώς και ενημέρωση και εκπαίδευσή τους στην εφαρμογή των μέτρων υγιεινής που πρέπει να τηρηθούν
- v) Αυστηρή εφαρμογή και επιτήρηση της καθαριότητας και της απολύμανσης των συγκεκριμένων θαλάμων καθώς και του ιατρικού εξοπλισμού που χρησιμοποιείται

## **9. Συλλογή δεδομένων ασθενών**

Η συλλογή των δεδομένων των ασθενών έγινε ανώνυμα με συμπλήρωση προκαθορισμένης φόρμας. Σε κάθε ασθενή δόθηκε ένας μοναδικός κωδικός. Η ενημέρωση της φόρμας πραγματοποιήθηκε από τους φακέλους των ασθενών με καθημερινές επισκέψεις στα αντίστοιχα νοσηλευτικά τμήματα καθόλη τη διάρκεια της νοσηλείας του ασθενούς. Τα κλινικά στοιχεία αξιολογήθηκαν σε συνεργασία με τους θεράποντες ιατρούς του τμήματος και τους λοιμωξιολόγους του νοσοκομείου. Όλοι οι ασθενείς της μελέτης παρακολουθήθηκαν από την εισαγωγή μέχρι την έξοδο από το νοσοκομείο ή το θάνατο.

Η μελέτη ήταν αποκλειστικά μελέτη παρατήρησης και δεν περιελάμβανε οποιαδήποτε παρέμβαση στη θεραπευτική αντιμετώπιση του ασθενούς. Οι αποφάσεις για τη χορήγηση αντιμικροβιακής αγωγής έγινε από τους θεράποντες ιατρούς σε συνεργασία με τη ομάδα των λοιμωξιολόγων του νοσοκομείου.

## **10. Μελέτες ασθενών-μαρτύρων**

Οι μελέτες ασθενών-μαρτύρων αποτελούν ένα τύπο επιδημιολογικών μελετών παρατήρησης στις οποίες άτομα που εμφανίζουν τη νόσο ή την κατάσταση που μελετάμε (ασθενείς, cases) συγκρίνονται με άτομα που δεν εμφανίζουν τη νόσο ή την κατάσταση που μελετάμε (μάρτυρες, controls). Η σύγκριση γίνεται αναφορικά με προηγηθείσα έκθεση σε διάφορους παράγοντες. Η ανεύρεση διαφορών στην έκθεση μεταξύ ασθε-

νών και μαρτύρων βοηθά στην εξεύρεση παραγόντων κινδύνου ή προστατευτικών παραγόντων. Ο σκοπός των μελετών αυτών είναι να καθοριστεί αν υπάρχουν ένας ή περισσότεροι παράγοντες που σχετίζονται με την υπό μελέτη κατάσταση. Καθορίζουν τη σχετική σημαντικότητα ενός προγνωστικού παράγοντα σε σχέση με την παρουσία ή απουσία της υπό μελέτη κατάστασης. Χρησιμοποιούνται για να υπολογιστούν οι λόγοι πιθανοτήτων, που συνήθως προσεγγίζουν το σχετικό κίνδυνο (386). Η χρήση τους είναι πολύ συχνή λόγω της ευκολίας και της ταχύτητας με την οποία μπορεί να μελετηθούν διάφορα κλινικά ερωτήματα. Απαιτούν προσεκτικό και σαφή ορισμό του ασθενούς (case) και του μάρτυρα (control) καθώς και κατάλληλη επιλογή των μαρτύρων. Όταν η επιλογή των μαρτύρων γίνεται από τον ίδιο πληθυσμό επιλογής των ασθενών αναφερόμαστε σε nested case-control μελέτες.

### **10.1 Παράγοντες κινδύνου για εμφάνιση κλινικής λοίμωξης**

Στην συγκεκριμένη ανάλυση επιχειρήθηκε η αναζήτηση παραγόντων που σχετίζονται με την εμφάνιση κλινικής λοίμωξης από στελέχη *Klebsiella pneumoniae* που παράγουν KPC καρβαπενεμάση. Ως «ασθενείς» (cases) ορίστηκαν οι ασθενείς που εμφάνισαν κλινική λοίμωξη, ενώ την ομάδα ελέγχου (μάρτυρες, controls) αποτέλεσαν οι ασθενείς που θεωρήθηκαν αποικισμένοι σύμφωνα με τα κριτήρια ορισμού των λοιμώξεων. Οι δύο ομάδες συγκρίθηκαν ως προς τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά και ως προς μεταβλητές που σχετίζονται με προηγηθείσα χορήγηση αντιμικροβιακών, παρεμβατικές πράξεις, προηγηθείσα έκθεση στο νοσοκομειακό περιβάλλον και προηγηθείσα ορθική φορεία από στελέχη KPC-KP.

### **10.2 Παράγοντες κινδύνου για ορθική φορεία σε ασθενείς Παθολογικού Τμήματος**

Στην ανάλυση αυτή, προκειμένου να διερευνηθούν οι παράγοντες που σχετίζονται με τον αποικισμό από βακτήρια που παράγουν KPC καρβαπενεμάση, συγκρίθηκαν οι ασθενείς που αποικίστηκαν κατά τη διάρκεια της νοσηλείας με ομάδα ελέγχου αποτελούμενη από τους μη αποικισμένους ασθενείς που νοσηλεύτηκαν κατά την ίδια χρονική περίοδο. Η επιλογή των μαρτύρων βασίστηκε στο κριτήριο του χρόνου νοσηλείας. Οι δύο ομάδες συγκρίθηκαν ως προς τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά και ως προς μεταβλητές που σχετίζονται με προηγηθείσα χορήγηση αντιμικροβιακών, παρεμβατικές πράξεις και προηγηθείσα έκθεση στο νοσοκομειακό περιβάλλον.

### 10.3 Παράγοντες κινδύνου για δυσμενή έκβαση σε ασθενείς με βακτηριαμία

Προκειμένου να διερευνηθούν οι παράγοντες κινδύνου για αυξημένη θνητότητα λοίμωξης διενεργήθηκε μελέτη ασθενών-μαρτύρων μεταξύ των ασθενών που απεβίωσαν και των ασθενών που επιβίωσαν από τη λοίμωξη. Δεν συμπεριελήφθη ομάδα ελέγχου ασθενών με απομόνωση ευαίσθητου στις καρβαπενέμες στελέχους *K. pneumoniae* δεδομένου ότι η απομόνωση τέτοιων στελεχών είναι σπάνια για τους βαρέως πάσχοντες ασθενείς και ειδικότερα τους νοσηλευόμενους στη ΜΕΘ, που αποτελούν τον κύριο πληθυσμό της μελέτης. Συγκεκριμένα μόνο 5 επεισόδια βακτηριαμίας από ευαίσθητα στις καρβαπενέμες στελέχη καταγράφηκαν στη ΜΕΘ κατά τη διάρκεια της μελέτης. Οι δύο ομάδες συγκρίθηκαν ως προς τις ακόλουθες μεταβλητές:

- i) Σχετιζόμενες με τον ασθενή (δημογραφικά χαρακτηριστικά, χρόνος νοσηλείας και νοσηλευτικό τμήμα, υποκείμενα νοσήματα, παρεμβατικές πράξεις, προηγηθείσα χορήγηση αντιμικροβιακών, προηγηθείσα έκθεση στο νοσοκομειακό περιβάλλον, APACHE II score κατά την εισαγωγή)
- ii) Σχετιζόμενες με τη λοίμωξη και το βακτηριακό στέλεχος (προέλευση βακτηριαμίας, APACHE II score κατά τη λοίμωξη, παρουσία σοβαρής σήψης ή σηπτικής καταπληξίας, MIC στη μεροπενέμη > 4 μg/ml, αντοχή στην κολιστίνη, μειωμένη ευαισθησία στην τιγκεκυκλίνη)
- iii) Σχετιζόμενες με τη θεραπεία (κατάλληλη εμπειρική αγωγή, κατάλληλη οριστική αντιμικροβιακή αγωγή, έναρξη κατάλληλης αγωγής μέσα σε 3 ημέρες, συνδυασμός αντιμικροβιακών, άλλες θεραπευτικές παρεμβάσεις)

### 10.4 Παράγοντες κινδύνου για εμφάνιση λοίμωξης ή αποικισμού από ανθεκτικό στην κολιστίνη στέλεχος

Η συγκεκριμένη μελέτη ασθενών-μαρτύρων σχεδιάστηκε προκειμένου να διερευνηθούν οι παράγοντες κινδύνου για την απομόνωση ανθεκτικών στην κολιστίνη στελεχών KPC-KP και να προσδιοριστεί η επίδραση της αντοχής στην έκβαση των ασθενών. Στην ομάδα των ασθενών συμπεριελήφθησαν οι νοσηλευόμενοι από τους οποίους απομονώθηκε μοριακά επιβεβαιωμένο στέλεχος KPC-KP με αντοχή στην κολιστίνη (CR). Η επιλογή των μαρτύρων (σε αναλογία 1:2) έγινε μεταξύ των ασθενών από τους οποίους απομονώθηκε μοριακά επιβεβαιωμένο στέλεχος KPC-KP με ευαισθησία στην κολιστίνη

(CS) κατά το ίδιο χρονικό διάστημα και με κριτήρια επιλογής την πηγή απομόνωσης και το νοσηλευτικό τμήμα. Μελετήθηκε ένα στέλεχος ανά ασθενή.

Οι δύο ομάδες συγκρίθηκαν ως προς τις ακόλουθες μεταβλητές:

- i) Σχετιζόμενες με τον ασθενή (όπως αναφέρθηκε παραπάνω και επιπλέον ελέγχθηκε τυχόν προηγηθείς αποικισμός με ανθεκτικό στην κολιστίνη στέλεχος)
- ii) Σχετιζόμενες με τη θεραπεία (όπως αναφέρθηκε παραπάνω) στους ασθενείς με κλινική λοίμωξη
- iii) Σχετιζόμενες με την έκβαση (ολική θνητότητα, θνητότητα 15 ημερών, θνητότητα λοίμωξης, ημέρες από την απομόνωση του υπό μελέτη στελέχους έως το θάνατο)

## 11. Στατιστική ανάλυση

Οι ποσοτικές μεταβλητές εκφράστηκαν ως μέση τιμή  $\pm$  σταθερή απόκλιση (standard deviation, sd), ενώ οι ποιοτικές (κατηγορικές) μεταβλητές παρουσιάστηκαν ως ποσοστά των ομάδων από τις οποίες προήλθαν. Η κανονικότητα της κατανομής για τις ποσοτικές μεταβλητές εκτιμήθηκε με τη δοκιμασία Kolmogorov–Smirnov. Ανάλογα με την κανονικότητα της κατανομής συγκρίθηκαν με το Student t-test ή το Mann–Whitney U-test, όπως ενδείκνυται. Η σύγκριση μεταξύ των κατηγορικών μεταβλητών έγινε με τη χρήση του chi-square test ή του Fisher’s exact test. Υπολογίστηκαν οι λόγοι του πηλίκου συμπληρωματικών πιθανοτήτων (odds ratios, ORs) και τα διαστήματα εμπιστοσύνης (95% confidence intervals, CIs). Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν δοκιμασίες δύο τιμών (two-tailed tests) για να καθοριστεί η στατιστική σημαντικότητα και τιμή  $p \leq 0,05$  θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

Η πολυπαραγοντική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε για την ανάδειξη ανεξάρτητων παραγόντων κινδύνου ή προστατευτικών παραγόντων για τη θνητότητα της λοίμωξης στη μελέτη των βακτηριαιμιών. Εφαρμόστηκε η μέθοδος της λογιστικής παλινδρόμησης (logistic regression). Μεταβλητές με τιμή  $p \leq 0,05$  στην μονοπαραγοντική ανάλυση, εισήχθησαν στο μοντέλο σταδιακά. Η εισαγωγή έγινε σε διαδοχικά βήματα, ξεκινώντας από εκείνη την μεταβλητή που συνδέεται ισχυρότερα με την εξαρτημένη μεταβλητή (forward stepwise approach). Τιμή  $p \leq 0,05$  τέθηκε ως όριο για τη διατήρηση της μεταβλητής στο μοντέλο.

Ομοίως η αναζήτηση ανεξάρτητων παραγόντων σχετιζόμενων με την απομόνωση ανθεκτικού στην κολιστίνη στελέχους KPC-KP πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της λογιστικής παλινδρόμησης και στο μοντέλο εισήχθησαν μεταβλητές με τιμή  $p \leq 0,1$ .

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS (SPSS statistical software version 20, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 1. Στελέχη

#### 1.1 Κατανομή ανά κλινικό υλικό και νοσηλευτικό τμήμα

Κατά τη χρονική περίοδο της μελέτης (5/2008- 11/2010) συνολικά απομονώθηκαν 414 στελέχη *Klebsiella pneumoniae* με μοριακά επιβεβαιωμένη παραγωγή ΚΡC καρβαπενεμάσης (ΚΡC-ΚΡ) από κλινικά δείγματα 185 ασθενών που νοσηλεύτηκαν στο Γ.Ν. Πειραιά «Τζάνειο». Ο αριθμός των διαφορετικών απομονώσεων ανά ασθενή κυμάνθηκε από ένα ως 16 στελέχη. Περισσότερες από δύο απομονώσεις ΚΡC-ΚΡ στελεχών εμφάνισαν 45 ασθενείς. Ο αριθμός των απομονώσεων ανά ασθενή παρουσιάζεται στον Πίνακα 5. Το συνηθέστερο κλινικό υλικό απομόνωσης στο σύνολο των στελεχών ήταν οι καλλιέργειες αίματος (106/414, 25,6%) και ακολουθούν οι κεντρικοί φλεβικοί καθετήρες (ΚΦΓ, 101/404, 24,4%) και τα ούρα (75/414, 18,1%). Η κατανομή των στελεχών ΚΡC-ΚΡ ανά κλινικό υλικό απομόνωσης παρουσιάζεται στον Πίνακα 6.

Η πλειονότητα των ΚΡC-ΚΡ στελεχών απομονώθηκε από ασθενείς της ΜΕΘ (257 στελέχη, 62,1%). Από εξωτερικούς ασθενείς απομονώθηκαν 6 ΚΡC-ΚΡ στελέχη. Η κατανομή ανά κλινική και νοσηλευτικό τομέα παρουσιάζεται στον Πίνακα 7.

Η πρώτη απομόνωση ΚΡC-ΚΡ στελέχους σημειώνεται το Μάιο του 2008. Ο αναδρομικός έλεγχος στελεχών με μειωμένη ευαισθησία στις καρβαπενέμες απέβη αρνητικός για παραγωγή ΚΡC καρβαπενεμάσης.

**Πίνακας 5. Αριθμός απομονώσεων ΚΡC-ΚΡ ανά ασθενή**

Αριθμός απομονώσεων	Αριθμός ασθενών
1	95
2	45
3	17
4	10
5	6
6	4
7	1
8	2
9	1
10	1
13	2
16	1

**Πίνακας 6. Κατανομή των στελεχών ΚΡC-ΚΡ ανά κλινικό υλικό απομόνωσης**

Κλινικό υλικό	Αριθμός στελεχών	%
Αίμα	106	25,6%
ΚΦΓ	101	24,4%
Ούρα	75	18,1%
Βρογχικές εκκρίσεις	47	11,4%
Βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα	2	0,5%
Πτύελα	2	0,5%
Τραύμα	46	11,1%
Έλκη κατακλίσεων	8	1,9%
Διαβητικά έλκη	4	1,0%
Δερματική βλάβη	1	0,2%
Περιτοναϊκό υγρό	5	1,2%
Περιτοναϊκή παροχέτευση	3	0,7%
Πλευριτικό υγρό	4	1,0%
ΕΝΥ	6	1,4%
Stent χοληφόρων	2	0,5%
Κολοστομία	2	0,5%
<b>Σύνολο</b>	<b>414</b>	<b>100%</b>

**Πίνακας 7. Κατανομή των στελεχών και των ασθενών ανά κλινική και νοσηλευτικό τομέα**

Νοσηλευτικός Τομέας	Κλινική	Αριθμός στελεχών (%)	Αριθμός ασθενών (%)
ΜΕΘ		257 (62,1%)	91 (49,2%)
	ΜΕΘ Αναπνευστική	253	88
	Μονάδα Εμφραγμάτων	4	3
Παθολογικός Τομέας		83 (20,0%)	49 (26,5%)
	Α΄ Παθολογική	32	19
	Β΄ Παθολογική	19	12
	Γ΄ Παθολογική	12	10
	Καρδιολογική	2	2
	Νεφρολογική	18	6
Χειρουργικός Τομέας		68 (16,4%)	40 (21,6%)
	Α΄ Χειρουργική	26	15
	Β΄ Χειρουργική	10	4
	Γ΄ Χειρουργική	6	3
	Νευροχειρουργική	14	8
	Ορθοπαιδική	3	2
	Ουρολογική	9	8
Εξωτερικοί ασθενείς		6 (2,7%)	5 (2,7%)
<b>Σύνολο</b>		<b>414</b>	<b>185</b>



## 1.2 Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας

Όλα τα στελέχη παρουσίασαν μειωμένη ευαισθησία στις καρβαπενέμες. Οι τιμές MIC στην ιμιπενέμη, μεροπενέμη και ερταπενέμη κυμάνθηκαν από 1 - >32, 1 - >32 και 4 - >32 μg/ml, αντίστοιχα. Τιμές MIC στη ιμιπενέμη και στη μεροπενέμη  $\leq$  4 μg/ml εμφάνισαν το 19,8% (82/414) και το 31,9% (132/414) των στελεχών αντίστοιχα.

Όλα τα στελέχη ήταν ανθεκτικά στα υπόλοιπα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Ένα στέλεχος παρουσίασε ευαισθησία στις κινολόνες. Από τις αμινογλυκοσίδες, μεγαλύτερη *in vitro* δραστηριότητα παρουσιάζει η γενταμικίνη (ευαισθησία 86,7%), ενώ πολύ μικρός αριθμός στελεχών παρουσιάζει ευαισθησία στις λοιπές αμινογλυκοσίδες. Την υψηλότερη *in vitro* δραστηριότητα εμφανίζουν η φωσφομυκίνη και η τιγκεκυκλίνη (ευαισθησία 96,8% και 95,4%) και ακολουθούν η γενταμικίνη, η κολιστίνη και η τετρακυκλίνη (79,5% και 63,3%). Τα αποτελέσματα του ελέγχου ευαισθησίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.

**Πίνακας 8. Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας**

Αντιβιοτικά	Ε	ΜΕ	Α
	Αριθμός στελεχών (%)		
Ιμιπενέμη	4 (1)	19 (4,6)	391 (94,4)
Μεροπενέμη	37 (8,2)	57 (13,8)	323 (78)
Ερταπενέμη	0 (0,0)	0 (0,0)	414 (100)
Γενταμικίνη	359 (86,7)	6 (1,4)	49 (11,8)
Αμικασίνη	38 (9,2)	4 (1,0)	372 (89,9)
Νετιλμυκίνη	11 (2,7)	0 (0,0)	403 (97,3)
Τομπραμυκίνη	9 (2,2)	0 (0,0)	405 (97,8)
Σιπροφλοξασίνη	1 (0,2)	0 (0,0)	413 (99,8)
Τετρακυκλίνη	262 (63,3)	0 (0,0)	152 (36,7)
Τιγκεκυκλίνη	395 (95,4)	17 (4,1)	2 (0,5)
Κολιστίνη	329 (79,5)	0 (0,0)	85 (20,5)
Κοτριμοξαζόλη	16 (3,9)	0 (0,0)	398 (96,1)
Φωσφομυκίνη <sup>1</sup>	122 (93,8)	0 (0,0)	8 (6,2)

<sup>1</sup>Έλεγχος της δραστηριότητας της φωσφομυκίνης πραγματοποιήθηκε σε 130 μοναδικά για τον ασθενή στελέχη

Τα τελευταία χρόνια η φωσφομυκίνη επανήλθε στο προσκήνιο για τη θεραπεία συστηματικών λοιμώξεων προκαλούμενων από πολυανθεκτικά παθογόνα στα πλαίσια συνδυαστικής θεραπείας. Όμως, η δυνητική ανάπτυξη αντοχής κατά τη διάρκεια της θεραπείας και η επιλογή ανθεκτικών μεταλλακτών θέτει ένα σημαντικό προβληματισμό. Με αυτό το δεδομένο ελέγχθηκαν οι τιμές MIC των στελεχών που απομονώθηκαν προ και μετά τη χορήγηση φωσφομυκίνης στους 7 ασθενείς που χορηγήθηκε φωσφομυκίνη θεραπευτικά κατά τη διάρκεια της μελέτης. Όλα τα απομονωθέντα στελέχη προ της χορήγησης φωσφομυκίνης παρουσίασαν τιμές MIC στη φωσφομυκίνη από 2-32 µg/ml. Ανάπτυξη αντοχής με τιμές MIC > 256 µg/ml παρατηρήθηκε σε δύο περιπτώσεις μετά από χορήγηση φωσφομυκίνης για 17 και 24 ημέρες αντίστοιχα.

### **1.2.1 Αποτελέσματα μελέτης συγκριτικής αξιολόγησης των μεθόδων ελέγχου ευαισθησίας στην τιγκεκυκλίνη**

Οι 4 μέθοδοι ελέγχου της ευαισθησίας στην τιγκεκυκλίνη (BMD, Vitek 2, Etest και MTS) εφαρμόστηκαν σε 86 μοναδικά για τον ασθενή στελέχη που παρήγαγαν KPC καρβαπενεμάση. Από αυτά τα 13 παρήγαγαν εκτός από KPC καρβαπενεμάση και VIM καρβαπενεμάση.

Με τη μέθοδο αναφοράς (BMD) το 81,4% (70/86) των στελεχών εμφάνισαν ευαισθησία στην τιγκεκυκλίνη σύμφωνα με τα όρια ευαισθησίας του FDA. Παρόμοια ήταν το ποσοστό ευαισθησίας και με τη μέθοδο του Etest (82,6%, 71/86), το οποίο επιτυγχάνει υψηλό ποσοστό συμφωνίας στην κατηγοριοποίηση (94,2%). Αντίθετα, με το Vitek 2 το ποσοστό ευαισθησίας ήταν σημαντικά μειωμένο (44,2% , 38/86) με αποτέλεσμα η συμφωνία στην κατηγοριοποίηση να μην ξεπερνά το 50%. Το MTS παρουσίασε υψηλότερο ποσοστό ευαισθησίας σε σχέση με τη μέθοδο αναφοράς (98,8%, 85/86) και η συμφωνία στην κατηγοριοποίηση ήταν 81,4%. Τα αποτελέσματα του ελέγχου ευαισθησίας στην τιγκεκυκλίνη και οι MIC<sub>50</sub> και MIC<sub>90</sub> όπως προσδιορίστηκαν με τις μεθόδους BMD, Vitek 2, Etest και MTS παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.

Οι τιμές MIC που ελήφθησαν με το MTS ήταν 1, 2 και 3 υποδιπλάσιες αραιώσεις χαμηλότερες συγκρινόμενες με τη μέθοδο BMD για το 61,6%, 14% και 1,2% των στελεχών, αντίστοιχα. Σε αντιδιαστολή, το Vitek 2 συγκρινόμενο με τη μέθοδο BMD, παρήγαγε τιμές MIC που ήταν 1, 2, 3 υποδιπλάσιες αραιώσεις υψηλότερες στο 47,7%, 41,9% και 1,2% των στελεχών, αντίστοιχα. Οι τιμές MIC που ελήφθησαν με το Etest ήταν ταυτό-

σημες με τη μέθοδο BMD για το 53,5% των στελεχών και το υπόλοιπο 44,2% των στελεχών εμφάνισε τιμές MIC με  $\pm$  μια αραιώση διαφορά. Οι διαφορές στις υποδιπλάσιες αραιώσεις των τιμών MIC που ελήφθησαν με τις υπό εκτίμηση μεθόδους σε σύγκριση με τη μέθοδο BMD παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.

Με το Etest δεν παρουσιάζονται μέγιστα και μείζονα σφάλματα και το ποσοστό των ελασσόνων σφαλμάτων είναι χαμηλό (5,8%). Με το Vitek 2 δεν αναδεικνύονται μέγιστα σφάλματα, όμως τα ποσοστά μειζόνων και ελασσόνων σφαλμάτων είναι υψηλά (19,8% και 55,8% αντίστοιχα). Το MTS δεν εμφανίζει μείζονα σφάλματα, όμως αναδείχθηκε ένα μέγιστο σφάλμα (0,8%) και υψηλό ποσοστό ελασσόνων σφαλμάτων (17,4%). Η βασική συμφωνία (EA), η συμφωνία στη κατηγοριοποίηση (CA) και οι τύποι σφαλμάτων που παράγονται στον έλεγχο της ευαισθησίας στην τιγκεκυκλίνη με το Vitek 2, το Etest και το MTS σε σύγκριση με τη μέθοδο BMD παρουσιάζονται στον Πίνακα 11.

**Πίνακας 9. Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας στην τιγκεκυκλίνη και MIC<sub>50</sub> και MIC<sub>90</sub> όπως προσδιορίστηκαν με τις μεθόδους BMD, Vitek 2, Etest και MTS**

Μέθοδος	Αριθμός στελεχών (%)						MIC <sub>50</sub> (μg/ml)	MIC <sub>90</sub> (μg/ml)
	Ευαίσθητα		Μετρίως Ευαίσθητα		Ανθεκτικά			
	FDA	EUCAST	FDA	EUCAST	FDA	EUCAST		
<b>BMD</b>	70 (81,4)	54 (62,8)	14 (16,3)	16 (18,6)	2 (2,3)	16 (18,6)	1	4
<b>VITEK 2</b>	38 (44,2)	4 (4,7)	28 (32,6)	34 (39,5)	20 (23,3)	48 (55,8)	4	≥ 8
<b>Etest</b>	71 (82,6)	36 (41,9)	13 (15,1)	34 (39,5)	2 (2,3)	16 (18,6)	2	4
<b>MTS</b>	85 (98,8)	74 (86,0)	1 (1,2)	11 (12,8)	0 (0,0)	1 (1,2)	1	2

**Πίνακας 10. Διαφορές στις υποδιπλάσιες αραιώσεις των τιμών MIC που ελήφθησαν με το Vitek 2, το Etest και το MTS σε σύγκριση με τη μέθοδο BMD**

Μέθοδος	Αριθμός στελεχών (%)						
	-3	-2	-1	0	1	2	3
<b>VITEK 2</b>				8 (9,3)	41 (47,7)	36 (41,9)	1 (1,2)
<b>Etest</b>		1 (1,2)	10 (11,6)	46 (53,5)	28 (32,6)	1 (1,2)	
<b>MTS</b>	1 (1,2)	12 (14,0)	53 (61,6)	20 (23,3)			

**Πίνακας 11. Βασική συμφωνία (EA), συμφωνία στη κατηγοριοποίηση (CA) και τύποι σφαλμάτων που παράγονται στον έλεγχο της ευαισθησίας στην τιγκεκυκλίνη με το Vitek2, το Etest και το MTS σε σύγκριση με τη μέθοδο BMD.**

Μέθοδος	EA No (%)	CA		No (%) Σφαλμάτων					
		No (%)		VME <sup>α</sup>		ME <sup>β</sup>		mE <sup>γ</sup>	
		FDA	EUCAST	FDA	EUCAST	FDA	EUCAST	FDA	EUCAST
<b>VITEK2</b>	49 (57,0)	43 (50,0)	21 (24,4)	0 (0)	0 (0)	7 (8,1)	17 (19,8)	36 (41,9)	48 (55,8)
<b>Etest</b>	84 (97,7)	81 (94,2)	61 (70,9)	0 (0)	0 (0)	0 (0,0)	1 (1,2)	5 (5,8)	24 (27,9)
<b>MTS</b>	73 (84,9)	70 (81,4)	55 (64,0)	1 (0,8)	4 (4,7)	0 (0)	0 (0)	15 (17,4)	27 (31,4)

<sup>α</sup> VME, very major errors, μέγιστα σφάλματα

<sup>β</sup> ME, major errors, μείζονα σφάλματα

<sup>γ</sup> mE, minor errors, ελάσσονα σφάλματα

### 1.3 Αποτελέσματα φαινοτυπικού ελέγχου παρουσίας καρβαπενεμασών

Σε όλα τα στελέχη το τροποποιημένο Hodge Test για την ανίχνευση της υδρόλυσης των καρβαπενεμών ήταν θετικό.

Η δοκιμασία συνδυασμού των δίσκων καρβαπενεμών με αναστολείς καρβαπενεμασών (EDTA και φαινυλβορονικό οξύ) ήταν ενδεικτική της παραγωγής KPC καρβαπενεμάσης σε 391 στελέχη με διαφορά  $\geq 5$  mm στη διάμετρο της ζώνης αναστολής της μεροπενέμης με φαινυλβορονικό οξύ σε σχέση με τη ζώνη αναστολής της μεροπενέμης χωρίς αναστολέα. Σε 23 στελέχη, η δοκιμασία έδειξε την ταυτόχρονη παραγωγή KPC και VIM καρβαπενεμάσης με αύξηση της διαμέτρου της ζώνης αναστολής μόνο γύρω από το δίσκο της μεροπενέμης με EDTA και φαινυλβορονικό οξύ.

### 1.4 Αποτελέσματα μοριακού ελέγχου παρουσίας καρβαπενεμασών

Σε όλα τα στελέχη εφαρμόστηκε η τεχνική της PCR, με χρήση ειδικών εκκινητών για την ανίχνευση των γονιδίων *bla*<sub>KPC</sub> και *bla*<sub>VIM</sub>. Το γονίδιο *bla*<sub>KPC</sub> ανιχνεύτηκε στο σύνολο των στελεχών. Εκτός από το γονίδιο *bla*<sub>KPC</sub>, 21 στελέχη (5,1%) έφεραν και το γονίδιο *bla*<sub>VIM</sub>. Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων της PCR για το γονίδιο *bla*<sub>KPC</sub> σε 101 μοναδικά για τον ασθενή στελέχη τα οποία ήταν αντιπροσωπευτικά της

συλλογής, έδειξε ότι όλα τα στελέχη έφεραν το γονίδιο *bla*<sub>KPC-2</sub>. Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων της PCR για το γονίδιο *bla*<sub>VIM</sub> έδειξε ότι και τα 21 στελέχη έφεραν το γονίδιο *bla*<sub>VIM-1</sub>.

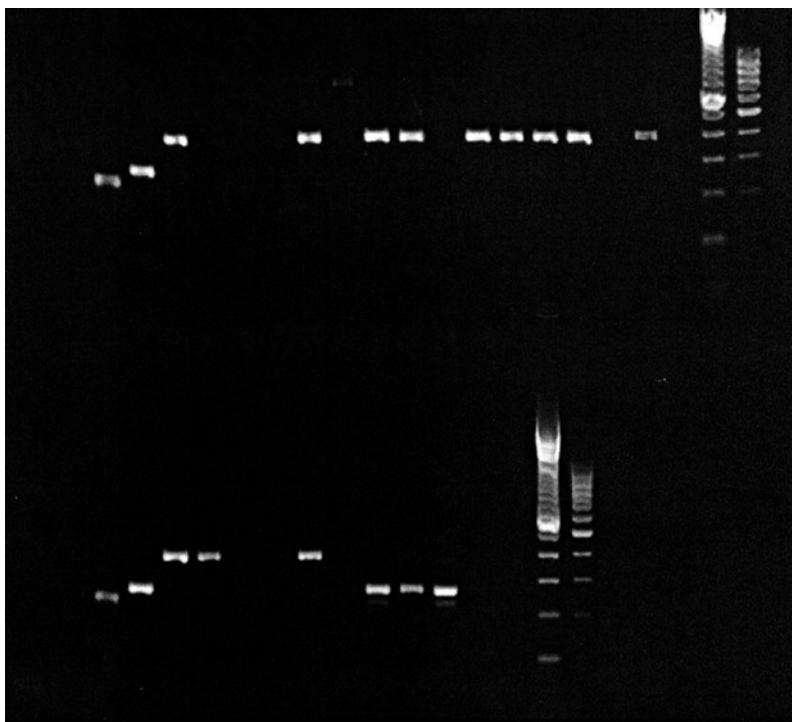
Η πολυπλεκτική PCR πραγματοποιήθηκε στα προαναφερθέντα 101 στελέχη. Με την πολυπλεκτική PCR επιβεβαιώθηκαν τα παραπάνω αποτελέσματα, ενώ δεν ανιχνεύθηκαν γονίδια άλλων καρβαπενεμασών (*bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>BIC</sub>, *bla*<sub>AIM</sub>, *bla*<sub>GIM</sub>, *bla*<sub>SIM</sub> και *bla*<sub>DIM</sub>). Τα αποτελέσματα της πολυπλεκτικής PCR για αντιπροσωπευτικά στελέχη της συλλογής παρουσιάζονται στις Εικόνες 1 και 2.

Τα 21 στελέχη με ταυτόχρονη παραγωγή και των δύο καρβαπενεμασών απομονώθηκαν από 12 ασθενείς από τους οποίους οι 8 ήταν ασθενείς της ΜΕΘ. Το πρώτο τέτοιο στέλεχος απομονώθηκε τον Ιανουάριο του 2010 από ασθενή της ΜΕΘ μετά από 90 ημέρες νοσηλείας. Ακολούθησαν άλλες 12 απομονώσεις από τον ίδιο ασθενή (7/12 στελέχη έφεραν και τα δύο γονίδια).

Ο φαινοτυπικός έλεγχος παρήγαγε ψευδώς θετικά αποτελέσματα για δύο στελέχη τα οποία ταυτοποιήθηκαν ως θετικά για την παραγωγή και των δύο καρβαπενεμασών, αλλά με την PCR ανιχνεύθηκε μόνο το γονίδιο *bla*<sub>KPC</sub> (ευαισθησία για την ταυτόχρονη παρουσία και των δύο γονιδίων 91,3%). Όλα τα θετικά με την PCR στελέχη για τα γονίδια *bla*<sub>KPC</sub> και *bla*<sub>VIM</sub>, ανιχνεύθηκαν με επιτυχία. Η ευαισθησία και η ειδικότητα του φαινοτυπικού ελέγχου για την παραγωγή KPC καρβαπενεμάσης ήταν 100%.

**Εικόνα 1. Πολυπλεκτική PCR, Αντίδραση 1**

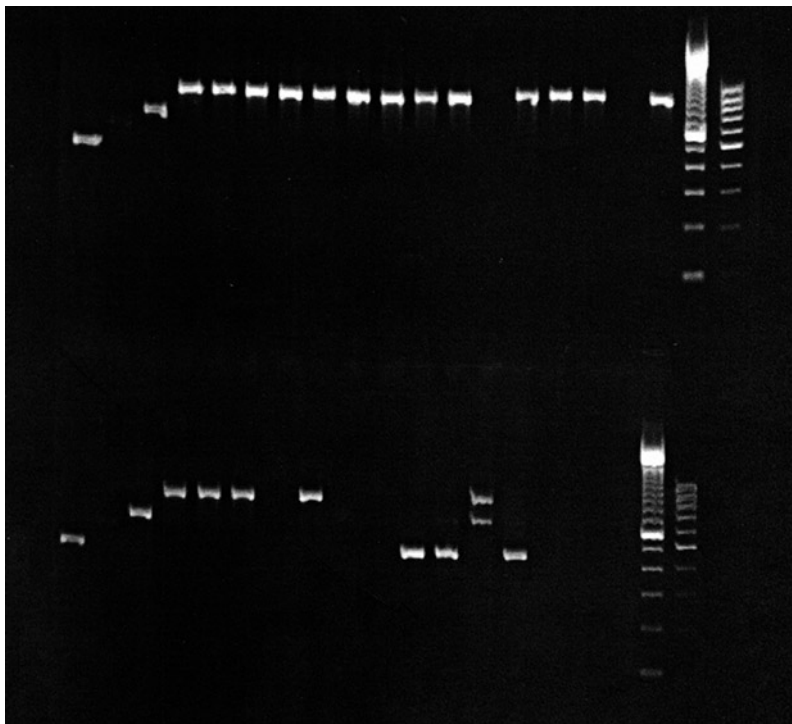
C1 C2 C3 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 L MR



C1 C2 C3 16 18 17 19 20 M1 M2 M3 N BL L MR

**Εικόνα 2. Πολυπλεκτική PCR, Αντίδραση 2**

C4 C5 C6 C7 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 L MR



C4 C5 C6 C7 15 16 18 17 19 20 M4 M5 M6 M7 N1 N2 BL L MR

C1: θετικός μάρτυρας για *bla*<sub>IMP</sub>  
C2, M2: θετικός μάρτυρας για *bla*<sub>SPM</sub>  
C3: θετικός μάρτυρας για *bla*<sub>VIM</sub>  
C4, M4, M5: θετικός μάρτυρας για *bla*<sub>OXA-48</sub>  
C5: θετικός μάρτυρας για *bla*<sub>BIC</sub>  
C6: θετικός μάρτυρας για *bla*<sub>NDM</sub>  
C7: θετικός μάρτυρας για *bla*<sub>KPC</sub>  
M1, M3: θετικός μάρτυρας για *bla*<sub>IMP</sub> και *bla*<sub>SPM</sub>  
M6: θετικός μάρτυρας για *bla*<sub>NDM</sub> και *bla*<sub>KPC</sub>  
1-8, 10-12 και 14-17: στελέχη της συλλογής  
9, 19: στελέχη θετικά για *bla*<sub>VIM</sub> που απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια της μελέτης  
13, 18, 20: στελέχη αρνητικά για παραγωγή καρβαπενεμάσης που απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια της μελέτης  
N1, N2: αρνητικοί μάρτυρες  
BL: blank  
L: ladder  
MR: mass ruler  
Τα στελέχη 1-3, 5, 8 και 15-17 είναι θετικά μόνο για *bla*<sub>KPC</sub>  
Τα στελέχη 4, 6, 7, 10, 11, 12, 14 και 16 είναι θετικά για *bla*<sub>KPC</sub> και *bla*<sub>VIM</sub>

### 1.5 Αποτελέσματα μοριακού ελέγχου παρουσίας ESBL

Ανίχνευση γονιδίων ευρέως φάσματος β-λακταμασών τύπου SHV και CTX-M πραγματοποιήθηκε σε 130 αντιπροσωπευτικά στελέχη που απομονώθηκαν από 112 ασθενείς. ESBL τύπου SHV βρέθηκαν σε 108 στελέχη (83,1%), το γονίδιο *bla*<sub>CTX-M</sub> ανιχνεύτηκε σε 4 στελέχη (3,1%), ενώ 4 στελέχη έφεραν ESBL και των δύο τύπων (3,1%).

Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων της PCR για το γονίδιο *bla*<sub>SHV</sub> έδειξε ότι η πλειονότητα των στελεχών έφερε το γονίδιο *bla*<sub>SHV-12</sub> (101/108 στελέχη, 93,5%), ενώ 7 στελέχη έφεραν το γονίδιο *bla*<sub>SHV-5</sub>.

Και τα 8 θετικά για το γονίδιο *bla*<sub>CTX-M</sub> στελέχη έφεραν το γονίδιο *bla*<sub>CTX-M-15</sub>.

## 1.6 Αξιολόγηση του νέου φαινοτυπικού αλγορίθμου για τον έλεγχο ορθικής φορείας

Η αξιολόγηση του νέου φαινοτυπικού αλγορίθμου για τον έλεγχο ορθικής φορείας πραγματοποιήθηκε σε 92 δείγματα, τα οποία εξετάστηκαν με τις τρεις μεθόδους (MC με δίσκους ερταπενέμης, MC με δίσκους μεροπενέμης και αναστολείς καρβαπενεμασών, PCR απευθείας από τον ορθικό στυλεό). Δείγματα στα οποία αναπτύχθηκε στέλεχος *P. aeruginosa* με παραγωγή καρβαπενεμάσης τύπου VIM ανιχνεύθηκαν με επιτυχία, αλλά εξαιρέθηκαν από την ανάλυση δεδομένου ότι η παρούσα μελέτη στόχευε στην ανίχνευση στελεχών Εντεροβακτηριακών. Στα δείγματα αυτά η PCR απευθείας από τον στυλεό ανίχνευσε την παρουσία του *bla*<sub>VIM</sub> γονιδίου.

Από τα 92 δείγματα, 23 ήταν αληθώς αρνητικά για στελέχη που παράγουν καρβαπενεμάση. Από τα υπόλοιπα 69 θετικά δείγματα, 40 βρέθηκαν θετικά μόνο για στελέχη *K. pneumoniae* που παρήγαγαν καρβαπενεμάση τύπου KPC και 4 ήταν θετικά μόνο για στελέχη που παρήγαγαν καρβαπενεμάση τύπου VIM. Στα υπόλοιπα 25 δείγματα ανιχνεύτηκε παραγωγή και των δύο τύπων καρβαπενεμασών είτε από το ίδιο είτε από διαφορετικά στελέχη.

Ο φαινοτυπικός αλγόριθμος με τους δίσκους μεροπενέμης ανίχνευσε 67/69 θετικά δείγματα (ευαισθησία 97,1%). Η μέθοδος απέτυχε να ανιχνεύσει την παρουσία στελεχών με παραγωγή KPC καρβαπενεμάσης σε δύο δείγματα (ψευδώς αρνητικά), ένα από τα οποία ήταν θετικό για την παρουσία του *bla*<sub>KPC</sub> γονιδίου μόνο με την PCR. Όλα τα αρνητικά δείγματα αναγνωρίστηκαν σωστά (ειδικότητα 100%).

Η ευαισθησία για τη μέθοδο με τους δίσκους ερταπενέμης ήταν 98,6% (68/69). Το ένα ψευδώς αρνητικό δείγμα ήταν θετικό για την παρουσία του *bla*<sub>KPC</sub> γονιδίου μόνο με την PCR. Η μέθοδος αυτή έδωσε ένα ψευδώς θετικό αποτέλεσμα (ειδικότητα 95,7%).

Η PCR απευθείας από τον ορθικό στυλεό εμφάνισε ευαισθησία 94,2% (65/69) και ειδικότητα 100%.

Αναφορικά με την ταυτοποίηση του είδους της καρβαπενεμάσης η μέθοδος του φαινοτυπικού αλγορίθμου ταυτοποίησε σωστά 38/40 δείγματα που ήταν θετικά μόνο για στελέχη *K. pneumoniae* που παρήγαγαν καρβαπενεμάσες τύπου KPC και επίσης και 4/4 δείγματα που ήταν θετικά μόνο για στελέχη *K. pneumoniae* που παρήγαγαν καρβαπενεμάσες τύπου VIM. Διαφορές παρατηρήθηκαν σε 14/25 δείγματα που ήταν θετικά και για τις δύο καρβαπενεμάσες. Σε 12 από αυτά, ο φαινοτυπικός αλγόριθμος ήταν



ενδεικτικός για παραγωγή μόνο KPC καρβαπενεμάσης, ενώ στα υπόλοιπα 2 ήταν ενδεικτικός για παραγωγή μόνο MBL. Συνολικά ταυτοποιήθηκε σωστά η παρουσία και το είδος της καρβαπενεμάσης σε 53/69 δείγματα (76,8%).

Η PCR απευθείας από τον ορθικό στυλεό ανίχνευσε 37/40 που ήταν θετικά μόνο για στελέχη *K. pneumoniae* που παρήγαγαν καρβαπενεμάσες τύπου KPC, 4/4 δείγματα που ήταν θετικά μόνο για στελέχη *K. pneumoniae* που παρήγαγαν καρβαπενεμάσες τύπου VIM και 19/25 δείγματα που ήταν θετικά και για τις δύο καρβαπενεμάσες. Συνολικά ανιχνεύτηκε με ακρίβεια η παρουσία και το είδος της καρβαπενεμάσης σε 60/69 δείγματα (87%).

### 1.7 Αποτελέσματα μοριακής τυποποίησης

Η μέθοδος τυποποίησης MLST εφαρμόστηκε σε 113 στελέχη που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα 101 ασθενών. Σε 5 ασθενείς αναλύθηκαν διαδοχικές απομονώσεις (2-9 στελέχη ανά ασθενή), ώστε να διερευνηθεί η ανεύρεση όμοιων ή διαφορετικών ST τύπων. Η επιλογή των στελεχών έγινε έτσι ώστε να προέρχονται από κλινικά σημαντικές λοιμώξεις και να αντιπροσωπεύονται όλα τα νοσηλευτικά τμήματα και όλη η χρονική περίοδος της μελέτης.

Συνολικά βρέθηκαν 5 ST τύποι με επικρατούντα τύπο τον ST258 (93 στελέχη, 82,3%) που κυριαρχεί στην Ελλάδα και παγκοσμίως. Ακολουθεί ο ST383 (15 στελέχη, 13,3%), ενώ 3 στελέχη ανήκαν στον ST147 και από ένα στους τύπους ST36 και ST340 (single locus variant του ST258). Τα αποτελέσματα της μοριακής τυποποίησης με τη μέθοδο MLST, καθώς και τα χαρακτηριστικά των στελεχών παρουσιάζονται στον Πίνακα 12.

Η εμφάνιση του πρώτου στελέχους του τύπου ST383 σημειώνεται τον Οκτώβριο του 2008 σε δείγμα βρογχικών εκκρίσεων ασθενούς της ΜΕΘ, μετά από 37 ημέρες νοσηλείας. Όλα τα στελέχη που ανήκαν στον τύπο ST383, εκτός από το πρώτο στέλεχος παρήγαγαν εκτός από KPC καρβαπενεμάση και VIM καρβαπενεμάση.

Τα στελέχη των τύπων ST36 και ST340 εμφάνισαν ευαισθησία σε όλες τις αμινογλυκοσίδες. Το στέλεχος του τύπου ST36 απομονώθηκε από ουροκαλλιέργεια ασθενούς Παθολογικής κλινικής τη δεύτερη ημέρα νοσηλείας. Είχαν προηγηθεί δύο νοσηλείες κατά τον προηγούμενο μήνα, σε ιδιωτική κλινική και σε άλλο νοσοκομείο των Αθηνών. Το στέλεχος του τύπου ST340 απομονώθηκε επίσης από ουροκαλλιέργεια ασθενούς της Νεφρολογικής κλινικής τη δεύτερη ημέρα νοσηλείας. Σημειώνεται νοσηλεία σε άλλο

νοσοκομείο της Αττικής προ εβδομάδος. Φαίνεται ότι και τα δύο αυτά στελέχη ήταν εισαγόμενα από άλλα νοσοκομεία. Το πρώτο στέλεχος του τύπου ST147 απομονώθηκε από αιμοκαλλιέργεια ασθενούς της ΜΕΘ μετά από 37 ημέρες νοσηλείας και έφερε μόνο το γονίδιο *bla*<sub>KPC</sub>. Τα δύο επόμενα στελέχη έφεραν τα γονίδια *bla*<sub>KPC</sub> και *bla*<sub>VIM</sub>. Το δεύτερο στέλεχος απομονώθηκε μετά από πολύμηνη νοσηλεία στη ΜΕΘ. Τέλος, το τρίτο στέλεχος, ήταν μάλλον εισαγόμενο, δεδομένου ότι απομονώθηκε από ασθενή που διακομίστηκε από ΜΕΘ άλλου νοσοκομείου και βρέθηκε αποικισμένος κατά την εισαγωγή του.

Από τους 5 ασθενείς (4/5 ασθενείς της ΜΕΘ) στους οποίους ελέγχθηκαν διαδοχικές απομονώσεις (21 στελέχη) οι τρεις έφεραν αποκλειστικά στελέχη του τύπου ST258. Ένας ασθενής έφερε στελέχη δύο διαφορετικών τύπων (ST258, ST383). Τρεις διαφορετικοί ST τύποι (ST383, ST258, ST147) ανιχνεύτηκαν σε 9 διαδοχικές απομονώσεις ενός ασθενούς με την πλειονότητα των στελεχών (7/9) να ανήκει στον τύπο ST383.

**Πίνακας 12. Αποτελέσματα μοριακής τυποποίησης με τη μέθοδο MLST**

ST τύποι	N (%)	Χαρακτηριστικά στελεχών
ST36	1 (0,9%)	Ευαισθησία και στις 4 αμινογλυκοσίδες, ευαισθησία στις κινολόνες Ημερομηνία απομόνωσης 5/10/2010 Κλινική: Παθολογική
ST147	3 (2,7%)	2/3 στελέχη παρήγαγαν KPC και VIM καρβαπενεμάση Ημερομηνία 1 <sup>ης</sup> απομόνωσης 22/8/2009 Κλινική: ΜΕΘ
ST258	93 (82,3%)	Όλα τα στελέχη παρήγαγαν μόνο KPC καρβαπενεμάση
ST340	1 (0,9%)	Ευαισθησία και στις 4 αμινογλυκοσίδες Ημερομηνία 1 <sup>ης</sup> απομόνωσης 27/7/2009 Κλινική: Νεφρολογική
ST383	15 (13,3%)	14/15 στελέχη παρήγαγαν KPC και VIM καρβαπενεμάση

## 2. Ασθενείς

Μελετήθηκαν τα χαρακτηριστικά των ασθενών από τους οποίους απομονώθηκε τουλάχιστον ένα στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* με μοριακά επιβεβαιωμένη παραγωγή KPC καρβαπενεμάσης (KPC-KP) από κλινικό δείγμα, κατά το χρονικό διάστημα της μελέτης. Πλήρη στοιχεία συγκεντρώθηκαν και αναλύθηκαν για 175/185 ασθενείς.

### 2.1 Επιδημική καμπύλη, επίπτωση, επιπολασμός

Ο πρώτος ασθενής που έφερε KPC-KP στέλεχος ανιχνεύτηκε το Μάιο του 2008. Επρόκειτο για ασθενή που διακομίστηκε στη ΜΕΘ, απευθείας από Καρδιοχειρουργική Μονάδα άλλου νοσοκομείου της Αττικής, όπου νοσηλευόταν για 20 ημέρες. Η απομόνωση του KPC-KP στελέχους σημειώθηκε την 7<sup>η</sup> ημέρα νοσηλείας. Δεν πραγματοποιήθηκε έλεγχος ορθικής φορέας κατά την εισαγωγή, ώστε να διαπιστωθεί αν το στέλεχος ήταν εισαγόμενο.

Έως το τέλος του 2008, KPC-KP στελέχη απομονώθηκαν από 33 ασθενείς. Αυξημένη καταγραφή περιστατικών στο σύνολο των νοσηλευτικών τμημάτων παρατηρείται κατά το πρώτο εξάμηνο του 2010, ενώ το επόμενο εξάμηνο επέρχεται σημαντική μείωση. Η καταγραφή νέων περιστατικών στη ΜΕΘ, παρουσιάζει μικρές αυξομειώσεις κατά τη διάρκεια της μελέτης, με εξαίρεση το δεύτερο εξάμηνο του 2010, που επίσης παρατηρείται μείωση των νέων περιστατικών. Η κατανομή των νέων ασθενών με απομόνωση KPC-KP στελέχους τόσο στο σύνολο των νοσηλευτικών τμημάτων, όσο και αποκλειστικά στη ΜΕΘ, ανά εξάμηνο (S1, S2) της μελέτης, παρουσιάζεται στο Γράφημα 1.

Λαμβάνοντας υπόψη τον ετήσιο αριθμό εισαγωγών στο νοσοκομείο, ο επιπολασμός των μοναδικών για τον ασθενή KPC-KP απομονώσεων υπολογίστηκε σε 1,36 ανά 1000 εισαγωγές για το 2008, 3,37 ανά 1000 εισαγωγές για το 2009 και 3,69 ανά 1000 εισαγωγές για το 2010. Εδικά στη ΜΕΘ ο επιπολασμός ήταν 14,17, 30,66 και 36,08 ανά 100 εισαγωγές για τα έτη 2008, 2009 και 2010 αντίστοιχα.

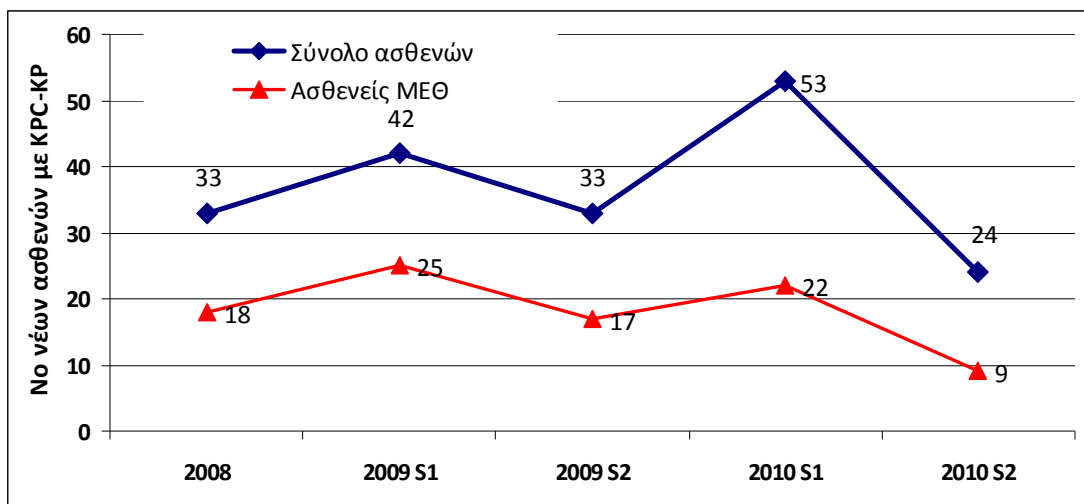
Η επίπτωση στο σύνολο των νοσηλευτικών τμημάτων ήταν 31,09, 74,35 και 86,48 περιπτώσεις ανά 100.000 ασθενονήμερες για τα έτη 2008, 2009 και 2010 αντίστοιχα, παρουσιάζοντας σημαντική αύξηση μεταξύ των ετών 2008 και 2009 ( $p < 0,001$ ). Στη ΜΕΘ, η ετήσια επίπτωση για τα ίδια έτη ήταν 8,86, 18,03 και 16,40 περιπτώσεις ανά 1000 ασθενονήμερες, εμφανίζοντας επίσης σημαντική αύξηση μεταξύ των δύο πρώτων ετών ( $p < 0,001$ ). Το πρώτο έτος της εφαρμογής του Εθνικού Σχεδίου Δράσης «Προκρούστης»

(2011) η ετήσια επίπτωση στο σύνολο των νοσηλευτικών τμημάτων υπολογίστηκε σε 81,26 περιπτώσεις ανά 100.000 ασθενομέρες χωρίς να διαφέρει από την επίπτωση που καταγράφηκε για το 2010 ( $p= 0,76$ ). Αντίθετα στη ΜΕΘ η επίπτωση ήταν 8,10 περιπτώσεις ανά 1000 ασθενομέρες, καταγράφοντας σημαντική μείωση ( $p= 0,003$ ). Η επίπτωση στο σύνολο των νοσηλευτικών τμημάτων και στη ΜΕΘ για τα έτη 2008-2011 παρουσιάζονται στα γραφήματα 2 και 3.

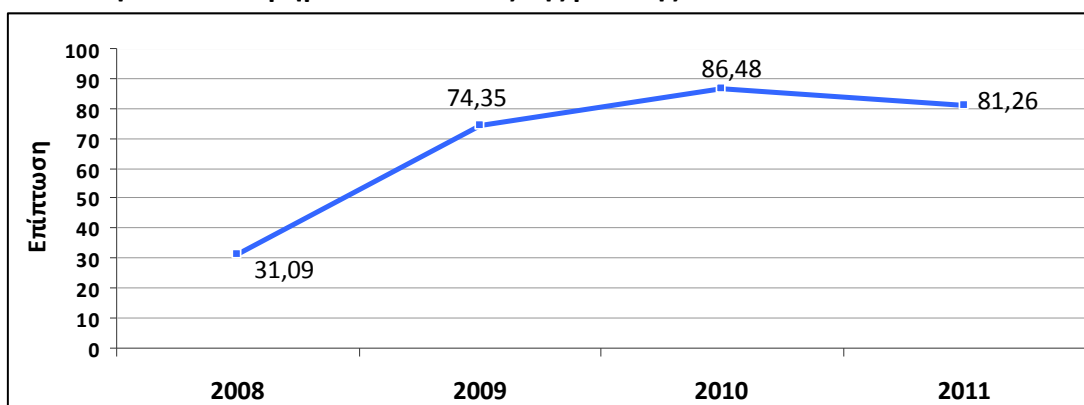
Με βάση το χρόνο νοσηλείας (>48 ωρών), σε 139 ασθενείς (77,2% των νοσηλευόμενων ασθενών) το κλινικό στέλεχος πιθανά αποκτήθηκε ενδονοσοκομειακά κατά τη διάρκεια της παρούσας νοσηλείας. Όμως, βρέθηκε ότι επιπλέον 14 ασθενείς ήταν αποικισμένοι στο γαστρεντερικό με ΚΡC-ΚΡ στέλεχος, έτσι το ποσοστό της ενδονοσοκομειακής απόκτησης υπολογίζεται σε 69,4%. Το ποσοστό αυτό ενδέχεται να είναι μικρότερο, δεδομένου ότι έλεγχος φορέας κατά την εισαγωγή δεν πραγματοποιήθηκε σε όλους τους ασθενείς. Στους υπόλοιπους 41 νοσηλευόμενους ασθενείς η απομόνωση σημειώθηκε τις πρώτες 48 ώρες της νοσηλείας. Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις η απόκτηση του στελέχους σχετίστηκε με τις υπηρεσίες υγείας (healthcare associated) και συγκεκριμένα οι 22 διακομίστηκαν απευθείας από άλλα νοσηλευτικά ιδρύματα και οι 19 είχαν πρόσφατες νοσηλείες. Ο αριθμός των εισαγόμενων περιπτώσεων με βάση τα προαναφερθέντα κριτήρια, σε σχέση με τις περιπτώσεις που τα στελέχη αποκτήθηκαν ενδονοσοκομειακά ανά έτος της μελέτης, παρουσιάζονται στα Γραφήματα 4 (σύνολο νοσηλευτικών τμημάτων) και 5 (ΜΕΘ). Το ποσοστό των εισαγόμενων περιπτώσεων επί του συνόλου των ασθενών με απομόνωση ΚΡC-ΚΡ στελέχους παρουσιάζει αύξηση μεταξύ των ετών 2008-2009 (12,9% και 32,4% αντίστοιχα,  $p= 0,068$ ), ενώ μικρή αύξηση σημειώνεται για το 2010 (36,0%,  $p= 0,77$ ).

ΚΡC-ΚΡ στελέχη απομονώθηκαν και από 5 εξωτερικούς ασθενείς (σε 3 ασθενείς από ουροκαλλιέργειες, σε έναν ασθενή από διαβητικό έλκος και σε έναν από έλκος κατάκλισης). Οι 4 από αυτούς ανέφεραν πρόσφατες νοσηλείες και ένας ασθενής μακρά χρήση (> 4 εβδομάδες) αντιμικροβιακών ευρέως φάσματος κατά το προηγούμενο τρίμηνο, ενώ είχε υποβληθεί στο παρελθόν και σε βιοψία προστάτη.

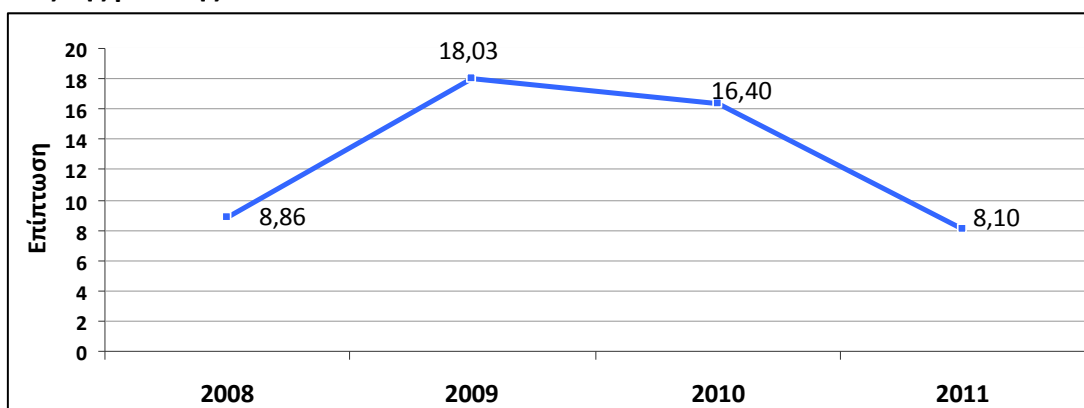
**Γράφημα 1. Νέοι ασθενείς με απομόνωση ΚΡC-ΚΡ στελέχους στο σύνολο των νοσηλευτικών τμημάτων και στη ΜΕΘ, ανά εξάμηνο της μελέτης**



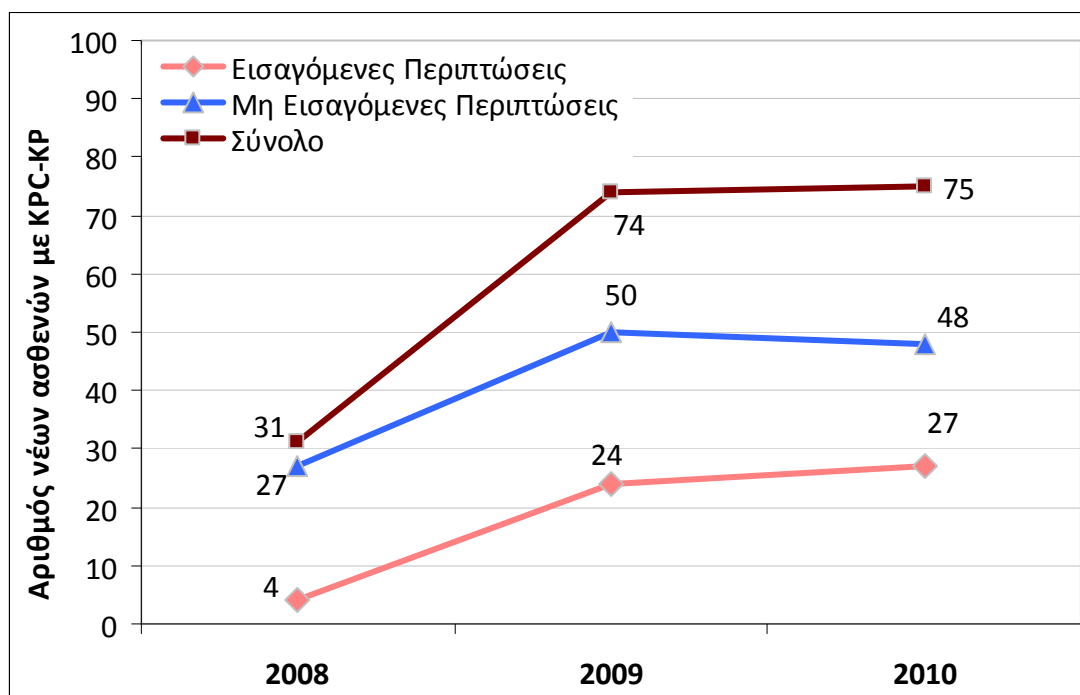
**Γράφημα 2. Επίπτωση των ΚΡC-ΚΡ στελεχών ανά 100.000 ασθενοημέρες στο σύνολο των νοσηλευτικών τμημάτων ανά έτος της μελέτης**



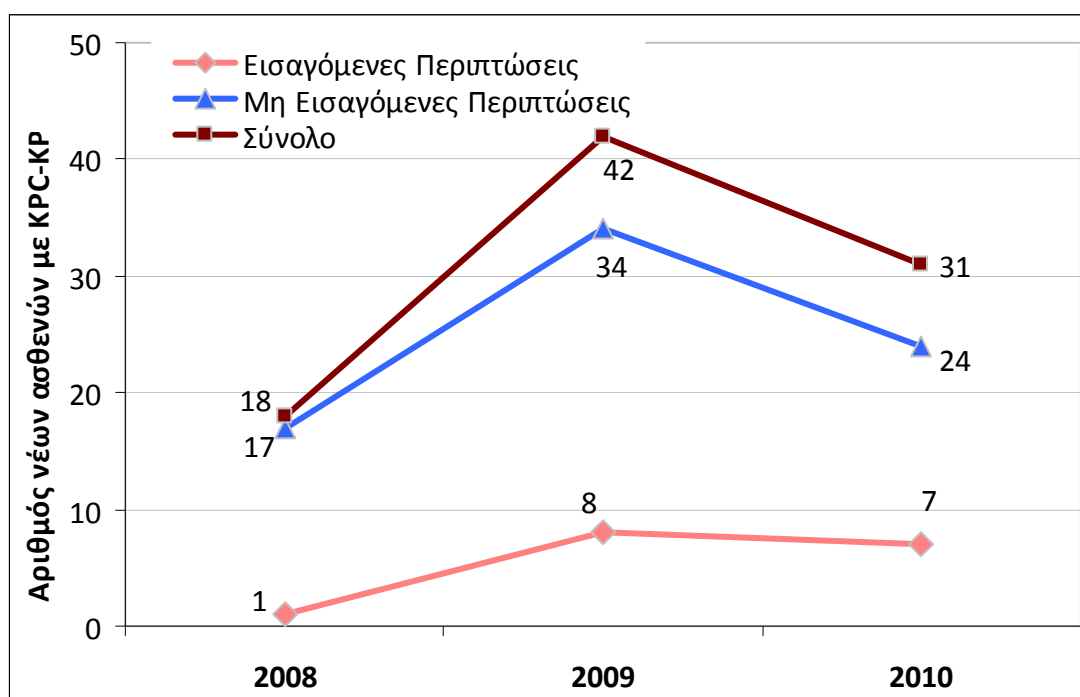
**Γράφημα 3. Επίπτωση των ΚΡC-ΚΡ στελεχών ανά 1000 ασθενοημέρες στη ΜΕΘ ανά έτος της μελέτης**



**Γράφημα 4. Εισαγόμενες περιπτώσεις στο σύνολο των νοσηλευτικών τμημάτων ανά έτος της μελέτης**



**Γράφημα 5. Εισαγόμενες περιπτώσεις στη ΜΕΘ ανά έτος της μελέτης**



## **2.2 Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά**

Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 63 έτη και η πλειονότητα αυτών ήταν άνδρες (104/175, 59,4%). Οι περισσότεροι ασθενείς που έφεραν ΚΡC-ΚΡ στελέχη νοσηλευόταν στη ΜΕΘ (91/175, 52%) και ακολουθούν τα τμήματα του Παθολογικού Τομέα.

Ο μέσος χρόνος νοσηλείας έως την απομόνωση του πρώτου ΚΡC-ΚΡ στελέχους ήταν 15,65 ημέρες. Η πλειοψηφία των ασθενών (104, 59,4%) εμφάνιζε περισσότερα από δύο υποκείμενα νοσήματα, με συνηθέστερα τα καρδιαγγειακά νοσήματα, το σακχαρώδη διαβήτη και τη νεφρική ανεπάρκεια. Περισσότεροι από τους μισούς ασθενείς (53,7%) είχαν υποβληθεί σε χειρουργική επέμβαση κατά το προηγούμενο της απομόνωσης έτος. Τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των 175 ασθενών από τους οποίους απομονώθηκε στέλεχος ΚΡC-ΚΡ παρουσιάζονται στον Πίνακα 13.

**Πίνακας 13. Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των 175 ασθενών από τους οποίους απομονώθηκε στέλεχος KPC-KP**

Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά	N (%)
	Μέση τιμή ± Σταθερή απόκλιση
Ηλικία, έτη	63,02 ± 19,84
Άρρεν φύλο	104 (59,4)
Χρόνος νοσηλείας, ημέρες	15,65 ± 16,30
<i>Νοσηλευτικό Τμήμα</i>	
ΜΕΘ	91 (52,0)
Παθολογικός Τομέας	47 (26,9)
Χειρουργικός Τομέας	32 (18,3)
Εξωτερικός ασθενής	5 (2,9)
<i>Υποκείμενα νοσήματα</i>	
Υποκείμενα νοσήματα >2	104 (59,4)
Κρανιοεγκεφαλική κάκωση	29 (16,6)
Πολυτραυματίας	20 (11,4)
ΑΕΕ	27 (15,4)
Καρδιαγγειακά νοσήματα	89 (50,9)
ΧΑΠ	17 (9,7)
Σακχαρώδης διαβήτης	35 (20,0)
Κακοήθεια	29 (16,6)
Νεφρική ανεπάρκεια	36 (20,6)
Νοσήματα ήπατος και γαστρεντερικού	25 (14,3)
Αιματολογικές διαταραχές	10 (5,7)
Ψυχιατρικά νοσήματα	11 (6,3)
Νευρολογικά νοσήματα	30 (17,1)
Ανοσοκαταστολή	21 (12,0)
Παχυσαρκία	8 (4,6)
Αλκοολισμός	5 (2,9)
Χρήση τοξικών ουσιών	3 (1,7)
Προηγηθείσα χειρουργική επέμβαση	94 (53,7)

### 2.3 Προηγηθείσα χορήγηση αντιμικροβιακών

Η μελέτη της προηγηθείσας χορήγησης αντιμικροβιακών (Πίνακας 14) έδειξε ότι 142/175 ασθενείς (81,1%) είχαν λάβει τουλάχιστον ένα αντιμικροβιακό προ της απομόνωσης του πρώτου KPC-KP στελέχους. Ο αριθμός των διαφορετικών αντιμικροβιακών που είχαν χορηγηθεί κυμάνθηκε από 1-12. Από 1-3 αντιβιοτικά είχαν λάβει 77 ασθενείς (44%), ενώ υψηλό δείκτη έκθεσης σε αντιμικροβιακά (>3) εμφάνισαν 65 ασθενείς (37,1%). Χαρακτηριστικό είναι ότι 10 ασθενείς (5,7%) είχαν λάβει >8 διαφορετικά αντι-



μικροβιακά. Το συνηθέστερα χορηγηθέν αντιβιοτικό ήταν οι συνδυασμοί β-λακταμών με αναστολείς β-λακταμασών (58,3%) και ακολουθούν οι κινολόνες (53,1%). Προηγηθείσα χορήγηση καρβαπενεμών σημειώθηκε σε 50 ασθενείς (28,6%) με μέση διάρκεια χορήγησης 12,93 ημέρες.

**Πίνακας 14. Προηγηθείσα χορήγηση αντιμικροβιακών και διάρκεια αυτής**

Προηγηθείσα χορήγηση αντιμικροβιακών	N (%) Μέση Τιμή ± Σταθερή Απόκλιση (Εύρος)
Χορήγηση τουλάχιστον ενός αντιμικροβιακού	142 (81,1)
Υψηλός δείκτης έκθεσης σε αντιμικροβιακά	65 (37,1)
Κεφαλοσπορίνες β' γενιάς ημέρες	10 (5,7) 7,80±5,22 (2-17)
Κεφαλοσπορίνες γ' /δ' γενιάς ημέρες	38 (21,7) 7,80±5,22 (2-17)
Κινολόνες ημέρες	93 (53,1) 9,43±7,36 (1-42)
Αμινογλυκοσίδες ημέρες	49 (28,0) 8,23±5,00 (2-22)
Καρβαπενέμες ημέρες	50 (28,6) 12,93±9,31 (1-42)
Αζτρεονάμη ημέρες	6 (3,4) 7,67±5,85 (3-19)
Συνδυασμοί β-λακταμών με αναστολείς β-λακταμασών ημέρες	102 (58,3) 10,95±7,55 (2-32)
Κολιστίνη ημέρες	28 (16,0) 13,65±11,04 (1-42)
Τιγκεκυκλίνη ημέρες	22 (12,6) 13,11±9,78 (1-40)
Μετρονιδαζόλη ημέρες	24 (13,7) 10,83±5,88 (4-26)
Γλυκοπεπτίδια ημέρες	50 (28,6) 11,64±8,20 (2-48)
Λινεζολίδη ημέρες	35 (20,0) 12,94±6,61 (1-27)
Αντιμυκητιακά ημέρες	34 (19,4) 15,24±12,69 (2-50)
Κλινταμυκίνη ημέρες	16 (9,1) 8,50±7,12 (2-30)
Κοτριμοξαζόλη ημέρες	2 (1,1) 8,00±5,66 (4-12)

## 2.4 Παρεμβατικές πράξεις

Οι περισσότεροι ασθενείς είχαν υποβληθεί σε ποικίλες παρεμβατικές πράξεις πριν την απομόνωση του πρώτου ΚΡC-ΚΡ στελέχους. Η πλειονότητα αυτών (93,7%) έφερε ουροκαθετήρα, ενώ σχεδόν οι μισοί βρίσκονταν σε μηχανικό αερισμό κατά την απομόνωση (48%). Υψηλό δείκτη παρεμβατικών πράξεων εμφάνισαν 107 ασθενείς (61,1%).

Οι παρεμβατικές πράξεις που προηγήθηκαν της απομόνωσης και η διάρκεια αυτών παρουσιάζεται στον Πίνακα 15.

**Πίνακας 15. Παρεμβατικές πράξεις και διάρκεια αυτών**

Παρεμβατικές πράξεις	N (%)
	Μέση Τιμή ± Σταθερή Απόκλιση (Εύρος)
Μηχανικός αερισμός κατά την απομόνωση	84 (48,0)
Ημέρες	15,55±14,29 (1-95)
Παρουσία ΚΦΓ	107 (61,1)
Ημέρες	16,85±15,97 (1-95)
Παρουσία ουροκαθετήρα	164 (93,7)
Ημέρες	14,45±15,25 (1-95)
Ρινογαστρικός σωλήνας	114 (65,1)
Ξένο σώμα	44 (25,1)
Άλλες θεραπευτικές παρεμβάσεις	77 (44,0)
Χειρουργική επέμβαση μετά την εισαγωγή	47 (26,9)

## 2.5 Προηγηθείσα έκθεση στο νοσοκομειακό περιβάλλον

Απευθείας διακομιδή από άλλο νοσηλευτικό ίδρυμα σημειώνεται για 51 ασθενείς (29,1%), με σημαντικό αριθμό αυτών να διακομίζεται απευθείας από ΜΕΘ (29/51). Επιπλέον, 26 ασθενείς διακομίστηκαν από άλλο νοσηλευτικό τμήμα του νοσοκομείου. Προηγηθείσα νοσηλεία σημειώνεται για 134/175 ασθενείς (76,6%) με μέση διάρκεια που ξεπερνά τις 2 εβδομάδες. Από αυτούς 48 ασθενείς είχαν νοσηλευτεί και σε ΜΕΘ. Τα δεδομένα για την προηγηθείσα έκθεση στο νοσοκομειακό περιβάλλον παρουσιάζονται στον Πίνακα 16.

**Πίνακας 16. Προηγηθείσα έκθεση στο νοσοκομειακό περιβάλλον**

Προηγηθείσα έκθεση στο νοσοκομειακό περιβάλλον	N (%)
	Μέση τιμή ± Σταθερή απόκλιση (εύρος)
Απευθείας διακομιδή από άλλο νοσηλευτικό ίδρυμα	51(29,1)
ΜΕΘ	29(16,6)
Νοσοκομείο	21(12,0)
ΜΦΗ	1(0,6)
Διακομιδή από άλλο νοσηλευτικό τμήμα του νοσοκομείου	26(14,9)
Προηγηθείσα νοσηλεία	134(76,6)
ημέρες	16,86±17,72 (2-120)
ΜΕΘ	22(12,6)
ημέρες	18,29±22,59 (2-120)
Νοσοκομείο	87 (49,7)
ΜΕΘ και Νοσοκομείο	26(14,9)
Προηγηθείσα χειρουργική επέμβαση	94(53,7)

## 2.6 Αποτελέσματα ελέγχου αποικισμού

Έλεγχος αποικισμού με λήψη ορθικού επιχρίσματος, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε (κατά την εισαγωγή και περιοδικά κατά τη διάρκεια της νοσηλείας), πραγματοποιήθηκε σε 81 ασθενείς της μελέτης, εκ των οποίων 52 ήταν ασθενείς ΜΕΘ. Επιπλέον, 29 ασθενείς ελέγχθηκαν μετά την απομόνωση σε κλινικό δείγμα και δεν συμπεριελήφθησαν στην ανάλυση. Ελήφθησαν 1-13 δείγματα ανά ασθενή.

Το 74,1% (60/81) των ασθενών βρέθηκαν αποικισμένοι στο γαστρεντερικό με ΚΡC-ΚΡ στέλεχος, πριν την απομόνωση σε κλινικό δείγμα. Από αυτούς, 33 ασθενείς ήταν αποικισμένοι κατά την εισαγωγή τους στο νοσοκομείο. Ο αποικισμός κατά την εισαγωγή ήταν συχνότερος στους ασθενείς που διακομίστηκαν απευθείας από άλλο νοσηλευτικό ίδρυμα, χωρίς όμως να φτάνει τη στατιστική σημαντικότητα [ $p=0,073$ ,  $OR= 2,42$  (0,98-5,97)]. Ο μέσος χρόνος νοσηλείας έως τον αποικισμό ήταν 6,23 ημέρες, ενώ ο μέσος χρόνος από τον αποικισμό έως την απομόνωση ΚΡC-ΚΡ στελέχους από κλινικό δείγμα ήταν 6,26 ημέρες.

Τα αποτελέσματα του ελέγχου αποικισμού παρουσιάζονται στον Πίνακα 17.

**Πίνακας 17. Αποτελέσματα ελέγχου αποικισμού**

Έλεγχος αποικισμού (N=81)	N (%)
	Μέση τιμή ± Σταθερή απόκλιση (εύρος)
Προηγηθείς αποικισμός	60 (74,1)
Νοσηλευτικό τμήμα	
ΜΕΘ	35 (58,3)
Παθολογικός Τομέας	18 (30,0)
Χειρουργικός Τομέας	7 (11,7)
Κατά την εισαγωγή	33 (30,0)
Ημέρες νοσηλείας έως τον αποικισμό	6,23±8,33 (0-38)
Ημέρες από τον αποικισμό έως την απομόνωση σε κλινικό δείγμα	6,26±12,90 (0-81)

Κατά τη διάρκεια των 3 ετών (10/08-10/11), που εφαρμόστηκε το παραπάνω πρωτόκολλο ελέγχου αποικισμού, μελετήθηκαν 462 ορθικά δείγματα από 266 ασθενείς. Στελέχη *K. pneumoniae* με μειωμένη ευαισθησία στις καρβαπενέμες βρέθηκαν σε 168 ασθενείς (63,2%). Στην πλειονότητα των περιπτώσεων (152/168) επρόκειτο για στελέχη που παρήγαγαν KPC ή KPC και MBL καρβαπενεμάσες, ενώ μόνο 16 ασθενείς έφεραν στελέχη που παρήγαγαν μόνο καρβαπενεμάση τύπου MBL. Από τους 152 ασθενείς, οι 102 (67,1%) ανέπτυξαν τέτοια στελέχη σε κλινικό δείγμα και 65 από αυτούς εμφάνισαν κλινικά σημαντική λοίμωξη με συνηθέστερη τη βακτηραιμία (52 ασθενείς). Ταυτόχρονα αποικισμένοι με άλλο ανθεκτικό στις καρβαπενέμες βακτήριο (συνηθέστερα *P. aeruginosa* ή *A. baumannii*) βρέθηκαν 99 ασθενείς. Συν-αποικισμός με στέλεχος VRE ή *Candida spp*, σημειώθηκε για 42 και 103 ασθενείς αντίστοιχα.

### 2.6.1 Αποτελέσματα προοπτικής μελέτης ελέγχου αποικισμού σε ασθενείς Παθολογικού Τμήματος

Μεταξύ Νοεμβρίου 2008 και Απριλίου 2009, έγινε έλεγχος αποικισμού με λήψη ορθικού επιχρίσματος κατά την εισαγωγή και ανά εβδομάδα νοσηλείας σε όλους τους ασθενείς που εισήχθησαν στην Γ΄ Παθολογική Κλινική. Συνολικά εξετάστηκαν 256 δείγματα από 236 ασθενείς.

Σε 13 ασθενείς (5,5%) αναπτύχθηκαν στελέχη *K. pneumoniae* με μειωμένη ευαισθησία στις καρβαπενέμες στην καλλιέργεια του ορθικού επιχρίσματος. Στελέχη που παρήγαγαν KPC καρβαπενεμάση ανιχνεύτηκαν σε 12 ασθενείς (5,1%, 9 γυναίκες, μέση ηλικία

73 έτη), ενώ ένας ασθενής ήταν αποικισμένος με στέλεχος *K. pneumoniae* που παράγαγε καρβαπενεμάση τύπου MBL.

Μεταξύ των ΚΡC-φορέων, 4 (1,7%) βρέθηκαν αποικισμένοι κατά την εισαγωγή (3 από αυτούς διακομίσθηκαν από ΜΕΘ, ενώ ένας εισήχθη από Κέντρο Φροντίδας Ηλικιωμένων, ΚΦΗ). Οι υπόλοιποι 8 αποικίστηκαν κατά τη διάρκεια της νοσηλείας τους και ένας από αυτούς εμφάνισε κλινική λοίμωξη. Τα χαρακτηριστικά των αποικισμένων ασθενών με ΚΡC-ΚΡ στελέχη παρουσιάζονται στον Πίνακα 18.

Στην ανάλυση που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας σαν ομάδα ελέγχου μη αποικισμένους ασθενείς (Πίνακας 19), οι ακόλουθοι παράγοντες βρέθηκε να σχετίζονται με τον αποικισμό από ΚΡC-ΚΡ: παρουσία >2 υποκείμενων νοσημάτων ( $p=0,03$ ), ΧΝΑ ( $p=0,03$ ) και χορήγηση καρβαπενέμης κατά τη νοσηλεία ( $p=0,01$ ).

**Πίνακας 18. Χαρακτηριστικά των αποικισμένων ασθενών με ΚΡC-ΚΡ στελέχη**

No	Ηλικία Φύλο	Ημέρες νοσηλείας έως τον αποικισμό	Υποκείμενα νοσήματα	Προηγούμενες νοσηλείες	Λοίμωξη
1	59Γ	57	Ηπατική νόσος	ΝΑΙ	SSTI, Χοληφόρων
2	75Γ	22	ΧΝΑ	ΟΧΙ	
3	89Γ	15	ΧΝΑ, ΣΔ	ΟΧΙ	
4	77Γ	8	ΧΝΑ, ΣΔ, Κακοήθεια	ΟΧΙ	
5	53Γ	8	ΣΔ, Κακοήθεια, ΧΕ	ΟΧΙ	
6	86Α	0	ΧΝΑ, ΣΔ	ΜΕΘ (ΑΔ)	
7	69Γ	8		ΚΦΗ	
8	82Α	15	ΣΔ, ΧΑΠ	ΟΧΙ	
9	81Γ	0	ΣΔ	ΜΕΘ (ΑΔ)	Βακτηριαμία
10	69Α	0	ΣΔ, ΧΑΠ	ΜΕΘ (ΑΔ)	Λοίμωξη ανα- πνευστικού
11	85Γ	0	ΣΔ, Κακοήθεια, ΧΕ	ΚΦΗ (ΑΔ)	
12	80Γ	15	ΧΝΑ, ΣΔ, ΧΑΠ	ΟΧΙ	

Γ= Γυναίκα, Α= Άνδρας

ΧΝΑ =Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, ΣΔ= Σακχαρώδης διαβήτης, ΧΑΠ= Χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια

ΑΔ= απευθείας διακομιδή, ΧΕ= Χειρουργική επέμβαση, ΚΦΗ= Κέντρο Φροντίδας Ηλικιωμένων

SSTI= Λοίμωξη δέρματος-μαλακών μορίων

**Πίνακας 19. Παράγοντες κινδύνου για αποικισμό από ΚΡC-ΚΡ στέλεχος**

Μεταβλητές	Αποικισμένοι (N=8)	Μη αποικισμένοι (N=22)	p
Ηλικία (έτη), μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση	73 ± 12,06	72.27 ± 10,96	0,677
Θήλυ φύλο, n (%)	7 (87,5)	10 (45,5)	0,092
Προηγηθείσα νοσηλεία, n (%)	2 (25)	2 (9)	0,284
Υποκείμενα νοσήματα >2, n (%)	5 (62,5)	2 (9)	<b>0,029</b>
Νεφρική ανεπάρκεια, n (%)	4 (50)	2 (9)	<b>0,029</b>
ΣΔ, n (%)	5 (62,5)	6 (27,3)	0,104
Κακοήθεια, n (%)	2 (25)	7 (31,8)	1
ΧΑΠ, n (%)	2 (25)	8 (36,4)	0,682
Χειρουργική επέμβαση, n (%)	1 (13)	2 (9)	1
Προηγηθείσα λήψη αντιβιοτι- κών, n (%)	7 (87,5)	16 (72,7)	0,638
Καρβαπενέμες, n (%)	3 (37,5)	0 (0)	<b>0,014</b>
Κινολόνες, n (%)	2 (25)	5 (22,7)	0,623
β-λακταμικά + αναστολείς, n (%)	3 (37,5)	11 (50)	0,689

**2.7 Κλινικό υλικό πρώτης απομόνωσης και πρώτο επεισόδιο λοίμωξης**

Η ανάλυση των κλινικών υλικών πρώτης απομόνωσης για τους ασθενείς της μελέτης (Πίνακας 20) έδειξε ότι τα συνηθέστερα κλινικά υλικά ήταν οι κεντρικές φλεβικές γραμμές (26,9%) και τα ούρα (26,3%), ακολουθούμενα από τις αιμοκαλλιέργειες (21,1%).

**Πίνακας 20. Κλινικό υλικό πρώτης απομόνωσης ΚΡC-ΚΡ στελέχους**

Κλινικό υλικό	N	%
Αίμα	37	21,1
ΚΦΓ	47	26,9
Ούρα	46	26,3
Τραύμα	18	10,3
Έλκη κατακλίσεων	6	3,4
Διαβητικά έλκη	3	1,7
Βρογχικές εκκρίσεις	12	6,9
Πτύελα	1	0,6
Πλευριτικό υγρό	1	0,6
ΕΝΥ	1	0,6
Περιτοναϊκό υγρό	2	1,1
Stent χοληφόρων	1	0,6

Από τους 175 ασθενείς που μελετήθηκαν, κλινική λοίμωξη εμφάνισαν 95 ασθενείς (54,3%) με συνηθέστερη τη βακτηριαιμία (60, 34,3%). Οι υπόλοιποι ασθενείς, σύμφωνα με τα προαναφερθέντα κριτήρια ορισμού λοιμώξεων, θεωρήθηκαν αποικισμένοι. Περισσότερα από ένα επεισόδια λοιμώξεων παρατηρήθηκαν σε 7 ασθενείς. Τα είδη των λοιμώξεων που καταγράφηκαν στο πρώτο επεισόδιο λοίμωξης παρουσιάζονται στον Πίνακα 21.

**Πίνακας 21. Είδη κλινικών λοιμώξεων από στελέχη ΚΡC-ΚΡ (1<sup>ο</sup> επεισόδιο)**

Κλινική λοίμωξη	N	%
Βακτηριαιμία	60	34,3
Λοίμωξη ουροποιητικού	15	8,6
Λοίμωξη αναπνευστικού	3	1,7
Ενδοκοιλιακή λοίμωξη	6	3,4
Λοίμωξη δέρματος/μαλακών μορίων	7	4,0
Λοίμωξη χειρουργικού τραύματος	3	1,7
Λοίμωξη ΚΝΣ	1	0,6
<b>Σύνολο</b>	<b>95</b>	<b>54,3</b>

## 2.8 Παράγοντες κινδύνου για εμφάνιση κλινικής λοίμωξης

Προκειμένου να προσδιοριστούν οι παράγοντες που σχετίζονται με την εμφάνιση κλινικής λοίμωξης από στελέχη ΚΡC-ΚΡ, συγκρίθηκαν οι ασθενείς που εμφάνισαν κλινική λοίμωξη (N=95), με ομάδα ελέγχου (μάρτυρες, controls) τους ασθενείς που θεωρήθηκαν αποικισμένοι (N=80). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 22.

Η ανάλυση έδειξε ότι οι ασθενείς με κλινική λοίμωξη ήταν μεγαλύτεροι σε ηλικία ( $p=0,034$ ), ενώ ο μέσος χρόνος νοσηλείας και το νοσηλευτικό τμήμα δε διέφερε μεταξύ των δύο ομάδων.

Από την ανάλυση των υποκείμενων νοσημάτων, προέκυψε ότι οι πολυτραυματίες έχουν μικρότερη πιθανότητα ανάπτυξης κλινικής λοίμωξης [ $p=0,030$ , OR=0,32 (0,12-0,87)], ενώ ως προς τα υπόλοιπα υποκείμενα νοσήματα, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων, παρότι η νεφρική ανεπάρκεια και η ΧΑΠ ανευρίσκονται συχνότερα μεταξύ των ασθενών με λοίμωξη. Η παρουσία περισσότερων από δύο υποκείμενων νοσημάτων, επίσης δε σχετίστηκε με την εμφάνιση λοίμωξης.

Η μελέτη της προηγηθείσας χορήγησης αντιμικροβιακών, ανέδειξε τρεις ομάδες αντιμικροβιακών οι οποίες σχετίζονταν σε βαθμό στατιστικά σημαντικό με την ανάπτυξη λοίμωξης: κινολόνες [ $p=0,05$ ,  $OR=1,83$  (1,00-3,35)], αζτρεονάμη ( $p=0,032$ ) και αντιμυκητιακά [ $p=0,013$ ,  $OR=2,82$  (1,23-6,46)]. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη διάρκεια της προηγηθείσας χορήγησης αντιμικροβιακών.

Οι δύο ομάδες δεν διέφεραν ως προς τις παρεμβατικές πράξεις, τη διάρκειά τους και ως προς το δείκτη βαρύτητας παρεμβατικών πράξεων.

Από τις μεταβλητές που σχετίζονται με την προηγηθείσα έκθεση στο νοσοκομειακό περιβάλλον μόνο η διάρκεια της προηγηθείσας νοσηλείας ( $p=0,052$ ) πλησιάζει τη στατιστική σημαντικότητα.

Από τη μελέτη των δεδομένων του προηγηθέντος αποικισμού σε δείγματα ορθικών επιχρισμάτων, αναδεικνύεται ότι ο προηγηθείς αποικισμός και ο αποικισμός κατά την εισαγωγή αποτελεί παράγοντα κινδύνου για εμφάνιση κλινικής λοίμωξης [ $p=0,001$ ,  $OR=6,40$  (2,05-19,98) και  $p=0,007$ ,  $OR=3,75$  (1,47-9,57) αντίστοιχα].

Οι ασθενείς με κλινική λοίμωξη εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη ολική θνητότητα και θνητότητα 15 ημερών [ $p \leq 0,001$ ,  $OR=4,43$  (2,22-8,83) και  $p=0,029$ ,  $OR=3,08$  (1,17-8,15) αντίστοιχα].

Η πολυπαραγοντική ανάλυση έδειξε ότι ανεξάρτητοι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση κλινικής λοίμωξης ήταν η ηλικία [ $p=0,03$ ,  $OR=1,02$  (1,002-1,04)] και η προηγηθείσα χορήγηση αντιμυκητιακών [ $p=0,043$ ,  $OR=3,14$  (1,04-9,50)]. Όταν στο μοντέλο εισήχθησαν και τα δεδομένα του ελέγχου ορθικής φορέας, ο προηγηθείς αποικισμός στο γαστρεντερικό ήταν ο μοναδικός ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου [ $p=0,006$ ,  $OR=10,80$  (1,95-59,77)].

**Πίνακας 22. Παράγοντες κινδύνου για εμφάνιση κλινικής λοίμωξης στους 175 ασθενείς που έφεραν KPC-KP στελέχη**

Μεταβλητές	Ασθενείς με κλινική λοίμωξη n= 95	Ασθενείς χωρίς κλινική λοίμωξη n= 80	OR (95% CI)	p
	N (%), Μέση τιμή±σταθερή απόκλιση			
<b>Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά</b>				
Ηλικία, έτη	65,94±19,05	59,59±20,31	NA	<b>0,034</b>
Άρρεν φύλο	54 (56,8)	50 (62,5)	0,79 (0,43-1,45)	0,537
Χρόνος νοσηλείας, ημέρες	16,00±18,54	15,22±13,14		0,514
Νοσηλεία στη ΜΕΘ	53 (55,8)	38 (47,5)	1,39 (0,77-2,53)	0,291



<sup>1</sup> Υποκείμενα νοσήματα >2	58 (61,1)	47 (58,8)	1,10 (0,60-2,02)	0,877
Πολυτραυματίας	6 (6,3)	14 (17,5)	<b>0,32 (0,12-0,87)</b>	<b>0,030</b>
ΧΑΠ	13 (13,7)	4 (5,0)	3,01 (0,94-9,64)	0,072
Νεφρική ανεπάρκεια	25 (26,3)	11 (13,8)	2,24 (1,02-4,90)	0,060
Νοσήματα ήπατος- γαστρεντερικού	9 (9,5)	16 (20,0)	0,42 (0,17-1,01)	0,054
<b><sup>2</sup>Προηγηθείσα χορήγηση αντιμικροβιακών</b>				
Υψηλός δείκτης έκθεσης	38 (40,0)	27 (33,8)	1,31 (0,70-2,43)	0,434
Κινολόνες	57 (60,0)	36 (45,0)	<b>1,83 (1,00-3,35)</b>	<b>0,050</b>
Αζτρεονάμη	6 (6,3)	0 (0,0)		<b>0,032</b>
Αντιμυκητιακά	25 (26,3)	9 (11,3)	<b>2,82 (1,23-6,46)</b>	<b>0,013</b>
<b>Παρεμβατικές πράξεις</b>				
Υψηλός δείκτης παρεμβατικών πράξεων	63 (66,3)	44 (55,0)	1,61 (0,87-2,97)	0,161
Μηχ. αερισμός κατά την απομό- νωση	50 (52,6)	34 (42,5)	1,50 (0,83-2,74)	0,225
Ημέρες	15,94±16,42	15,03±11,09		0,739
Παρουσία ΚΦΓ	63 (66,3)	44 (55,0)	1,61 (0,87-2,97)	0,161
Ημέρες	17,94±19,35	15,57±10,69		0,743
Παρουσία ουροκαθετήρα	92 (96,8)	72 (90,0)	3,41 (0,87-13,31)	0,115
Ημέρες	14,74±17,58	14,08±11,72		0,447
ΡΙνογαστρικός σωλήνας	64 (67,4)	50 (62,5)	1,24 (0,66-2,31)	0,527
Ξένο σώμα	29 (30,5)	15 (18,8)		0,082
Άλλες θεραπευτικές παρεμβάσεις	44 (46,3)	33 (41,3)	1,90 (0,93-3,88)	0,543
Χειρ/κή επέμβαση μετά την εισα- γωγή	30 (31,6)	17 (21,3)	1,71 (0,86-3,41)	0,170
<b>Προηγηθείσα έκθεση στο νοσοκομειακό περιβάλλον</b>				
Απευθείας διακομιδή	32 (33,7)	19 (23,8)	1,63 (0,84-3,18)	0,182
Προηγηθείσα νοσηλεία	74 (77,9)	60 (75,0)	1,17 (0,58-2,37)	0,721
Ημέρες	18,21±17,07	14,94±18,63		0,052
Νοσηλεία σε ΜΕΘ	30 (31,6)	18 (22,5)	1,59 (0,81-3,14)	0,234
Ημέρες	16,21±17,81	22,43±30,37		0,631
Προηγηθείσα χειρ/κή επέμβαση	50 (52,6)	44 (55,0)	0,91 (0,50-1,65)	0,763
<b>Έκβαση</b>				
Ολική θνητότητα	48 (50,1)	15 (18,8)	4,43 (2,22-8,83)	<b>&lt;0,001</b>
Θνητότητα 15 ημερών	19 (20,0)	6 (7,5)	3,08 (1,17-8,15)	<b>0,029</b>
<b>Έλεγχος ορθικής φορείας<sup>3</sup></b>				
Προηγηθείσα ορθική φορεία	<b>N=45</b>	<b>N=36</b>		
Ορθική φορεία κατά την εισαγωγή	40 (88,9)	20 (55,6)	<b>6,40 (2,05-19,98)</b>	<b>0,001</b>
Ημέρες νοσηλείας έως τον αποι- κισμό στο γαστρεντερικό	23 (54,8)	10 (24,4)	<b>3,75 (1,47-9,57)</b>	<b>0,007</b>
Ημέρες από τον αποικισμό έως την απομόνωση σε κλινικό δείγμα	5,41±7,75	7,75±9,31		0,266
	7,78±15,49	3,45±4,80		0,408

<sup>1</sup>Παρουσιάζονται τα υποκείμενα νοσήματα τα οποία εμφανίζουν  $p < 0,1$

<sup>2</sup>Παρουσιάζονται τα αντιμικροβιακά τα οποία εμφανίζουν  $p < 0,1$

<sup>3</sup>Έλεγχος ορθικής φορείας πραγματοποιήθηκε σε 81 ασθενείς

## 2.9 Έκβαση

Η μελέτη της έκβασης (Πίνακας 23) έδειξε ότι η ολική θνητότητα ήταν 36%, ενώ η θνητότητα της λοίμωξης 32,6% (31/95 ασθενείς με κλινική λοίμωξη).

Μικροβιολογική εκρίζωση σημειώθηκε σε 76 ασθενείς (43,4%).

**Πίνακας 23. Έκβαση των 175 ασθενών που έφεραν ΚΡC-ΚΡ στελέχη**

Έκβαση	N	%
Ολική θνητότητα	63	36,0
Θνητότητα 15 ημερών	25	14,3
Θνητότητα λοίμωξης	31	32,6
<b>Μικροβιολογική έκβαση</b>		
Εκρίζωση	76	43,4
Μικροβιολογική υποτροπή	60	34,3
Μη διαθέσιμες καλλιέργειες	39	22,3

## 3. Κλινικές λοιμώξεις από στελέχη *Klebsiella pneumoniae* που παράγουν ΚΡC καρβαπενεμάση

### 3.1 Βακτηριαιμίες

#### 3.1.1 Παράγοντες που σχετίζονται με τον ασθενή, το βακτηριακό στέλεχος και τη θεραπεία

Η βακτηριαμία, όπως αναφέρθηκε, ήταν η συχνότερη λοίμωξη από στέλεχος ΚΡC-ΚΡ στους ασθενείς της μελέτης. Κατά τη διάρκεια της μελέτης 62 ασθενείς (64,5% άνδρες, μέση ηλικία 63,56 ημέρες) εμφάνισαν βακτηριαμία μετά από μέσο χρόνο νοσηλείας 22,97 ημέρες. Σε 60 από αυτούς, η βακτηριαμία ήταν το πρώτο επεισόδιο κλινικής λοίμωξης. Περισσότερα από ένα βακτηριαμικά επεισόδια παρουσίασαν 7 ασθενείς. Μελετήθηκε το πρώτο βακτηριαμικό επεισόδιο ανά ασθενή.

Η λοίμωξη ήταν νοσοκομειακή για τους 53 ασθενείς (85,5%), ενώ για τους υπόλοιπους 9 ήταν σχετιζόμενη με τις υπηρεσίες υγείας. Συγκεκριμένα 6/9 ασθενείς διακομίστηκαν απευθείας από άλλο νοσηλευτικό ίδρυμα, ενώ οι υπόλοιποι 3 ασθενείς ανέφεραν νοσηλείες κατά το προηγούμενο τρίμηνο.

Ο μεγαλύτερος αριθμός βακτηριαμικών επεισοδίων παρατηρήθηκε το πρώτο εξάμηνο του 2009, ενώ ο μικρότερος αριθμός σημειώθηκε το δεύτερο εξάμηνο του 2010. Το πρώτο εξάμηνο του 2010, ενώ ο συνολικός αριθμός των νέων ασθενών με απομόνωση

KPC-KP στελέχους παρουσιάζει αύξηση, δεν παρατηρείται ανάλογη αύξηση των νέων ασθενών με βακτηριαμία. Η αναλογία των βακτηριαμιών επί του συνόλου των περιπτώσεων παραμένει σταθερή μεταξύ των δύο πρώτων ετών ( $p=0,883$ ) και παρουσιάζεται σημαντικά μειωμένη το 2010 ( $p=0,049$ ). Η κατανομή των νέων ασθενών με βακτηριαμία από KPC-KP στέλεχος ανά εξάμηνο (S1, S2) της μελέτης, παρουσιάζεται στο Γράφημα 6.

Οι περισσότεροι ασθενείς νοσηλεύονταν στη ΜΕΘ (74,2%), είχαν περισσότερα από δύο υποκείμενα νοσήματα (67,7%) με συχνότερα τα καρδιαγγειακά νοσήματα, βρίσκονταν σε μηχανικό αερισμό κατά την απομόνωση (66,1%), έφεραν ουροκαθετήρα (100%), κεντρικό φλεβικό καθετήρα (83,9%) και ρινογαστρικό σωλήνα (79%). Το 74,2% των ασθενών είχε προηγούμενες νοσηλείες με μέση διάρκεια 16,95 ημέρες. Οι ασθενείς είχαν λάβει πολλαπλά αντιμικροβιακά με συχνότερες τις κινολόνες (69,4%) και τους συνδυασμούς β-λακταμών με αναστολείς β-λακταμασών (66,1%). Καρβαπενέμες είχε λάβει το 41,9% των ασθενών με μέση διάρκεια χορήγησης 14,35 ημέρες.

Η μέση τιμή του APACHE II score ήταν υψηλή τόσο κατά την εισαγωγή, όσο και κατά τη λοίμωξη (20,93 και 20,98 αντίστοιχα) και 24 ασθενείς (38,7%) βρίσκονταν σε σοβαρή σήψη ή σηπτική καταπληξία κατά την έναρξη της λοίμωξης. Η προέλευση της βακτηριαμίας καθορίστηκε σε 34 ασθενείς (κεντρικοί φλεβικοί καθετήρες 13, αναπνευστικό 8, ουροποιητικό 8, τραύμα 2, κατακλίσεις 2). Στους υπόλοιπους 28 ασθενείς (45,2%) η βακτηριαμία θεωρήθηκε πρωτοπαθής.

Ο έλεγχος ευαισθησίας των απομονωθέντων στελεχών έδειξε ότι το 96,8% των απομονωθέντων στελεχών εμφάνιζαν ευαισθησία στην γενταμικίνη, 74,2% ήταν ευαίσθητα στην κολιστίνη και 91,9% παρουσίαζαν ευαισθησία στην τιγκεκυκλίνη.

Τιμές MIC στη μεροπενέμη  $> 4 \mu\text{g/ml}$  εμφάνισαν 40 στελέχη (64,5%). Ευαισθησία στην αμικασίνη παρουσίαζαν 3 στελέχη (4,8%).

Δύο στελέχη (3,2%) έφεραν και το γονίδιο *bla<sub>VIM</sub>* εκτός από το γονίδιο *bla<sub>KPC</sub>*.

Τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των 62 ασθενών παρουσιάζονται στον Πίνακα 24. Τα υποκείμενα νοσήματα και η προηγηθείσα έκθεση σε αντιμικροβιακά παρουσιάζονται στους Πίνακες 25 και 26 αντίστοιχα.

**Πίνακας 24. Μονοπαράγοντική ανάλυση των παραγόντων που σχετίζονται με τη θνητότητα της λοίμωξης για τους 62 ασθενείς που εμφάνισαν βακτηριαμία από ΚΡC-ΚΡ στέλεχος**

Μεταβλητές	Σύνολο n = 62	Επιβίωσαν n= 42	Δεν επιβίωσαν n= 20	OR (95% CI)	p
	N (%)				
Μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση (εύρος)					
<b>Σχετιζόμενες με τον ασθενή</b>					
Ηλικία, έτη	63,56±19,56 (18-89)	57,45±20,39	76,40±8,71		<b>&lt;0,001</b>
Άρρεν φύλο	40 (64,5)	27 (64,3)	13 (65,0)	0,97 (0,32-2,95)	1,000
Υποκείμενα νοσήματα >2	42 (67,7)	27 (64,3)	15 (75,0)	1,67 (0,51-5,49)	0,563
Χρόνος νοσηλείας ημέρες	22,97±24,61 (1-128)	25,64±27,98	17,35±14,35		0,474
Νοσηλεία σε ΜΕΘ	46 (74,2)	33 (78,6)	13 (65,0)	0,51 (0,16-1,64)	0,353
ημέρες	25,52±25,38 (1-128)	28,15±27,68	18,85±17,45		0,272
Μηχανικός αερισμός κατά την απομόνωση	41 (66,1)	28 (66,7)	13 (65,0)	0,93 (0,30-2,85)	1,000
ημέρες	21,23±17,24 (1-95)	22,06±18,60	19,23±13,95		0,797
Παρουσία ΚΦΓ	52 (83,9)	37 (88,1)	15 (75,0)	0,41 (0,10-1,61)	0,269
Ουροκαθετήρας	62 (100,0)	42 (100)	20 (100)	NA	
Ρινογαστρικός σωλήνας	49 (79,0)	35 (83,3)	14 (70,0)	0,47 (0,13-1,64)	0,318
Άλλες θεραπευτικές παρεμβάσεις	25 (40,3)	16 (38,1)	9 (45,0)	1,33 (0,45-3,91)	0,782
Ξένο σώμα	24 (38,7)	19 (45,2)	5 (25,0)	0,40 (0,12-1,31)	0,167
Χειρουργική επέμβαση μετά την εισαγωγή	20 (32,3)	17 (40,5)	3 (15,0)	0,26 (0,07-1,02)	0,079
Διακομιδή από άλλο νοσοκομείο	22 (35,5)	17 (40,5)	5 (25,0)	0,49 (0,15-1,60)	0,270
Προηγηθείσα νοσηλεία	46 (74,2)	31 (73,8)	15 (75,0)	1,06 (0,31-3,62)	1,000
ημέρες	16,95±14,14 (2-70)	18,00±15,95	14,09±7,05		0,942
Προηγηθείσα νοσηλεία σε ΜΕΘ	21 (33,9)	17 (40,5)	4 (20,0)	0,37 (0,10-1,29)	0,154
ημέρες	15,42±14,97 (2-70)	16,31±16,15	10,67±4,51		0,793
Προηγηθείσα χειρουργική επέμβαση	40 (64,5)	32 (76,2)	8 (40,0)	<b>0,21 (0,07-0,65)</b>	<b>0,010</b>
APACHE II score κατά την εισαγωγή	20,93±7,32 (7-41)	18,11±5,58	26,56±7,27		<b>&lt;0,001</b>
APACHE II score κατά την λοίμωξη	20,98±8,14 (6-46)	17,47±5,71	28,00±7,84		<b>&lt;0,001</b>

**Σχετιζόμενες με τη λοίμωξη και το βακτηριακό στέλεχος**

Πρωτοπαθής βακτηριαϊμία	28 (45,2)	17 (40,5)	11 (55,0)	1,80 (0,61-5,27)	0,413
Δευτεροπαθής βακτηριαϊμία					
Σχετιζόμενη με καθετήρα	13 (21,0)	11 (26,2)	2 (10,0)	0,31 (0,06-1,57)	0,192
ΚΝΣ	1 (1,6)				
Αναπνευστικό	8 (12,9)				
Τραύμα	2 (3,2)				
Κατακλίσεις	2 (3,2)				
Ουροποιητικό	8 (12,9)				
Σοβαρή σήψη ή σηπτικό shock	24 (38,7)	7 (16,7)	17 (85,0)	<b>28,33 (6,51-123,40)</b>	<b>&lt;0,001</b>
Meropenem MIC > 4 μg/ml	40 (64,5)	30 (71,4)	10 (50,0)	0,40 (0,13-1,21)	0,155
Αντοχή στην κολιστίνη	16 (25,8)	13 (31,0)	3 (15,0)	0,39 (0,10-1,58)	0,226
Μη ευαισθησία στην τιγκεκυκλίνη	5 (8,1)	2 (4,8)	3 (15,0)	3,53 (0,54-23,06)	0,317
<b>Σχετιζόμενες με τη θεραπεία</b>					
Κατάλληλη εμπειρική αγωγή	18 (29,0)	13 (31,0)	5 (25,0)	0,74 (0,22-2,48)	0,768
Κατάλληλη αντιμικροβιακή αγωγή	43 (69,4)	35 (83,3)	8 (40,0)	<b>0,13 (0,04-0,45)</b>	<b>0,001</b>
Έναρξη κατάλληλης αγωγής μέσα σε 3 ημέρες <sup>1</sup>	24 (55,8)	20 (57,1)	4 (50,0)	0,75 (0,16-3,50)	1,000
Συνδυασμός <sup>1</sup> αντιμικροβιακών	23 (53,5)	23 (65,7)	0 (0,0)	NA	<b>0,001</b>
Άλλες θεραπευτικές παρεμβάσεις	23 (37,1)	20 (47,6)	3 (15,0)	<b>0,19 (0,05-0,76)</b>	<b>0,023</b>

<sup>1</sup> Για τους ασθενείς που έλαβαν κατάλληλη αντιμικροβιακή αγωγή

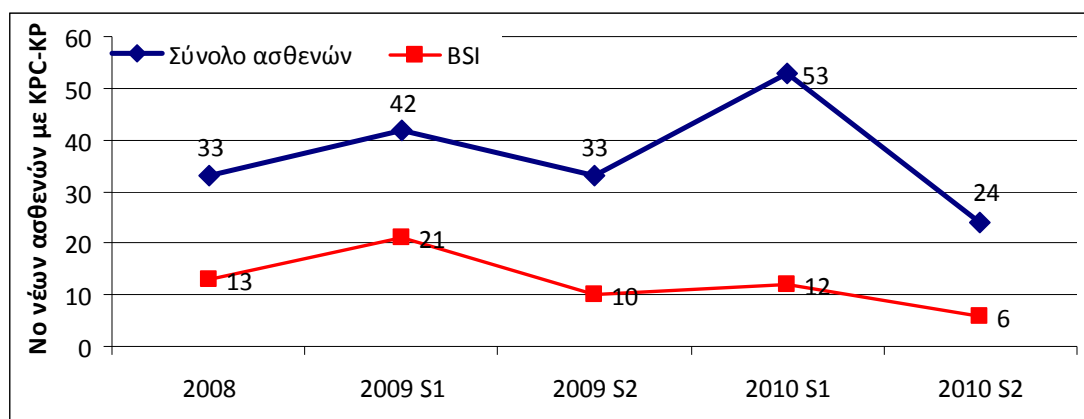
**Πίνακας 25. Μονοπαραγοντική ανάλυση των παραγόντων που σχετίζονται με τη θνητότητα της λοίμωξης για τους 62 ασθενείς που εμφάνισαν βακτηριαμία από ΚΡC-ΚΡ στέλεχος: υποκείμενα νοσήματα**

Υποκείμενα νοσήματα	Σύνολο n = 62	Επιβίωσαν n= 42 N (%)	Δεν επιβίωσαν n= 20	OR (95% CI)	p
Κρανιοεγκεφαλική κάκωση	11 (17,7)	10 (23,8)	1 (5,0)	0,17 (0,02-1,42)	0,087
Πολυτραυματίας	6 (9,7)	5 (11,9)	1 (5,0)	0,39 (0,04-3,58)	0,654
ΑΕΕ	13 (21,0)	8 (19,0)	5 (25,0)	1,42 (0,40-5,05)	0,740
Καρδιαγγειακά νοσήματα	36 (58,1)	20 (47,6)	16 (80,0)	<b>4,40 (1,26-15,39)</b>	<b>0,026</b>
ΧΑΠ	10 (16,1)	8 (19,0)	2 (10,0)	0,47 (0,09-2,46)	0,478
Σακχαρώδης διαβήτης	13 (21,0)	9 (21,4)	4 (20,0)	0,92 (0,24-3,43)	1,000
Κακοήθεια	10 (16,1)	6 (14,3)	4 (20,0)	1,50 (0,37-6,06)	0,714
Νεφρική ανεπάρκεια	16 (25,8)	6 (14,3)	10 (50,0)	<b>6,00 (1,75-20,55)</b>	<b>0,005</b>
Νοσήματα ήπατος και γαστρεντερικού	4 (6,5)	2 (4,8)	2 (10,0)	2,22 (0,29-17,05)	0,588
Αιματολογικές διαταραχές	3 (4,8)	1 (2,4)	2 (10,0)	4,56 (0,39-53,51)	0,241
Ψυχιατρικά νοσήματα	3 (4,8)	2 (4,8)	1 (5,0)	1,05 (0,09-12,34)	1,000
Νευρολογικά νοσήματα	10 (16,1)	6 (14,3)	4 (20,0)	1,50 (0,37-6,06)	0,714
Προηγηθείσα χειρουργική επέμβαση	40 (64,5)	32 (76,2)	8 (40,0)	<b>0,21 (0,07-0,65)</b>	<b>0,010</b>
Ανοσοκαταστολή	5 (8,1)	5 (11,9)	0 (0,0)	NA	0,165
Παχυσαρκία	2 (3,2)	2 (4,8)	0 (0,0)	NA	1,000
Αλκοολισμός	0 (0,0)				
Χρήση τοξικών ουσιών	0 (0,0)				

**Πίνακας 26. Μονοπαραγοντική ανάλυση των παραγόντων που σχετίζονται με τη θνητότητα της λοίμωξης για τους 62 ασθενείς που εμφάνισαν βακτηριαμία από ΚΡC-ΚΡ στέλεχος: προηγηθείσα χορήγηση αντιμικροβιακών**

Προηγηθείσα χορήγηση αντιμικροβιακών	Σύνολο	Επιβίωσαν	Δεν επιβίωσαν	OR (95% CI)	p
	n = 62	n= 42	n= 20		
	N (%)				
	Μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση (εύρος)				
Κεφαλοσπορίνες β' γενιάς	1 (1,6)	0 (0,0)	1 (5,0)	NA	0,323
ημέρες	4,00±0,00 (4-4)		4,00±0,00		
Κεφαλοσπορίνες γ'/δ' γενιάς	24 (38,7)	18 (42,9)	6 (30,0)	0,57 (0,18-1,78)	0,409
ημέρες	10,33±5,65 (4-23)	10,50±5,90	9,83±5,27		0,809
Κινολόνες	43 (69,4)	28 (66,7)	15 (75,0)	1,50 (0,45-4,97)	0,569
ημέρες	9,95±6,13 (2-25)	9,08±5,73	11,47±6,71		0,192
Αμινογλυκοσίδες	26 (41,9)	21 (50,0)	5 (25,0)	0,33 (0,10-1,08)	0,098
ημέρες	9,52±5,20 (2-22)	10,17±5,15	7,20±5,22		0,290
Καρβαπενέμες	26 (41,9)	20 (47,6)	6 (30,0)	0,47 (0,15-1,46)	0,272
ημέρες	14,35±10,81 (3-44)	15,11±11,68	11,60±7,13		0,533
Αζτρεονάμη	7 (11,3)	5 (11,9)	2 (10,0)	0,82 (0,15-4,66)	1,000
ημέρες	9,71±8,67 (2-23)	8,40±7,44	13,00±14,14		0,575
Συνδυασμοί β-λακταμών με αναστολείς β-λακταμασών	41 (66,1)	27 (64,3)	14 (70,0)	1,30 (0,41-4,08)	0,777
ημέρες	11,55±8,18 (3-32)	11,84±8,64	11,00±7,51		0,716
Κολιστίνη	21 (33,9)	18 (42,9)	3 (15,0)	<b>0,24 (0,06-0,93)</b>	<b>0,044</b>
ημέρες	18,42±9,80 (6-42)	17,81±10,39	21,67±6,03		0,547
Τιγκεκυκλίνη	15 (24,2)	11 (26,2)	4 (20,0)	0,70 (0,19-2,57)	0,755
ημέρες	15,00±7,45 (5-30)	15,22±8,48	14,50±5,45		0,880
Μετρονιδαζόλη	7 (11,3)	4 (9,5)	3 (15,0)	1,68 (0,34-8,32)	0,671
ημέρες	8,57±2,88 (5-14)	8,00±2,16	9,33±4,04		0,592
Γλυκοπεπτιδία	30 (48,4)	22 (52,4)	8 (40,0)	0,61 (0,21-1,79)	0,423
ημέρες	14,68±10,18 (2-48)	14,90±11,46	14,13±6,56		0,860
Λινεζολίδη	17 (27,4)	16 (38,1)	1 (5,0)	<b>0,09 (0,01-0,70)</b>	<b>0,006</b>
ημέρες	14,71±7,56 (5-32)	14,19±7,49	NA		0,353
Αντιμυκητιακά	24 (38,7)	19 (45,2)	5 (25,0)	0,40 (0,12-1,31)	0,167
ημέρες	15,88±14,06 (3-52)	16,21±13,75	14,60±16,82		0,367
Κλινταμυκίνη	8 (12,9)	7 (16,7)	1 (5,0)	0,26 (0,03-2,30)	0,258
ημέρες	8,13±3,23 (5-15)	7,86±3,39	10,00±0,00		0,576

**Γράφημα 6. Νέοι ασθενείς με απομόνωση ΚΡC-KP στελέχους από καλλιέργεια αίματος (BSI), ανά εξάμηνο της μελέτης**



### 3.1.2 Έκβαση

Η ολική θνητότητα ήταν 56,5%, ενώ η θνητότητα της λοίμωξης ήταν 32,3%. Για τους ασθενείς της ΜΕΘ, η θνητότητα λοίμωξης ήταν 28,3%.

Μικροβιολογική εκρίζωση σημειώθηκε στο 48,4% των περιπτώσεων. Στους ασθενείς που δεν επιβίωσαν ο θάνατος επήλθε σε μέσο χρόνο 7,2 ημερών από την έναρξη της λοίμωξης. Εξαιτίας αυτού, σε σημαντικό ποσοστό ασθενών αυτής της ομάδας δεν υπήρχαν διαθέσιμες καλλιέργειες για εκτίμηση της μικροβιολογικής έκβασης.

Τα δεδομένα για τη έκβαση των ασθενών παρουσιάζονται στον Πίνακα 27.

**Πίνακας 27. Έκβαση των 62 ασθενών με βακτηριαιμία από ΚΡC-KP στέλεχος**

Έκβαση	Σύνολο n = 62	Επιβίωσαν n= 42	Δεν επιβίωσαν n= 20
	N (%)		
Μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση			
Ολική θνητότητα	35 (56,5)	15 (35,7)	20 (100)
Θνητότητα 15 ημερών	18 (29,0)	0 (0,0)	18 (90)
Ημέρες από τη λοίμωξη έως το θάνατο	43,59 ± 92,67	95,57 ± 129,64	7,20 ± 5,62
Θνητότητα λοίμωξης	20 (32,3)		
<b>Μικροβιολογική έκβαση</b>			
Εκρίζωση	30 (48,4)	24 (57,1)	6 (30,0)
Μικροβιολογική υποτροπή	20 (32,3)	18 (42,9)	2 (10,0)
Μη διαθέσιμες καλλιέργειες	12 (19,4)	0 (0)	12 (60)



### 3.1.3 Αντιμικροβιακή αγωγή

Κατάλληλη αντιμικροβιακή αγωγή με διάρκεια τουλάχιστον 48 ωρών χορηγήθηκε σε 43 ασθενείς. Η θνητότητα της λοίμωξης μεταξύ αυτών ήταν 18,6% και ήταν μικρότερη σε βαθμό στατιστικά σημαντικό από τη θνητότητα της λοίμωξης στους ασθενείς που δεν έλαβαν κατάλληλη αντιμικροβιακή αγωγή [63,2%,  $p=0,001$ , OR=0,13 (0,04-0,45)], αποτελώντας σημαντικό προστατευτικό παράγοντα. Κατάλληλη εμπειρική αγωγή χορηγήθηκε σε 18 ασθενείς (8/18 με σοβαρή σήψη) και η θνητότητα της λοίμωξης μεταξύ αυτών ήταν 27,8%, χωρίς να διαφέρει σημαντικά από τη θνητότητα της λοίμωξης στους ασθενείς που δεν έλαβαν κατάλληλη εμπειρική αγωγή (34,1%). Έγκαιρη (μέσα σε τρεις ημέρες) έναρξη δραστικών αντιμικροβιακών σημειώθηκε για 24 από τους 43 ασθενείς, στους οποίους χορηγήθηκε κατάλληλη αντιμικροβιακή αγωγή, χωρίς σημαντική επίδραση στην επιβίωση των ασθενών (θνητότητα λοίμωξης 16,7% έναντι 21,1%,  $p=1,00$ ). Συνδυασμοί δραστικών αντιμικροβιακών χορηγήθηκαν σε 23 ασθενείς και όλοι οι ασθενείς επιβίωσαν. Αντίθετα, η θνητότητα λοίμωξης μεταξύ των 20 ασθενών που έλαβαν δραστική μονοθεραπεία ήταν 40%, όντας σημαντικά υψηλότερη ( $p=0,001$ ). Το συχνότερα χρησιμοποιηθέν σχήμα ήταν ο συνδυασμός κολιστίνης με τιγκεκυκλίνη, που χορηγήθηκε σε 9 ασθενείς. Η κολιστίνη χορηγήθηκε ως μονοθεραπεία σε 7 ασθενείς με θνητότητα λοίμωξης που δε διέφερε από αυτήν των ασθενών που δεν έλαβαν κατάλληλη αντιμικροβιακή αγωγή (57,1% έναντι 63,2%). Μονοθεραπεία με τιγκεκυκλίνη έλαβαν επίσης 7 ασθενείς και η θνητότητα λοίμωξης μεταξύ αυτών ήταν 28,6%. Στην ομάδα μονοθεραπείας με γενταμικίνη (5 ασθενείς) η θνητότητα λοίμωξης ήταν 25%. Ο μοναδικός ασθενής που έλαβε μονοθεραπεία με καρβαπενέμη, εμφάνισε δυσμενή έκβαση. Τα αντιμικροβιακά που χορηγήθηκαν στους 43 ασθενείς που έλαβαν κατάλληλη αντιμικροβιακή αγωγή και η θνητότητα λοίμωξης στην κάθε ομάδα παρουσιάζεται στον Πίνακα 28.

Στην μονοπαραγοντική ανάλυση επιχειρήθηκε σύγκριση μεταξύ των διαφορετικών αντιμικροβιακών, που χορηγήθηκαν στα πλαίσια της κατάλληλης αντιμικροβιακής αγωγής, καθώς και στη διάρκεια χορήγησής τους (Πίνακας 29). Βρέθηκε ότι η χορήγηση τιγκεκυκλίνης σχετίζεται σε βαθμό στατιστικά σημαντικό με την επιβίωση [ $p=0,042$ , OR=0,15 (0,03-0,88)]. Επίσης η διάρκεια χορήγησης κολιστίνης εμφανίζει θετική συσχέτιση με την έκβαση της λοίμωξης ( $p=0,001$ ).

**Πίνακας 28. Κατάλληλη αντιμικροβιακή αγωγή και θνητότητα λοίμωξης**

Αντιμικροβιακή αγωγή για τη λοίμωξη	n	(%)	Θνητότητα λοίμωξης	(%)
<b>Συνδυασμοί αντιμικροβιακών</b>	23	53,5	0	0,0
Τιγκεκυκλίνη με				
κολιστίνη	9	39,1	0	0
γενταμικίνη	5	21,7	0	0
κολιστίνη + καρβαπενέμη	2	8,7	0	0
καρβαπενέμη	1	4,3	0	0
κολιστίνη + γενταμικίνη	1	4,3	0	0
αμικασίνη + φωσφομυκίνη	1	4,3	0	0
κολιστίνη με		0,0		
ριφαμπικίνη	1	4,3	0	0
καρβαπενέμη	1	4,3	0	0
καρβαπενέμη + γενταμικίνη	1	4,3	0	0
γενταμικίνη + ριφαμπικίνη	1	4,3	0	0
<b>Μονοθεραπεία</b>	20	46,5	8	40,0
κολιστίνη	7	35,0	4	57,1
τιγκεκυκλίνη	7	35,0	2	28,6
γενταμικίνη	5	25,0	1	20,0
καρβαπενέμη	1	5,0	1	100
<b>Σύνολο</b>	43		8	18,6

**Πίνακας 29. Μονοπαραγοντική ανάλυση των αντιμικροβιακών που χορηγήθηκαν**

Αντιμικροβιακά	Σύνολο n = 43	Επιβίωσαν n= 35	Δεν επιβίωσαν n= 8	OR (95% CI)	p
N (%)					
Μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση					
Κολιστίνη	21 (48,8)	17 (48,6)	4 (50,0)	1,06 (0,23-4,92)	1,000
ημέρες	16,05±16,38 (3-80)	18,53±16,77	5,00±1,83		<b>0,001</b>
Τιγκεκυκλίνη	26 (60,5)	24 (68,6)	2 (25,0)	<b>0,15 (0,03-0,88)</b>	<b>0,042</b>
ημέρες	12,70±5,92 (2-24)	13,92±5,03	9,50±0,71		0,235
Αμινογλυκοσίδη	13 (30,2)	12 (34,3)	1 (12,5)	0,27 (0,03-2,49)	0,400
ημέρες	8,00±3,06 (4-14)	7,92±3,04	9,00		0,739
Καρβαπενέμη	6 (14,0)	5 (14,3)	1 (12,5)	0,86 (0,09-8,54)	1,000
ημέρες	16,50±8,60 (2-24)	19,80±4,15	13,00		0,209
Φωσφομυκίνη	1 (2,3)	1 (2,9)	0 (0,0)	NA	1,000
ημέρες		20,00			NA
Ριφαμπικίνη	2 (4,7)	2 (5,7)	0 (0,0)	NA	1,000
ημέρες		7,50±3,54			NA

### 3.1.4 Παράγοντες κινδύνου για δυσμενή έκβαση

Στη μονοπαραγοντική ανάλυση (Πίνακες 24, 25, 26), διάφοροι παράγοντες βρέθηκε να σχετίζονται σε βαθμό στατιστικά σημαντικό με την έκβαση της λοίμωξης. Οι ασθενείς που επιβίωσαν ήταν νεότεροι ( $p < 0,001$ ), είχαν συχνότερα υποβληθεί σε χειρουργική επέμβαση προ της απομόνωσης [ $p=0,010$ ,  $OR=0,21$  (0,07-0,65)] και είχαν συχνότερα προηγηθείσα θεραπεία με κολιστίνη και λινεζολίδη [ $p=0,044$ ,  $OR=0,24$  (0,06-0,93) και  $p=0,006$ ,  $OR=0,09$  (0,01-0,70) αντίστοιχα].

Οι ασθενείς που δεν επιβίωσαν είχαν συχνότερα καρδιαγγειακά νοσήματα και νεφρική ανεπάρκεια [ $p=0,026$ ,  $OR=4,40$  (1,26-15,39) και  $p=0,005$ ,  $OR=6,00$  (1,75-20,55) αντίστοιχα]. Τα APACHE II scores κατά την εισαγωγή και κατά την έναρξη της λοίμωξης ήταν σημαντικά υψηλότερα στην ομάδα αυτή των ασθενών ( $p < 0,001$ ). Επίσης η παρουσία σοβαρής σήψης ή σηπτικής καταπληξίας σχετίστηκε σε βαθμό στατιστικά σημαντικό με τη θνητότητα λοίμωξης [ $p < 0,001$ ,  $OR=28,33$  (6,51-123,40)].

Από τις μεταβλητές που αφορούν στη θεραπεία, η κατάλληλη αντιμικροβιακή αγωγή [ $p=0,001$ ,  $OR=0,13$  (0,04-0,45)], οι συνδυασμοί αντιμικροβιακών ( $p=0,001$ ) και οι άλλες θεραπευτικές παρεμβάσεις που στοχεύουν στην εστία της λοίμωξης [ $p=0,023$ ,  $OR=0,19$  (0,05-0,76)], παρουσίασαν ισχυρή συσχέτιση με την επιβίωση.

Τα αποτελέσματα του τελικού μοντέλου της πολυπαραγοντικής ανάλυσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 30. Η ηλικία των ασθενών, το APACHE II score κατά την έναρξη της λοίμωξης και η μη χορήγηση κατάλληλης αντιμικροβιακής αγωγής αναδείχτηκαν ως ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες για τη θνητότητα της λοίμωξης. Προκειμένου να εκτιμηθεί περαιτέρω η επίδραση της κατάλληλης αντιμικροβιακής αγωγής στην επιβίωση των ασθενών, κατασκευάστηκε ένα δεύτερο πολυπαραγοντικό μοντέλο, διατηρώντας την κατάλληλη αντιμικροβιακή αγωγή, προσαρμοσμένη ως προς τους σημαντικότερους δυνητικούς συγχυτικούς παράγοντες (ηλικία, APACHE II score κατά την έναρξη της λοίμωξης, παρουσία σοβαρής σήψης ή σηπτικής καταπληξίας και άλλες θεραπευτικές παρεμβάσεις).

Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο μοντέλων, υπογραμμίζοντας τη σημασία της κατάλληλης αντιμικροβιακής αγωγής.

**Πίνακας 30. Πολυπαραγοντική ανάλυση των παραγόντων που σχετίζονται με τη θνητότητα λοίμωξης**

Μεταβλητές	OR (95% CI)	p
APACHE II score κατά την έναρξη της λοίμωξης	1,41 (1,08-1,84)	0,012
Ηλικία	1,39 (1,04-1,86)	0,025
Κατάλληλη αντιμικροβιακή αγωγή	0,009 (0,0002-0,57)	0,026

### **3.2 Λοιμώξεις ουροποιητικού**

#### **3.2.1 Παράγοντες που σχετίζονται με τον ασθενή, το βακτηριακό στέλεχος και τη θεραπεία**

Οι ουροκαλλιέργειες αποτέλεσαν την τρίτη συνηθέστερη πηγή απομόνωσης KPC-KP στελεχών μετά τις αιμοκαλλιέργειες και τις καλλιέργειες κεντρικών φλεβικών καθετήρων. Οι λοιμώξεις ουροποιητικού ήταν οι δεύτερες σε συχνότητα λοιμώξεις μετά τις βακτηριαιμίες.

Κατά τη διάρκεια της μελέτης, στελέχη KPC-KP απομονώθηκαν από ουροκαλλιέργειες 54 ασθενών (23 άνδρες, 42,6%, μέση ηλικία  $70,65 \pm 17,74$  έτη). Ο μέσος χρόνος νοσηλείας έως την απομόνωση του KPC-KP στελέχους ήταν  $9,67 \pm 12,70$  ημέρες. Χαρακτηριστικό είναι ότι στους μισούς ασθενείς (27/54) το KPC-KP στέλεχος απομονώθηκε μέσα στις πρώτες 48 ώρες της νοσηλείας, υποδεικνύοντας ότι δεν αποκτήθηκε ενδοноσοκομειακά στην παρούσα νοσηλεία. Από αυτούς, οι 23 ασθενείς ανέφεραν πρόσφατη (κατά το προηγούμενο τρίμηνο) νοσηλεία, 3 ασθενείς είχαν νοσηλευτεί 4-9 μήνες πριν, ενώ ένας ασθενής δεν ανέφερε νοσηλεία, είχε όμως λάβει μακρόχρονη θεραπεία με κινολόνες και είχε υποβληθεί σε βιοψία προστάτη.

Η πλειονότητα των ασθενών νοσηλευόταν σε Παθολογικά Τμήματα (32, 59,3%), παρουσίαζε περισσότερα από 2 υποκείμενα νοσήματα (38, 70,4%), είχε ιστορικό προηγούμενων νοσηλείων (47, 87%) και έφερε ουροκαθετήρα (48, 88,9%).

Μεταξύ των υποκείμενων νοσημάτων επικρατούσαν τα καρδιαγγειακά νοσήματα (74,1%), οι διαταραχές του ουροποιητικού (66,7%) και ο σακχαρώδης διαβήτης (33,3%). Νεφρική ανεπάρκεια παρουσίαζαν 14 ασθενείς (25,9%). Το 54,2% των ασθενών είχε

ιστορικό χειρουργικών επεμβάσεων. Υποτροπιάζουσες λοιμώξεις ουροποιητικού ανέφεραν 13 ασθενείς (24,1%).

Έλεγχος αποικισμού με λήψη ορθικού επιχρίσματος πραγματοποιήθηκε σε 23 ασθενείς. Από αυτούς οι 17 (73,9%) βρέθηκαν αποικισμένοι με KPC-KP στέλεχος.

Κλινική λοίμωξη παρατηρήθηκε σε 18/54 ασθενείς (33,3%), από τους οποίους 6 (11,1%) εμφάνισαν δευτεροπαθή βακτηριαιμία.

Ο έλεγχος της ευαισθησίας των απομονωθέντων στελεχών (μελετήθηκε ένα στέλεχος ανά ασθενή), έδειξε ότι 32 στελέχη (59,3%) εμφάνιζαν τιμές MIC στη μεροπενέμη > 4 μg/ml, ενώ ευαισθησία στη μεροπενέμη σύμφωνα με τα αναθεωρημένα όρια του CLSI, εμφάνισαν 4 στελέχη (MIC ≤ 1 μg/ml). Το ποσοστό αντοχής στην κολιστίνη και μειωμένης ευαισθησίας στην τιγκεκυκλίνη ήταν 9,3%. Ευαισθησία στην αμικασίνη παρουσίασαν 6 στελέχη (11,1%) και στην κοτριμοξαζόλη 4 στελέχη (7,4%). Ταυτόχρονη παρουσία των γονιδίων *bla*<sub>KPC</sub> και *bla*<sub>VIM</sub> ανιχνεύθηκε σε 2 στελέχη.

Τα κλινικά χαρακτηριστικά των 54 ασθενών παρουσιάζονται στον Πίνακα 31.

**Πίνακας 31. Παράγοντες που σχετίζονται με τον ασθενή, το βακτηριακό στέλεχος και τη λοίμωξη στους 54 ασθενείς από τους οποίους απομονώθηκαν στελέχη ΚΡC-KP από ουροκαλλιέργειες.**

Μεταβλητές	N (%)
	Μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση (εύρος)
<b>Σχετιζόμενες με τον ασθενή</b>	
Ηλικία, έτη	70,65 ± 17,74 (17-93)
Άρρεν φύλο	23 (42,6)
Χρόνος νοσηλείας, ημέρες	9,67±12,70 (0-51)
Νοσηλευτικό Τμήμα	
ΜΕΘ	5 (9,3)
Παθολογικός Τομέας	32 (59,3)
Χειρουργικός Τομέας	13 (24,1)
Εξωτερικός ασθενής	4 (7,4)
<i>Υποκείμενα νοσήματα</i>	
Υποκείμενα νοσήματα >2	38 (70,4)
Υποτροπιάζουσες λοιμώξεις ουροποιητικού	13 (24,1)
Υποκείμενα νοσήματα από το ουροποιητικό	36 (66,7)
Κρανιοεγκεφαλική κάκωση	2 (3,7)
Πολυτραυματίας	2 (3,7)
ΑΕΕ	6 (11,1)
Καρδιαγγειακά νοσήματα	40 (74,1)
ΧΑΠ	3 (5,6)
Σακχαρώδης διαβήτης	18 (33,3)
Κακοήθεια	9 (16,7)
Νεφρική ανεπάρκεια	14 (25,9)
Νοσήματα ήπατος και γαστρεντερικού	10 (18,5)
Αιματολογικές διαταραχές	5 (9,3)
Ψυχιατρικά νοσήματα	3 (5,6)
Νευρολογικά νοσήματα	11 (20,4)
Ανοσοκαταστολή	13 (24,1)
Παχυσαρκία	3 (5,6)
Αλκοολισμός	1 (1,9)
<i>Παρεμβατικές πράξεις</i>	
Μηχανικός αερισμός κατά την απομόνωση	4 (7,4)
Παρουσία ΚΦΓ	9 (16,7)
Παρουσία ουροκαθετήρα	48 (88,9)
Ρινογαστρικός σωλήνας	13 (24,1)
Ξένο σώμα	12 (22,2)
Άλλες θεραπευτικές παρεμβάσεις	17 (31,5)
Χειρουργική επέμβαση μετά την εισαγωγή	6 (11,1)

Απευθείας διακομιδή από άλλο νοσηλευτικό ίδρυμα	8 (14,8)
ΜΕΘ	6 (11,1)
Νοσοκομείο	2 (3,7)
Διακομιδή από άλλο νοσηλευτικό τμήμα του νοσοκομείου	6 (11,1)
Προηγηθείσα νοσηλεία	47 (87,0)
ημέρες	15,05 ± 10,25 (4-42)
ΜΕΘ	6 (11,1)
ημέρες	15,63 ± 11,04 (3-33)
Νοσοκομείο	35 (64,8)
ΜΕΘ και Νοσοκομείο	6 (11,1)
Προηγηθείσα χειρουργική επέμβαση	25 (46,3)
Προηγηθείς αποικισμός (n=23)	17 (73,9)
<b>Σχετιζόμενες με τη λοίμωξη και το βακτηριακό στέλεχος</b>	
Λοίμωξη	18 (33,3)
Συνυπάρχουσα βακτηριαίμια	6 (11,1)
Meropenem MIC > 4 μg/ml	32 (59,3)
Αντοχή στην κολιστίνη	5 (9,3)
Μειωμένη ευαισθησία στην τιγκεκυκλίνη	5 (9,3)
<b>Σχετιζόμενες με τη θεραπεία</b>	
Κατάλληλη εμπειρική αγωγή	3 (16,7)
Κατάλληλη αντιμικροβιακή αγωγή	13 (72,2)

---

### 3.2.2 Αντιμικροβιακή αγωγή

Από τους 18 ασθενείς που εμφάνισαν κλινική λοίμωξη, κατάλληλη εμπειρική αγωγή έλαβαν 3 ασθενείς (16,7%) Κατάλληλη οριστική αντιμικροβιακή αγωγή (Πίνακας 32) χορηγήθηκε σε 13 ασθενείς (72,2%). Από αυτούς οι 11 ασθενείς έλαβαν μονοθεραπεία με συνηθέστερη την τιγκεκυκλίνη (7 ασθενείς) και δύο ασθενείς συνδυαστική θεραπεία (τιγκεκυκλίνη με γενταμικίνη και φωσφομυκίνη με γενταμικίνη).

**Πίνακας 32. Κατάλληλη αντιμικροβιακή αγωγή στους ασθενείς με κλινική λοίμωξη ουροποιητικού από ΚΡC-ΚΡ στέλεχος**

Αντιμικροβιακά	N (%)
	Μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση (εύρος)
τιγκεκυκλίνη	8
ημέρες	10,13±2,59 (6-14)
αμινογλυκοσίδη	4
ημέρες	6,75±2,50 (4-10)
καρβαπενέμη	1
ημέρες	6,00
φωσφομυκίνη	1
ημέρες	7,00
κοτριμοξαζόλη	1
ημέρες	5,00

### 3.2.3 Έκβαση

Η ολική θνητότητα ήταν 11,1%, ενώ η θνητότητα της λοίμωξης ήταν 21,2%. Μικροβιολογική εκρίζωση επιτεύχθηκε σε 26 ασθενείς (48,1%), ενώ υποτροπή σημειώθηκε στο 22,2 των ασθενών. Η μέση διάρκεια της νοσηλείας μετά την απομόνωση ήταν 9,85 ± 8,34 ημέρες.

Τα δεδομένα για την έκβαση των ασθενών παρουσιάζονται στον Πίνακα 33.



**Πίνακας 33. Έκβαση των 54 ασθενών από τους οποίους απομονώθηκαν στελέχη KPC-KP από ουροκαλλιέργειες.**

Μεταβλητές σχετιζόμενες με την έκβαση	N (%)
	Μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση (εύρος)
Ολική θνητότητα	6 (11,1)
Ημέρες από την απομόνωση έως το θάνατο	19,6 7 ± 31,20 (2-83)
Θνητότητα 15 ημερών	5 (9,3)
Θνητότητα λοίμωξης <sup>1</sup>	4 (22,2)
Μικροβιολογική έκβαση	
Εκρίζωση	26 (48,1)
Μικροβιολογική υποτροπή	12 (22,2)
Μη διαθέσιμες καλλιέργειες	16 (29,6)
Ημέρες νοσηλείας μετά την απομόνωση	9,85 ± 8,34 (2-47)

<sup>1</sup>Η θνητότητα λοίμωξης αναφέρεται στους 18 ασθενείς που εμφάνισαν κλινική λοίμωξη

### 3.3 Άλλες λοιμώξεις

#### 3.3.1 Παράγοντες που σχετίζονται με τον ασθενή, το βακτηριακό στέλεχος, τη λοίμωξη και τη θεραπεία

Κατά τη διάρκεια της μελέτης, άλλες λοιμώξεις από στελέχη KPC-KP καταγράφηκαν σε 20 ασθενείς (55% άνδρες, μέση ηλικία 67,32 ± 20,56 έτη, 40% ασθενείς ΜΕΘ) μετά από μέσο χρόνο νοσηλείας 17,55 ± 15,37 ημερών. Από τις λοιμώξεις αυτές συχνότερες ήταν οι λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων (7 ασθενείς) καθώς και οι ενδοκοιλιακές λοιμώξεις (6 ασθενείς). Ένας ασθενής εμφάνισε λοίμωξη του ΚΝΣ (κοιλίτιδα).

Τα κλινικά χαρακτηριστικά των 20 ασθενών (Πίνακας 34) δεν διέφεραν από τα χαρακτηριστικά των ασθενών με βακτηραιμία.

Από τον έλεγχο ευαισθησίας των απομονωθέντων στελεχών προέκυψε ότι η ευαισθησία στη μεροπενέμη, σύμφωνα με τα αναθεωρημένα όρια ευαισθησίας του CLSI, ήταν 10%, ενώ το 45% των στελεχών παρουσίασαν τιμές MIC στη μεροπενέμη > 4 μg/ml. Τα ποσοστά ευαισθησίας στη γενταμικίνη, κολιστίνη και τιγκεκυκλίνη ήταν 95%, 85% και 100% αντίστοιχα.

Ταυτόχρονη παρουσία του γονιδίου *bla<sub>VIM</sub>* εκτός από το γονίδιο *bla<sub>KPC</sub>* δεν βρέθηκε σε κανένα στέλεχος.

**Πίνακας 34. Παράγοντες που σχετίζονται με τον ασθενή, το βακτηριακό στέλεχος και τη λοίμωξη στους 20 ασθενείς με άλλες λοιμώξεις από KPC-στελέχη**

Μεταβλητές	N (%)
	Μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση (εύρος)
<b>Σχετιζόμενες με τον ασθενή</b>	
Ηλικία, έτη	67,32±20,56 (18-96)
Άρρεν φύλο	11 (55,0)
<i>Υποκείμενα νοσήματα</i>	
Υποκείμενα νοσήματα >2	7 (35,0)
Κρανιοεγκεφαλική κάκωση	2 (10,0)
Πολυτραυματίας	0 (0,0)
ΑΕΕ	1 (5,0)
Καρδιαγγειακά νοσήματα	5 (25,0)
ΧΑΠ	3 (15,0)
Σακχαρώδης διαβήτης	4 (20,0)
Κακοήθεια	5 (25,0)
Νεφρική ανεπάρκεια	5 (25,0)
Νοσήματα ήπατος και γαστρεντερικού	5 (25,0)
Αιματολογικές διαταραχές	0 (0,0)
Ψυχιατρικά νοσήματα	1 (5,0)
Νευρολογικά νοσήματα	2 (10,0)
Προηγηθείσα χειρουργική επέμβαση	7 (35,0)
Ανοσοκαταστολή	1 (5,0)
Παχυσαρκία	1 (5,0)
Αλκοολισμός	1 (5,0)
Χρήση τοξικών ουσιών	2 (10,0)
Χρόνος νοσηλείας, ημέρες	17,55±15,37 (1-52)
<i>Νοσηλευτικό Τμήμα</i>	
ΜΕΘ	8 (40,0)
Παθολογικός Τομέας	6 (30,0)
Χειρουργικός Τομέας	6 (30,0)
<i>Παραμβατικές πράξεις</i>	
Μηχανικός αερισμός κατά την απομόνωση	6 (30,0)
ημέρες	11,29±7,91 (1-22)
Παρουσία ΚΦΓ	12 (60,0)
ημέρες	13,54±7,76 (1-22)
Ουροκαθετήρας	19 (95,0)
ημέρες	13,26±10,25 (1-38)
Ρινογαστρικός σωλήνας	15 (75,0)
Άλλες θεραπευτικές παρεμβάσεις	15 (75,0)
Ξένο σώμα	4 (20,0)
Χειρουργική επέμβαση μετά την εισαγωγή	9 (45,0)
<i>Προηγηθείσα έκθεση στο νοσοκομειακό περιβάλλον</i>	
Απευθείας διακομιδή από άλλο νοσοκομείο	13 (65,0)

Προηγηθείσα νοσηλεία ημέρες	16 (80,0) 22,53±25,69 (3-108)
Προηγηθείσα νοσηλεία σε ΜΕΘ ημέρες	9 (45,0) 15,22±23,13 (3-75)
Προηγηθείσα χειρουργική επέμβαση	7 (35,0)
Προηγηθείς αποικισμός (N=10) ημέρες νοσηλείας έως τον αποικισμό	9 (90,0) 3,67±4,97 (0-11)
ημέρες νοσηλείας από τον αποικισμό έως τη λοίμωξη	5,50±4,89 (0-14)
<i>Προηγηθείσα χορήγηση αντιμικροβιακών</i>	
Κεφαλοσπορίνες β' γενιάς ημέρες	3 (15,0) 10,33±4,51 (6-15)
Κεφαλοσπορίνες γ' /δ' γενιάς ημέρες	3 (15,0) 10,00±3,00 (7-13)
Κινολόνες ημέρες	9 (45,0) 11,00±6,76 (4-20)
Αμινογλυκοσίδες ημέρες	6 (30,0) 5,17±2,64 (2-9)
Καρβαπενέμες ημέρες	5 (25,0) 9,60±7,40 (2-19)
Αζτρεονάμη ημέρες	0 (0,0)
Συνδυασμοί β-λακταμών με αναστολείς β-λακταμασών ημέρες	13 (65,0) 10,46±8,11 (2-23)
Κολιστίνη ημέρες	2 (10,0) 7,00±5,66 (3-11)
Τιγκεκυκλίνη ημέρες	2 (10,0) 9,50±10,61 (2-17)
Μετρονιδαζόλη ημέρες	6 (30,0) 16,33±6,28 (7-26)
Γλυκοπεπίδια	4 (20,0)
<b>Σχετιζόμενες με τη λοίμωξη</b>	
<i>Είδος λοίμωξης</i>	
Λοίμωξη αναπνευστικού	3 (15,0)
Ενδοκοιλιακή λοίμωξη	6 (30,0)
Λοίμωξη δέρματος/μαλακών μοριών	7 (35,0)
Λοίμωξη χειρουργικού τραύματος	3 (15,0)
Λοίμωξη ΚΝΣ	1 (5,0)
Σοβαρή σήψη ή σηπτική καταπληξία	9 (45,0)
<b>Σχετιζόμενες με το βακτηριακό στέλεχος</b>	
Meropenem MIC > 4 μg/ml	9 (45,0)
Αντοχή στην κολιστίνη	3 (15,0)
Μειωμένη ευαισθησία στην τιγκεκυκλίνη	0 (0,0)
<b>Σχετιζόμενες με τη θεραπεία</b>	
Κατάλληλη εμπειρική αγωγή	7 (35,0)
Κατάλληλη αντιμικροβιακή αγωγή	15 (75,0)
Έναρξη κατάλληλης αγωγής μέσα σε 3 ημέρες	13 (86,7)
Συνδυασμός αντιμικροβιακών	6 (40,0)
Άλλες θεραπευτικές παρεμβάσεις	14 (70,0)

### 3.3.2 Αντιμικροβιακή αγωγή

Κατάλληλη αντιμικροβιακή αγωγή (Πίνακας 35) χορηγήθηκε σε 15/20 ασθενείς και η θνητότητα λοίμωξης μεταξύ αυτών ήταν 33,3%, σημαντικά μικρότερη από τους ασθενείς που δεν έλαβαν κατάλληλη αντιμικροβιακή αγωγή (80%). Ο μικρός αριθμός ασθενών στις δύο ομάδες δεν επέτρεψε την ανάδειξη στατιστικά σημαντικών συσχετίσεων. Συνδυασμοί δραστικών αντιμικροβιακών χρησιμοποιήθηκαν σε 6/15 ασθενείς (θνητότητα λοίμωξης 33,3%). Έγκαιρη έναρξη της κατάλληλης αντιμικροβιακής αγωγής σημειώθηκε για 13/15 ασθενείς (θνητότητα λοίμωξης 33,3%).

Το συνηθέστερα χορηγηθέν αντιμικροβιακό ήταν η τιγκεκυκλίνη, η οποία χορηγήθηκε ως μονοθεραπεία σε 6 περιπτώσεις και στα πλαίσια συνδυαστικής θεραπείας σε άλλες 3 περιπτώσεις (σε 2 με κολιστίνη και σε μία με καρβαπενέμη). Η κολιστίνη χρησιμοποιήθηκε ως μονοθεραπεία σε μία περίπτωση.

Στους περισσότερους ασθενείς (70%) εφαρμόστηκαν και επιπρόσθετες θεραπευτικές παρεμβάσεις (χειρουργικός καθαρισμός, χειρουργικές επεμβάσεις, αντικατάσταση stent χοληφόρων κα) που στόχευαν στην εξάλειψη της εστίας της λοίμωξης.

Η κοιλίτιδα αντιμετωπίστηκε με κοιλιοστομία και χορήγηση κολιστίνης (ενδοφλέβια και ενδοκοιλιακά) σε συνδυασμό με φωσφομυκίνη για 80 και 67 ημέρες αντίστοιχα.

**Πίνακας 35. Κατάλληλη αντιμικροβιακή αγωγή στους 20 ασθενείς με άλλες λοιμώξεις από ΚΡC-ΚΡ στέλεχος**

Αντιμικροβιακά	N (%)
	Μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση (εύρος)
Κολιστίνη	6 (30,0)
ημέρες	24,67±27,61 (8-80)
Τιγκεκυκλίνη	9 (45,0)
ημέρες	11,67±3,91 (6-17)
Αμινογλυκοσίδη	2 (10,0)
ημέρες	5,00±0,00 (5-5)
Καρβαπενέμη	3 (15,0)
ημέρες	13,67±5,51 (10-20)
Φωσφομυκίνη	1 (5,0)
ημέρες	67

### 3.3.3 Έκβαση

Τόσο η ολική θνητότητα (55%) όσο και η θνητότητα της λοίμωξης (45%) ήταν υψηλές. Μικροβιολογική εκρίζωση σημειώθηκε σε 7 ασθενείς (35%), ενώ συχνή ήταν η μικροβιολογική υποτροπή (45%). Τα δεδομένα για την έκβαση των ασθενών παρουσιάζονται στον Πίνακα 36.

**Πίνακας 36. Έκβαση των 20 ασθενών με άλλες λοιμώξεις από στελέχη KPC-KP.**

Έκβαση	N (%)
	Μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση (εύρος)
Ολική θνητότητα	11 (55,0)
Ημέρες από τη λοίμωξη έως το θάνατο	31,50±34,17 (1-119)
Θνητότητα 15 ημερών	4 (20,0)
Θνητότητα λοίμωξης	9 (45,0)
Μικροβιολογική έκβαση	
Εκρίζωση	7 (35,0)
Μικροβιολογική υποτροπή	9 (45,0)
Μη διαθέσιμες καλλιέργειες	4 (20,0)

### 3.4 Λοιμώξεις από ανθεκτικά στην κολιστίνη στελέχη *Klebsiella pneumoniae* που παράγουν KPC καρβαπενεμάση

#### 3.4.1 Λοίμωξη ή αποικισμός από ανθεκτικό στην κολιστίνη στέλεχος

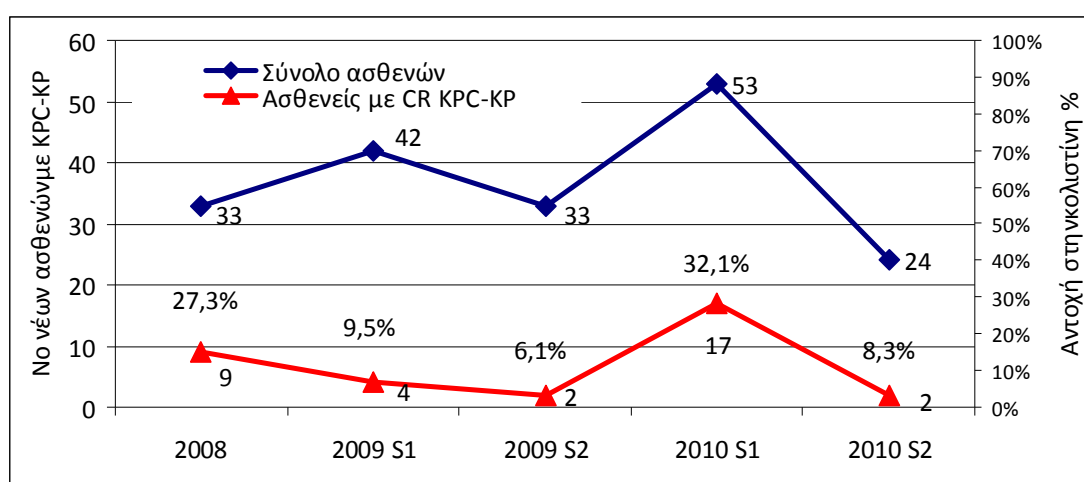
Κατά τη διάρκεια της μελέτης, συνολικά 34 ασθενείς (58,8% άνδρες, μέση ηλικία 59,15 ± 18,25 έτη) έφεραν ανθεκτικά στην κολιστίνη στελέχη (CR) KPC-KP. Από αυτούς 18 ασθενείς εμφάνισαν κλινική λοίμωξη (16 ασθενείς βακτηραιμία και 2 λοίμωξη δέρματος και μαλακών μορίων), ενώ οι υπόλοιποι 16 θεωρήθηκαν αποικισμένοι. Μεταξύ των στελεχών που θεωρήθηκαν υπεύθυνα για αποικισμό, 7 στελέχη προήλθαν από κεντρικές φλεβικές γραμμές (οι αιμοκαλλιέργειες ήταν αρνητικές), 3 στελέχη από καλλιέργειες χειρουργικού τραύματος χωρίς σημεία λοίμωξης, 5 στελέχη από ουροκαλλιέργειες χωρίς να πληρούνται τα κριτήρια λοίμωξης και ένα στέλεχος από καλλιέργεια βρογχικών εκκρίσεων. Οι περισσότεροι ασθενείς νοσηλεύονταν στη ΜΕΘ (23/34), ενώ σε Παθολογικές και Χειρουργικές Κλινικές νοσηλεύονταν 5 και 6 ασθενείς αντίστοιχα.

Η ανάλυση της κατανομής των περιστατικών ανά εξάμηνο της μελέτης (Γράφημα 7) έδειξε ότι ο μεγαλύτερος αριθμός ασθενών με απομόνωση CR KPC-KP σημειώνεται το πρώτο εξάμηνο του 2010 (17, 32,1%).

Συνολικά απομονώθηκαν 85 CR-KP στελέχη από τους 34 ασθενείς και ένα στέλεχος ανά ασθενή περιελήφθη στη μελέτη. Σε 5 ασθενείς προηγήθηκε απομόνωση ευαίσθητου στην κολιστίνη (CS) στελέχους KPC-KP. Και οι 5 ασθενείς είχαν λάβει κολιστίνη στο μεσοδιάστημα μεταξύ των δύο απομονώσεων. Ο μέσος χρόνος νοσηλείας έως την απομόνωση του ανθεκτικού στην κολιστίνη στελέχους ήταν  $23,12 \pm 24,56$  ημέρες. Σε 7 ασθενείς (20,6%), ο χρόνος νοσηλείας έως την απομόνωση του CR KPC-KP στελέχους ήταν  $\leq 48$  ωρών. Από αυτούς, οι 4 ασθενείς διακομίστηκαν απευθείας από άλλα νοσηλευτικά ιδρύματα, ενώ οι υπόλοιποι 3 είχαν πρόσφατη νοσηλεία.

Ο έλεγχος ευαισθησίας των 34 CR KPC-KP στελεχών έδειξε ότι όλα τα στελέχη διατηρούσαν ευαισθησία στην τιγκεκυκλίνη, 30/34 (88,2%) βρέθηκαν ευαίσθητα στη γενταμικίνη και ένα στέλεχος παρουσίαζε ευαισθησία στην αμικασίνη (2,9%). Κανένα στέλεχος δεν εμφάνισε ευαισθησία στη μεροπενέμη, σύμφωνα με τα αναθεωρημένα όρια του CLSI, ενώ τιμή MIC  $\leq 4$   $\mu\text{g/ml}$  παρουσίασαν 6 στελέχη (17,6%). Η τιμή MIC στην κολιστίνη κυμάνθηκε από 4 έως 32  $\mu\text{g/ml}$ .

**Γράφημα 7. Νέοι ασθενείς με CR KPC-KP ανά εξάμηνο μελέτης**



### 3.4.2 Παράγοντες κινδύνου για εμφάνιση λοίμωξης ή αποικισμού από ανθεκτικό στην κολιστίνη στέλεχος

Προκειμένου να διερευνηθούν οι παράγοντες κινδύνου για λοίμωξη ή αποικισμό από ανθεκτικό στην κολιστίνη στέλεχος και να προσδιοριστεί η επίδραση της αντοχής στην έκβαση των ασθενών, οι 34 ασθενείς που έφεραν ανθεκτικό στέλεχος συγκρίθηκαν με ομάδα ελέγχου (controls) αποτελούμενη από 64 ασθενείς (36 ασθενείς με κλινική λοίμωξη, 32 αποικισμένοι, 46 ασθενείς ΜΕΘ) που επιλέχθηκαν από τους 141 ασθενείς της μελέτης που έφεραν ευαίσθητο στην κολιστίνη στέλεχος, χρησιμοποιώντας τα κριτήρια επιλογής.

Η μονοπαραγοντική ανάλυση μεταξύ των δύο ομάδων αναφορικά με τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά, την προηγηθείσα έκθεση στο νοσοκομειακό περιβάλλον, τα υποκείμενα νοσήματα, τις παρεμβατικές πράξεις και την προηγηθείσα χορήγηση αντιμικροβιακών παρουσιάζεται στους Πίνακες 37, 38 και 39. Οι περισσότεροι ασθενείς και στις δύο ομάδες είχαν υποβληθεί σε πολλαπλές παρεμβατικές πράξεις κατά τη διάρκεια της νοσηλείας τους (βρίσκονταν σε μηχανικό αερισμό, έφεραν κεντρικές φλεβικές γραμμές, ουροκαθετήρα και ρινογαστρικό σωλήνα) και είχαν λάβει πολλαπλά αντιμικροβιακά. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων αναφορικά με τη μέση ηλικία, τα υποκείμενα νοσήματα, τις παρεμβατικές πράξεις και τη διάρκεια αυτών, καθώς και το μέσο χρόνο της παρούσας νοσηλείας.

Η μελέτη της προηγηθείσας χορήγησης αντιμικροβιακών, έδειξε ότι η προηγηθείσα χορήγηση κινολονών ήταν συχνότερη στην ομάδα ελέγχου [ $p=0,019$ ,  $OR=0,35$  (0,15-0,83)]. Η λήψη και η διάρκεια χορήγησης κολιστίνης, αλλά και των υπόλοιπων αντιμικροβιακών δεν διέφερε μεταξύ των δύο ομάδων.

Στην ομάδα των ασθενών με CR KPC-KP παρατηρήθηκε συχνότερη απευθείας διακομιδή από άλλα νοσηλευτικά ιδρύματα και συγκεκριμένα από άλλες ΜΕΘ, καθώς και συχνότερη προηγηθείσα νοσηλεία σε ΜΕΘ, χωρίς όμως να αναδεικνύεται στατιστική σημαντικότητα ( $p=0,141$ ,  $p=0,067$  και  $p=0,065$ ).

Έλεγχος προηγηθέντος αποικισμού πραγματοποιήθηκε σε 55 ασθενείς (20 ασθενείς με CR KPC-KP και 35 ασθενείς από την ομάδα ελέγχου). Ο προηγηθείς αποικισμός με ανθεκτικό στην κολιστίνη στέλεχος ήταν σημαντικά συχνότερος στην ομάδα των ασθενών με CR KPC-KP [ $p \leq 0,001$ ,  $OR=66,00$  (10,92-399,01)].

Η πολυπαραγοντική ανάλυση έδειξε ότι από τις μεταβλητές που εισήχθησαν στο μοντέλο (απευθείας διακομιδή από άλλο νοσοκομείο, απευθείας διακομιδή από ΜΕΘ, προηγηθείσα νοσηλεία σε ΜΕΘ, προηγηθείσα χορήγηση κινολονών, άλλες θεραπευτικές παρεμβάσεις και προηγηθείς αποικισμός με ανθεκτικό στην κολιστίνη στέλεχος) ο προηγηθείς αποικισμός με ανθεκτικό στην κολιστίνη στέλεχος αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την απομόνωση σε κλινικό δείγμα ανθεκτικού στην κολιστίνη στελέχους [ $p \leq 0,001$ , OR=75,88 (10,76-535,41)]. Εισάγοντας στο μοντέλο και την προηγηθείσα χορήγηση κολιστίνης, δεν μεταβλήθηκαν τα αποτελέσματα.

**Πίνακας 37. Μονοπαραγοντική ανάλυση των δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών μεταξύ των ασθενών με CR KPC-KP στέλεχος και των ασθενών με CS KPC-KP στέλεχος.**

Μεταβλητές	Ασθενείς με CR στέλεχος n= 34 N (%) Μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση (εύρος)	Ασθενείς με CS στέλεχος n= 68 N (%) Μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση (εύρος)	OR (95% CI)	p
<b>Σχετιζόμενες με τον ασθενή</b>				
Ηλικία, έτη	59,15±18,25	62,76±20,93	NA	0,183
Άρρεν φύλο	20 (58,8)	42 (61,8)	1,13 (0,49-2,62)	0,831
Υποκείμενα νοσήματα >2	21 (61,8)	47 (69,1)	0,72 (0,30-1,71)	0,508
Χρόνος νοσηλείας, ημέρες	23,12±24,56	17,53±13,81	NA	0,662
<i>Παρεμβατικές πράξεις</i>				
Μηχανικός αερισμός κατά την απομόνωση	20 (58,8)	38 (55,9)	1,13 (0,49-2,60)	0,834
Μηχανικός αερισμός κατά τη διάρκεια της νοσηλείας	21 (61,8)	42 (61,8)	1,00 (0,43-2,33)	1,000
Ημέρες	22,30±21,56	17,29±11,16	NA	0,756
Παρουσία ΚΦΓ	29 (85,3)	48 (70,6)	2,42 (0,82-7,14)	0,143
Ημέρες	22,66±24,56	18,42±12,50		0,874
Παρουσία ουροκαθετήρα	32 (94,1)	65 (95,6)	0,74 (0,12-4,64)	1,000
Ημέρες	19,24±20,96	16,83±13,16		0,946
Ρινογαστρικός σωλήνας	27 (79,4)	51 (75,0)	1,29 (0,47-3,48)	0,805
Ξένο σώμα	11 (32,4)	19 (27,9)	1,23 (0,51-3,01)	0,818
Άλλες θεραπευτικές παρεμβάσεις	12 (35,3)	35 (51,5)	0,51 (0,22-1,20)	0,144



Χειρουργική επέμβαση μετά την εισαγωγή	13 (38,2)	20 (29,4)	1,49 (0,62-3,53)	0,501
Απευθείας διακομιδή από νοσοκομείο	21 (61,8)	30 (44,1)	2,05 (0,88-4,75)	0,141
Απευθείας διακομιδή από ΜΕΘ	11 (32,4)	10 (14,7)	2,77 (1,04-7,41)	0,067
Προηγηθείσα νοσηλεία Ημέρες	26 (76,5)	49 (72,1)	1,26 (0,49-3,27)	0,812
	19,81±18,39	15,69±18,45		0,422
Προηγηθείσα νοσηλεία σε ΜΕΘ	14 (41,2)	16 (23,5)	2,28 (0,94-5,50)	0,065
Ημέρες	18,75±18,90	18,85±30,71		0,574
Προηγηθείς αποικισμός	20 (95,2)	35 (83,3)	4,00 (0,46-34,90)	0,250
Ημέρες νοσηλείας έως τον αποικισμό	12,47±19,51	8,88±7,60	NA	0,782
Ημέρες νοσηλείας από τον αποικισμό έως τη λοίμωξη	10,94±19,14	10,66±11,66	NA	0,569
Προηγηθείς αποικισμός στο γαστρεντερικό με ανθεκτικό στην κολιστίνη στέλεχος	16 (80,0)	2 (5,7)	<b>66,00 (10,92-399,01)</b>	<b>≤0,001</b>
<b>Σχετιζόμενες με τη θεραπεία (Ασθενείς με λοίμωξη N=54)</b>				
Κατάλληλη εμπειρική αγωγή	6 (33,3)	12 (33,3)	1,00 (0,30-3,32)	1,000
Κατάλληλη αντιμικροβιακή αγωγή	13 (72,2)	26 (72,2)	1,00 (0,28-3,54)	1,000
Έναρξη κατάλληλης αγωγής μέσα σε 3 ημέρες	6 (46,2)	16 (61,5)	0,54 (0,14-2,06)	0,497
Συνδυασμός αντιμικροβιακών	6 (46,2)	12 (46,2)	1,00 (0,26-3,80)	1,000

**Πίνακας 38. Μονοπαραγοντική ανάλυση των υποκείμενων νοσημάτων μεταξύ των ασθενών με CR KPC-KP στέλεχος και των ασθενών με CS KPC-KP στέλεχος.**

Υποκείμενα νοσήματα	Ασθενείς με CR στέλεχος n= 34	Ασθενείς με CS στέλεχος n= 68	OR (95% CI)	p
	N (%)			
	Μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση (εύρος)			
Κρανιοεγκεφαλική κά- κωση	8 (23,5)	13 (19,1)	1,30 (0,48-3,53)	0,796
Πολυτραυματίας	4 (11,8)	10 (14,7)	0,77 (0,22-2,67)	0,769
ΑΕΕ	5 (14,7)	13 (19,1)	0,73 (0,24-2,25)	0,784
Καρδιαγγειακά νοσήμα- τα	13 (38,2)	38 (55,9)	0,49 (0,21-1,13)	0,141
ΧΑΠ	5 (14,7)	7 (10,3)	1,50 (0,44-5,14)	0,746
Σακχαρώδης διαβήτης	3 (8,8)	15 (22,1)	0,34 (0,09-1,28)	0,167
Κακοήθεια	5 (14,7)	14 (20,6)	0,67 (0,22-2,03)	0,594
Νεφρική ανεπάρκεια	6 (17,6)	16 (23,5)	0,70 (0,25-1,98)	0,613
Νοσήματα ήπατος και γαστρεντερικού	5 (14,7)	7 (10,3)	1,50 (0,44-5,14)	0,746
Αιματολογικές διατα- ραχές	2 (5,9)	2 (2,9)	2,06 (0,28-15,32)	0,599
Ψυχιατρικά νοσήματα	3 (8,8)	3 (4,4)	2,10 (0,40-10,99)	0,398
Νευρολογικά νοσήματα	8 (23,5)	10 (14,7)	1,78 (0,63-5,04)	0,409
Προηγηθείσα χειρουρ- γική επέμβαση	22 (64,7)	43 (63,2)	1,07 (0,45-2,52)	1,000
Ανοσοκαταστολή	5 (14,7)	6 (8,8)	1,78 (0,50-6,32)	0,499
Παχυσαρκία	0 (0,0)	4 (5,9)	NA	0,298
Αλκοολισμός	2 (5,9)	1 (1,5)	4,19 (0,37-47,91)	0,257

**Πίνακας 39. Μονοπαραγοντική ανάλυση της προηγηθείσας χορήγησης αντιμικροβιακών μεταξύ των ασθενών με CR KPC-KP στέλεχος και των ασθενών με CS KPC-KP στέλεχος.**

Προηγηθείσα χορήγηση Αντιμικροβιακών	Ασθενείς με CR στέλεχος n= 34	Ασθενείς με CS στέλεχος n= 68	OR (95% CI)	p
	N (%) Μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση (εύρος)			
Κεφαλοσπορίνες β' γενιάς	2 (5,9)	3 (4,4)	1,35 (0,22-8,51)	1,000
ημέρες	12,50±6,36	5,33±4,16		0,215
Κεφαλοσπορίνες γ'/δ' γενιάς	12 (35,3)	23 (33,8)	1,07 (0,45-2,53)	1,000
ημέρες	9,67±4,40	9,43±5,29		0,694
Κινολόνες	15 (44,1)	47 (69,1)	<b>0,35 (0,15-0,83)</b>	<b>0,019</b>
ημέρες	12,64±7,31	8,80±5,94		0,077
Αμινογλυκοσίδες	14 (41,2)	22 (32,4)	1,46 (0,62-3,43)	0,510
ημέρες	10,92±4,99	8,21±4,29		0,111
Καρβαπενέμες	14 (41,2)	22 (32,4)	1,46 (0,62-3,43)	0,510
ημέρες	13,69±10,59	14,79±8,98		0,754
Αζτρεονάμη	2 (5,9)	4 (5,9)	1,00 (0,17-5,75)	1,000
ημέρες	15,00±11,31	9,00±8,29		0,491
Συνδυασμοί β-λακταμών με αναστολείς β-λακταμασών	20 (58,8)	47 (69,1)	0,64 (0,27-1,50)	0,377
ημέρες	14,11±9,08	10,91±6,90		0,200
Κολιστίνη	12 (35,3)	15 (22,1)	1,93 (0,78-4,78)	0,233
ημέρες	16,73±12,78	15,40±6,87		0,574
Τιγκεκυκλίνη	9 (26,5)	10 (14,7)	2,09 (0,76-5,76)	0,181
ημέρες	15,63±9,13	11,00±5,41		0,217
Μετρονιδαζόλη	6 (17,6)	8 (11,8)	1,61 (0,51-5,07)	0,543
ημέρες	9,83±4,62	9,71±5,71		0,968
Γλυκοπεπτίδια	14 (41,2)	27 (39,7)	1,06 (0,46-2,46)	1,000
ημέρες	14,38±13,58	12,31±6,35		0,648
Λινεζολίδη	12 (35,3)	16 (23,5)	1,77 (0,72-4,36)	0,243
ημέρες	13,50±7,09	13,47±7,18		0,943
Αντιμυκητιακά	9 (26,5)	19 (27,9)	0,93 (0,37-2,35)	1,000
ημέρες	21,44±16,18	12,94±11,14		0,121
Κλινταμυκίνη	2 (5,9)	10 (14,7)	0,36 (0,07-1,76)	0,328
ημέρες	3,50±2,12	7,80±3,68		0,149

### 3.4.3 Κατάλληλη αντιμικροβιακή αγωγή

Κατάλληλη αντιμικροβιακή αγωγή έλαβαν συνολικά 39 από τους 54 ασθενείς με κλινική λοίμωξη (Πίνακας 40). Οι δύο ομάδες δεν διέφεραν ως προς τη χορήγηση κατάλληλης εμπειρικής αλλά και οριστικής αντιμικροβιακής αγωγής αλλά και ως προς την έγκαιρη έναρξη αυτής και τη χρήση συνδυαστικής θεραπείας. Η χορήγηση τιγκεκυκλίνης ήταν συχνότερη στους ασθενείς με CR KPC-KP [ $p=0,029$ ,  $OR=10,29$  (1,16-91,07)], όπως ήταν αναμενόμενο.

**Πίνακας 40. Κατάλληλη αντιμικροβιακή αγωγή στους ασθενείς με κλινική λοίμωξη από CR KPC-KP και CS KPC-KP στέλεχος**

Μεταβλητές σχετιζόμενες με τη θεραπεία	Ασθενείς με CR στέλεχος n= 18	Ασθενείς με CS στέλεχος n= 36	OR (95% CI)	p
	N (%)			
	Μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση (εύρος)			
Κατάλληλη εμπειρική αγωγή	6 (33,3)	12 (33,3)	1,00 (0,30-3,32)	1,000
Κατάλληλη αντιμικροβιακή αγωγή	13 (72,2)	26 (72,2)	1,00 (0,28-3,54)	1,000
Έναρξη κατάλληλης αγωγής μέσα σε 3 ημέρες	6 (46,2)	16 (61,5)	0,54 (0,14-2,06)	0,497
Συνδυασμός αντιμικροβιακών	6 (46,2)	12 (46,2)	1,00 (0,26-3,80)	1,000
<i>Αντιμικροβιακά</i>				
κολιστίνη	0 (0,0)	14 (53,8)		<b>0,001</b>
ημέρες		19,14±18,75		NA
τιγκεκυκλίνη	12 (92,3)	14 (53,8)	<b>10,29 (1,16-91,07)</b>	<b>0,029</b>
ημέρες	14,33±5,63	13,57±3,92		0,689
αμινογλυκοσίδη	5 (38,5)	7 (26,9)	1,70 (0,41-6,98)	0,714
ημέρες	8,83±3,71	7,29±2,56		0,394
καρβαπενέμη	1 (7,7)	4 (15,4)	0,46 (0,05-4,58)	0,648
ημέρες	15,00±0,00	18,25±6,24		0,673
φωσφομυκίνη	1 (7,7)	0 (0,0)	NA (0,00-0,00)	0,333
ημέρες	20,00±0,00			NA
ριφαμπικίνη	0 (0,0)	2 (7,7)	NA (0,00-0,00)	0,544
ημέρες		7,50±3,54		NA

### 3.4.4 Έκβαση

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων ως προς τις μεταβλητές που σχετίζονται με την έκβαση (Πίνακας 41).

**Πίνακας 41. Έκβαση των ασθενών με CR KPC-KP και CS KPC-KP στέλεχος**

Έκβαση	Ασθενείς με CR στέλεχος n= 34	Ασθενείς με CS στέλεχος n= 68	OR (95% CI)	p
	N (%)			
	Μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση (εύρος)			
Ολική θνητότητα	16 (47,1)	25 (36,8)	1,53 (0,66-3,52)	0,393
Ημέρες από την απομόνωση έως το θάνατο	40,60±57,39	37,21±50,42	NA	0,658
Θνητότητα 15 ημερών	6 (17,6)	7 (10,3)	1,87 (0,57-6,07)	0,350
Θνητότητα λοίμωξης <sup>1</sup>	5 (27,8)	11 (30,6)	0,87 (0,25-3,06)	1,000

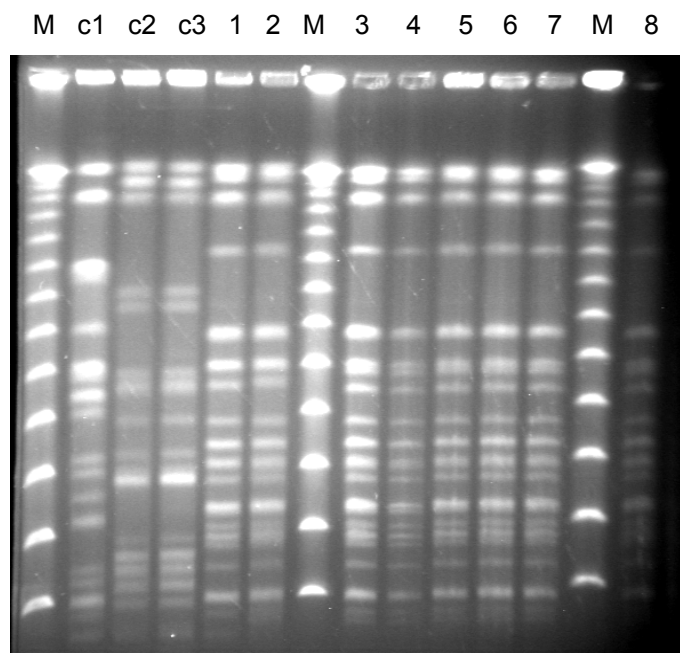
<sup>1</sup>Για τους ασθενείς με κλινική λοίμωξη

### 3.4.5 Μοριακή τυποποίηση

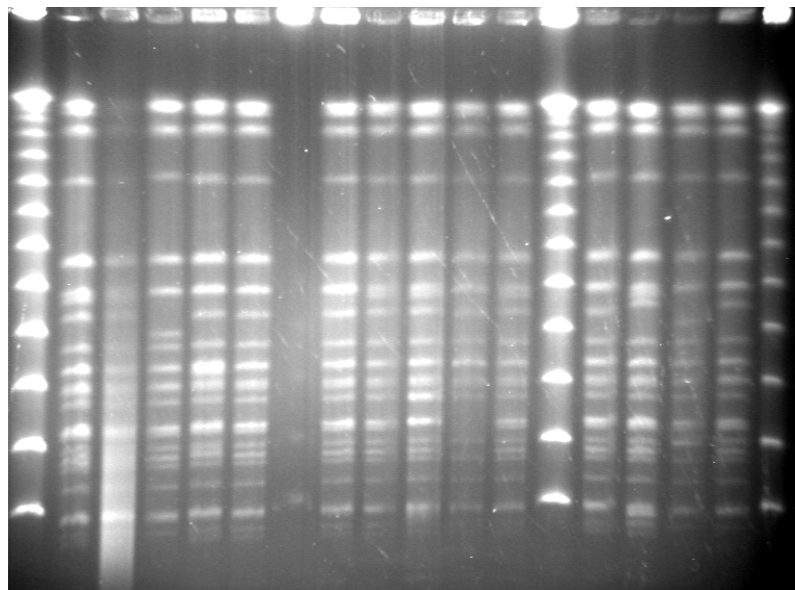
Η PFGE έδειξε ότι και τα 72 (34 CR KPC-KP και 38 CS KPC-KP) στελέχη που ελέγχθηκαν ανήκαν σε έναν επιδημικό κλώνο με 5 υποτύπους που διέφεραν κατά 1-3 μπάντες από τον επικρατούντα υπότυπο. Εξήντα στελέχη (32 CR και 28 CS) ήταν πανομοιότυπα και ανήκαν στον επικρατούντα υπότυπο Ia, δύο CR στελέχη ανήκαν στον υπότυπο Ib και τα υπόλοιπα 10 CS στελέχη στους υποτύπους Ic έως Ie: 6 στελέχη ανήκαν στον υπότυπο Ic, ένα στον υπότυπο Id και τρία στον υπότυπο Ie. Τα στελέχη των υποτύπων Ib και Id προήλθαν από ασθενείς Παθολογικών Τμημάτων, ενώ τα στελέχη των υποτύπων Ic και Ie απομονώθηκαν από ασθενείς της ΜΕΘ. Τα αποτελέσματα της μοριακής τυποποίησης με τη μέθοδο PFGE παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.

Η μοριακή τυποποίηση με τη μέθοδο MLST έδειξε ότι και τα 72 στελέχη ανήκαν στον τύπο ST258.

**Εικόνα 3.**



M 9 10 11 12 13 M 14 15 16 17 18 M 19 20 21 22 M



Ηλεκτροφορητικά πρότυπα 12 CR KPC-KP και 10 CS KPC-KP στελεχών αντιπροσωπευτικών όλων των υποτύπων του ενός κλώνου που ανιχνεύθηκε.

M: lambda-phage molecular size marker

c1 - c3: 3 στελέχη *K. pneumoniae* αρνητικά για παραγωγή KPC καρβαπενεμάσης, που απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια της μελέτης

1-10 και 12: CR KPC-KP υπότυπος Ia

11: CR KPC-KP υπότυπος Ib

13-16, 18, 19 και 22: CS ΚΡC-ΚΡ υπότυπος Ia

17: CS ΚΡC-ΚΡ υπότυπος Ic

20: CS ΚΡC-ΚΡ υπότυπος Id

21: CS ΚΡC-ΚΡ υπότυπος Ie.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παγκόσμια διασπορά ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών Εντεροβακτηριακών συνιστά μείζον πρόβλημα δημόσιας υγείας, με σημαντικότερες επιπτώσεις τόσο σε ανθρώπινες ζωές όσο και στην εύρυθμη λειτουργία του συστήματος υγείας. Η παραγωγή KPC καρβαπενεμασών συγκαταλέγεται στους κυρίαρχους μηχανισμούς αντοχής στις καρβαπενέμες. Η εξάπλωση των στελεχών *Klebsiella pneumoniae* που παράγουν KPC καρβαπενεμάσες, είναι ευρεία και εξελίχθηκε με μεγάλη ταχύτητα την τελευταία δεκαετία, ξεκινώντας από τις Βορειοανατολικές πολιτείες των ΗΠΑ και επίκεντρο της επιδημίας την πολιτεία της Νέας Υόρκης. Η γεωγραφική τους κατανομή ποικίλει σημαντικά ανά την υφήλιο, με ενδημική εμφάνιση εκτός από τις ΗΠΑ, στο Ισραήλ, την Ελλάδα, την Κίνα και χώρες της Νοτίου Αμερικής (29).

Τα *bla*<sub>KPC</sub> γονίδια βρίσκονται σε δομή τρανσποζονίου. Τα τρανσποζόνια αυτά εισέρχονται σε πλασμίδια διαφόρων ομάδων, στα οποία ανευρίσκονται και άλλα γονίδια αντοχής, με αποτέλεσμα τα στελέχη να αποκτούν πολυανθεκτικό φαινότυπο. Τα *bla*<sub>KPC</sub> γονίδια επωφελούνται όλων των μοριακών μηχανισμών (τρανσποζόνια, πλασμίδια και επιτυχημένους κλώνους) που διευκολύνουν τη διασπορά τους (129).

Η πλειονότητα των στελεχών παγκοσμίως ανήκει στον κλώνο ST258, αν και σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές έχουν αναγνωρισθεί διάφοροι άλλοι κλώνοι. Τα στελέχη *K. pneumoniae* του κλώνου ST258, συμπεριλαμβάνονται στα πλέον επιτυχημένα πολυανθεκτικά νοσοκομειακά παθογόνα (178). Η αναγνώριση της κλωνικής, κυρίως, φύσης της επιδημίας είναι ένα σημαντικό βήμα προς την ανάπτυξη στοχευμένων στρατηγικών για τον περιορισμό της περαιτέρω εξάπλωσης (281).

Στη χώρα μας μέχρι το 2007 το πρόβλημα της αντοχής στις καρβαπενέμες για τα στελέχη *K. pneumoniae* εντοπιζόταν στην πολυκλωνική διασπορά στελεχών που παρήγαγαν καρβαπενεμάσες τύπου VIM. Από το τέλος του 2007, σημειώνεται παράλληλη επιδημική εμφάνιση στελεχών που παράγουν KPC-2 καρβαπενεμάση, που πλέον ενδημούν στα ελληνικά νοσοκομεία και σταδιακά έχουν επικρατήσει έναντι των VIM-θετικών στελεχών. Η επιδημία παραμένει κυρίως κλωνική με επικράτηση των στελεχών του κλώνου ST258, ενώ άλλοι τύποι αναφέρονται σε πολύ μικρότερη συχνότητα (278). Επίσης σημειώνεται ανάδυση στελεχών που φέρουν ταυτόχρονα γονίδια καρβαπενεμασών τύ-



που VIM και KPC (274, 275). Τα στελέχη αυτά δεν παρουσιάζουν μέχρι στιγμής ευρεία εξάπλωση.

Αναγνωρίζοντας το μέγεθος του προβλήματος των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες Gram-αρνητικών παθογόνων, από το Νοέμβριο του 2010 έχει τεθεί σε εφαρμογή το εθνικό σχέδιο δράσης «Προκρούστης». Κύριοι στόχοι του σχεδίου είναι η συστηματική επιτήρηση των λοιμώξεων μέσω υποχρεωτικής δήλωσής τους στο ΚΕΕΛΠΝΟ και η συστηματική εφαρμογή μέτρων ελέγχου λοιμώξεων. Σύμφωνα με τα πρώτα αποτελέσματα, ο συνολικός αριθμός των λοιμώξεων από τα τρία παθογόνα-στόχους ανά μήνα κυμάνθηκε μεταξύ 230-450, με την *K. pneumoniae* να αποτελεί το συχνότερο παθογόνο (43,2%). Ο κυρίαρχος μηχανισμός αντοχής για τα στελέχη *K. pneumoniae* ήταν η παραγωγή KPC καρβαπενεμάσης (84,4%). Η μέση επίπτωση, που υπολογίστηκε από τα δεδομένα 64 νοσοκομείων για την περίοδο από τον Ιανουάριο έως τον Ιούνιο 2011, ήταν 55 ανά 100.000 ασθενοημέρες. Τα παραπάνω δεδομένα υπογραμμίζουν την αναγκαιότητα συστηματικής παρέμβασης, η οποία αποτελεί και τη δεύτερη φάση του σχεδίου που τέθηκε σε εφαρμογή από το Σεπτέμβριο του 2012.

Η ανάληψη δράσης για την αντιμετώπιση αυτής της ταχέως κλιμακούμενης κατάστασης σε παγκόσμιο αλλά και τοπικό επίπεδο, προϋποθέτει καταρχάς την ακριβή αποτύπωση του προβλήματος. Η συλλογή όσο το δυνατόν πληρέστερων επιδημιολογικών δεδομένων είναι απαραίτητη για την επιλογή των πλέον αποτελεσματικών αλλά και προσιτών μέτρων, ανάλογα με την έκταση και τη φύση της διασποράς. Όμως, εκτός από τους επιδημιολογικούς σκοπούς, η έγκαιρη και αξιόπιστη ανίχνευση των μηχανισμών αντοχής καθώς και η ακρίβεια των αποτελεσμάτων του ελέγχου ευαισθησίας στο κλινικό εργαστήριο, κατέχουν θεμελιώδη ρόλο στη θεραπευτική αντιμετώπιση των λοιμώξεων και στην άμεση λήψη μέτρων περιορισμού της διασποράς. Επιπλέον, σημαντική συνιστώσα των στρατηγικών παρέμβασης είναι η ενεργητική επιτήρηση των φορέων. Μέθοδοι εύχρηστες, αξιόπιστες και χαμηλού κόστους είναι δυνατόν να εφαρμοστούν στην καθημερινή εργαστηριακή πρακτική. Τέλος, η συγκέντρωση δεδομένων για τη θεραπευτική αντιμετώπιση αυτών των λοιμώξεων από καλά σχεδιασμένες κλινικές μελέτες είναι απαραίτητη για τη δημιουργία θεραπευτικών κατευθύνσεων.

Αυτοί ήταν και οι κύριοι άξονες στους οποίους βασίστηκε και ο σχεδιασμός της παρούσας προοπτικής μελέτης. Η μελέτη αποσκοπούσε στην όσο το δυνατόν πληρέστερη διερεύνηση των λοιμώξεων από στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν KPC καρβαπε-

νεμάση, σε ένα τριτοβάθμιο νοσοκομείο. Πραγματοποιήθηκε ακριβής καταγραφή για διάστημα 2,5 ετών, ώστε να αποτυπωθεί το μέγεθος του προβλήματος στο σύνολο του νοσοκομείου και ανά τμήμα, να υπολογιστεί η επίπτωση και να σκιαγραφηθεί η πορεία της επιδημίας. Εξετάστηκαν προβλήματα που τίθενται στην κλινική πράξη, αναφορικά με την κλινική επιδημιολογία των λοιμώξεων και την καλύτερη θεραπευτική τους προσέγγιση. Συγκεντρώθηκαν λεπτομερή κλινικά και επιδημιολογικά δεδομένα των ασθενών και διερευνήθηκαν οι παράγοντες κινδύνου για ανάπτυξη κλινικής λοίμωξης, οι παράγοντες που σχετίζονται με την απομόνωση ανθεκτικών στη κολιστίνη στελεχών και οι παράγοντες που σχετίζονται με την έκβαση και την αποτελεσματικότητα των χρησιμοποιηθέντων θεραπευτικών σχημάτων. Ταυτόχρονα εξετάστηκαν προβλήματα που απασχολούν την εργαστηριακή πράξη, αναφορικά με τον αξιόπιστο έλεγχο ευαισθησίας και τις τεχνικές ελέγχου φορέας. Τέλος, η μελέτη της μοριακής επιδημιολογίας στόχευε στη διερεύνηση της διασποράς των *bla*<sub>KPC</sub> γονιδίων σε διαφορετικούς κλώνους, καθώς η πληροφορία για την κλωνική ή μη φύση της επιδημίας είναι σημαντική για το σχεδιασμό επιτυχούς παρέμβασης.

Κατά τη διάρκεια της μελέτης απομονώθηκαν συνολικά 414 στελέχη *K. pneumoniae* με μοριακά επιβεβαιωμένη παραγωγή KPC καρβαπενεμάσης (KPC-KP) από 185 ασθενείς. Πλήρη στοιχεία συγκεντρώθηκαν και αναλύθηκαν για 175 από αυτούς. Οι μισοί ασθενείς (49,2%) νοσηλεύονταν στη ΜΕΘ. Απομόνωση KPC-KP στελεχών σημειώθηκε και από 5 εξωτερικούς ασθενείς, εκ των οποίων οι 4 εμφάνιζαν πρόσφατες νοσηλείες. Ο αποικισμός από KPC-KP στελέχη είναι παρατεταμένος και η μέση διάρκεια του υπολογίζεται στους τρεις μήνες (231, 374). Οι ασθενείς αυτοί φαίνεται ότι παρέμειναν αποικισμένοι μετά την νοσηλεία τους. Η μοριακή τυποποίηση αυτών των στελεχών έδειξε ότι ανήκαν στον επικρατούντα στα Ελληνικά νοσοκομεία τύπο ST258.

Οι συνηθέστερες πηγές απομόνωσης ήταν οι αιμοκαλλιέργειες, οι κεντρικοί φλεβικοί καθετήρες και τα ούρα. Με βάση το χρόνο νοσηλείας των ασθενών και τα υπάρχοντα δεδομένα του ελέγχου ορθικής φορέας κατά την εισαγωγή, υπολογίστηκε ότι στο 69,4% των περιπτώσεων τα στελέχη αποκτήθηκαν ενδονοσοκομειακά. Το σημαντικό ποσοστό των εισαγόμενων περιστατικών (30,6%), υπογραμμίζει τη σημασία της ενεργητικής επιτήρησης των φορέων και της προληπτικής εφαρμογής των μέτρων ελέγχου των λοιμώξεων σε ασθενείς υψηλού κινδύνου, για την αποφυγή της δευτερογενούς μετάδοσης. Ειδικά στη χώρα μας, τα KPC-KP στελέχη ενδημούν στα νοσοκομεία και οι

ασθενείς συχνά διακινούνται από το ένα νοσοκομείο στο άλλο, έτσι ο κίνδυνος να φέρουν τέτοια στελέχη είναι υψηλός. Επίσης δεν υπάρχουν δεδομένα για τα κέντρα μακροχρόνιας φροντίδας, τα οποία πιθανά αποτελούν σημαντική δεξαμενή διασποράς (164, 169, 199, 231). Θα ήταν χρήσιμες μελέτες σημειακής επιτήρησης, ώστε να καθοριστεί το εύρος της εξάπλωσης. Στην παρούσα μελέτη η αναλογία των εισαγόμενων περιστατικών σε σχέση με το σύνολο παρουσιάζει αύξηση το δεύτερο και το τρίτο έτος της μελέτης, ενώ μειώθηκε η αναλογία των περιπτώσεων που τα στελέχη αποκτήθηκαν ενδονοσοκομειακά, υποδεικνύοντας τη σχετική απόδοση της προσπάθειας για αποφυγή της δευτερογενούς μετάδοσης. Υπάρχουν βέβαια σημαντικά περιθώρια βελτίωσης, με τη συνεχή επιτήρηση της εφαρμογής των μέτρων και τη δυνατότητα νοσηλείας σε συνθήκες μόνωσης, όπως πλέον επιβάλλεται στα πλαίσια του σχεδίου δράσης «Προκρούστης».

Η μελέτη της επιδημικής καμπύλης, έδειξε ότι ο συνολικός ετήσιος αριθμός ασθενών με απομόνωση KPC-KP στελέχους δεν παρουσιάζει σημαντική μεταβολή μεταξύ των ετών 2009 και 2010, αν και παρατηρείται μείωση κατά το τελευταίο εξάμηνο της μελέτης. Η επίπτωση παρουσιάζει στατιστικά σημαντική αύξηση ( $p < 0,001$ ) το 2009 σε σύγκριση με το 2008, τόσο στο σύνολο των νοσηλευτικών τμημάτων (από 31,09 σε 74,35 περιπτώσεις ανά 100.000 ασθενοημέρες), όσο και στη ΜΕΘ (από 8,86 σε 18,03 περιπτώσεις ανά 1000 ασθενοημέρες). Η επίπτωση για το 2010 (86,48 περιπτώσεις ανά 100.000 ασθενοημέρες), παρουσιάζεται σημαντικά υψηλότερη από την αναφερόμενη στην κορύφωση της επιδημίας στο Ισραήλ (229), υπογραμμίζοντας το μέγεθος του προβλήματος. Η αναλογία των βακτηριαιμιών επί του συνόλου των περιπτώσεων παραμένει σταθερή μεταξύ των δύο πρώτων ετών και παρουσιάζεται σημαντικά μειωμένη το 2010, αντανακλώντας πιθανά την έγκαιρη αντιμετώπιση της πρωτοπαθούς εστίας, λόγω της αυξημένης επαγρύπνησης. Δεν υπάρχει δυνατότητα σύγκρισης της επίπτωσης με τα εθνικά δεδομένα του σχεδίου «Προκρούστης», διότι η καταγραφή σε εθνικό επίπεδο αφορά σε συγκεκριμένες λοιμώξεις και για τρία παθογόνα-στόχους. Η ετήσια επίπτωση για πρώτο έτος της εφαρμογής του σχεδίου «Προκρούστης» στο σύνολο των νοσηλευτικών τμημάτων του νοσοκομείου παρουσιάζει μικρή μείωση ( $p = 0,76$ ), ενώ σημαντική είναι η μείωση της επίπτωσης στη ΜΕΘ ( $p = 0,003$ ). Στον περαιτέρω σχεδιασμό περιλαμβάνεται η ενσωμάτωση των δεδομένων για το 2012, ώστε να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα των μέτρων και να συγκριθεί με τα δεδομένα που

παράγονται σε εθνικό επίπεδο. Η ύπαρξη λεπτομερών δεδομένων καταγραφής στο τοπικό επίπεδο του νοσοκομείου βοηθά στην ανάδειξη ιδιαιτεροτήτων και πιθανών σημείων που απαιτούν ιδιαίτερες δράσεις.

Θεμελιώδης βέβαια προϋπόθεση τόσο για την επιδημιολογική διερεύνηση και παρέμβαση, αλλά και για τη θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών είναι η ακριβής ανίχνευση των μηχανισμών αντοχής. Στην παρούσα μελέτη, η χρήση απλών και χαμηλού κόστους φαινοτυπικών δοκιμασιών για την ανίχνευση παραγωγής καρβαπενεμασών, παρουσίασε υψηλή ακρίβεια σε σχέση με το μοριακό έλεγχο. Η επακόλουθη ταχεία κοινοποίηση του αποτελέσματος θεωρείται ότι συνέβαλλε στην επιλογή κατάλληλης αντιμικροβιακής αγωγής και στην ενημέρωση για τη λήψη μέτρων ελέγχου των λοιμώξεων.

Σε αυτό το πλαίσιο, είναι επίσης απαραίτητη η ύπαρξη αξιόπιστων δεδομένων σχετικά με το φαινότυπο ευαισθησίας. Ο έλεγχος των στελεχών της μελέτης έδειξε ότι η υψηλότερη *in vitro* δραστηριότητα σημειώθηκε για την τιγκεκυκλίνη (95,4%) και τη γενταμικίνη (86,7%). Πράγματι, μεταξύ των αμινογλυκοσιδών η γενταμικίνη παρουσιάζει την υψηλότερη δραστηριότητα έναντι των στελεχών του κλώνου ST258, όπως προκύπτει από πολυάριθμες μελέτες. Τα ποσοστά ευαισθησίας στην τιγκεκυκλίνη παρουσιάζουν σημαντική διακύμανση και δεν είναι συγκρίσιμα μεταξύ των μελετών, λόγω της χρήσης διαφορετικών ορίων ευαισθησίας. Ταυτόχρονα, διάφορα μεθοδολογικά προβλήματα επηρεάζουν τα λαμβανόμενα αποτελέσματα. Σε γενικές γραμμές η τιγκεκυκλίνη συμπεριλαμβάνεται στα αντιβιοτικά με την υψηλότερη δραστηριότητα (178). Το ποσοστό αντοχής στην κολιστίνη (20,5%), αν και υψηλό, συμβαδίζει με το αναφερόμενο σε πρόσφατες μελέτες από τον ελληνικό χώρο (278, 332, 334). Σχετικά υψηλό ποσοστό ευαισθησίας καταγράφεται για την τετρακυκλίνη (63,3%), αν και για την κλινική της χρήση πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η δυνατότητα επίτευξης υψηλών συγκεντρώσεων του φαρμάκου στο σημείο της λοίμωξης. Αυτό δεν είναι πάντα εφικτό, δεδομένου ότι τα περισσότερα στελέχη εμφανίζουν τιμές MIC κοντά στα όρια ευαισθησίας.

Επίσης πραγματοποιήθηκε αναδρομικός έλεγχος αντιπροσωπευτικών στελεχών αναφορικά με την ευαισθησία τους στη φωσφομυκίνη, της οποίας η χρήση πρόσφατα προτάθηκε για τη θεραπεία λοιμώξεων από πολυανθεκτικά παθογόνα. Η φωσφομυκίνη παρουσίασε πολύ υψηλό ποσοστό ευαισθησίας (93,8%), εύρημα που συμφωνεί με προηγηθείσες αναφορές (326). Ο προβληματισμός που υφίσταται σχετικά με την επι-

λογή ανθεκτικών μεταλλακτών κατά τη διάρκεια της θεραπείας, οδήγησε στον έλεγχο στελεχών που απομονώθηκαν μετά τη λήψη φωσφομυκίνης. Παρότι ο αριθμός των ασθενών στους οποίους χορηγήθηκε η φωσφομυκίνη στα πλαίσια συνδυαστικής αγωγής ήταν μικρός (7 ασθενείς), παρατηρήθηκε ανάπτυξη αντοχής σε δύο περιπτώσεις. Οπωσδήποτε είναι απαραίτητα περισσότερα κλινικά δεδομένα για την αποτελεσματικότητά της, καθώς και κλινικά και *in vitro* δεδομένα για τον καθορισμό των συνδυασμών εκείνων που σχετίζονται με τη μικρότερη πιθανότητα ανάπτυξης αντοχής.

Σημαντικό ρόλο στις θεραπευτικές αποφάσεις, κατέχει ο ακριβής προσδιορισμός των τιμών MIC στις καρβαπενέμες. Οι τιμές αυτές παρουσίασαν ευρεία διακύμανση, όπως ήταν αναμενόμενο σε σχέση με τα υπάρχοντα δεδομένα (29). Εφαρμόζοντας τα αναθεωρημένα όρια ευαισθησίας του CLSI ( $S \leq 1 \mu\text{g/ml}$ ), το 8,2% των στελεχών παρουσίασαν ευαισθησία στη μεροπενέμη. Τιμή MIC στη μεροπενέμη  $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ , που θεωρείται απαραίτητη προϋπόθεση για τη δυνατότητα συμμετοχής της μεροπενέμης σε συνδυαστικά θεραπευτικά σχήματα, ελήφθη για το 31,9% των στελεχών. Η παρουσία ετεροανθεκτικών υποπληθυσμών καθιστά δύσκολο τον ακριβή προσδιορισμό του επιπέδου αντοχής στις καρβαπενέμες. Τα στελέχη αυτά εμφανίζονται ευαίσθητα με τις μεθόδους αναφοράς (αραίωση σε άγαρ και μικροαραίωση σε ζωμό), καθώς και με τα αυτοματοποιημένα συστήματα. Επίσης δημιουργείται δυσκολία στην ανάγνωση του αποτελέσματος των μεθόδων διάχυσης (350). Επιπρόσθετα η παρουσία ετεροαντοχής συνδέεται με θεραπευτική αποτυχία σε περίπτωση χορήγησης μονοθεραπείας. Απαιτούνται περισσότερα δεδομένα, τόσο εργαστηριακά όσο και κλινικά, για τη αποσαφήνιση του ρόλου των καρβαπενεμών.

Ένας από τους σημαντικότερους προβληματισμούς που τίθενται στο κλινικό εργαστήριο, είναι το κατά πόσον οι μέθοδοι ρουτίνας για τον έλεγχο της ευαισθησίας παράγουν αξιόπιστα αποτελέσματα. Το ερώτημα αυτό είναι ακόμα πιο καίριο για τα στελέχη που παράγουν KPC καρβαπενεμάση, δεδομένου ότι οι θεραπευτικές επιλογές είναι εξαιρετικά περιορισμένες. Ο αξιόπιστος έλεγχος ευαισθησίας θα καθοδηγήσει τις θεραπευτικές αποφάσεις για την επιλογή της κατάλληλης αντιμικροβιακής αγωγή (349). Λανθασμένα αποτελέσματα μπορεί είτε να περιορίσουν ακόμη περισσότερο το φάσμα των δραστικών αντιμικροβιακών, είτε να οδηγήσουν σε επιλογή ακατάλληλης αγωγής, με σημαντικές επιπτώσεις στην έκβαση των ασθενών. Ο ακριβής προσδιορισμός των τιμών MIC για τις καρβαπενέμες, την κολιστίνη και την τιγκεκυκλίνη κατέχει θεμελιώδη

ρόλο στη συμμετοχή αυτών των αντιμικροβιακών στο θεραπευτικό σχήμα και στη δολογία τους, σε συνδυασμό με τις φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες του κάθε αντιβιοτικού και λαμβανομένης υπόψη της εστίας της λοίμωξης.

Ο βαθμός συμφωνίας των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται για την τιγκεκυκλίνη με διαφορετικές μεθόδους δεν έχει καθοριστεί για τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη Εντεροβακτηριακών (333). Προηγούμενες μελέτες έχουν αναφέρει ασυμφωνία μεταξύ της μεθόδου διάχυσης των δίσκων ή/και του Etest σε σύγκριση με τη μέθοδο αναφοράς, ιδιαίτερα για στελέχη *A. baumannii* complex (387, 388, 389, 390, 391). Ελάχιστα δεδομένα υπάρχουν σχετικά με την ακρίβεια των αποτελεσμάτων που παράγονται από τα αυτοματοποιημένα συστήματα. Συγκεκριμένα, το Vitek2 έχει αξιολογηθεί σε μικρό αριθμό ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών Εντεροβακτηριακών σε δύο πρόσφατες μελέτες (392, 393). Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε να διερευνηθεί η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται για την τιγκεκυκλίνη στον έλεγχο στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν KPC καρβαπενεμάση, δεδομένου του κενού που υπάρχει στη σχετική βιβλιογραφία. Πραγματοποιήθηκε συγκριτική αξιολόγηση τριών μεθόδων ρουτίνας: ενός αυτοματοποιημένου συστήματος (Vitek 2) και δύο ταινιών διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιβιοτικών (Etest και MIC Test Strip), χρησιμοποιώντας ως μέθοδο αναφοράς την μέθοδο μικροαραίωσης σε ζυμό.

Ο χαρακτηρισμός ευαισθησίας πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τόσο τα όρια ευαισθησίας του FDA όσο και του EUCAST, λαμβάνοντας υπόψη ότι δεν υπάρχει ομοφωνία μεταξύ των δύο οργανισμών. Εφαρμόζοντας τα όρια ευαισθησίας του EUCAST τα ποσοστά ευαισθησίας εμφανίζονται σημαντικά χαμηλότερα με όλες τις μεθόδους και τα ποσοστά σφαλμάτων παρουσιάζονται αυξημένα. Το εύρημα αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από το γεγονός ότι οι τιμές MIC πολλών στελεχών βρίσκονταν κοντά στα όρια ευαισθησίας. Έτσι μπορούν να ερμηνευτούν και τα σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά ευαισθησίας που αναφέρονται σε άλλες μελέτες, στις οποίες εφαρμόζονται τα όρια του EUCAST (272).

Από τις μεθόδους που εξετάστηκαν, το Etest παρουσίασε την καλύτερη επίδοση, επιδεικνύοντας χαμηλά ποσοστά σφαλμάτων και υψηλή βασική συμφωνία και συμφωνία στην κατηγοριοποίηση. Προηγούμενες μελέτες αναφέρουν πολύ καλή συσχέτιση των αποτελεσμάτων μεταξύ του Etest και της μεθόδου αναφοράς για στελέχη Εντεροβακτηριακών, χωρίς όμως να έχουν εξεταστεί ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη (389,

394). Το σχετικά υψηλό ποσοστό ελασσόνων σφαλμάτων που προέκυψε όταν η ανάλυση έγινε με τα όρια ευαισθησίας του EUCAST, μπορεί να θεωρηθεί αποδεκτό, δεδομένου ότι δεν υπήρχε συστηματική τάση προς την ευαισθησία ή την αντοχή. Εφαρμόζοντας τα όρια ευαισθησίας του CLSI, το Etest ήταν η μόνη από τις συγκρινόμενες μεθόδους που πληρούσε τα κριτήρια για αποδεκτή απόδοση των μεθόδων ελέγχου της ευαισθησίας.

Επίσης αξιολογήθηκε και μια ακόμη ταινία διαβαθμισμένης συγκέντρωσης, το MIC Test Strip (MTS), το οποίο έχει αρχίσει να χρησιμοποιείται στα νοσοκομειακά εργαστήρια με αυξανόμενη συχνότητα. Για το MTS δεν υπάρχει δημοσιευμένη μελέτη αξιολόγησης. Παρήγαγε, σε γενικές γραμμές, χαμηλότερες τιμές MIC και αναδείχτηκε αυξημένο ποσοστό ελασσόνων σφαλμάτων, με τάση προς ψευδή ευαισθησία. Επίσης, ήταν η μόνη μέθοδος που παρήγαγε μέγιστα σφάλματα, αν και σε πολύ χαμηλό ποσοστό.

Τα αυτοματοποιημένα συστήματα είναι ευρέως διαδεδομένα στα κλινικά εργαστήρια, δεδομένου ότι προσφέρουν ταχύτητα και ευκολία στην εργαστηριακή ρουτίνα. Μεταξύ αυτών, το Vitek χρησιμοποιείται σε πολλά εργαστήρια παγκοσμίως και στην Ελλάδα. Τα δεδομένα της μελέτης υπογραμμίζουν τους περιορισμούς του Vitek 2 στον έλεγχο ευαισθησίας στη τιγκεκυκλίνη. Παρήγαγε αποτελέσματα με χαμηλό βαθμό βασικής συμφωνίας και συμφωνίας στην κατηγοριοποίηση και τα ποσοστά μειζόνων και ελασσόνων σφαλμάτων ήταν πολύ υψηλότερα από τα αποδεκτά όρια για τις μεθόδους ελέγχου της ευαισθησίας. Το Vitek 2 παρουσίασε τάση να παράγει υψηλότερες τιμές MIC, αντανakλώντας τα προαναφερθέντα σφάλματα και οδηγώντας σε λήψη πολύ χαμηλότερων ποσοστών ευαισθησίας σε σχέση με τη μέθοδο αναφοράς. Μελέτη που αξιολόγησε το Vitek 2 αναφορικά με τον έλεγχο ευαισθησίας στην τιγκεκυκλίνη στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν KPC καρβαπενεμάση, παρουσιάζει χαμηλότερα ποσοστά σφαλμάτων και υψηλότερο βαθμό συμφωνίας (392). Η διαφορά αυτή μπορεί να αποδοθεί στη χαμηλότερη τιμή της MIC<sub>90</sub> των στελεχών που συμπεριελήφθησαν στη προαναφερθείσα μελέτη. Αντίθετα, σε μελέτη που δημοσιεύτηκε ταυτόχρονα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης και ελέγχθηκαν εκτός από στελέχη που παρήγαγαν ESBL και 29 στελέχη Εντεροβακτηριακών με μειωμένη ευαισθησία στις καρβαπενέμες εντοπίστηκε σημαντική ασυμφωνία των αποτελεσμάτων σε σύγκριση με τη μέθοδο αναφοράς και παραγωγή υψηλότερων τιμών MIC (393).

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης κατέδειξαν για πρώτη φορά την ανάγκη επιβεβαίωσης των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται από το αυτοματοποιημένο σύστημα Vitek 2, τα οποία παρουσιάζουν τάση προς ψευδή αντοχή. Το Etest θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για το σκοπό αυτό. Τα λανθασμένα αποτελέσματα του ελέγχου ευαισθησίας για την τιγκεκυκλίνη στα βακτήρια που παράγουν KPC καρβαπενεμάση έχουν σημαντικές επιπτώσεις στη θεραπεία των λοιμώξεων, περιορίζοντας περαιτέρω τις ήδη ελάχιστες θεραπευτικές επιλογές.

Η εργαστηριακή διερεύνηση των στελεχών της μελέτης περιελάμβανε και τον έλεγχο της παρουσίας γονιδίων άλλων καρβαπενεμασών. Ταυτόχρονη παρουσία του *bla<sub>VIM-1</sub>* γονιδίου ανιχνεύθηκε στο 5,1% των στελεχών, ποσοστό που βρίσκεται σε συμφωνία με την αναφερθείσα διασπορά τέτοιων στελεχών στον Ελληνικό χώρο (278). Ο έλεγχος αντιπροσωπευτικών στελεχών με πολυπλεκτική PCR, δεν ανίχνευσε παρουσία γονιδίων άλλων καρβαπενεμασών, που θα μπορούσε να έχει διαφύγει από τον φαινοτυπικό έλεγχο. Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων της PCR έδειξε ότι όλα τα στελέχη έφεραν το *bla<sub>KPC-2</sub>* γονίδιο. Δεν υπάρχουν αναφορές προερχόμενες από τη χώρα μας για παρουσία άλλων παραλλαγών των KPC-ενζύμων. Όμως σε πρόσφατα δημοσιευθείσα μελέτη αναφέρεται ανίχνευση της KPC-11 σε στελέχη που απομονώθηκαν από την Ελλάδα το 2009 και είχαν συλλεχθεί στα πλαίσια της μελέτης SMART (128). Πιθανά η διασπορά της KPC-11 ήταν πολύ περιορισμένη. Η διερεύνηση της παρουσίας γονιδίων ESBL, έδειξε ότι η πλειοψηφία των στελεχών έφεραν το *bla<sub>SHV-12</sub>* γονίδιο (83,1%), ενώ πολύ λιγότερα στελέχη έφεραν το *bla<sub>CTX-M-15</sub>*. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με άλλες μελέτες που αναλύουν το προφίλ των β-λακταμασών σε KPC-KP στελέχη από Ελληνικά νοσοκομεία (138, 271, 272). Ο καθορισμός των επιπρόσθετων γονιδίων αντοχής είναι σημαντικός για επιδημιολογικούς λόγους.

Η μοριακή τυποποίηση των στελεχών είναι απαραίτητη σε περίπτωση επιδημιών, για τη διερεύνηση της φύσης της επιδημίας, αλλά και σε σποραδικές απομονώσεις για τη σύγκριση των στελεχών με επιδημικά στελέχη. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η PFGE παράγει χρήσιμα αποτελέσματα σε τοπικό επίπεδο, όμως τα δεδομένα αυτά δεν είναι συγκρίσιμα μεταξύ διαφορετικών κέντρων και χωρών, δεδομένου ότι δύσκολα επιτυγχάνεται διεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα. Η μέθοδος MLST πλεονεκτεί διότι παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τους κλώνους και τα κλωνικά συμπλέγματα που κυκλοφο-



ρούν και επιτρέπει την ανταλλαγή πληροφοριών μεταξύ διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών και τον εντοπισμό επιδημικών κλώνων, όπως ο ST258 (150, 385). Για αυτούς τους λόγους στην παρούσα μελέτη η μοριακή τυποποίηση των στελεχών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο MLST. Το 82,3% των στελεχών βρέθηκε ότι ανήκαν στον πανδημικό κλώνο ST258, επιβεβαιώνοντας την κατά κύριο λόγο κλωνική φύση της επιδημίας. Όμως παρατηρήθηκε διασπορά των *bla*<sub>KPC-2</sub> γονιδίων και σε άλλους τύπους: ST383, ST147, ST340 και ST36. Οι τύποι ST383 και ST147 περιελάμβαναν στην πλειοψηφία τους στελέχη που έφεραν ταυτόχρονα και το *bla*<sub>VIM-1</sub> γονίδιο. Οι ST340 και ST36 ήταν εισαγόμενοι στο νοσοκομείο και δεν παρουσίασαν διασπορά.

Ο τύπος ST258 είναι επίσης ο επικρατών στις ΗΠΑ, την Ευρώπη και το Ισραήλ και περιλαμβάνει στελέχη που φέρουν είτε το *bla*<sub>KPC-2</sub> είτε το *bla*<sub>KPC-3</sub> γονίδιο (228, 281). Επικράτηση του ST258 σε παρόμοιο ποσοστό (85,2%) αναφέρεται και από πολυκεντρική μελέτη από τη χώρα μας, που είναι και η μοναδική που προχώρησε σε μοριακή τυποποίηση με τη μέθοδο MLST. Στην ίδια μελέτη ανευρέθησαν και οι υπόλοιποι τύποι που ανιχνεύθηκαν πλην του ST36 (278).

Ο τύπος ST340 αποτελεί single locus variant του ST258 (διαφέρουν μόνο στο αλληλίο *tonB*) και ανήκει στο κλωνικό σύμπλεγμα CC11 που περιλαμβάνει τους τύπους ST11, ST258 και ST340. Ο ST340 συγκαταλέγεται μεταξύ των κυρίαρχων τύπων στη Βραζιλία (210). Έχει σχετιστεί επίσης με τη διασπορά στελεχών που παράγουν NDM καρβαπενεμάση και VIM καρβαπενεμάση (395, 396).

Ο ST147 δεν παρουσιάζει γενετική συγγένεια με τον ST258 (διαφέρουν σε 5/7 loci). Αποτελεί επίσης επιτυχημένο διεθνώς κλώνο, που έχει σχετιστεί με τη διασπορά στελεχών που παράγουν CTX-M-15 στην Ουγγαρία (397) και κατόπιν με την εξάπλωση σε ποικίλες γεωγραφικές περιοχές στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες διαφόρων τύπων. Στελέχη του κλώνου ST147 με παραγωγή καρβαπενεμασών τύπου VIM (VIM-1, VIM-27) έχουν ανιχνευθεί στη χώρα μας (109, 398), σε Σκανδιναβικές χώρες (με προέλευση όμως των στελεχών από την Ελλάδα) και στην Ιταλία (109, 251, 399). Στελέχη του κλώνου αυτού με παραγωγή NDM καρβαπενεμάσης φαίνεται ότι παρουσιάζουν σημαντική διασπορά στην Ινδία και έχουν ανιχνευτεί επίσης στη Μεγάλη Βρετανία και Καναδά (109, 395, 400). Στην Ινδία έχουν ανιχνευτεί επιπλέον και στελέχη του ST147 που παράγουν καρβαπενεμάσες τύπου OXA (109). Πρόσφατα, αναφέρεται διασπορά στελεχών του ST147, που παρήγαγαν KPC-2 καρβαπενεμάση, σε δύο νοσοκομεία στη Βό-

ρειο Ιταλία (401). Η πλειονότητα των στελεχών της παρούσας μελέτης που ανήκαν στον κλώνο ST147, παρήγαγαν KPC-2 και VIM-1 καρβαπενεμάσες. Δεδομένων των αναφορών για την παρουσία στη χώρα μας στελεχών του ST147 με παραγωγή καρβαπενεμασών τύπου VIM ήδη από το 2005, θα μπορούσε να υποθεθεί ότι τα στελέχη της μελέτης απέκτησαν και το πλασμίδιο που έφερε το *bla*<sub>KPC</sub> γονίδιο.

Ο ST383 αναφέρθηκε για πρώτη φορά από την Ελλάδα το 2010 σε στέλεχος που παρήγαγε KPC-2 και VIM-4 καρβαπενεμάσες και φαίνεται ότι τέτοια στελέχη κυκλοφορούν στα Ελληνικά νοσοκομεία (277, 278). Δεν παρουσιάζει γενετική συγγένεια με τον ST258 (διαφέρουν σε 5/7 loci). Στην παρούσα μελέτη ο ST383 ήταν ο δεύτερος σε συχνότητα τύπος και περιελάμβανε κυρίως στελέχη που παρήγαγαν και τις δύο καρβαπενεμάσες. Ο τύπος αυτός αναφέρεται και από Σκανδιναβικές χώρες σε VIM-θετικά στελέχη με προέλευση από την Ελλάδα (251, 399). Λαμβάνοντας υπόψη ότι δεν υπάρχουν δεδομένα για τους κλωνικούς τύπους που κυκλοφορούσαν στην Ελλάδα πριν την εισαγωγή των *bla*<sub>KPC</sub> γονιδίων, δεν μπορεί να διατυπωθεί κάποια υπόθεση για την ανάδυση αυτών των στελεχών.

Ο ST36, στον οποίο ανήκε ένα στέλεχος της μελέτης, δεν έχει μέχρι τώρα σχετιστεί με παραγωγή KPC καρβαπενεμάσης. Στέλεχος του κλώνου αυτού, που παρήγαγε καρβαπενεμάση τύπου VIM και προερχόταν από την Ελλάδα, αναφέρεται από τη Σουηδία (399). Το στέλεχος αυτό είχε απομονωθεί το 2006. Στον περαιτέρω σχεδιασμό της παρούσας μελέτης περιλαμβάνεται πλασμιδιακή ανάλυση του ST36 στελέχους.

Ένας από τους κύριους στόχους της μελέτης ήταν η διερεύνηση της κλινικής επιδημιολογίας των λοιμώξεων από στελέχη που παράγουν KPC καρβαπενεμάση. Σε πολλές περιγραφικές μελέτες αναφέρεται ότι οι περισσότεροι ασθενείς που φέρουν τέτοια στελέχη παρουσιάζουν πολλαπλούς προδιαθεσικούς παράγοντες για λοίμωξη από πολυανθεκτικό παθογόνο: βαρύτητα υποκείμενης νόσου, προχωρημένη ηλικία, παρατεταμένο χρόνο νοσηλείας, παρεμβατικές πράξεις, διακομιδή από άλλες νοσηλευτικές μονάδες, προηγηθείσες νοσηλείες και προηγηθείσα χορήγηση αντιμικροβιακών. Διάφορες ομάδες αντιβιοτικών έχουν σχετιστεί με την απομόνωση στελεχών που παράγουν KPC καρβαπενεμάση με συχνότερες τις κινολόνες και τις καρβαπενέμες. Αυτοί οι παράγοντες κινδύνου έχουν αναδειχτεί και σε μελέτες ασθενών-μαρτύρων, όπου ως ομάδα ελέγχου έχουν χρησιμοποιηθεί ασθενείς με απομόνωση ευαίσθητων στις καρβαπενέμες στελεχών (126, 312, 313, 314, 315). Η απομόνωση ανθεκτικού στις καρβα-

πενέμες στελεχούς, στις μελέτες αυτές, βρέθηκε ότι παρουσιάζει ανεξάρτητη συσχέτιση με τη θνητότητα των ασθενών, υπογραμμίζοντας τη σημαντική επίδραση της αντοχής στην έκβαση και προβάλλοντας την αναγκαιότητα της έγκαιρης ανίχνευσης των μηχανισμών αντοχής αλλά και της αναγνώρισης των ασθενών που βρίσκονται σε κίνδυνο.

Στη σειρά των ασθενών της μελέτης επιβεβαιώθηκαν οι προαναφερθέντες παράγοντες. Η πλειονότητα των ασθενών ήταν ασθενείς ΜΕΘ (52%), αντανακλώντας τόσο τη βαρύτητα της γενικής κατάστασης, όσο και τις παρεμβατικές πράξεις στις οποίες είχαν υποβληθεί. Η πλειοψηφία τους (59,4%) εμφάνιζε περισσότερα από δύο υποκείμενα νοσήματα, με συνηθέστερα τα καρδιαγγειακά νοσήματα, το σακχαρώδη διαβήτη και τη νεφρική ανεπάρκεια, τα οποία έχουν σχετιστεί με απομόνωση τέτοιων στελεχών και σε άλλες μελέτες (172). Οι ασθενείς εμφάνιζαν παρατεταμένο χρόνο νοσηλείας (μέσος χρόνος νοσηλείας 15,65 ημέρες), υψηλό δείκτη βαρύτητας παρεμβατικών πράξεων και το 81,1% αυτών είχε λάβει τουλάχιστον ένα αντιμικροβιακό προ της απομόνωσης. Τα συνηθέστερα χορηγηθέντα αντιβιοτικά ήταν οι συνδυασμοί β-λακταμών με αναστολείς β-λακταμασών (58,3%) και οι κινολόνες (53,1%). Οι υψηλές τιμές MIC των στελεχών KPC-KP στους συνδυασμούς β-λακταμικών με αναστολείς β-λακταμασών πιθανά οδηγεί σε αυξημένη πίεση επιλογής. Η συσχέτιση της χρήσης των κινολονών μπορεί να ερμηνευτεί από το γεγονός ότι οι καθοριστές αντοχής για τις κινολόνες φέρονται στα ίδια πλασμίδια με τα *bla*<sub>KPC</sub> γονίδια. Η συνεχής και αθροιστική επίδραση της χορήγησης πολλαπλών αντιβιοτικών, διαταράσσει τη φυσιολογική χλωρίδα και προδιαθέτει στον αποικισμό από ανθεκτικά στελέχη.

Στους ασθενείς της μελέτης συχνές ήταν επίσης οι προηγηθείσες νοσηλείες (76,6%) και οι προηγηθείσες χειρουργικές επεμβάσεις (53,7%), ενώ σημαντικό ποσοστό ασθενών είχαν διακομιστεί απευθείας από άλλα νοσηλευτικά ιδρύματα (29,1%) ή άλλα νοσηλευτικά τμήματα του νοσοκομείου. Η προηγηθείσα έκθεση στο νοσοκομειακό περιβάλλον σχετίζεται με έκθεση σε αντιμικροβιακά και παρεμβατικές πράξεις, ενώ επίσης υπάρχει ο κίνδυνος οριζόντιας μετάδοσης από συν-νοσηλευόμενους ασθενείς. Τόσο η μετακίνηση μεταξύ των νοσηλευτικών τμημάτων, όσο και οι προηγηθείσες χειρουργικές επεμβάσεις έχουν αναφερθεί ως ανεξάρτητοι παράγοντες κινδύνου για απομόνωση KPC-KP στελεχών (126).

Στη μελέτη δεν πραγματοποιήθηκε σύγκριση με ομάδα ελέγχου ασθενείς από τους οποίους απομονώθηκε ευαίσθητο στις καρβαπενέμες στέλεχος, λόγω της σπανιότητας απομόνωσης ευαίσθητων στελεχών από τους ασθενείς της ΜΕΘ. Τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *K. pneumoniae* ενδημούν στις ΜΕΘ των Ελληνικών νοσοκομείων ήδη από τα μέσα της προηγούμενης δεκαετίας.

Από τους 175 ασθενείς που συμπεριελήφθησαν στη μελέτη, κλινική λοίμωξη εμφάνισαν 95 ασθενείς (54,3%) με συνηθέστερη τη βακτηριαιμία (34,3%). Οι ασθενείς με κλινική λοίμωξη, όπως ήταν αναμενόμενο, παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερη ολική θνητότητα και θνητότητα 15 ημερών. Προκειμένου να προσδιοριστούν οι παράγοντες κινδύνου για ανάπτυξη κλινικής λοίμωξης, οι ασθενείς με λοίμωξη συγκρίθηκαν με αυτούς που θεωρήθηκαν αποικισμένοι. Βρέθηκε ότι προδιαθεσικοί παράγοντες ήταν η ηλικία και η προηγηθείσα χορήγηση κινολονών, αζτρεονάμης και αντιμυκητιακών, ενώ η διάρκεια της νοσηλείας παρότι μεγαλύτερη στους ασθενείς με λοίμωξη, δεν έφτασε τη στατιστική σημαντικότητα. Μεταξύ αυτών των παραγόντων, η ηλικία και η χορήγηση αντιμυκητιακών παρέμειναν ως ανεξάρτητοι παράγοντας κινδύνου στην πολυπαραγοντική ανάλυση. Η προχωρημένη ηλικία σχετίζεται με μείωση των αμυντικών μηχανισμών του ξενιστή, παρουσία διάφορων υποκείμενων νοσημάτων και μεγαλύτερη πιθανότητα για προηγούμενες νοσηλείες και έκθεση σε αντιβιοτικά. Αντίθετα, οι πολυτραυματίες παρουσίασαν μικρότερο κίνδυνο για ανάπτυξη λοίμωξης, πιθανά λόγω της μικρότερης ηλικίας τους και της απουσίας υποκείμενων νοσημάτων αλλά και της στενότερης παρακολούθησης. Η χρήση κινολονών έχει βρεθεί ότι παρουσιάζει ανεξάρτητη συσχέτιση με την ανάπτυξη κλινικής λοίμωξης, σε μελέτη που αναλύθηκαν ασθενείς με ορθική φορεία KPC-KP στελέχους (360). Η χορήγηση αντιμυκητιακών αντανακλά τη βαρύτητα της γενικής κατάστασης των ασθενών, την πιθανή ανοσοκαταστολή και την παρουσία πολλαπλών προδιαθεσικών παραγόντων. Όταν στην ανάλυση εισήχθησαν και τα δεδομένα του ελέγχου ορθικής φορείας, διαπιστώθηκε ότι η ορθική φορεία πριν την απομόνωση από κλινικό δείγμα ήταν ο μοναδικός ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για ανάπτυξη κλινικής λοίμωξης, υπογραμμίζοντας τη χρησιμότητα της ενεργητικής επιτήρησης των φορέων, πέραν του ρόλου της στον έλεγχο των λοιμώξεων.

Η αναγνώριση των ασθενών που βρίσκονται σε κίνδυνο για ανάπτυξη κλινικής λοίμωξης, αποκτά ιδιαίτερη σημασία δεδομένης της επίδρασης της λοίμωξης στην έκβαση των ασθενών. Αναδεικνύονται τροποποιήσιμοι παράγοντες, όπως η χρήση συγκεκριμέ-

νων ομάδων αντιμικροβιακών αλλά και παράγοντες που έχουν σχέση με τους ασθενείς που πρέπει να βρίσκονται σε στενότερη παρακολούθηση και να λαμβάνουν τη κατάλληλη εμπειρική αγωγή, όταν κρίνεται απαραίτητο. Σημαντικές πληροφορίες σε αυτό το επίπεδο, όπως αποδεικνύεται, παρέχει ο έλεγχος ορθικής φορέας.

Οι καλλιέργειες ενεργητικής επιτήρησης με λήψη ορθικού επιχρίσματος έδειξαν ότι το 74,1% των ασθενών ήταν αποικισμένοι στο γαστρεντερικό με ΚΡC-ΚΡ στέλεχος προ της απομόνωσης σε κλινικό δείγμα, ενώ ο μέσος χρόνος νοσηλείας έως την απομόνωση σε κλινικό δείγμα ήταν 6,26 ημέρες, χρόνος ο οποίος συμβαδίζει με τον αναφερόμενο σε ανάλογες μελέτες (356). Σημαντικό ποσοστό ασθενών βρέθηκαν αποικισμένοι κατά την εισαγωγή (30%) και η έγκαιρη αναγνώριση τους μειώνει τον κίνδυνο δευτερογενούς μετάδοσης. Η εφαρμογή του πρωτοκόλλου ελέγχου ορθικής φορέας, κυρίως σε ασθενείς ΜΕΘ, έδειξε ότι το 67,1% των ασθενών που ήταν φορείς ΚΡC-ΚΡ στελεχών ανέπτυξαν τέτοια στελέχη σε κλινικό δείγμα. Οι υπόλοιποι ασθενείς αποτελούν σημαντική δεξαμενή διασποράς που δεν θα είχε αναγνωριστεί χωρίς την πραγματοποίηση ελέγχου φορέας. Σημαντικός αριθμός ασθενών ήταν ταυτόχρονα αποικισμένοι με άλλο ανθεκτικό στις καρβαπενέμες βακτήριο (συνηθέστερα *P. aeruginosa* ή *A. baumannii*) και *Candida* spp. Τα ευρήματα αυτά, βρίσκονται σε αντιστοιχία με τα δεδομένα πρόσφατων μελετών. Επιβεβαιώνεται ότι οι καλλιέργειες των κλινικών δειγμάτων αναγνωρίζουν μόνο ένα ποσοστό των ασθενών που φέρουν ανθεκτικά στις καρβαπενέμες βακτήρια, ενώ σημαντικός αριθμός ασθενών βρίσκονται αποικισμένοι κατά την εισαγωγή (356, 357, 358). Επίσης συχνά ανευρίσκεται συν-αποικισμός με άλλα πολυανθεκτικά παθογόνα, που επιπλέον έχει αναδειχτεί ως προγνωστικός παράγοντας για αυξημένη θνητότητα (231, 323).

Στα πλαίσια της μελέτης πραγματοποιήθηκε και πεντάμηνος έλεγχος με καλλιέργειες επιτήρησης σε όλους τους ασθενείς ενός Παθολογικού Τμήματος. Το 5,5% των ασθενών έφεραν ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη με την πλειονότητα αυτών να παράγουν ΚΡC καρβαπενεμάση. Παρόμοιο ποσοστό επιπολασμού φορέας αναφέρεται από το Ισραήλ (357). Διπλάσιο είναι το ποσοστό φορέας που έχει ανευρεθεί στα κέντρα μακροχρόνιας φροντίδας (231). Το 30% των αποικισμένων ασθενών του Παθολογικού Τμήματος βρέθηκαν αποικισμένοι κατά την εισαγωγή και όλοι αυτοί οι ασθενείς είχαν διακομιστεί απευθείας είτε από ΜΕΘ, είτε από ΚΦΗ. Από τους αποικισμένους ασθενείς το 25% ανέπτυξε κλινική λοίμωξη. Η διερεύνηση των παραγόντων κινδύνου για τον

αποικισμό, έδειξε ότι ο αποικισμός σχετιζόταν με τη χορήγηση καρβαπενεμών κατά τη διάρκεια της νοσηλείας και την παρουσία περισσότερων από δύο υποκείμενων νοσημάτων. Επίσης, στους παράγοντες κινδύνου περιλαμβανόταν η νεφρική ανεπάρκεια. Ο μικρός αριθμός ασθενών δεν επέτρεψε την ανάδειξη άλλων συσχετίσεων. Οι παράγοντες κινδύνου για τον αποικισμό έχουν διερευνηθεί σε πρόσφατες μελέτες, οι περισσότερες των οποίων προέρχονται από το Ισραήλ. Ως παράγοντες κινδύνου αναφέρονται η προηγηθείσα χορήγηση αντιβιοτικών, ο αριθμός των υποκείμενων νοσημάτων, ο κλινοστατισμός, η διαβίωση σε γηροκομείο, η χρήση πάνας ενηλίκων και η μακρά διάρκεια νοσηλείας (231, 357, 358, 359). Επίσης, η νοσηλεία στον ίδιο θάλαμο με φορέα, καθώς και ο υψηλός αριθμός φορέων στον ίδιο θάλαμο βρέθηκε ότι αποτελούν ανεξάρτητους παράγοντες κινδύνου για τον αποικισμό, υπογραμμίζοντας τη σημασία τήρησης των κανόνων νοσηλείας σε συνθήκες μόνωσης ή συν-νοσηλείας (231). Ο καθορισμός των ασθενών υψηλού κινδύνου για αποικισμό παίζει σημαντικό ρόλο στο στοχευμένο έλεγχο φορείας κατά την εισαγωγή στο νοσοκομείο και την άμεση εφαρμογή μέτρων ελέγχου των λοιμώξεων μέχρι τα αποτελέσματα του ελέγχου να είναι διαθέσιμα.

Ο προαναφερθείς έλεγχος σε ασθενείς Παθολογικού Τμήματος πραγματοποιήθηκε κατά το πρώτο έτος της επιδημίας. Στον περαιτέρω σχεδιασμό περιλαμβάνεται η πραγματοποίηση νέας μικρής διάρκειας μελέτη στο ίδιο τμήμα, ώστε να αποτυπωθεί η επικρατούσα κατάσταση μετά την ευρύτατη διασπορά των ΚΡC-ΚΡ στελεχών στα Ελληνικά νοσοκομεία. Επίσης σχεδιάζεται μελέτη σημειακής επιτήρησης στο σύνολο των νοσηλευτικών τμημάτων του νοσοκομείου εκτός ΜΕΘ, ώστε να προσδιοριστεί ο επιπολασμός ορθικής φορείας, να εκτιμηθεί ο κίνδυνος διασποράς και να καθοριστούν οι ασθενείς υψηλού κινδύνου. Ο έλεγχος φορείας έχει αναδειχτεί ως αναπόσπαστο συστατικό όλων των στρατηγικών παρέμβασης για τον περιορισμό της διασποράς των στελεχών που παράγουν ΚΡC καρβαπενεμάση.

Παρά την αναμφισβήτητη αξία των καλλιεργείων ενεργητικής επιτήρησης, δεν υπάρχει ομοφωνία σχετικά με την καταλληλότερη μέθοδο για την ανίχνευση των στελεχών που παράγουν ΚΡC καρβαπενεμάση από τις καλλιέργειες ορθικών επιχρισμάτων (372). Διάφορες καλλιεργητικές μέθοδοι, συμπεριλαμβανόμενων και ποικίλων χρωμογόνων υλικών, αλλά και μοριακές μέθοδοι, έχουν χρησιμοποιηθεί και αξιολογηθεί. Δεδομένου ότι δεν υπάρχει καθιερωμένη μέθοδος αναφοράς, η αξιολόγηση είναι δύσκολη και συ-

νήθως γίνεται μεταξύ των μεθόδων, ενώ η πραγματική ευαισθησία και ειδικότητα μπορεί να είναι μικρότερη από αυτήν που αναφέρεται στις διάφορες μελέτες (366).

Οι καλλιεργητικές μέθοδοι ανιχνεύουν αντοχή στις καρβαπενέμες και όχι παραγωγή καρβαπενεμάσης. Δεν παρέχουν άμεσα πληροφορίες σχετικά με το είδος της καρβαπενεμάσης. Η ευαισθησία παρουσιάζει ευρεία διακύμανση στις διάφορες μελέτες και εξαρτάται από τη συγκριτική μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε. Τα χρωμογόνα υλικά έχουν υψηλότερο κόστος από τις μη εμπορικά διαθέσιμες καλλιεργητικές μεθόδους, ενώ δεν διακρίνουν τον μηχανισμό αντοχής.

Οι μοριακές μέθοδοι εμφανίζουν ευαισθησία > 95% και το κύριο πλεονέκτημα τους είναι η γρήγορη λήψη του αποτελέσματος που οδηγεί στην έγκαιρη εφαρμογή των απαραίτητων μέτρων ελέγχου των λοιμώξεων, ώστε να αποφευχθεί η οριζόντια μετάδοση του στελέχους σε άλλους ασθενείς. Κύριο μειονέκτημα τους είναι το υψηλό κόστος και η ανάγκη ύπαρξης εξοπλισμού και εξειδικευμένου προσωπικού. Έτσι η ευρεία εφαρμογή τους σε όλα τα κλινικά εργαστήρια δεν είναι δυνατή. Επιπλέον είναι στοχευμένες έναντι συγκεκριμένων γονιδίων καρβαπενεμασών που επιλέγονται με βάση τα επιδημιολογικά δεδομένα σε κάθε περιοχή. Κατά συνέπεια, δεν είναι δυνατή η ανίχνευση στελεχών που παράγουν άλλες καρβαπενεμάσες πλην των ενδημούντων ή καρβαπενεμάσες νέων τύπων. Τέλος, δεν είναι διαθέσιμο το στέλεχος ώστε να ακολουθήσει έλεγχος ευαισθησίας, ο οποίος παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την επιλογή εμπειρικής αγωγής σε περίπτωση επακόλουθης λοίμωξης. Επιπλέον, ο έλεγχος ευαισθησίας του στελέχους της ορθικής φορέας οδηγεί στην έγκαιρη αναγνώριση επιδημιολογικά σημαντικής επιπρόσθετης αντοχής στην κολιστίνη ή την τιγκεκυκλίνη.

Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκε και αξιολογήθηκε ένας νέος φαινοτυπικός αλγόριθμος για την ανίχνευση των στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες τύπου KPC ή/και MBL στις καλλιέργειες ορθικών επιχρισμάτων. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη δοκιμασία συνδυασμού των δίσκων μεροπενέμης με αναστολείς καρβαπενεμασών και επιτρέπει την ανίχνευση και διάκριση του τύπου της καρβαπενεμάσης το πρώτο 24ωρο μετά τη λήψη του ορθικού επιχρίσματος. Η μελέτη αξιολόγησης της μεθόδου έδειξε ότι παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία (97,1%) και ειδικότητα 100%. Βρέθηκε να πλεονεκτεί στην ευαισθησία έναντι της PCR για την ανίχνευση των γονιδίων *bla*<sub>KPC</sub> και *bla*<sub>VIM</sub> απευθείας από τον στυλεό (ευαισθησία 94,2%).

Η επίσης συγκριθείσα μέθοδος με χρήση δίσκων ερταπενέμης παρουσίασε ελαφρώς υψηλότερη ευαισθησία (98,6%) και ελαφρώς μικρότερη ειδικότητα (98,6%). Η μέθοδος αυτή ανιχνεύει βακτήρια ανθεκτικά στην ερταπενέμη, έτσι είναι αναμενόμενο να λαμβάνονται ψευδώς θετικά αποτελέσματα σε στελέχη όπου η αντοχή στην ερταπενέμη οφείλεται σε άλλους μηχανισμούς και όχι στην παραγωγή καρβαπενεμάσης. Επίσης, για να γίνει ανίχνευση του τύπου της καρβαπενεμάσης απαιτείται επιπρόσθετος έλεγχος με αύξηση του φόρτου εργασίας, του κόστους και του χρόνου για τη λήψη του ειδικού αποτελέσματος. Επιπλέον, η ανάπτυξη στελεχών όλων των στελεχών *P. aeruginosa* και *A. baumannii* στη ζώνη αναστολής της ερταπενέμης λόγω της ενδογενούς μειωμένης ευαισθησίας αυτών των βακτηριακών ειδών στην ερταπενέμη, περιπλέκει την γνώση του αποτελέσματος.

Η μέθοδος του φαινοτυπικού αλγορίθμου είναι απλή στη εφαρμογή της και επιπλέον είναι χαμηλού κόστους. Σημαντικό επίσης πλεονέκτημα είναι ο χρόνος λήψης του ειδικού για τον τύπο της καρβαπενεμάσης αποτελέσματος. Η εντός του πρώτου 24ώρου πληροφορία για τον τύπο της καρβαπενεμάσης είναι ιδιαίτερος σημαντική σε περιοχές, όπως η χώρα μας, όπου ενδημούν βακτήρια που παράγουν καρβαπενεμάσες τόσο τύπου KPC όσο και τύπου MBL. Η ταχεία διασπορά των βακτηρίων που παράγουν NDM καρβαπενεμάση, διαμορφώνει μια σύνθετη επιδημιολογία για τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη Εντεροβακτηριακών στις περισσότερες Ευρωπαϊκές χώρες, καθιστώντας σημαντική την ταχεία και ειδική για τον τύπο της καρβαπενεμάσης ανίχνευση. Τα πλεονεκτήματα αυτά της μεθόδου του φαινοτυπικού αλγορίθμου την καθιστούν μια ελκυστική μέθοδο για ευρεία εφαρμογή στα κλινικά εργαστήρια. Ο περαιτέρω σχεδιασμός περιλαμβάνει τη διερεύνηση της ικανότητας ανίχνευσης των στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες τύπου OXA, τα οποία επίσης παρουσιάζουν διασπορά σε πολλές Ευρωπαϊκές χώρες και πρόσφατα ανιχνεύτηκαν και στη χώρα μας (108).

Η κολιστίνη αντιπροσωπεύει ένα από τα λίγα αντιμικροβιακά που διατηρούν *in vitro* δραστηριότητα έναντι των στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν KPC καρβαπενεμάση. Όμως, τα τελευταία χρόνια πληθαίνουν οι αναφορές για ανάδυση και διασπορά ανθεκτικών στην κολιστίνη στελεχών σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές. Υψηλά ποσοστά αντοχής στην κολιστίνη (36,1%) έχουν αναφερθεί πρόσφατα από την Ιταλία (242). Στη χώρα μας η αντοχή στην κολιστίνη κυμαίνεται μεταξύ 14%-21%, όπως περιγράφεται σε διάφορες μελέτες, ενώ σημειώνονται αυξητικές τάσεις (272, 278, 332). Ανάπτυξη αντο-



χής έχει παρατηρηθεί και κατά τη διάρκεια μονοθεραπείας με κολιστίνη (324, 325). Αν και πολλές μελέτες έχουν εστιάσει στην περιγραφή επιδημιών από ανθεκτικά στην κολιστίνη στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν KPC καρβαπενεμάση, δεν υπάρχουν δεδομένα που αφορούν στους παράγοντες κινδύνου για την απομόνωση τέτοιων στελεχών. Στην παρούσα μελέτη η αντοχή στην κολιστίνη ήταν 20,5% και συμβαδίζει με τα ποσοστά που αναφέρονται από την Ελλάδα. Υψηλά ποσοστά αντοχής παρατηρήθηκαν από το πρώτο εξάμηνο της μελέτης, με αυξητική τάση μόνο κατά το πρώτο εξάμηνο του 2010. Η συχνή ανεύρεση αντοχής στην κολιστίνη από την αρχή της επιδημίας, οδήγησε στο σχεδιασμό μελέτης ασθενών-μαρτύρων για τη διερεύνηση πιθανών παραγόντων κινδύνου αλλά και για την ανάδειξη της επίδρασης της αντοχής στην έκβαση των ασθενών. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ασθενείς με απομόνωση ευαίσθητων στην κολιστίνη στελεχών KPC-KP.

Η προηγηθείσα χορήγηση κολιστίνης δεν σχετίστηκε με την ανάπτυξη αντοχής, σε αντίθεση με προηγηθείσες μελέτες (402). Βέβαια ο ρόλος της χρήσης της κολιστίνης μπορεί να έχει υποεκτιμηθεί, δεδομένου ότι σημαντικό ποσοστό των ασθενών με ανθεκτικό στην κολιστίνη στέλεχος είχαν διακομιστεί απευθείας από άλλα νοσηλευτικά ιδρύματα και μπορεί να είχαν λάβει κολιστίνη πριν την παρούσα νοσηλεία. Ως μοναδικός ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου αναδείχθηκε η προηγηθείσα ορθική φορεία με ανθεκτικό στην κολιστίνη στέλεχος. Τα ευρήματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία και με τα αποτελέσματα του ελέγχου της κλωνικότητας των στελεχών. Η μελέτη της μοριακής επιδημιολογίας έδειξε όλα τα στελέχη ανήκαν στον ίδιο κλώνο, υποδεικνύοντας οριζόντια μετάδοση. Πιθανά η αντοχή στην κολιστίνη αναπτύχθηκε από την πίεση της χρήσης της κολιστίνης σε κάποιο στέλεχος και κατόπιν μεταδόθηκε οριζόντια σε άλλους ασθενείς, ανεξάρτητα από τη χρήση της κολιστίνης.

Η αντοχή στην κολιστίνη δεν βρέθηκε να σχετίζεται με την έκβαση της λοίμωξης και τη συνολική έκβαση των ασθενών. Αντίθετα, σε πρόσφατη μελέτη από την Ιταλία, η λοίμωξη από ανθεκτικό στην κολιστίνη στέλεχος αποτέλεσε ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για δυσμενή έκβαση (242). Το γεγονός ότι το ποσοστό των ασθενών της μελέτης που έλαβαν κατάλληλη εμπειρική και οριστική αντιμικροβιακή αγωγή δεν διέφερε μεταξύ των δύο ομάδων, πιθανά εξηγεί την απουσία διαφοράς στη θνητότητα της λοίμωξης. Επίσης και οι δύο ομάδες περιελάμβαναν, κατά κύριο λόγο, βαρέως πάσχοντες

ασθενείς χωρίς σημαντικές διαφορές στα κλινικά χαρακτηριστικά και κατά συνέπεια η ολική θνητότητα ήταν υψηλή ανεξάρτητα από την παρουσία αντοχής στην κολιστίνη. Η ανάδυση και κλωνική διασπορά ανθεκτικών στην κολιστίνη στελεχών υπογραμμίζει την ανάγκη τήρησης αυστηρών μέτρων ελέγχου των λοιμώξεων και συνεχούς επιτήρησης της εφαρμογής τους. Το γεγονός ότι ο μοναδικός ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου ήταν η προηγηθείσα ορθική φορεία με τέτοιο στέλεχος, αναδεικνύει το θεμελιώδη ρόλο της ενεργητικής επιτήρησης φορέων η οποία μπορεί να εντοπίσει έγκαιρα τους ασθενείς που αποτελούν πηγή διασποράς και ταυτόχρονα βρίσκονται σε κίνδυνο να αναπτύξουν κλινική λοίμωξη. Η νοσηλεία αυτών των ασθενών σε συνθήκες μόνωσης, αν είναι εφικτό, ή διαφορετικά η ειδική σήμανση τους ώστε να τηρούνται απαρέγκλιτα οι προφυλάξεις επαφής, είναι απαραίτητη ώστε η επιδημία να μην λάβει διαστάσεις. Εφαρμόζοντας αυτήν την προσέγγιση, η αναλογία των περιπτώσεων με ανθεκτικά στην κολιστίνη στελέχη παρουσίασε πτώση το τελευταίο εξάμηνο της μελέτης. Τονίζεται όμως η αναγκαιότητα της συνεχούς επαγρύπνησης, δεδομένου ότι ο βαθμός συμμόρφωσης στην τήρηση των μέτρων δεν είναι σταθερός.

Επιπλέον βρίσκεται σε εξέλιξη μελέτη διερεύνησης των μηχανισμών αντοχής στην κολιστίνη σε συνεργασία με ερευνητικό κέντρο του Βελγίου, λαμβανομένου υπόψη ότι τα βιβλιογραφικά δεδομένα, ειδικά για στελέχη *K. pneumoniae*, είναι πολύ περιορισμένα. Η παγκόσμια διασπορά των στελεχών που παράγουν KPC καρβαπενεμάση θέτει σημαντικά κλινικά και θεραπευτικά προβλήματα. Οι προκαλούμενες από αυτά τα στελέχη λοιμώξεις, παρουσιάζουν αυξανόμενη επίπτωση και εμφανίζουν υψηλή θνητότητα, καθιστώντας επιτακτική την ανάγκη για αποτελεσματική αντιμικροβιακή αγωγή. Όμως οι θεραπευτικές επιλογές είναι ελάχιστες και τα δεδομένα για την αποτελεσματικότητα των διαφόρων σχημάτων αντιμικροβιακών είναι προς το παρόν περιορισμένα, ώστε να παρέχονται τεκμηριωμένες θεραπευτικές κατευθύνσεις. Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια να απαντηθούν κάποια κλινικά και θεραπευτικά ερωτήματα. Διερευνήθηκαν οι παράγοντες που σχετίζονται με δυσμενή έκβαση σε μια μεγάλη σειρά ασθενών (62 ασθενείς) με βακτηριαιμία και αξιολογήθηκε η κλινική αποτελεσματικότητα των χρησιμοποιηθέντων σχημάτων αντιμικροβιακών. Επιλέχθηκαν οι βακτηριαιμίες για τη συγκεκριμένη ανάλυση λόγω της σοβαρότητας της λοίμωξης και του μεγαλύτερου αριθμού του δείγματος. Επιπλέον η τεκμηρίωση κλινικά σημαντικής λοίμωξης στις υπό-

λοιπες περιπτώσεις δεν είναι πάντα εύκολη, ενώ μια σειρά με διαφορετικά είδη λοιμώξεων θα παρουσίαζε σημαντική ετερογένεια.

Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών δεν διέφεραν από αυτά που έχουν περιγραφεί σε παρόμοιες μελέτες. Πρόκειται για ασθενείς τόσο χρονίως, όσο και οξέως πάσχοντες (316, 319, 320, 321, 322). Η ολική θνητότητα ήταν υψηλή (56,5%) και βρίσκεται σε συμφωνία με τη σχετική βιβλιογραφία (316, 321, 322), αντανακλώντας τη βαρύτητα της γενικής κατάστασης των ασθενών απεικονιζόμενη και από το APACHE II score κατά την εισαγωγή. Η θνητότητα της λοίμωξης (32,3%), αν και επίσης υψηλή, εμφανίζεται χαμηλότερη από την αναφερθείσα σε άλλες μελέτες για ασθενείς με βακτηριαμία από ΚΡC-θετικά στελέχη (171, 316, 321, 322). Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στην αυξημένη ευαισθητοποίηση, την ταχεία επικοινωνία μεταξύ εργαστηρίου και κλινικών ιατρών και κατ' επέκταση τη έγκαιρη έναρξη κατάλληλης αντιμικροβιακής αγωγής. Βέβαια η θνητότητα της λοίμωξης παραμένει σημαντικά υψηλότερη από αυτή που αναφέρεται για τις λοιμώξεις που προκαλούνται από ευαίσθητα στις καρβαπενέμες στελέχη (315, 321). Προκειμένου να καθοριστούν οι παράγοντες που σχετίζονται με τη θνητότητα της λοίμωξης, διερευνήθηκε η επίδραση των χαρακτηριστικών του ασθενούς, του στελέχους και της λοίμωξης, καθώς και των θεραπευτικών παρεμβάσεων στη θνητότητα της λοίμωξης. Οι παράμετροι αυτές συγκρίθηκαν μεταξύ των ασθενών που επιβίωσαν και αυτών που κατέληξαν εξαιτίας της λοίμωξης. Η προσέγγιση αυτή στόχευε στην αναγνώριση ειδικών προγνωστικών παραγόντων και στη ανάδειξη της σημασίας των θεραπευτικών χειρισμών.

Η κατάλληλη αντιμικροβιακή αγωγή (οριζόμενη από την *in vitro* ευαισθησία του στελέχους) βρέθηκε ότι αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για τη επιβίωση. Αντίθετα η κατάλληλη εμπειρική αγωγή καθώς και η έγκαιρη έναρξη της κατάλληλης αντιμικροβιακής αγωγής δεν σχετίζονταν με τη θνητότητα της λοίμωξης. Το εύρημα αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από το μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών με σοβαρή σήψη στην ομάδα αυτή των ασθενών. Η σημασία της λήψης κατάλληλης αντιμικροβιακής αγωγής δεν αποτελεί σταθερό εύρημα μεταξύ των μελετών, αν και η πραγματοποίηση συγκρίσεων είναι δύσκολη λόγω μεθοδολογικών διαφορών. Η επιλογή διαφορετικού τελικού σημείου, όπως η θνητότητα 28 ή 30 ημερών, πιθανά επηρεάζει τα ευρήματα εξαιτίας της επίδρασης στη θνητότητα παραγόντων που έχουν σχέση με την υποκείμενη κατάσταση του ασθενούς.

Η παρούσα μελέτη ανέδειξε για πρώτη φορά την υπεροχή της συνδυαστικής αντιμικροβιακής αγωγής. Όλοι οι ασθενείς που έλαβαν συνδυασμούς αντιμικροβιακών επιβίωσαν, αντίθετα στην ομάδα της μονοθεραπείας η θνητότητα της λοίμωξης ήταν 40%. Η σημαντική υπεροχή των συνδυαστικών σχημάτων, αναφέρεται και από πρόσφατες μελέτες και μεταanalύσεις (151, 178, 319, 320). Η λήψη συνδυασμών δραστικών αντιμικροβιακών δεν αναδείχθηκε ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για ευνοϊκή έκβαση στην πολυπαραγοντική ανάλυση, πιθανά λόγω του μεγέθους του δείγματος. Το γεγονός ότι όλα τα συνδυαστικά σχήματα συνοδεύτηκαν από κλινική επιτυχία, δεν επέτρεψε τη συγκριτική τους αξιολόγηση. Αν και ο αριθμός των ασθενών στις επιμέρους ομάδες της μονοθεραπείας είναι μικρός για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων αναφορικά με την αποτελεσματικότητά τους, σημειώνονται κάποια σημαντικά επιμέρους ευρήματα. Το μεγαλύτερο ποσοστό κλινικής αποτυχίας παρατηρήθηκε στους ασθενείς που έλαβαν μονοθεραπεία με κολιστίνη με τη θνητότητα της λοίμωξης να μη διαφέρει σημαντικά από αυτήν που σημειώνεται για τους ασθενείς που δεν έλαβαν κατάλληλη αντιμικροβιακή αγωγή (57% έναντι 63,2%). Ανάλογο ποσοστό κλινικής αποτυχίας αναφέρεται και από άλλη μελέτη (320). Το εύρημα αυτό σε συνδυασμό με την ανάδυση αντοχής στην κολιστίνη, θέτει ένα σημαντικό προβληματισμό σχετικά με τη χρήση μονοθεραπείας με κολιστίνη σε αυτές τις λοιμώξεις. Η κλινική αποτυχία της κολιστίνης έχει σχετιστεί με τη δυσκολία καθορισμού του βέλτιστου δοσολογικού σχήματος, ιδιαίτερα σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια (349). Πράγματι, στην παρούσα μελέτη η πλειονότητα των ασθενών που έλαβαν μονοθεραπεία με κολιστίνη και είχαν δυσμενή έκβαση, εμφάνιζαν νεφρική ανεπάρκεια και υποβάλλονταν σε συνεχή φλεβοφλεβική διήθηση. Η μεγαλύτερη διάρκεια χορήγησης κολιστίνης βρέθηκε να σχετίζεται με την επιβίωση. Αυτό πιθανά οφείλεται στο ότι κάποιοι ασθενείς κατέληξαν πριν ολοκληρώσουν τη θεραπεία και δεν φαίνεται να αποτελεί ένδειξη της καλύτερης αποτελεσματικότητας των παρατεταμένων σχημάτων. Επίσης η συμμετοχή της τιγκεκυκλίνης στο θεραπευτικό σχήμα σχετίστηκε με την κλινική επιτυχία. Το συχνότερα χρησιμοποιηθέν σχήμα ήταν ο συνδυασμός κολιστίνης με τιγκεκυκλίνη, του οποίου η αποτελεσματικότητα υποστηρίζεται και από μελέτες συνέργειας (151). Η αξιολόγηση της χρήσης καρβαπενεμών ως μονοθεραπεία δεν ήταν εφικτή, δεδομένου ότι μόνο ένας ασθενής έλαβε μονοθεραπεία με καρβαπενέμη. Πάντως τα περισσότερα δεδομένα συγκλίνουν στο ότι υπό ορισμένες προϋποθέσεις, οι καρβαπενέμες έχουν θέση μό-

νο στα πλαίσια συνδυαστικών θεραπειών, ενώ η μονοθεραπεία συνδέεται συχνά με κλινική αποτυχία (320, 334, 348).

Εκτός από την αντιμικροβιακή αγωγή, αναδείχτηκε επίσης η σημασία των επιπρόσθετων θεραπευτικών παρεμβάσεων που στοχεύουν στην καταπολέμηση της εστίας της λοίμωξης. Σε προηγούμενη μελέτη οι παρεμβάσεις αυτές βρέθηκε να αποτελούν ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για την επιβίωση (313).

Διάφορες άλλες μεταβλητές που σχετίζονται με τον ασθενή και τη βαρύτητα της λοίμωξης βρέθηκε να σχετίζονται με την έκβαση: ηλικία, τα APACHE II score κατά την εισαγωγή και κατά την έναρξη της λοίμωξης, η σοβαρή σήψη και μεταξύ των υποκείμενων νοσημάτων τα καρδιαγγειακά νοσήματα και η νεφρική ανεπάρκεια. Η συσχέτιση των συγκεκριμένων υποκείμενων νοσημάτων με την έκβαση, αναφέρεται και σε άλλες μελέτες (313, 320, 242). Η νεφρική ανεπάρκεια, επίσης, επιβάλλει τροποποίηση της δόσης τόσο της κολιστίνης, όσο και των αμινογλυκοσίδων και πιθανά δυσχεραίνει τον καθορισμό του καταλληλότερου δοσολογικού σχήματος. Όλοι οι παραπάνω παράγοντες είναι μη τροποποιήσιμοι, όμως η αναγνώρισή τους βοηθά στον καθορισμό της ομάδας εκείνης των ασθενών που βρίσκονται σε υψηλότερο κίνδυνο για δυσμενή έκβαση και απαιτούν στενότερη παρακολούθηση.

Μεταξύ των ανεξάρτητων προγνωστικών παραγόντων για την έκβαση που εντοπίστηκαν, ο μοναδικός τροποποιήσιμος παράγοντας είναι η επιλογή της αντιμικροβιακής αγωγής. Η μελέτη προσφέρει χρήσιμα δεδομένα στην περιορισμένη μέχρι τώρα κλινική εμπειρία για τη θεραπευτική αντιμετώπιση αυτών των λοιμώξεων και συμβάλλει στη δημιουργία θεραπευτικών κατευθύνσεων.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι δεν αναμένονται στο άμεσο μέλλον νεότερα αντιβιοτικά, είναι απαραίτητες καλά σχεδιασμένες κλινικές μελέτες που θα προσδιορίσουν τα βέλτιστα δοσολογικά σχήματα της κολιστίνης, θα αποσαφηνίσουν τη θέση των καρβαπενεμών στη θεραπευτική αντιμετώπιση, θα διερευνήσουν τη συμμετοχή της φωσφομυκίνης στους συνδυασμούς αντιμικροβιακών και θα αναδείξουν τους συνδυασμούς που σχετίζονται με την υψηλότερη κλινική αποτελεσματικότητα.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M., Livermore DM, Miriagou V, Naas T, Rossolini GM, Samuelsen O, Seifert H, Woodford N, Nordmann P; the European Network on Carbapenemases. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18:413-431.
2. Woodford N, Livermore DM. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. *J Infect.* 2009; 59 Suppl 1:S4-16.
3. Hawkey PM, Jones AM. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 64 Suppl 1:i3-10.
4. Rice LB. The clinical consequences of antimicrobial resistance. *Curr Opin Microbiol.* 2009; 12: 476-81.
5. Souli M, Galani I, Giamarellou H. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Euro Surveill.* 2008; 13(47).
6. Livermore DM. Has the era of untreatable infections arrived? *J Antimicrob Chemother.* 2009; 64 Suppl 1:i29-36.
7. Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents.* 2010; 36 Suppl 3:S8-14.
8. Cornaglia G, Rossolini GM. The emerging threat of acquired carbapenemases in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 99-101.
9. Kattan JN, Villegas MV, Quinn JP. New developments in carbapenems. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14(12):1102-11.
10. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(11):4943-60.
11. Albers-Schonberg, G., et al. 1976. Abstr. 16th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. 229. American Society for Microbiology, Washington, DC.
12. Kropp, H., et al. 1976. Abstr. 16th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. 228. American Society for Microbiology, Washington, DC.
13. Norrby SR, Alestig K, Björnegård B, Burman LA, Ferber F, Huber JL, Jones KH, Kahan FM, Kahan JS, Kropp H, Meisinger MA, Sundelof JG. Urinary recovery of N-

- formimidoyl thienamycin (MK0787) as affected by coadministration of N-formimidoyl thienamycin dehydropeptidase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 1983; 23(2):300-7.
14. Fukasawa M, Sumita Y, Harabe ET, Tanio T, Nouda H, Kohzuki T, Okuda T, Matsumura H, Sunagawa M. Stability of meropenem and effect of 1 -methyl substitution on its stability in the presence of renal dehydropeptidase I. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992; 36(7):1577-9.
  15. Moellering RC Jr, Eliopoulos GM, Sentochnik DE. The carbapenems: new broad spectrum beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother.* 1989; 24 Suppl A:1-7.
  16. Sunagawa M, Matsumura H, Inoue T, Fukasawa M, Kato M. A novel carbapenem antibiotic, SM-7338 structure-activity relationships. *J Antibiot (Tokyo).* 1990; 43(5):519-32.
  17. Hashizume T, Ishino F, Nakagawa J, Tamaki S, Matsuhashi M. Studies on the mechanism of action of imipenem (N-formimidoylthienamycin) in vitro: binding to the penicillin-binding proteins (PBPs) in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, and inhibition of enzyme activities due to the PBPs in *E. coli*. *J Antibiot (Tokyo).* 1984; 37(4):394-400.
  18. Rossolini GM, Mantengoli E, Montagnani F, Pollini S. Epidemiology and clinical relevance of microbial resistance determinants versus anti-Gram-positive agents. *Curr Opin Microbiol.* 2010; 13(5):582-8.
  19. Livermore DM, Woodford N. The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol.* 2006; 14(9):413-20.
  20. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V; European Network on Carbapenemases. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18(5):432-8.
  21. Grundmann H, Livermore DM, Giske CG, Canton R, Rossolini GM, Campos J, Vatopoulos A, Gniadkowski M, Toth A, Pfeifer Y, Jarlier V, Carmeli Y; CNSE Working Group. Carbapenem-non-susceptible Enterobacteriaceae in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Euro Surveill* 2010 18; 15(46). pii: 19711.
  22. Elliott E, Brink AJ, van Greune J, Els Z, Woodford N, Turton J, Warner M, Livermore DM. In vivo development of ertapenem resistance in a patient with pneumonia

- caused by *Klebsiella pneumoniae* with an extended-spectrum beta-lactamase. Clin Infect Dis. 2006; 42(11):e95-8.
23. Jacoby GA, Mills DM, Chow N. Role of beta-lactamases and porins in resistance to ertapenem and other beta-lactams in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48(8):3203-6.
  24. Leavitt A, Chmelnitsky I, Colodner R, Ofek I, Carmeli Y, Navon-Venezia S. Ertapenem resistance among extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. J Clin Microbiol. 2009; 47(4):969-74.
  25. Lartigue MF, Poirel L, Poyart C, Réglie-Poupet H, Nordmann P. Ertapenem resistance of *Escherichia coli*. Emerg Infect Dis. 2007; 13(2):315-7.
  26. Szabó D, Silveira F, Hujer AM, Bonomo RA, Hujer KM, Marsh JW, Bethel CR, Doi Y, Deeley K, Paterson DL. Outer membrane protein changes and efflux pump expression together may confer resistance to ertapenem in *Enterobacter cloacae*. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(8):2833-5.
  27. Woodford N, Dallow JW, Hill RL, Palepou MF, Pike R, Ward ME, Warner M, Livermore DM. Ertapenem resistance among *Klebsiella* and *Enterobacter* submitted in the UK to a reference laboratory. Int J Antimicrob Agents. 2007; 29(4):456-9.
  28. Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. J Antimicrob Chemother. 2009; 63(4):659-67.
  29. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis. 2011. 17:1791-8.
  30. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. Clin Microbiol Rev. 2007; 20(3):440-58.
  31. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 1991; 35(1):147-51.
  32. Naas T, Nordmann P. Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994; 91(16):7693-7.
  33. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1980; 289(1036):321-31.



34. Ambler RP, Coulson AF, Frère JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, Levesque RC, Tiraby G, Waley SG. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J.* 1991; 276 (Pt 1):269-70.
35. Bush K. Characterization of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989; 33(3):259-63.
36. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39(6):1211-33.
37. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(3):969-76.
38. Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev.* 2010; 23(1):160-201.
39. Papp-Wallace KM, Bethel CR, Distler AM, Kasuboski C, Taracila M, Bonomo RA. Inhibitor resistance in the KPC-2 beta-lactamase, a preeminent property of this class A beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(2):890-7.
40. Walther-Rasmussen J, Høiby N. Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 60(3):470-82.
41. Henriques I, Moura A, Alves A, Saavedra MJ, Correia A. Molecular characterization of a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, SFC-1, from *Serratia fonticola* UTAD54. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(6):2321-4.
42. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Novel ambler class A carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase from a *Pseudomonas fluorescens* isolate from the Seine River, Paris, France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(1):328-32.
43. Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(3):622-32.
44. Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, Nordmann P. GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(9):2598-603.

45. Moubareck C, Brémont S, Conroy MC, Courvalin P, Lambert T. GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(8):3579-81.
46. Bonnin RA, Nordmann P, Potron A, Lecuyer H, Zahar JR, Poirel L. Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(1):349-54.
47. Vourli S, Giakkoupi P, Miriagou V, Tzelepi E, Vatopoulos AC, Tzouveleki LS. Novel GES/IBC extended-spectrum beta-lactamase variants with carbapenemase activity in clinical enterobacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2004; 234(2):209-13.
48. Poirel L, Weldhagen GF, De Champs C, Nordmann P. A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum beta-lactamase GES-2 in South Africa. *J Antimicrob Chemother.* 2002; 49(3):561-5.
49. Labuschagne Cde J, Weldhagen GF, Ehlers MM, Dove MG. Emergence of class 1 integron-associated GES-5 and GES-5-like extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in South Africa. *Int J Antimicrob Agents.* 2008; 31(6):527-30.
50. Naas T, Vandell L, Sougakoff W, Livermore DM, Nordmann P. Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, Sme-1, from *Serratia marcescens* S6. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994; 38(6):1262-70.
51. Queenan AM, Torres-Viera C, Gold HS, Carmeli Y, Eliopoulos GM, Moellering RC Jr, Quinn JP, Hindler J, Medeiros AA, Bush K. SME-type carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(11):3035-9.
52. Deshpande LM, Rhomberg PR, Sader HS, Jones RN. Emergence of serine carbapenemases (KPC and SME) among clinical strains of Enterobacteriaceae isolated in the United States Medical Centers: report from the MYSTIC Program (1999-2005). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006; 56(4):367-72.
53. Fairfax MR, Queenan AM, Lephart PR, Kaye KS, Dror M, Arnous N, Salimnia TT, Mitchell RA, Alangaden G, Salimnia H. Detection of 2 SME-1 carbapenemase-producing *Serratia marcescens* in Detroit. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011; 71(3):325-6.

54. Carrer A, Poirel L, Pitout JD, Church D, Nordmann P. Occurrence of an SME-2-producing *Serratia marcescens* isolate in Canada. *Int J Antimicrob Agents*. 2008; 31(2):181-2.
55. Poirel L, Wenger A, Bille J, Bernabeu S, Naas T, Nordmann P. SME-2-producing *Serratia marcescens* isolate from Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51(6):2282-3.
56. Queenan AM, Shang W, Schreckenberger P, Lolans K, Bush K, Quinn J. SME-3, a novel member of the *Serratia marcescens* SME family of carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50(10):3485-7.
57. Rasmussen BA, Bush K, Keeney D, Yang Y, Hare R, O'Gara C, Medeiros AA. Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996; 40(9):2080-6.
58. Pottumarthy S, Moland ES, Juretschko S, Swanzy SR, Thomson KS, Fritsche TR. Nmca carbapenem-hydrolyzing enzyme in *Enterobacter cloacae* in North America. *Emerg Infect Dis*. 2003; 9(8):999-1002.
59. Nordmann P, Mariotte S, Naas T, Labia R, Nicolas MH. Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993; 37(5):939-46.
60. Radice M, Power P, Gutkind G, Fernández K, Vay C, Famiglietti A, Ricover N, Ayala JA. First class a carbapenemase isolated from enterobacteriaceae in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48(3):1068-9.
61. Aubron C, Poirel L, Ash RJ, Nordmann P. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, U.S. rivers. *Emerg Infect Dis*. 2005; 11(2):260-4.
62. Yu YS, Du XX, Zhou ZH, Chen YG, Li LJ. First isolation of *bla*<sub>IMI-2</sub> in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate from China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50(4):1610-1.
63. Shahid M, Sobia F, Singh A, Malik A, Khan HM, Jonas D, et al. Beta-lactams and beta-lactamase-inhibitors in current- or potential-clinical practice: a comprehensive update. *Crit Rev Microbiol* 2009; 35:81–108
64. Kuwabara S, Abraham EP. Some properties of two extracellular beta-lactamases from *Bacillus cereus* 569/H. *Biochem J*. 1967; 103(3):27C-30C.

65. Iaconis JP, Sanders CC. Purification and characterization of inducible beta-lactamases in *Aeromonas* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990; 34(1):44-51.
66. Saino Y, Kobayashi F, Inoue M, Mitsuhashi S. Purification and properties of inducible penicillin beta-lactamase isolated from *Pseudomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1982; 22(4):564-70.
67. Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, Yoshimura F, Kato N. Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994; 38(1):71-8.
68. Ode T, Saito R, Kumita W, Sato K, Okugawa S, Moriya K, Koike K, Okamura N. Analysis of plasmid-mediated multidrug resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca* isolates from clinical specimens in Japan. *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 34(4):347-50.
69. Yang Q, Wang H, Sun H, Chen H, Xu Y, Chen M. Phenotypic and genotypic characterization of Enterobacteriaceae with decreased susceptibility to carbapenems: results from large hospital-based surveillance studies in China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54:573-77.
70. Espedido BA, Partridge SR, Iredell JR. *bla*<sub>IMP-4</sub> in different genetic contexts in Enterobacteriaceae isolates from Australia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52:2984-7.
71. Zhao WH, Chen G, Ito R, Hu ZQ. Relevance of resistance levels to carbapenems and integron-borne *bla*<sub>IMP-1</sub>, *bla*<sub>IMP-7</sub>, *bla*<sub>IMP-10</sub> and *bla*<sub>VIM-2</sub> in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol.* 2009; 58:1080-85.
72. Riccio ML, Franceschini N, Boschi L, Caravelli B, Cornaglia G, Fontana R, Amicosante G, Rossolini GM. Characterization of the metallo-beta-lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of *bla*<sub>IMP</sub> allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(5):1229-35.
73. Zhao WH, Hu ZQ. IMP-type metallo-β-lactamases in Gram-negative bacilli: distribution, phylogeny, and association with integrons. *Crit Rev Microbiol.* 2011; 37(3):214-26.

74. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. Cloning and characterization of *bla*<sub>VIM</sub>, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43(7):1584-90.
75. Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, Nordmann P. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(4):891-7.
76. Tsakris A, Pournaras S, Woodford N, Palepou MF, Babini GS, Douboyas J, Livermore DM. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(3):1290-2.
77. Mavroidi A, Tsakris A, Tzelepi E, Pournaras S, Loukova V, Tzouvelekis LS. Carbapenem-hydrolysing VIM-2 metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* from Greece. *J Antimicrob Chemother.* 2000; 46(6):1041-2.
78. Psychogiou M, Tassios PT, Avlami A, Stefanou I, Kosmidis C, Platsouka E, Paniara O, Xanthaki A, Toutouza M, Daikos GL, Tzouvelekis LS. Ongoing epidemic of *bla*<sub>VIM-1</sub>-positive *Klebsiella pneumoniae* in Athens, Greece: a prospective survey. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 61(1):59-63.
79. Giakkoupi P, Xanthaki A, Kanelopoulou M, Vlahaki A, Miriagou V, Kontou S, Papafraggas E, Malamou-Lada H, Tzouvelekis LS, Legakis NJ, Vatopoulos AC. VIM-1 Metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greek hospitals. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(8):3893-6.
80. Tsakris A, Poulou A, Kristo I, Pittaras T, Spanakis N, Pournaras S, Markou F. Large dissemination of VIM-2-metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains causing health care-associated community-onset infections. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(11):3524-9.
81. Poulou A, Spanakis N, Pournaras S, Pitiriga V, Ranellou K, Markou F, Tsakris A. Recurrent healthcare-associated community-onset infections due to *Klebsiella pneumoniae* producing VIM-1 metallo-beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65(12):2538-42.
82. Bogaerts P, Bebrone C, Huang TD, Bouchahrouf W, Degheldre Y, Deplano A, Hoffmann K, Glupczynski Y. Detection and characterization of VIM-31, a new variant

- of VIM-2 with Tyr224His and His252Arg mutations, in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(6):3283-7.
83. Zhao WH, Hu ZQ. Epidemiology and genetics of VIM-type metallo- $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacilli. *Future Microbiol*. 2011; 6(3):317-33.
84. Williamson DA, Sidjabat HE, Freeman JT, Roberts SA, Silvey A, Woodhouse R, Mowat E, Dyet K, Paterson DL, Blackmore T, Burns A, Heffernan H. Identification and molecular characterisation of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1 (NDM-1)- and NDM-6-producing Enterobacteriaceae from New Zealand hospitals. *Int J Antimicrob Agents*. 2012; 39(6):529-33
85. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*<sub>NDM-1</sub>, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53(12):5046-54.
86. Castanheira M, Deshpande LM, Mathai D, Bell JM, Jones RN, Mendes RE. Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing Enterobacteriaceae in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55(3):1274-8.
87. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, Chaudhary U, Doumith M, Giske CG, Irfan S, Krishnan P, Kumar AV, Maharjan S, Mushtaq S, Noorie T, Paterson DL, Pearson A, Perry C, Pike R, Rao B, Ray U, Sarma JB, Sharma M, Sheridan E, Thirunarayan MA, Turton J, Upadhyay S, Warner M, Welfare W, Livermore DM, Woodford N. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis*. 2010; 10(9):597-602.
88. Nordmann P, Poirel L, Toleman MA, Walsh TR. 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*. 2011; 66(4):689-92.
89. Bonnin RA, Poirel L, Naas T, Pirs M, Seme K, Schrenzel J, Nordmann P. Dissemination of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1-producing *Acinetobacter baumannii* in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18(9):E362-5.

90. Pfeifer Y, Wilharm G, Zander E, Wichelhaus TA, Göttig S, Hunfeld KP, Seifert H, Witte W, Higgins PG. Molecular characterization of *bla*<sub>NDM-1</sub> in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66(9):1998-2001.
91. Chen Y, Zhou Z, Jiang Y, Yu Y. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66(6):1255-9.
92. Yang J, Chen Y, Jia X, Luo Y, Song Q, Zhao W, Wang Y, Liu H, Zheng D, Xia Y, Yu R, Han X, Jiang G, Zhou Y, Zhou W, Hu X, Liang L, Han L. Dissemination and characterization of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in an intensive care unit in China. *Clin Microbiol Infect.* 2012 Sep 25. [Epub ahead of print].
93. Jovicic B, Lepsanovic Z, Suljagic V, Rackov G, Begovic J, Topisirovic L, Kojic M. Emergence of NDM-1 metallo- $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(8):3929-31.
94. Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, et al. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis.* 2011; 11:355-62.
95. Walsh TR, Toleman MA. The new medical challenge: why NDM-1? Why Indian? *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011; 9(2):137-41.
96. Livermore DM, Walsh TR, Toleman M, Woodford N. Balkan NDM-1: escape or transplant? *Lancet Infect Dis.* 2011; 11(3):164.
97. Arpin C, Noury P, Boraud D, Coulange L, Manetti A, André C, M'Zali F, Quentin C. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* resistant to colistin in a French community patient without history of foreign travel. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(6):3432-4.
98. Rolain JM, Parola P, Cornaglia G. New Delhi metallo-beta-lactamase NDM-1: towards a new pandemic? *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16(12):1699-701.
99. Paton R, Miles RS, Hood J, Amyes SG, Miles RS, Amyes SG. ARI 1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents.* 1993; 2(2):81-7.
100. Donald HM, Scaife W, Amyes SG, Young HK. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(1):196-9.

101. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(1):24-38.
102. Tsakris A, Tsioni C, Pournaras S, Polyzos S, Maniatis AN, Sofianou D. Spread of low-level carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones in a tertiary care Greek hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 52(6):1046-7.
103. 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; 66(12):2767-72
104. Liakopoulos A, Miriagou V, Katsifas EA, Karagouni AD, Daikos GL, Tzouveleki LS, Petinaki E. Identification of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* in Greece, 2010 to 2011. *Euro Surveill.* 2012; 17(11). pii: 20117.
105. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(1):15-22.
106. Carrër A, Poirel L, Eraksoy H, Cagatay AA, Badur S, Nordmann P. Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(8):2950-4.
107. Carrër A, Poirel L, Yilmaz M, Akan OA, Feriha C, Cuzon G, Matar G, Honderlick P, Nordmann P. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(3):1369-73.
108. 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.* 2012 Sep 3. [Epub ahead of print].
109. Lascols C, Peirano G, Hackel M, Laupland KB, Pitout JD. Surveillance and molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* that produce carbapenemases; the first report of OXA-48-like enzymes in North America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Oct 15. [Epub ahead of print].
110. Potron A, Nordmann P, Lafeuille E, Al Maskari Z, Al Rashdi F, Poirel L. Characterization of OXA-181, a carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(10):4896-9.



111. Oteo J, Hernández JM, Espasa M, Fleites A, Sáez D, Bautista V, Pérez-Vázquez M, Fernández-García MD, Delgado-Iribarren A, Sánchez-Romero I, García-Picazo L, Miguel MD, Solís S, Aznar E, Trujillo G, Mediavilla C, Fontanals D, Rojo S, Vindel A, Campos J. Emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* and the novel carbapenemases OXA-244 and OXA-245 in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2012 Oct 2. [Epub ahead of print].
112. Ke W, Bethel CR, Thomson JM, Bonomo RA, van den Akker F. Crystal structure of KPC-2: insights into carbapenemase activity in class A beta-lactamases. *Biochemistry.* 2007; 46(19):5732-40.
113. Papp-Wallace KM, Taracila M, Hornick JM, Hujer AM, Hujer KM, Distler AM, Endimiani A, Bonomo RA. Substrate selectivity and a novel role in inhibitor discrimination by residue 237 in the KPC-2 beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(7):2867-77.
114. Papp-Wallace KM, Taracila M, Wallace CJ, Hujer KM, Bethel CR, Hornick JM, Bonomo RA. Elucidating the role of Trp105 in the KPC-2  $\beta$ -lactamase. *Protein Sci.* 2010; 19(9):1714-27.
115. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis.* 2009; 9: 228–236.
116. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(4):1151-61.
117. Yigit H, Queenan AM, Rasheed JK, Biddle JW, Domenech-Sanchez A, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(12):3881-9.
118. Alba J, Ishii Y, Thomson K, Moland ES, Yamaguchi K. Kinetics study of KPC-3, a plasmid-encoded class A carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(11):4760-2.
119. Wolter DJ, Kurpiel PM, Woodford N, Palepou MF, Goering RV, Hanson ND. Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and

- its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(2):557-62.
120. Lamoureaux TL, Frase H, Antunes NT, Vakulenko SB. Antibiotic Resistance and Substrate Profiles of the Class A Carbapenemase KPC-6. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(11):6006-8.
121. Hidalgo-Grass C, Warburg G, Temper V, Benenson S, Moses AE, Block C, Strahilevitz J. KPC-9, a Novel Carbapenemase from Clinical Specimens in Israel. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(11):6057-9.
122. Smith Moland E, Hanson ND, Herrera VL, Black JA, Lockhart TJ, Hossain A, Johnson JA, Goering RV, Thomson KS. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing beta-lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 51(3):711-4.
123. Miriagou V, Tzouveleki LS, Rossiter S, Tzelepi E, Angulo FJ, Whichard JM. Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(4):1297-300.
124. Erratum in *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008; 52(2):809.
125. Woodford N, Tierno PM Jr, Young K, Tysall L, Palepou MF, Ward E, Painter RE, Suber DF, Shungu D, Silver LL, Inglima K, Kornblum J, Livermore DM. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(12):4793-9.
126. Gregory CJ, Llata E, Stine N, Gould C, Santiago LM, Vazquez GJ, Robledo IE, Srinivasan A, Goering RV, Tomashek KM. Outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Puerto Rico associated with a novel carbapenemase variant. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2010; 31(5):476-84.
127. Robledo IE, Aquino EE, Santé MI, Santana JL, Otero DM, León CF, Vázquez GJ. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(3):1354-7.
128. Lascols C, Hackel M, Hujer AM, Marshall SH, Bouchillon SK, Hoban DJ, Hawser SP, Badal RE, Bonomo RA. Using nucleic acid microarrays to perform molecular epidemiology and detect novel  $\beta$ -lactamases: a snapshot of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases throughout the world. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(5):1632-9.

129. Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas MV, Wisell KT, Carmeli Y, Gales AC, Venezia SN, Quinn JP, Nordmann P. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase *bla*<sub>KPC-2</sub> gene. *Emerg Infect Dis*. 2010; 16(9):1349-56.
130. Gootz TD, Lescoe MK, Dib-Hajj F, Dougherty BA, He W, Della-Latta P, Huard RC. Genetic organization of transposase regions surrounding *bla*<sub>KPC</sub> carbapenemase genes on plasmids from *Klebsiella* strains isolated in a New York City hospital. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53(5):1998-2004.
131. Leavitt A, Chmelnitsky I, Ofek I, Carmeli Y, Navon-Venezia S. Plasmid pKpQIL encoding KPC-3 and TEM-1 confers carbapenem resistance in an extremely drug-resistant epidemic *Klebsiella pneumoniae* strain. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65(2):243-8.
132. Jiang Y, Yu D, Wei Z, Shen P, Zhou Z, Yu Y. Complete nucleotide sequence of *Klebsiella pneumoniae* multidrug resistance plasmid pKP048, carrying *bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>DHA-1</sub>, *qnrB4*, and *armA*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54(9):3967-9.
133. Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, Clímaco EC, Martinez R, Bellissimo-Rodrigues F, Basile-Filho A, Evaristo MA, Del Peloso PF, Ribeiro VB, Barth AL, Paula MC, Baquero F, Cantón R, Darini AL, Coque TM. Dissemination of *bla*<sub>KPC-2</sub> by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae species in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55(7):3579-83.
134. Kassis-Chikhani N, Frangeul L, Drieux L, Sengelin C, Jarlier V, Brisse S, Arlet G, Decré D. Complete nucleotide sequence of the first KPC-2- and SHV-12-encoding IncX plasmid pKpS90 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Oct 22. [Epub ahead of print]
135. Rasheed JK, Biddle JW, Anderson KF, Washer L, Chenoweth C, Perrin J, Newton DW, Patel JB. Detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase type 2 Carbapenem-hydrolyzing enzyme in clinical isolates of *Citrobacter freundii* and *K. oxytoca* carrying a common plasmid. *J Clin Microbiol*. 2008; 46(6):2066-9.
136. Baraniak A, Grabowska A, Izdebski R, Fiett J, Herda M, Bojarska K, Żabicka D, Kania-Pudło M, Młynarczyk G, Żak-Puławska Z, Hryniewicz W, Gniadkowski M; KPC-PL Study Group. Molecular characteristics of KPC-producing Enterobacteriaceae at

- the early stage of their dissemination in Poland, 2008-2009. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(12):5493-9.
137. Richter SN, Frasson I, Bergo C, Parisi S, Cavallaro A, Palù G. Transfer of KPC-2 Carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* in a patient: first case in Europe. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(5):2040-2.
138. 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 beta-lactamases in clinical isolates of KPC carbapenemase-possessing enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(11):3420-6.
139. Chmelnitsky I, Navon-Venezia S, Strahilevitz J, Carmeli Y. Plasmid-mediated *qnrB2* and carbapenemase gene *bla*<sub>KPC-2</sub> carried on the same plasmid in carbapenem-resistant ciprofloxacin-susceptible *Enterobacter cloacae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(8):2962-5.
140. Chmelnitsky I, Hermesh O, Navon-Venezia S, Strahilevitz J, Carmeli Y. Detection of *aac(6')-Ib-cr* in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from Tel Aviv, Israel. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 64(4):718-22.
141. Moland ES, Hong SG, Thomson KS, Larone DH, Hanson ND. *Klebsiella pneumoniae* isolate producing at least eight different beta-lactamases, including AmpC and KPC beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(2):800-1
142. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP; Colombian Nosocomial Resistance Study Group. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(4):1553-5.
143. Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartigue MF, Quinn JP, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase *bla*<sub>KPC</sub> gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(4):1257-63.
144. Kitchel B, Rasheed JK, Endimiani A, Hujer AM, Anderson KF, Bonomo RA, Patel JB. Genetic factors associated with elevated carbapenem resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(10):4201-7.
145. Bryant KA, Van Schooneveld TC, Thapa I, Bastola D, Williams LO, Safranek TJ, Hinrichs SH, Rupp ME, Fey PD. *bla*<sub>KPC-4</sub> is encoded within a truncated Tn4401 in an

- Incl/M plasmid pNE1280 isolated from *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens*. Antimicrob Agents Chemother. 2012 Oct 15. [Epub ahead of print].
146. Cuzon G, Naas T, Villegas MV, Correa A, Quinn JP, Nordmann P. Wide dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing beta-lactamase *bla*<sub>KPC-2</sub> gene in Colombia. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55(11):5350-3.
147. Cuzon G, Naas T, Nordmann P. Functional characterization of Tn4401, a Tn3-based transposon involved in *bla*<sub>KPC</sub> gene mobilization. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55(11):5370-3.
148. Naas T, Cuzon G, Truong HV, Nordmann P. Role of ISKpn7 and deletions in *bla*<sub>KPC</sub> gene expression. Antimicrob Agents Chemother. 2012; 56(9):4753-9.
149. Landman D, Bratu S, Quale J. Contribution of OmpK36 to carbapenem susceptibility in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. J Med Microbiol. 2009; 58(Pt 10):1303-8.
150. Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, Galani I, Giske CG, Gniadkowski M, Malamou-Lada E, Martinez-Martinez L, Navarro F, Nordmann P, Peixe L, Pournaras S, Rossolini GM, Tsakris A, Vatopoulos A, Cantón R. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. Clin Microbiol Infect. 2010; 16(2):112-22.
151. Akova M, Daikos GL, Tzouvelekis L, Carmeli Y. Interventional strategies and current clinical experience with carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. Clin. Microbiol. Infect. 2012; 18:439-448.
152. D'Alincourt Carvalho-Assef AP, Leão RS, da Silva RV, Ferreira AG, Seki LM, Asensi MD, Marques EA. *Escherichia coli* producing KPC-2 carbapenemase: first report in Brazil. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010; 68(3):337-8.
153. Almeida AC, de Sá Cavalcanti FL, Vilela MA, Gales AC, de Morais MA Junior, Camargo de Morais MM. *Escherichia coli* ST502 and *Klebsiella pneumoniae* ST11 sharing an IncW plasmid harbouring the *bla*<sub>KPC-2</sub> gene in an Intensive Care Unit patient. Int J Antimicrob Agents. 2012; 40(4):374-376.
154. Cai JC, Zhou HW, Zhang R, Chen GX. Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* isolates possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in intensive care units of a Chinese hospital. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52(6):2014-8.

155. Li G, Wei Q, Wang Y, Du X, Zhao Y, Jiang X. Novel genetic environment of the plasmid-mediated KPC-3 gene detected in *Escherichia coli* and *Citrobacter freundii* isolates from China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011; 30(4):575-80.
156. Petrella S, Ziental-Gelus N, Mayer C, Renard M, Jarlier V, Sougakoff W. Genetic and structural insights into the dissemination potential of the extremely broad-spectrum class A beta-lactamase KPC-2 identified in an *Escherichia coli* strain and an *Enterobacter cloacae* strain isolated from the same patient in France. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52(10):3725-36.
157. Naas T, Cuzon G, Gaillot O, Courcol R, Nordmann P. When carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC meets *Escherichia coli* ST131 in France. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55(10):4933-4.
158. Potron A, Poirel L, Verdavaine D, Nordmann P. Importation of KPC-2-producing *Escherichia coli* from India. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67(1):242-3.
159. Morris D, Boyle F, Ludden C, Condon I, Hale J, O'Connell N, Power L, Boo TW, Dhanji H, Lavallee C, Woodford N, Cormican M. Production of KPC-2 carbapenemase by an *Escherichia coli* clinical isolate belonging to the international ST131 clone. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55(10):4935-6.
160. Poirel L, Barbosa-Vasconcelos A, Simões RR, Da Costa PM, Liu W, Nordmann P. Environmental KPC-producing *Escherichia coli* isolates in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(3):1662-3.
161. Hong T, Moland ES, Abdalhamid B, Hanson ND, Wang J, Sloan C, Fabian D, Farajallah A, Levine J, Thomson KS. *Escherichia coli*: development of carbapenem resistance during therapy. *Clin Infect Dis*. 2005; 40(10):e84-6.
162. Bratu S, Brooks S, Burney S, Kochar S, Gupta J, Landman D, Quale J. Detection and spread of *Escherichia coli* possessing the plasmid-borne carbapenemase KPC-2 in Brooklyn, New York. *Clin Infect Dis*. 2007; 44(7):972-5.
163. Landman D, Urban C, Bäcker M, Kelly P, Shah N, Babu E, Bratu S, Quale J. Susceptibility profiles, molecular epidemiology, and detection of KPC-producing *Escherichia coli* isolates from the New York City vicinity. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(12):4604-7.
164. Urban C, Bradford PA, Tuckman M, Segal-Maurer S, Wehbeh W, Grenner L, Colon-Urban R, Mariano N, Rahal JJ. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* harboring

- Klebsiella pneumoniae* carbapenemase beta-lactamases associated with long-term care facilities. Clin Infect Dis. 2008; 46(11):e127-30.
165. Kim YA, Qureshi ZA, Adams-Haduch JM, Park YS, Shutt KA, Doi Y. Features of infections due to *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Escherichia coli*: emergence of sequence type 131. Clin Infect Dis. 2012; 55(2):224-31.
166. Robledo IE, Aquino EE, Vázquez GJ. Detection of the KPC gene in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* during a PCR-based nosocomial surveillance study in Puerto Rico. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55(6):2968-70.
167. Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Leavitt A, Schwaber MJ, Schwartz D, Carmeli Y. Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem-resistant *Escherichia coli* clones in Israel. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(9):3098-101.
168. Goren MG, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Carmeli Y. Carbapenem-resistant KPC-2-producing *Escherichia coli* in a Tel Aviv Medical Center, 2005 to 2008. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(6):2687-91.
169. Mavroidi A, Miriagou V, Malli E, Stefos A, Dalekos GN, Tzouvelekis LS, Petinaki E. Emergence of *Escherichia coli* sequence type 410 (ST410) with KPC-2  $\beta$ -lactamase. Int J Antimicrob Agents. 2012; 39(3):247-50.
170. Hossain A, Ferraro MJ, Pino RM, Dew RB 3rd, Moland ES, Lockhart TJ, Thomson KS, Goering RV, Hanson ND. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 in an *Enterobacter* sp. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48(11):4438-40.
171. Bratu S, Landman D, Alam M, Tolentino E, Quale J. Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter* spp. from Brooklyn, New York. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49(2):776-8.
172. Marchaim D, Navon-Venezia S, Schwaber MJ, Carmeli Y. Isolation of imipenem-resistant *Enterobacter* species: emergence of KPC-2 carbapenemase, molecular characterization, epidemiology, and outcomes. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52(4):1413-8.
173. Zavascki AP, Machado AB, de Oliveira KR, Superti SV, Pilger DA, Cantarelli VV, Pereira PR, Lieberkmecht AC, Barth AL. KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. Int J Antimicrob Agents. 2009; 34(3):286-8.

174. Zhang X, Lü X, Zong Z. Enterobacteriaceae producing the KPC-2 carbapenemase from hospital sewage. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012; 73(2):204-6.
175. Hu YY, Cai JC, Zhang R, Zhou HW, Sun Q, Chen GX. Emergence of *Proteus mirabilis* harboring *bla*<sub>KPC-2</sub> and *qnrD* in a Chinese Hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(5):2278-82.
176. Tsakris A, Voulgari E, Poulou A, Kimouli M, Pournaras S, Ranellou K, Kosmopoulou O, Petropoulou D. In vivo acquisition of a plasmid-mediated *bla*<sub>KPC-2</sub> gene among clonal isolates of *Serratia marcescens*. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(7):2546-9.
177. Mavroidi A, Neonakis I, Liakopoulos A, Papaioannou A, Ntala M, Tryposkiadis F, Miriagou V, Petinaki E. Detection of *Citrobacter koseri* carrying beta-lactamase KPC-2 in a hospitalised patient, Greece, July 2011. *Euro Surveill.* 2011; 16(41).
178. Tzouveleki LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev.* 2012; 25(4):682-707.
179. Correa A, Montealegre MC, Mojica MF, Maya JJ, Rojas LJ, De La Cadena EP, Ruiz SJ, Recalde M, Rosso F, Quinn JP, Villegas MV. First Report of a *Pseudomonas aeruginosa* Isolate Coharboring KPC and VIM Carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(10):5422-3.
180. Wolter DJ, Khalaf N, Robledo IE, Vázquez GJ, Santé MI, Aquino EE, Goering RV, Hanson ND. Surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Puerto Rican Medical Center Hospitals: dissemination of KPC and IMP-18 beta-lactamases *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(4):1660-4.
181. Martínez T, Vázquez GJ, Aquino EE, Ramírez-Ronda R, Robledo IE. First report of a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate co-harboring KPC-2 and IMP-18 carbapenemases. *Int J Antimicrob Agents.* 2012; 39(6):542-3.
182. Akpaka PE, Swanston WH, Ihemere HN, Correa A, Torres JA, Tafur JD, Montealegre MC, Quinn JP, Villegas MV. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Trinidad and Tobago. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(8):2670-1.
183. Poirel L, Nordmann P, Lagrutta E, Cleary T, Munoz-Price LS. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(7):3072.



184. Ge C, Wei Z, Jiang Y, Shen P, Yu Y, Li L. Identification of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in China. J Antimicrob Chemother. 2011; 66(5):1184-6
185. Jácome PR, Alves LR, Cabral AB, Lopes AC, Maciel MA. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2012; 56(9):4990.
186. Almeida AC, Vilela MA, Cavalcanti FL, Martins WM, Morais MA Jr, Morais MM. First description of KPC-2-producing *Pseudomonas putida* in Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2012; 56(4):2205-6.
187. Pasteran F, Faccone D, Gomez S, De Bunder S, Spinelli F, Rapoport M, Petroni A, Galas M, Corso A; *Pseudomonas aeruginosa* KPC Group. Detection of an international multiresistant clone belonging to sequence type 654 involved in the dissemination of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Argentina. J Antimicrob Chemother. 2012; 67(5):1291-3.
188. Bradford PA, Bratu S, Urban C, Visalli M, Mariano N, Landman D, Rahal JJ, Brooks S, Cebular S, Quale J. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City. Clin Infect Dis. 2004; 39(1):55-60.
189. Bratu S, Tolaney P, Karumudi U, Quale J, Mooty M, Nichani S, Landman D. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents. J Antimicrob Chemother. 2005; 56(1):128-32.
190. Bratu S, Mooty M, Nichani S, Landman D, Gullans C, Pettinato B, Karumudi U, Tolaney P, Quale J. Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49(7):3018-20.
191. Landman D, Bratu S, Kochar S, Panwar M, Trehan M, Doymaz M, Quale J. Evolution of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY. J Antimicrob Chemother. 2007; 60(1):78-82.

192. Landman D, Babu E, Shah N, Kelly P, Olawole O, Bäcker M, Bratu S, Quale J. Transmission of carbapenem-resistant pathogens in New York City hospitals: progress and frustration. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67(6):1427-31.
193. Chiang T, Mariano N, Urban C, Colon-Urban R, Grenner L, Eng RH, Huang D, Dholakia H, Rahal JJ. Identification of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring KPC enzymes in New Jersey. *Microb Drug Resist.* 2007; 13(4):235-39.
194. Endimiani A, Hujer AM, Perez F, Bethel CR, Hujer KM, Kroeger J, Oethinger M, Paterson DL, Adams MD, Jacobs MR, Diekema DJ, Hall GS, Jenkins SG, Rice LB, Tenover FC, Bonomo RA. Characterization of *bla*<sub>KPC</sub>-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates detected in different institutions in the Eastern USA. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 63(3):427-37.
195. Halstead DC, Sellen TJ, Adams-Haduch JM, Dossenback DA, Abid J, Doi Y, Paterson DL. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, Northeast Florida. *South Med J.* 2009; 102(7):680-7.
196. Le J, Castanheira M, Burgess DS, McKee B, Iqbal R, Jones RN. Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase KPC-3 in Long Beach, California. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(2):623-5.
197. Munoz-Price LS, De La Cuesta C, Adams S, Wyckoff M, Cleary T, McCurdy SP, Huband MD, Lemmon MM, Lescoe M, Dibhajj FB, Hayden MK, Lolans K, Quinn JP. Successful eradication of a monoclonal strain of *Klebsiella pneumoniae* during a *K. pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* outbreak in a surgical intensive care unit in Miami, Florida. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2010; 31(10):1074-7.
198. Chen LF, Anderson DJ, Paterson DL. Overview of the epidemiology and the threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) resistance. *Infect Drug Resist.* 2012; 5:133-41.
199. Viau RA, Hujer AM, Marshall SH, Perez F, Hujer KM, Briceño DF, Dul M, Jacobs MR, Grossberg R, Toltzis P, Bonomo RA. "Silent" dissemination of *Klebsiella pneumoniae* isolates bearing *K. pneumoniae* carbapenemase in a long-term care facility for children and young adults in Northeast Ohio. *Clin Infect Dis.* 2012; 54(9):1314-21.

200. Goldfarb D, Harvey SB, Jessamine K, Jessamine P, Toye B, Desjardins M. Detection of plasmid-mediated KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Ottawa, Canada: evidence of intrahospital transmission. *J Clin Microbiol*. 2009; 47(6):1920-2.
201. Mataseje LF, Boyd DA, Willey BM, Prayitno N, Kreiswirth N, Gelosia A, Poutanen SM, Low DE, Jenkins SG, Katz K, Mulvey MR. Plasmid comparison and molecular analysis of *Klebsiella pneumoniae* harbouring *bla*<sub>KPC</sub> from New York City and Toronto. *J Antimicrob Chemother*. 2011; 66(6):1273-7.
202. Mataseje LF, Bryce E, Roscoe D, Boyd DA, Embree J, Gravel D, Katz K, Kibsey P, Kuhn M, Mouchili A, Simor A, Taylor G, Thomas E, Turgeon N, Mulvey MR; Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program. Carbapenem-resistant Gram-negative bacilli in Canada 2009-10: results from the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program (CNISP). *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67(6):1359-67.
203. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Suarez CJ, Lopez JA, Vallejo M, Quinn JP; Colombian Nosocomial Resistance Study Group. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50(8):2880-2.
204. Lopez JA, Correa A, Navon-Venezia S, Correa AL, Torres JA, Briceño DF, Montealegre MC, Quinn JP, Carmeli Y, Villegas MV. Intercontinental spread from Israel to Colombia of a KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* strain. *Clin Microbiol Infect*. 2011; 17(1):52-6.
205. Pasteran FG, Otaegui L, Guerriero L, Radice G, Maggiora R, Rapoport M, Faccione D, Di Martino A, Galas M. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14(7):1178-80.
206. Gomez SA, Pasteran FG, Faccione D, Tijet N, Rapoport M, Lucero C, Lastovetska O, Albornoz E, Galas M; KPC Group, Melano RG, Corso A, Petroni A. Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST258 harbouring KPC-2 in Argentina. *Clin Microbiol Infect*. 2011; 17(10):1520-4.
207. Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53(1):333-4.

208. Pavez M, Mamizuka EM, Lincopan N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(6):2702.
209. Peirano G, Seki LM, Val Passos VL, Pinto MC, Guerra LR, Asensi MD. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 63(2):265-8.
210. Pereira PS, de Araujo CF, Seki LM, Zahner V, Carvalho-Assef AP, Asensi MD. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). *J Antimicrob Chemother.* 2012 Oct 15. [Epub ahead of print].
211. Cifuentes M, García P, San Martín P, Silva F, Zúñiga J, Reyes S, Rojas R, Ponce R, Quintanilla R, Delpiano L, Wolff M. First isolation of KPC in Chile: from Italy to a public hospital in Santiago. *Rev Chilena Infectol.* 2012; 29(2):224-8.
212. Wei ZQ, Du XX, Yu YS, Shen P, Chen YG, Li LJ. Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(2):763-5.
213. Shen P, Wei Z, Jiang Y, Du X, Ji S, Yu Y, Li L. Novel genetic environment of the carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 among Enterobacteriaceae in China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(10):4333-8.
214. Qi Y, Wei Z, Ji S, Du X, Shen P, Yu Y. ST11, the dominant clone of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66(2):307-12.
215. Wei Z, Yu T, Qi Y, Ji S, Shen P, Yu Y, Chen Y. Coexistence of plasmid-mediated KPC-2 and IMP-4 carbapenemases in isolates of *Klebsiella pneumoniae* from China. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66(11):2670-1.
216. Chung KP, Tseng SP, Huang YT, Tsai TH, Teng LJ, Hsueh PR. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-2 in Taiwan. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66(5):1182-4.
217. Lauderdale TL, Shi ZY, Lin CF, Lai JF, Tan MC, Wang JT, Chang SC. KPC-2-producing sequence type 11 *Klebsiella pneumoniae* detected in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(4):2207-8.

218. Lee CM, Liao CH, Lee WS, Liu YC, Mu JJ, Lee MC, Hsueh PR. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-2-Producing *K. pneumoniae* Sequence Type 11 in Taiwan in 2011. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(10):5016-22.
219. Rhee JY, Park YK, Shin JY, Choi JY, Lee MY, Peck KR, Song JH, Ko KS. KPC-producing extreme drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate from a patient with diabetes mellitus and chronic renal failure on hemodialysis in South Korea. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(5):2278-9.
220. Balm MN, Ngan G, Jureen R, Lin RT, Teo J. Molecular characterization of newly emerged *bla*<sub>KPC-2</sub>-producing *Klebsiella pneumoniae* in Singapore. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(2):475-6.
221. Kumarasamy K, Kalyanasundaram A. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* isolate co-producing NDM-1 with KPC-2 from India. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67(1):243-4.
222. Suzuki S, Yamane K, Wachino J, Matsui M, Konda T, Arakawa Y. Three months survey of multidrug-resistant Enterobacteriaceae in Japan. *Nihon Rinsho.* 2012; 70(2):187-91.
223. Brink AJ, Coetzee J, Clay CG, Sithole S, Richards GA, Poirel L, Nordmann P. Emergence of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1) and *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC-2) in South Africa. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(2):525-7.
224. Colodner R, Samra Z, Keller N, Sprecher H, Block C, Peled N, Lazarovitch T, Bardenstein R, Schwartz-Harari O, Carmeli Y; Israel ESBL Group. First national surveillance of susceptibility of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. to antimicrobials in Israel. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007; 57(2):201-5.
225. Leavitt A, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Schwaber MJ, Carmeli Y. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(8):3026-9.
226. Samra Z, Ofir O, Lishtzinsky Y, Madar-Shapiro L, Bishara J. Outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-3 in a tertiary medical centre in Israel. *Int J Antimicrob Agents.* 2007; 30(6):525-9

227. Navon-Venezia S, Leavitt A, Schwaber MJ, Rasheed JK, Srinivasan A, Patel JB, Carmeli Y; Israeli KPC Kpn Study Group. First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(2):818-20.
228. Leavitt A, Carmeli Y, Chmelnitsky I, Goren MG, Ofek I, Navon-Venezia S. Molecular epidemiology, sequence types, and plasmid analyses of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Israel. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(7):3002-6.
229. Schwaber MJ, Lev B, Israeli A, Solter E, Smollan G, Rubinovitch B, Shalit I, Carmeli Y; Israel Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Working Group. Containment of a country-wide outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Israeli hospitals via a nationally implemented intervention. *Clin Infect Dis.* 2011; 52(7):848-55.
230. Warburg G, Hidalgo-Grass C, Partridge SR, Tolmasky ME, Temper V, Moses AE, Block C, Strahilevitz J. A carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* epidemic clone in Jerusalem: sequence type 512 carrying a plasmid encoding *aac(6')-Ib*. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67(4):898-901.
231. Ben-David D, Masarwa S, Navon-Venezia S, Mishali H, Fridental I, Rubinovitch B, Smollan G, Carmeli Y, Schwaber MJ; Israel PACF CRKP (Post-Acute-Care Facility Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*) Working Group. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in post-acute-care facilities in Israel. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2011; 32(9):845-53.
232. Naas T, Nordmann P, Vedel G, Poyart C. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(10):4423-4.
233. Giani T, D'Andrea MM, Pecile P, Borgianni L, Nicoletti P, Tonelli F, Bartoloni A, Rossolini GM. Emergence in Italy of *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 producing KPC-3 Carbapenemase. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(11):3793-4.
234. Marchese A, Coppo E, Barbieri R, Debbia E. Emergence of KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains and spread of an isolate of sequence type 258 in the neuro-rehabilitation unit of an Italian hospital. *J Chemother.* 2010; 22(3):212-4.

235. Mammina C, Palma DM, Bonura C, Anna Plano MR, Monastero R, Sodano C, Calà C, Tetamo R. Outbreak of infection with *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 producing *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase 3 in an intensive care unit in Italy. J Clin Microbiol. 2010; 48(4):1506-7.
236. 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-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy. J Clin Microbiol. 2011; 49(11):3986-9.
237. Mazzariol A, Lo Cascio G, Ballarini P, Ligozzi M, Soldani F, Fontana R, Cornaglia G. Rapid molecular technique analysis of a KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak in an Italian surgery unit. J Chemother. 2012 ; 24(2):93-6.
238. Gaibani P, Ambretti S, Berlingeri A, Gelsomino F, Bielli A, Landini MP, Sambri V. Rapid increase of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in a large Italian hospital: surveillance period 1 March - 30 September 2010. Euro Surveill. 2011; 16(8).
239. Mezzatesta ML, Gona F, Caio C, Petrolito V, Sciortino D, Sciacca A, Santangelo C, Stefani S. Outbreak of KPC-3-producing, and colistin-resistant, *Klebsiella pneumoniae* infections in two Sicilian hospitals. Clin Microbiol Infect. 2011; 17(9):1444-7.
240. Mammina C, Bonura C, Di Bernardo F, Aleo A, Fasciana T, Sodano C, Saporito MA, Verde MS, Tetamo R, Palma DM. Ongoing spread of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in different wards of an acute general hospital, Italy, June to December 2011. Euro Surveill. 2012; 17(33).
241. Frasson I, Lavezzo E, Franchin E, Toppo S, Barzon L, Cavallaro A, Richter SN, Palù G. Antimicrobial Treatment and Containment Measures for an Extremely Drug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* ST101 Isolate Carrying pKPN101-IT, a Novel Fully Sequenced *bla*<sub>KPC-2</sub> Plasmid. J Clin Microbiol. 2012; 50(11):3768-72.
242. Capone A, Giannella M, Fortini D, Giordano A, Meledandri M, Ballardini M, Venditti M, Bordi E, Capozzi D, Balice MP, Tarasi A, Parisi G, Lappa A, Carattoli A, Petrosillo N; The SEERBIO-GRAB network, Cantón R. High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection accounts for an excess of mortality. Clin Microbiol Infect. 2012 Oct 18. [Epub ahead of print].

243. Poirel L, Lienhard R, Potron A, Malinverni R, Siegrist HH, Nordmann P. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from Switzerland. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66(3):675-6.
244. Babouee B, Widmer AF, Dubuis O, Ciardo D, Droz S, Betsch BY, Garzoni C, Führer U, Battegay M, Frei R, Goldenberger D. Emergence of four cases of KPC-2 and KPC-3-carrying *Klebsiella pneumoniae* introduced to Switzerland, 2009-10. *Euro Surveill.* 2011; 16(11).
245. Bedenić B, Mazzariol A, Plečko V, Bošnjak Z, Barl P, Vraneš J, Cornaglia G. First report of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Croatia. *J Chemother.* 2012; 24(4):237-9.
246. Hrabák J, Niemczyková J, Chudáčková E, Fridrichová M, Studentová V, Cervená D, Urbášková P, Zemličková H. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from a Czech patient previously hospitalized in Greece and in vivo selection of colistin resistance. *Folia Microbiol (Praha).* 2011; 56(4):361-5.
247. Tóth A, Damjanova I, Puskás E, Jánvári L, Farkas M, Dobák A, Böröcz K, Pászti J. Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone in Hungary. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010; 29(7):765-9.
248. Baraniak A, Izdebski R, Herda M, Fiett J, Hryniewicz W, Gniadkowski M, Kern-Zdanowicz I, Filczak K, Łopaciuk U. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 with KPC-2 in Poland. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(10):4565-7.
249. Osterblad M, Kirveskari J, Koskela S, Tissari P, Vuorenoja K, Hakanen AJ, Vaara M, Jalava J. First isolations of KPC-2-carrying ST258 *Klebsiella pneumoniae* strains in Finland, June and August 2009. *Euro Surveill.* 2009; 14(40).
250. Samuelsen Ø, Naseer U, Tofteland S, Skutlaberg DH, Onken A, Hjetland R, Sundsfjord A, Giske CG. Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 63(4):654-8.
251. Osterblad M, Kirveskari J, Hakanen AJ, Tissari P, Vaara M, Jalava J. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Finland: the first years (2008-11). *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67(12):2860-4.



252. Hammerum AM, Hansen F, Lester CH, Jensen KT, Hansen DS, Dessau RB. Detection of the first two *Klebsiella pneumoniae* isolates with sequence type 258 producing KPC-2 carbapenemase in Denmark. *Int J Antimicrob Agents*. 2010; 35(6):610-2.
253. Bogaerts P, Montesinos I, Rodriguez-Villalobos H, Blairon L, Deplano A, Glupczynski Y. Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing KPC-2 carbapenemase in Belgium. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65(2):361-2.
254. Leverstein-van Hall MA, Stuart JC, Voets GM, Versteeg D, Roelofsen E, Fluit AC. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* following foreign travel. *Ned Tijdschr Geneesk*. 2010; 154:A2013.
255. Wendt C, Schütt S, Dalpke AH, Konrad M, Mieth M, Trierweiler-Hauke B, Weigand MA, Zimmermann S, Biehler K, Jonas D. First outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* in Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010; 29(5):563-70.
256. Steinmann J, Kaase M, Gatermann S, Popp W, Steinmann E, Damman M, Paul A, Saner F, Buer J, Rath P. Outbreak due to a *Klebsiella pneumoniae* strain harbouring KPC-2 and VIM-1 in a German university hospital, July 2010 to January 2011. *Euro Surveill*. 2011; 16(33).
257. Hoenigl M, Valentin T, Zarfel G, Wuerstl B, Leitner E, Salzer HJ, Posch J, Krause R, Grisold AJ. Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Klebsiella oxytoca* in Austria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(4):2158-61.
258. Dortet L, Radu I, Gautier V, Blot F, Chachaty E, Arlet G. Intercontinental travels of patients and dissemination of plasmid-mediated carbapenemase KPC-3 associated with OXA-9 and TEM-1. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 61(2):455-7.
259. Cuzon G, Naas T, Demachy MC, Nordmann P. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolate from Greece. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52(2):796-7.
260. Carbonne A, Thiolet JM, Fournier S, Fortineau N, Kassis-Chikhani N, Boytchev I, Aggoune M, Segulier JC, Senechal H, Tavolacci MP, Coignard B, Astagneau P, Jarlier V. Control of a multi-hospital outbreak of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* type 2 in France, September to October 2009. *Euro Surveill*. 2010; 15(48)

261. Kassis-Chikhani N, Decré D, Ichai P, Sengelin C, Geneste D, Mihaila L, Dussaix E, Arlet G. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 and SHV-12 in a French hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65(7):1539-40.
262. Cuzon G, Naas T, Demachy MC, Nordmann P. Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* harbouring *bla*<sub>KPC-3</sub> in France subsequent to a patient transfer from Italy. *Int J Antimicrob Agents.* 2012; 39(5):448-9.
263. Curiao T, Morosini MI, Ruiz-Garbajosa P, Robustillo A, Baquero F, Coque TM, Cantón R. Emergence of *bla*<sub>KPC-3</sub>-Tn4401a associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65(8):1608-14.
264. Gómez-Gil MR, Paño-Pardo JR, Romero-Gómez MP, Gasior M, Lorenzo M, Quiles I, Mingorance J. Detection of KPC-2-producing *Citrobacter freundii* isolates in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65(12):2695-7.
265. Woodford N, Zhang J, Warner M, Kaufmann ME, Matos J, Macdonald A, Brudney D, Sompolinsky D, Navon-Venezia S, Livermore DM. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 62(6):1261-4.
266. Virgincar N, Iyer S, Stacey A, Maharjan S, Pike R, Perry C, Wyeth J, Woodford N. *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in a district general hospital in the UK. *J Hosp Infect.* 2011; 78(4):293-6.
267. Roche C, Cotter M, O'Connell N, Crowley B. First identification of class A carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the Republic of Ireland. *Euro Surveill.* 2009; 14(13).
268. Morris D, Boyle F, Morris C, Condon I, Delannoy-Vieillard AS, Power L, Khan A, Morris-Downes M, Finnegan C, Powell J, Monahan R, Burns K, O'Connell N, Boyle L, O'Gorman A, Humphreys H, Brisse S, Turton J, Woodford N, Cormican M. Inter-hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 carbapenemase in Ireland. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67(10):2367-72.
269. Tsakris A, Kristo I, Poulou A, Markou F, Ikonomidis A, Pournaras S. First occurrence of KPC-2-possessing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek hospital and recommendation for detection with boronic acid disc tests. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 62(6):1257- 60.

270. Maltezou HC, Giakkoupi P, Maragos A, Bolikas M, Raftopoulos V, Papahatzaki H, Vrouhos G, Liakou V, Vatopoulos AC. Outbreak of infections due to KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Crete (Greece). *J Infect.* 2009; 58(3):213-9.
271. Pournaras S, Protonotariou E, Voulgari E, Kristo I, Dimitroulia E, Vitti D, Tsalidou M, Maniatis AN, Tsakris A, Sofianou D. Clonal spread of KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greece. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 64(2):348-52.
272. Souli M, Galani I, Antoniadou A, Papadomichelakis E, Poulakou G, Panagea T, Vourli S, Zerva L, Armaganidis A, Kanellakopoulou K, Giamarellou H. An outbreak of infection due to beta-Lactamase *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* in a Greek University Hospital: molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Clin Infect Dis.* 2010; 50(3):364-73.
273. Giakoupi P, Maltezou H, Polemis M, Pappa O, Saroglou G, Vatopoulos A; Greek System for the Surveillance of Antimicrobial Resistance. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Greek hospitals are mainly due to a hyperepidemic clone. *Euro Surveill.* 2009; 14(21).
274. Giakkoupi P, Pappa O, Polemis M, Vatopoulos AC, Miriagou V, Zioga A, Papagiannitsis CC, Tzouvelekis LS. Emerging *Klebsiella pneumoniae* isolates coproducing KPC-2 and VIM-1 carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(9):4048-50
275. Pournaras S, Poulou A, Voulgari E, Vrioni G, Kristo I, Tsakris A. Detection of the new metallo-beta-lactamase VIM-19 along with KPC-2, CMY-2 and CTX-M-15 in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65(8):1604-7.
276. Zioga A, Miriagou V, Tzelepi E, Douzinas E, Tsakiri M, Legakis NJ, Daikos GL, Tzouvelekis LS. The ongoing challenge of acquired carbapenemases: a hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* simultaneously producing VIM-1 and KPC-2. *Int J Antimicrob Agents.* 2010; 36(2):190-1.
277. Papagiannitsis CC, Giakkoupi P, Vatopoulos AC, Tryfinopoulou K, Miriagou V, Tzouvelekis LS. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* of a novel sequence type (ST383) producing VIM-4, KPC-2 and CMY-4  $\beta$ -lactamases. *Int J Antimicrob Agents.* 2010; 36(6):573-4.

278. Giakkoupi P, Papagiannitsis CC, Miriagou V, Pappa O, Polemis M, Tryfinopoulou K, Tzouveleakis LS, Vatopoulos AC. An update of the evolving epidemic of *bla*<sub>KPC-2</sub>-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009-10). *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66(7):1510-3.
279. Zarkotou O, Pournaras S, Voulgari E, Chrysos G, Prekates A, Voutsinas D, Themeli-Digalaki K, Tsakris A. Risk factors and outcomes associated with acquisition of colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: a matched case-control study. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(6):2271-4.
280. Kontopoulou K, Protonotariou E, Vasilakos K, Kriti M, Koteli A, Antoniadou E, Sofianou D. Hospital outbreak caused by *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 beta-lactamase resistant to colistin. *J Hosp Infect.* 2010; 76(1):70-3.
281. Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, Srinivasan A, Navon-Venezia S, Carmeli Y, Brolund A, Giske CG. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(8):3365-70.
282. Tenover FC, Kalsi RK, Williams PP, Carey RB, Stocker S, Lonsway D, Rasheed JK, Biddle JW, McGowan JE Jr, Hanna B. Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* not detected by automated susceptibility testing. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12(8):1209-13.
283. Thomson KS, Robledo IE, Vázquez GJ, Moland ES. KPC screening by updated BD Phoenix and Vitek 2 automated systems. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(9):3386-7.
284. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 20th informational supplement (June 2010 Update). CLSI document. M100-S20-U. Wayne, PA: CLSI, June 2010 Update.
285. European Committee on Antimicrobial susceptibility testing (EUCAST). 2012. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 2.0, valid from 2012-01-01. [www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/).
286. Livermore DM, Andrews JM, Hawkey PM, Ho PL, Keness Y, Doi Y, Paterson D, Woodford N. Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly? *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67(7):1569-77.
287. Bulik CC, Fauntleroy KA, Jenkins SG, Abuali M, LaBombardi VJ, Nicolau DP, Kuti JL. Comparison of meropenem MICs and susceptibilities for carbapenemase-producing

- Klebsiella pneumoniae* isolates by various testing methods. J Clin Microbiol. 2010; 48(7):2402-6.
288. Endimiani A, Perez F, Bajaksouzian S, Windau AR, Good CE, Choudhary Y, Hujer AM, Bethel CR, Bonomo RA, Jacobs MR Evaluation of updated interpretative criteria for categorizing *Klebsiella pneumoniae* with reduced carbapenem susceptibility. J Clin Microbiol. 2010; 48(12):4417-25.
289. Vading M, Samuelsen Ø, Haldorsen B, Sundsfjord AS, Giske CG. Comparison of disk diffusion, Etest and VITEK2 for detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* with the EUCAST and CLSI breakpoint systems. Clin Microbiol Infect. 2011; 17(5):668-74.
290. Carvalhaes CG, Picão RC, Nicoletti AG, Xavier DE, Gales AC. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. J Antimicrob Chemother. 2010; 65(2):249-51.
291. Pasteran F, Mendez T, Rapoport M, Guerriero L, Corso A. Controlling false-positive results obtained with the Hodge and Masuda assays for detection of class a carbapenemase in species of enterobacteriaceae by incorporating boronic Acid. J Clin Microbiol. 2010; 48(4):1323-32.
292. Pournaras S, Poulou A, Tsakris A. Inhibitor-based methods for the detection of KPC carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in clinical practice by using boronic acid compounds. J Antimicrob Chemother. 2010; 65(7):1319-21.
293. Tsakris A, Kristo I, Poulou A, Themeli-Digalaki K, Ikonomidis A, Petropoulou D, Pournaras S, Sofianou D. Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. J Clin Microbiol. 2009; 47(2):362-7.
294. Tsakris A, Poulou A, Pournaras S, Voulgari E, Vrioni G, Themeli-Digalaki K, Petropoulou D, Sofianou D. A simple phenotypic method for the differentiation of metallo-beta-lactamases and class A KPC carbapenemases in Enterobacteriaceae clinical isolates. J Antimicrob Chemother. 2010; 65(8):1664-71.
295. Doi Y, Potoski BA, Adams-Haduch JM, Sidjabat HE, Pasculle AW, Paterson DL. Simple disk-based method for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-

- type beta-lactamase by use of a boronic acid compound. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(12):4083-6.
296. Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, Rapoport M, Corso A. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(6):1631-9.
297. Giske CG, Gezelius L, Samuelsen Ø, Warner M, Sundsfjord A, Woodford N. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- $\beta$ -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(4):552-6.
298. 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; 49(8):2804-9.
299. Birgy A, Bidet P, Genel N, Doit C, Decré D, Arlet G, Bingen E. Phenotypic screening of carbapenemases and associated  $\beta$ -lactamases in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(4):1295-302.
300. Nordmann P, Poirel L. Strategies for identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2012 Oct 26. [Epub ahead of print].
301. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18(9):1503-7.
302. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid identification of carbapenemase types using a biochemical test in Enterobacteriaceae and Pseudomonas. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Oct 15. [Epub ahead of print].
303. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011; 70(1):119-23.
304. Kaase M, Szabados F, Wassill L, Gatermann SG. Detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae by a commercial multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(9):3115-8.
305. Spanu T, Fiori B, D'Inzeo T, Canu G, Campoli S, Giani T, Palucci I, Tumbarello M, Sanguinetti M, Rossolini GM. Evaluation of the New NucliSENS EasyQ KPC test for

- rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes (*bla<sub>KPC</sub>*). J Clin Microbiol. 2012; 50(8):2783-5.
306. Swayne RL, Ludlam HA, Shet VG, Woodford N, Curran MD. Real-time TaqMan PCR for rapid detection of genes encoding five types of non-metallo- (class A and D) carbapenemases in Enterobacteriaceae. Int J Antimicrob Agents. 2011; 38(1):35-8.
307. Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. J Antimicrob Chemother. 2012; 67(4):906-9.
308. Chen L, Mediavilla JR, Endimiani A, Rosenthal ME, Zhao Y, Bonomo RA, Kreiswirth BN. Multiplex real-time PCR assay for detection and classification of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase gene (*bla<sub>KPC</sub>*) variants. J Clin Microbiol. 2011; 49(2):579-85.
309. Chen L, Chavda KD, Mediavilla JR, Zhao Y, Fraimow HS, Jenkins SG, Levi MH, Hong T, Rojzman AD, Ginocchio CC, Bonomo RA, Kreiswirth BN. Multiplex real-time PCR for detection of an epidemic KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone. Antimicrob Agents Chemother. 2012; 56(6):3444-7.
310. Hindiye M, Smollan G, Grossman Z, Ram D, Robinov J, Belausov N, Ben-David D, Tal I, Davidson Y, Shamiss A, Mendelson E, Keller N. Rapid detection of *bla<sub>KPC</sub>* carbapenemase genes by internally controlled real-time PCR assay using bactec blood culture bottles. J Clin Microbiol. 2011; 49(7):2480-4.
311. Gazin M, Paasch F, Goossens H, Malhotra-Kumar S; MOSAR WP2 and SATURN WP1 Study Teams. Current trends in culture-based and molecular detection of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-harboring and carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2012; 50(4):1140-6.
312. Gasink LB, Edelstein PH, Lautenbach E, Synnestvedt M, Fishman NO. Risk factors and clinical impact of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. Infect Control Hosp Epidemiol. 2009; 30(12):1180-5.
313. Patel G, Huprikar S, Factor SH, Jenkins SG, Calfee DP. Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. Infect Control Hosp Epidemiol. 2008; 29(12):1099-106.
314. Hussein K, Sprecher H, Mashiach T, Oren I, Kassis I, Finkelstein R. Carbapenem resistance among *Klebsiella pneumoniae* isolates: risk factors, molecular

- characteristics, and susceptibility patterns. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2009; 30(7):666-71.
315. Schwaber MJ, Klarfeld-Lidji S, Navon-Venezia S, Schwartz D, Leavitt A, Carmeli Y. Predictors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(3):1028-33.
316. Mouloudi E, Protonotariou E, Zagorianou A, Iosifidis E, Karapanagiotou A, Giasnetsova T, Tsioka A, Roilides E, Sofianou D, Gritsi-Gerogianni N. Bloodstream infections caused by metallo- $\beta$ -lactamase/*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* among intensive care unit patients in Greece: risk factors for infection and impact of type of resistance on outcomes. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2010; 31(12):1250-6.
317. Zarkotou O, Pournaras S, Tselioti P, Dragoumanos V, Pitiriga V, Ranellou K, Prekates A, Themeli-Digalaki K, Tsakris A. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. *Clin Microbiol Infect.* 2011; 17(12):1798-803.
318. Kalpoe JS, Sonnenberg E, Factor SH, del Rio Martin J, Schiano T, Patel G, Huprikar S. Mortality associated with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections in liver transplant recipients. *Liver Transpl.* 2012; 18(4):468-74.
319. Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, Trecarichi EM, Tumietto F, Marchese A, Spanu T, Ambretti S, Ginocchio F, Cristini F, Losito AR, Tedeschi S, Cauda R, Bassetti M. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clin Infect Dis.* 2012; 55(7):943-50.
320. Qureshi ZA, Paterson DL, Potoski BA, Kilayko MC, Sandovsky G, Sordillo E, Polsky B, Adams-Haduch JM, Doi Y. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(4):2108-13.
321. Borer A, Saidel-Odes L, Riesenberk K, Eskira S, Peled N, Nativ R, Schlaeffer F, Sherf M. Attributable mortality rate for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2009; 30(10):972-6.



322. Neuner EA, Yeh JY, Hall GS, Sekeres J, Endimiani A, Bonomo RA, Shrestha NK, Fraser TG, van Duin D. Treatment and outcomes in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011; 69(4):357-62.
323. Marchaim D, Chopra T, Perez F, Hayakawa K, Lephart PR, Bheemreddy S, Blunden C, Hujer AM, Rudin S, Shango M, Campbell M, Varkey J, Slim J, Ahmad F, Patel D, Chen TY, Pogue JM, Salimnia H, Dhar S, Bonomo RA, Kaye KS. Outcomes and genetic relatedness of carbapenem-resistant enterobacteriaceae at Detroit medical center. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2011; 32(9):861-71.
324. Lee J, Patel G, Huprikar S, Calfee DP, Jenkins SG. Decreased susceptibility to polymyxin B during treatment for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. *J Clin Microbiol*. 2009; 47(5):1611-2.
325. Elemam A, Rahimian J, Mandell W. Infection with panresistant *Klebsiella pneumoniae*: a report of 2 cases and a brief review of the literature. *Clin Infect Dis*. 2009; 49(2):271-4.
326. Endimiani A, Patel G, Hujer KM, Swaminathan M, Perez F, Rice LB, Jacobs MR, Bonomo RA. In vitro activity of fosfomycin against *bla*<sub>KPC</sub>-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates, including those nonsusceptible to tigecycline and/or colistin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54(1):526-9.
327. Neonakis IK, Samonis G, Messaritakis H, Baritaki S, Georgiladakis A, Maraki S, Spandidos DA. Resistance status and evolution trends of *Klebsiella pneumoniae* isolates in a university hospital in Greece: ineffectiveness of carbapenems and increasing resistance to colistin. *Chemotherapy*. 2010; 56(6):448-52.
328. Bogdanovich T, Adams-Haduch JM, Tian GB, Nguyen MH, Kwak EJ, Muto CA, Doi Y. Colistin-resistant, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to the international epidemic clone ST258. *Clin Infect Dis*. 2011; 53(4):373-6.
329. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). *J Antimicrob Chemother*. 2011; 66(9):2070-4.
330. Marchaim D, Chopra T, Pogue JM, Perez F, Hujer AM, Rudin S, Endimiani A, Navon-Venezia S, Hothi J, Slim J, Blunden C, Shango M, Lephart PR, Salimnia H, Reid D,

- Moshos J, Hafeez W, Bheemreddy S, Chen TY, Dhar S, Bonomo RA, Kaye KS. Outbreak of colistin-resistant, carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in metropolitan Detroit, Michigan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55(2):593-9.
331. Livermore DM, Warner M, Mushtaq S, Doumith M, Zhang J, Woodford N. What remains against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. *Int J Antimicrob Agents*. 2011; 37(5):415-9.
332. Zagorianou A, Sianou E, Iosifidis E, Dimou V, Protonotariou E, Miyakis S, Roilides E, Sofianou D. Microbiological and molecular characteristics of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* endemic in a tertiary Greek hospital during 2004-2010. *Euro Surveill*. 2012; 17(7).
333. Kelesidis T, Karageorgopoulos DE, Kelesidis I, Falagas ME. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant Enterobacteriaceae: a systematic review of the evidence from microbiological and clinical studies. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 62(5):895-904.
334. Daikos GL, Markogiannakis A. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: (when) might we still consider treating with carbapenems? *Clin Microbiol Infect*. 2011; 17(8):1135-41.
335. Anthony KB, Fishman NO, Linkin DR, Gasink LB, Edelstein PH, Lautenbach E. Clinical and microbiological outcomes of serious infections with multidrug-resistant gram-negative organisms treated with tigecycline. *Clin Infect Dis*. 2008; 46(4):567-70.
336. Benenson S, Navon-Venezia S, Carmeli Y, Adler A, Strahilevitz J, Moses AE, Block C. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* endocarditis in a young adult. Successful treatment with gentamicin and colistin. *Int. J. Infect. Dis*. 2009; 13(5):e295-8.
337. Daly MW, Riddle DJ, Ledebor NA, Dunne WM, Ritchie DJ. Tigecycline for treatment of pneumonia and empyema caused by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Pharmacotherapy*. 2007; 27(7):1052-7.
338. Endimiani A, Carias LL, Hujer AM, Bethel CR, Hujer KM, Perez F, Hutton RA, Fox WR, Hall GS, Jacobs MR, Paterson DL, Rice LB, Jenkins SG, Tenover FC, Bonomo RA. Presence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae*

- isolates possessing *bla*<sub>KPC</sub> in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(7):2680-2.
339. Endimiani A, Depasquale JM, Forero S, Perez F, Hujer AM, Roberts-Pollack D, Fiorella PD, Pickens N, Kitchel B, Casiano-Colón AE, Tenover FC, Bonomo RA. Emergence of *bla*<sub>KPC</sub>-containing *Klebsiella pneumoniae* in a long-term acute care hospital: a new challenge to our healthcare system. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 64(5):1102-10.
340. Ho VP, Jenkins SG, Afaneh CI, Turbendian HK, Nicolau DP, Barie PS. Use of meropenem by continuous infusion to treat a patient with a *bla*<sub>KPC-2</sub>-positive *Klebsiella pneumoniae* blood stream infection. *Surg Infect (Larchmt).* 2011; 12(4):325-7.
341. Humphries RM, Kelesidis T, Dien Bard J, Ward KW, Bhattacharya D, Lewinski MA. Successful treatment of pan-resistant *Klebsiella pneumoniae* pneumonia and bacteraemia with a combination of high-dose tigecycline and colistin. *J Med Microbiol.* 2010; 59(Pt 11):1383-6.
342. Leão RS, Pereira RH, Folescu TW, Albano RM, Santos EA, Junior LG, Marques EA. KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2011; 10(2):140-2.
343. Lomaestro BM, Tobin EH, Shang W, Gootz T. The spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* to upstate New York. *Clin Infect Dis.* 2006; 43(3):e26-8.
344. Marschall J, Tibbetts RJ, Dunne WM Jr, Frye JG, Fraser VJ, Warren DK. Presence of the KPC carbapenemase gene in Enterobacteriaceae causing bacteremia and its correlation with in vitro carbapenem susceptibility. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(1):239-41.
345. Mathers AJ, Cox HL, Bonatti H, Kitchel B, Brassinga AK, Wispelwey B, Sawyer RG, Pruett TL, Hazen KC, Patel JB, Sifri CD. Fatal cross infection by carbapenem-resistant *Klebsiella* in two liver transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* 2009; 11(3):257-65.
346. Mendes RE, Bell JM, Turnidge JD, Yang Q, Yu Y, Sun Z, Jones RN. Carbapenem-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* in China and detection of a conjugative plasmid (*bla*<sub>KPC-2</sub> plus *qnrB4*) and a *bla*<sub>IMP-4</sub> gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(2):798-9.

347. Nadkarni AS, Schliep T, Khan L, Zeana CB. Cluster of bloodstream infections caused by KPC-2 carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* in Manhattan. Am J Infect Control. 2009; 37(2):121-6.
348. Weisenberg SA, Morgan DJ, Espinal-Witter R, Larone DH. Clinical outcomes of patients with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* after treatment with imipenem or meropenem. Diagn Microbiol Infect Dis. 2009; 64(2):233-5.
349. Falagas ME, Karageorgopoulos DE, Nordmann P. Therapeutic options for infections with Enterobacteriaceae producing carbapenem-hydrolyzing enzymes. Future Microbiol. 2011; 6(6):653-66.
350. Pournaras S, Kristo I, Vrioni G, Ikonomidis A, Poulou A, Petropoulou D, Tsakris A. Characteristics of meropenem heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing clinical isolates of *K. pneumoniae*. J Clin Microbiol. 2010; 48(7):2601-4.
351. Raz R. Fosfomycin: an old--new antibiotic. Clin Microbiol Infect. 2012; 18(1):4-7.
352. Michalopoulos A, Vartzili S, Rafailidis P, Chalevelakis G, Damala M, Falagas ME. Intravenous fosfomycin for the treatment of nosocomial infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in critically ill patients: a prospective evaluation. Clin Microbiol Infect. 2010; 16(2):184-6.
353. Karageorgopoulos DE, Wang R, Yu XH, Falagas ME. Fosfomycin: evaluation of the published evidence on the emergence of antimicrobial resistance in Gram-negative pathogens. J Antimicrob Chemother. 2012; 67(2):255-68.
354. Karageorgopoulos DE, Miriagou V, Tzouvelekis LS, Spyridopoulou K, Daikos GL. Emergence of resistance to fosfomycin used as adjunct therapy in KPC *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia: report of three cases. J Antimicrob Chemother. 2012; 67(11):2777-9.
355. Gupta N, Limbago BM, Patel JB, Kallen AJ. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. Clin Infect Dis. 2011; 53(1):60-7.
356. Calfee D, Jenkins SG. Use of active surveillance cultures to detect asymptomatic colonization with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in intensive care unit patients. Infect Control Hosp Epidemiol. 2008; 29(10):966-8.

357. Wiener-Well Y, Rudensky B, Yinnon AM, Kopuit P, Schlesinger Y, Broide E, Lachish T, Raveh D. Carriage rate of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospitalised patients during a national outbreak. *J Hosp Infect.* 2010; 74(4):344-9.
358. Papadimitriou-Olivgeris M, Marangos M, Fligou F, Christofidou M, Bartzavali C, Anastassiou ED, Filos KS. Risk factors for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* enteric colonization upon ICU admission. *J Antimicrob Chemother.* 2012 Aug 26. [Epub ahead of print].
359. Borer A, Saidel-Odes L, Eskira S, Nativ R, Riesenberk K, Livshiz-Riven I, Schlaeffer F, Sherf M, Peled N. Risk factors for developing clinical infection with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospital patients initially only colonized with carbapenem-resistant *K pneumoniae*. *Am J Infect Control.* 2012; 40(5):421-5.
360. Schechner V, Kotlovsky T, Kazma M, Mishali H, Schwartz D, Navon-Venezia S, Schwaber MJ, Carmeli Y. Asymptomatic rectal carriage of *bla*<sub>KPC</sub> producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: who is prone to become clinically infected? *Clin Microbiol Infect.* 2012 Apr 6. [Epub ahead of print].
361. Guidance for Control of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE). 2012 CRE Toolkit. CDC, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, Division of Healthcare Quality Promotion. <http://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/cre-toolkit/index.html>.
362. Landman D, Salvani JK, Bratu S, Quale J. Evaluation of techniques for detection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in stool surveillance cultures. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(11):5639-41.
363. Lolans K, Calvert K, Won S, Clark J, Hayden MK. Direct ertapenem disk screening method for identification of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in surveillance swab specimens. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(3):836-41.
364. Hindiyeh M, Smollen G, Grossman Z, Ram D, Davidson Y, Mileguir F, Vax M, Ben David D, Tal I, Rahav G, Shamiss A, Mendelson E, Keller N. Rapid detection of *bla*<sub>KPC</sub> carbapenemase genes by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(9):2879-83.
365. Samra Z, Bahar J, Madar-Shapiro L, Aziz N, Israel S, Bishara J. Evaluation of CHROMagar KPC for rapid detection of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(9):3110-1.

366. Schechner V, Straus-Robinson K, Schwartz D, Pfeffer I, Tarabeia J, Moskovich R, Chmelnitsky I, Schwaber MJ, Carmeli Y, Navon-Venezia S. Evaluation of PCR-based testing for surveillance of KPC-producing carbapenem-resistant members of the Enterobacteriaceae family. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(10):3261-5.
367. Adler A, Navon-Venezia S, Moran-Gilad J, Marcos E, Schwartz D, Carmeli Y. Laboratory and clinical evaluation of screening agar plates for detection of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae from surveillance rectal swabs. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(6):2239-42.
368. Nordmann P, Girlich D, Poirel L. Detection of carbapenemase producers in Enterobacteriaceae by use of a novel screening medium. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(8):2761-6.
369. Carrër A, Fortineau N, Nordmann P. Use of ChromID extended-spectrum beta-lactamase medium for detecting carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(5):1913-4.
370. Vrioni G, Daniil I, Voulgari E, Ranellou K, Koumaki V, Ghirardi S, Kimouli M, Zambardi G, Tsakris A. Comparative evaluation of a prototype chromogenic medium (ChromID CARBA) for detecting carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in surveillance rectal swabs. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(6):1841-6.
371. Wilkinson KM, Winstanley TG, Lanyon C, Cummings SP, Raza MW, Perry JD. Comparison of four chromogenic culture media for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(9):3102-4.
372. Singh K, Mangold KA, Wyant K, Schora DM, Voss B, Kaul KL, Hayden MK, Chundi V, Peterson LR. Rectal screening for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases: comparison of real-time PCR and culture using two selective screening agar plates. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(8):2596-600.
373. Richter SN, Frasson I, Biasolo MA, Bartolini A, Cavallaro A, Palù G. Ultrarapid detection of *bla*<sub>KPC<sub>1/2-12</sub></sub> from perirectal and nasal swabs by use of real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(5):1718-20.
374. Schechner V, Kotlovsky T, Tarabeia J, Kazma M, Schwartz D, Navon-Venezia S, Carmeli Y. Predictors of rectal carriage of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) among patients with known CRE carriage at their next hospital encounter. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2011; 32(5):497-503.

375. Carmeli Y, Akova M, Cornaglia G, et al. Controlling the spread of carbapenemase-producing Gram-negatives: therapeutic approach and infection control. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 102-11.
376. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *N Am J Infect Control*. 2008; 36:309-32.
377. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med*. 1985; 13: 818–829.
378. Ελληνική Εταιρία Χημειοθεραπείας. Ενημερωτικό Δελτίο για τη Σήψη. Αθήνα, 2012.
379. Zavascki AP, Barth AL, Fernandes JF, Moro AL, Goncalves AL, Goldani LZ. Reappraisal of *Pseudomonas aeruginosa* hospital-acquired pneumonia mortality in the era of metallo-β-lactamase-mediated multidrug resistance: a prospective observational study. *Crit Care*. 2006; 10: R114–R120.
380. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 8th edition. M08-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
381. Tygacil package insert. 2005. Philadelphia, PA: Wyeth Pharmaceuticals Inc.
382. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters, 3d edition. M23-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
383. International Organization for Standardization. 2007. ISO 20776-2:2007(E). Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems. Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. Part 2: evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
384. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 22nd informational supplement. M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
385. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(8):4178-82.

386. Mann CJ. Observational research methods. Research design II: cohort, cross sectional, and case-control studies. *Emerg Med J*. 2003; 20(1):54-60.
387. Cohen Stuart J, Mouton JW, Diederens BM, Al Naiemi N, Thijsen S, Vlamincx BJ, Fluit AC, Leverstein-van Hall MA. Evaluation of Etest to determine tigecycline MICs for *Enterobacter* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54(6):2746-7.
388. Casal M, Rodríguez F, Johnson B, Garduno E, Tubau F, de Lejarazu RO, Tenorio A, Giménez MJ, Bartolomé R, Garcia-Rey C, Aguilar L, García-Escribano N. Influence of testing methodology on the tigecycline activity profile against presumably tigecycline-non-susceptible *Acinetobacter* spp. *J Antimicrob Chemother*. 2009; 64(1):69-72.
389. Pillar CM, Draghi DC, Dowzicky MJ, Sahm DF. In vitro activity of tigecycline against gram-positive and gram-negative pathogens as evaluated by broth microdilution and Etest. *J Clin Microbiol*. 2008; 46(9):2862-7.
390. Torrico M, González N, Giménez MJ, Alou L, Sevillano D, Navarro D, Díaz-Antolín MP, Larrosa N, Aguilar L, Garcia-Escribano N. Influence of media and testing methodology on susceptibility to tigecycline of Enterobacteriaceae with reported high tigecycline MIC. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(6):2243-6.
391. Hope R, Mushtaq S, James D, Pllana T, Warner M, Livermore DM; Tigecycline Susceptibility Testing Group. Tigecycline activity: low resistance rates but problematic disc breakpoints revealed by a multicentre sentinel survey in the UK. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65(12):2602-9.
392. Lat A, Clock SA, Wu F, Whittier S, Della-Latta P, Fauntleroy K, Jenkins SG, Saiman L, Kubin CJ. Comparison of polymyxin B, tigecycline, cefepime, and meropenem MICs for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* by broth microdilution, Vitek 2, and Etest. *J Clin Microbiol*. 2011; 49(5):1795-8.
393. Huang TD, Berhin C, Bogaerts P, Glupczynski Y. In vitro susceptibility of multidrug-resistant Enterobacteriaceae clinical isolates to tigecycline. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67(11):2696-9.
394. Bolmström A, Karlsson A, Engelhardt A, Ho P, Petersen PJ, Bradford PA, Jones CH. Validation and reproducibility assessment of tigecycline MIC determinations by Etest. *J Clin Microbiol*. 2007; 45(8):2474-9.



395. Peirano G, Pillai DR, Pitondo-Silva A, Richardson D, Pitout JD. The characteristics of NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* from Canada. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011; 71(2):106-9.
396. Sánchez-Romero I, Asensio A, Oteo J, Muñoz-Algarra M, Isidoro B, Vindel A, Alvarez-Avello J, Balandín-Moreno B, Cuevas O, Fernández-Romero S, Azañedo L, Sáez D, Campos J. Nosocomial outbreak of VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates of multilocus sequence type 15: molecular basis, clinical risk factors, and outcome. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(1):420-7.
397. Damjanova I, Tóth A, Pászti J, Hajbel-Vékony G, Jakab M, Berta J, Milch H, Füzi M. Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005--the new 'MRSA's'? *J Antimicrob Chemother*. 2008; 62(5):978-85.
398. Papagiannitsis CC, Kotsakis SD, Petinaki E, Vatopoulos AC, Tzelepi E, Miriagou V, Tzouvelekis LS. Characterization of metallo-beta-lactamase VIM-27, an A57S mutant of VIM-1 associated with *Klebsiella pneumoniae* ST147. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55(7):3570-2.
399. Samuelsen Ø, Toleman MA, Hasseltvedt V, Fuursted K, Leegaard TM, Walsh TR, Sundsfjord A, Giske CG. Molecular characterization of VIM-producing *Klebsiella pneumoniae* from Scandinavia reveals genetic relatedness with international clonal complexes encoding transferable multidrug resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2011; 17(12):1811-6.
400. Giske CG, Fröding I, Hasan CM, Turlej-Rogacka A, Toleman M, Livermore D, Woodford N, Walsh TR. Diverse sequence types of *Klebsiella pneumoniae* contribute to the dissemination of *bla*<sub>NDM-1</sub> in India, Sweden, and the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(5):2735-8.
401. Richter SN, Frasson I, Franchin E, Bergo C, Lavezzo E, Barzon L, Cavallaro A, Palù G. KPC-mediated resistance in *Klebsiella pneumoniae* in two hospitals in Padua, Italy, June 2009-December 2011: massive spreading of a KPC-3-encoding plasmid and involvement of non-intensive care units. *Gut Pathog*. 2012; 4(1):7.
402. Kontopidou F, Plachouras D, Papadomichelakis E, Koukos G, Galani I, Poulakou G, Dimopoulos G, Antoniadou A, Armaganidis A, Giamarellou H. Colonization and

infection by colistin-resistant Gram-negative bacteria in a cohort of critically ill patients. *Clin Microbiol Infect.* 2011; 17(11):E9-E11.

## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

1. **Comparative evaluation of tigecycline susceptibility testing methods for expanded-spectrum cephalosporin- and carbapenem-resistant gram-negative pathogens.**

Zarkotou O, Pournaras S, Altouvas G, Pitiriga V, Tziraki M, Mamali V, Themeli-Digalaki K, Tsakris A.

J Clin Microbiol. 2012; 50(11):3747-50.

2. **Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment.**

Zarkotou O, Pournaras S, Tselioti P, Dragoumanos V, Pitiriga V, Ranellou K, Prekates A, Themeli-Digalaki K, Tsakris A.

Clin Microbiol Infect. 2011; 17(12):1798-803.

Βιβλιογραφικές αναφορές: 23

3. **Risk factors and outcomes associated with acquisition of colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: a matched case-control study.**

Zarkotou O, Pournaras S, Voulgari E, Chrysos G, Prekates A, Voutsinas D, Themeli-Digalaki K, Tsakris A.

J Clin Microbiol. 2010; 48(6):2271-4.

Βιβλιογραφικές αναφορές: 23